

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461487

研究課題名(和文) リゾホスファチジルセリン産生酵素のSLE病態における役割とバイオマーカーへの展開

研究課題名(英文) Role of lysophosphatidylserine-producing enzyme (PS-PLA1) in the pathogenesis of SLE and further applications as SLE biomarker

研究代表者

沢田 哲治 (Sawada, Tetsuji)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50235470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：SLEの病態形成におけるリゾリン脂質の役割を検討するため、血清リゾホスファチジン酸産生酵素(ATX)とリゾホスファチジルセリン産生酵素(PS-PLA1)を測定した。SLEではPS-PLA1が有意に上昇し、疾患活動性指標の一部と相関していた。プリスタン誘導マウスSLEモデルの脾臓ではPS-PLA1陽性細胞が増加していた。In vitroでT細胞を刺激するとLPS受容体発現は低下するが、PS-PLA1の発現は上昇した。末梢単核球細胞のPS-PLA1発現は高濃度IFN- γ 刺激で上昇した。従って、PS-PLA1はT細胞活性化マーカー・IFN- γ signatureとしての特徴を有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We determined the serum levels of lysophosphatidic acid-producing enzyme (ATX) and lysophosphatidylserine-producing enzyme (PS-PLA1) to clarify the role of the lysophospholipid in the pathophysiology SLE. The serum level of PS-PLA1 was significantly higher in SLE patients, and correlated with some of the SLE disease activity indices. In pristane-induced mouse SLE model, PS-PLA1 positive cells were more frequently detected in spleen. T cell stimulation led to the increase of PS-PLA1 expression and decrease of LPS receptor expression. High concentration of IFN- γ increased the PS-PLA1 expression in peripheral blood mononuclear cells. Therefore, PS-PLA1 is considered to be a T-cell activation marker as well as a member of IFN- γ signatures.

研究分野：内科学

キーワード：全身性エリテマトーデス

1. 研究開始当初の背景

リゾリン脂質(lysophospholipid)は多彩な生理現象に関与する第2世代の脂質メディエーターである。構造的にはアシル基を2本有するリン脂質に類似するが、リゾリン脂質のアシル基は1本である。リゾリン脂質に含まれるリン脂質には、リゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid; LPA)、スフィンゴシン 1-リン酸(sphingosine 1-phosphate; Sph-1-P)、リゾホスファチジルセリン(Lyso phosphatidylserine; LPS)等がある。個々のリゾリン脂質には特異的レセプター(G 蛋白質共役受容体)や特異的産生酵素が存在する。

例えば、LPA の産生酵素は autotaxin (ATX)/Lysophospholipase D であり、LPS の産生酵素は phosphatidylserine-specific phospholipase 1 (PS-PLA1)である。また、LPS 受容体として、GPR34、P2Y10、GPR174、GPR171 などが同定されている。

PS-PLA1 の基質である phosphatidylserine (PS) はアポトーシス細胞においてリン脂質二重膜内側から細胞表面に転座することでマクロファージへの”eat me”シグナルとして作用する。全身性エリテマトーデス(SLE)は抗核抗体、抗DNA抗体など多様な自己抗体が出現する自己免疫疾患であり、その病態形成には免疫系を中心に多くの機転が関与するが、アポトーシスの関与も示唆されており、SLE ではアポトーシス細胞の処理に異常があることが報告されている。従って、PS-LPS系の異常がSLEの病態形成に寄与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的はSLEの病態形成におけるリゾリン脂質の役割を検討することである。検体中のリゾリン脂質をLC/MS法で直接定量することは可能であるが、前処理(除蛋白・脂質抽出)含め労力を要する。直接法の代替としてリゾリン脂質産生酵素を解析する。SLEや関節リウマチ(RA)を含む自己免疫疾患におけるリゾリン脂質産生酵素(PS-PLA1、ATX)の蛋白質レベルでの発現について特異抗体を用いて免疫学的に検出する。

(2) SLEのモデルマウスとしては、MRL/lprマウス(アポトーシスに関与するFas遺伝子の変異によるFas機能欠損マウス)やDNase II遺伝子欠損マウス(自己抗原であるDNAの過剰蓄積による免疫寛容の破綻)など幾つかのモデルマウスが知られているが、本研究ではプリスタン腹腔内投与によりSLEモデルマウスを作成し、PS-PLA1の発現を免疫組織学的に検討する。

(3) 末梢血単核球細胞におけるリゾリン脂質産生酵素(PS-PLA1)およびLPSレセプターの発現レベルをRNAレベルで解析する。また、SLEではインターフェロン α (IFN- α)により誘導される遺伝子群の発現亢進が報告されており(IFN- α signature)、LPS産生酵素やその受容体がIFN- α で誘導されるか否か検討

する。

3. 研究の方法

(1) 血清等検体中のリゾリン脂質産生酵素の測定

2種類のモノクローナル抗体を用いたリゾリン脂質産生酵素(ATX、PSPLA1)濃度測定は自動免疫測定装置AIAシリーズ(東ソー社)を用いて東京大学医学部附属病院検査部(臨床病態検査医学)にて施行した。

(2) プリスタン(pristane, PST)誘導マウスSLEモデル

プリスタンは飽和テルペノイドアルカンであり、8週齢Balb/cxマウス(♀)をコントロール群(生理食塩水0.5mL腹腔内投与n=10)とPST群(プリスタン0.5mL腹腔内投与群n=16)に分けてモデル動物を作成した。4週間後にCT群、PST群の半数を解剖して全採血・血清分離し、腎臓および脾臓を摘出してOCTコンパウンドで包埋を行った。

(3) 免疫組織化学染色

PSPLA1染色:薄切を作成後、PS-PLA1の免疫組織化学染色は抗PLA1A抗体(ヤギ、sc79675サンタクルーズ)と酵素標識抗ヤギIgG抗体(二次抗体)を用いて施行した。

ATX染色:滑膜(II型コラーゲン誘導マウス関節炎モデル)およびマウス脈絡膜は、ビオチン化抗ATX抗体と酵素標識アビジンを用いて染色した。

(4) 末梢血リンパ球におけるPS-PLA1およびLPSレセプターのRNA発現解析

細胞RNA抽出はRNeasy mini kit (Qiagen)を用いて行った。cDNAはトランスクリプターゼユニバーサルcDNAマスター(Roche)を用いて合成し、定量的PCRはTaqman probeとFastStart Essential DNA probes Master、LightCycler (Roche)を用いて比較Ct法で施行した。PSPLA1(Hs01056915_m1)、GPR34(Hs00271105_s1)、GPR174(Hs00261404_s1)、P2RY10(Hs00274326_s1)、 β actin(Hs99999903_m1)のPCR効率は各々2.24、2.25、1.89、1.98、1.73であった。

In vitroでの細胞増殖/生存はRealTime-Glo(Promega)のMTT法を用いて評価し、化学発光はEnspire(PerkinElmer)で測定した。

4. 研究成果

(1) 血清検体中のリゾリン脂質産生酵素の測定

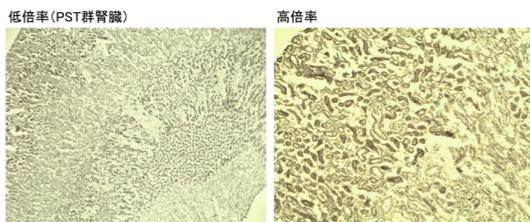
ATXに関しては、男性SLE(n=9)、女性SLE(n=17)ともに健常人レベルよりも軽度上昇していたが、疾患コントロールとの有意差はなく、ATXと疾患活動性マーカーとの関連も認められなかった。

PS-PLA1に関しては、女性SLEの血清レベルは 100.8 ± 76.0 pg/mlであり、健常女性(29.4 ± 12.0 pg/ml)より有意に高値であった。男性SLE(97.8 ± 65.2 pg/ml)も同様に健常男性(37.4 ± 20.8 pg/ml)に比して有意に高値であった。また、血清PS-PLA1値とSLE-DAI

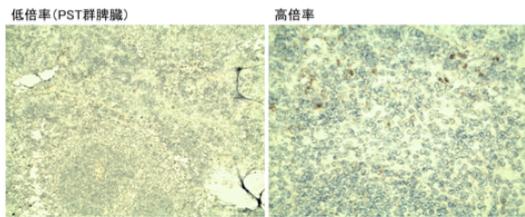
($r=0.53$, $p<0.01$) や BILAG ($r=0.54$, $p<0.01$) との間に有意な相関関係を認めた。個々の臨床所見、臨床検査との関連については、全身症状、皮膚粘膜症状、血管炎スコア、GOT とは有意な正の相関関係、白血球数、血小板数、C3 と P は有意な負の相関関係を呈した。また、ステロイドを含む免疫抑制療法により、血清 PS-PLA1 値は有意に減少した ($p<0.01$)。

(2) プリスタン (pristane, PST) 誘導マウス SLE モデル

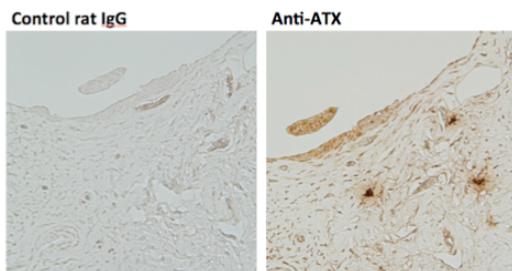
コントロール群の腎組織では、PS-PLA1 は尿細管細胞で発現がみられ、皮質領域の尿細管細胞に強く発現し、髄質外帯領域尿細管細胞での発現は比較的弱く、内帯領域には染色される細胞を認めなかった。PST 群でも同様であり、明らかな差異は認められなかった。



一方、脾臓についてはコントロール群でも赤脾髄や一部の白脾髄の脾小節に陽性細胞を認めたが、その頻度は少なかった。一方、PST 群では白脾髄周辺部や赤脾髄に陽性細胞が増加していた。



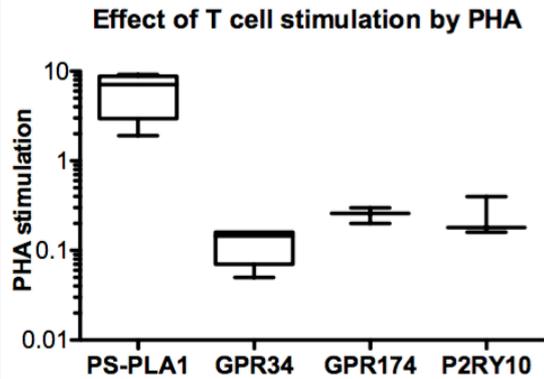
なお、マウス血清中に Western-blot では PS-PLA1 は検出されなかった。測定感度の問題、あるいは検体採取時期 (4W) の問題も考えられる。また、ATX は SLE 血清中で増加していなかったため、PST マウスモデルでの染色は施行しなかったが、既存のマウス膠原病関節炎モデルの滑膜切片を染色したところ、ATX の発現が認められた。



(3) 末梢血リンパ球における PS-PLA1 および LPS レセプターの RNA 発現解析

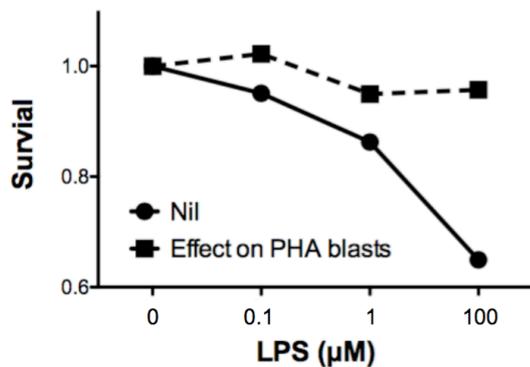
ヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) と好中球の

PS-PLA1 の mRNA 発現は同程度で、T 細胞の PS-PLA1 発現は B 細胞や単球に比して低値であった。フィトヘマグルチニン L (PHA-L) による *in vitro* での T 細胞活性化により ($10 \mu\text{g/mL}$)、PBMC の PS-PLA1 発現は有意に ($p=0.02$) 上昇した (5 回実験)。従って、PS-PLA1 は T 細胞の活性化マーカーと考えられる。一方、LPS 受容体の RNA 発現は GPR34 ($p<0.01$)、GPR174 ($p<0.01$)、P2RY10 ($p=0.01$) 全てで有意に低下していた (3 回)。

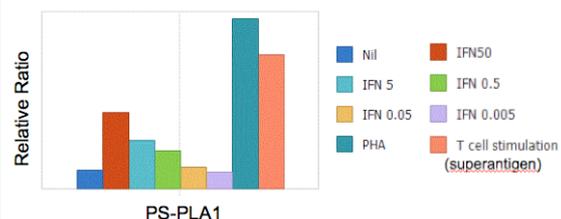


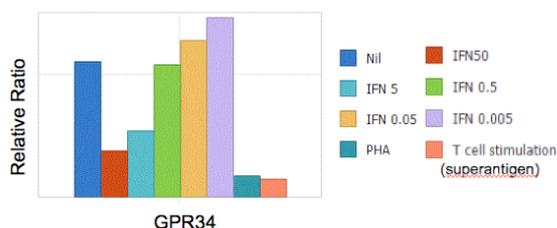
LPS は細胞増殖を抑制することが報告されている。本研究でも *in vitro* で LPS を添加するとヒト PBMC の生存は短縮したが、PHA-L で活性化した T 細胞への影響は限定的であった。従って、活性化 T 細胞では LPS 受容体の発現低下を介して、LPS の細胞傷害性を回避している可能性が示唆された。

LPS on resting and activated T cells



IFN- α signature に関し、PBMC の PS-PLA1 発現は高濃度 IFN- α ($500 \text{ pg/mL} \sim 50 \text{ ng/mL}$) 処理で発現が増強した。LPS 受容体も低濃度 ($5 \sim 500 \text{ pg/mL}$) IFN- α により発現が増強しており、IFN- α 域に相違はあるが、いずれも IFN- α signature に属すると考えられる。





PSPLA-1はIFN- α signatureの一つであり、血清PS-PLA1の測定はSLEの診断や活動性モニターに有用な可能性が示唆された。

ATX遺伝子多型の機能について、健常人Hap Mapで使用されているEBV不死化細胞のアレイデータベースでのATX発現量をgenotype別に解析することでin silicoでの解析を行うと、rs965301(ATX遺伝子イントロン)のgenotypeを0, 1, 2としてATX発現量との相関を回帰分析したところ有意差が検出され、rs965301領域にはATXの発現に影響をあたえる多型の存在が示唆された。PS-PLA1には、このような多型は検出されていないが、ATXやPS-PLA1遺伝子がSLEの疾患感受性遺伝子か否かを含め、今後の研究課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- (1) A Suzuki, Y Kochi, H Shoda, Y Seri, K Fujio, T Sawada, R Yamada, K Yamamoto: Decreased severity of experimental autoimmune arthritis in peptidyl-arginine deiminase type 4 knockout mice. BMC Musculoskeletal Disorders (査読あり)17(1):205, 2016.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計3件)

- (1) T Sawada: Prognosis and treatment. Behcet Disease (Ed Shunsei Hirohata) Nova Science publishers, New York, pp171-184, 2015
- (2) 太原恒一郎, 沢田哲治: 抗SS-A/Ro抗体, 抗SS-B/La抗体 Medicina 52(4): 416-417, 2015 (医学書院)
- (3) 林映, 沢田哲治: 抗DNA抗体と抗Sm抗体 リウマチ科 52(4):354-358, 2014 (科学評論社)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 (なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沢田 哲治 (SAWADA TETSUJI)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 50235470

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし