

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860059

研究課題名(和文)代謝性慢性炎症調節因子としてのsPLA2ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of sPLA2 network as a regulator of metabolic inflammation

研究代表者

佐藤 弘泰 (SATO, Hiroyasu)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号：50546629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外リン脂質代謝酵素である分泌性ホスホリパーゼA2 (sPLA2) 酵素群のメタボリックシンドロームにおける機能を解明するために高脂肪食負荷を施した各アイソザイム欠損マウスの解析を行った。我々は、(1) sPLA2-IIIEはリポ蛋白質に含まれる微量なリン脂質であるPS、PEの量を制御することにより、脂肪組織や肝臓への脂質の輸送や貯蔵を促進すること、(2) sPLA2-IIDはメタボリックシンドロームを抑制すること、(3) sPLA2-IIIは脂肪組織においてマスト細胞のリクルートを促進すること、(4) sPLA2-Xはメタボリックシンドロームを抑制することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of secreted phospholipase A2 (sPLA2) in metabolic syndrome, we analyzed high fat diet-fed mice knockout mice for individual sPLA2 isoforms. We found that (1) sPLA2-IIIE altered minor lipoprotein phospholipids, phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE), and moderately facilitated lipid accumulation in adipose tissue and liver. (2) sPLA2-IID plays a role in amelioration of metabolic syndrome. (3) sPLA2-III facilitated recruitment of immune cells such as mast cells in adipose tissue. (4) sPLA2-X plays a role in amelioration of metabolic syndrome.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分泌性ホスホリパーゼ メタボリックシンドローム 慢性炎症 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

PLA₂ はリン脂質を分解して脂肪酸とリゾリン脂質を産生する酵素であり、教科書的にはアラキドン酸代謝を始動する酵素として知られている。哺乳動物では 30 種類以上の分子種が同定されており、その中で分泌性 PLA₂ (sPLA₂) の一群は最大のファミリーを形成する。sPLA₂ アイソザイム (11 種) はそれぞれが固有の組織分布を示し、異なる基質リン脂質特異性を示す。sPLA₂ 群の機能としては一般に脂質メディエーター産生を介した炎症応答の亢進が想定されていたが、ここ数年来、申請者の所属グループをはじめとする国内外の研究グループから sPLA₂ アイソザイムの遺伝子改変マウスが報告されるようになり、各アイソザイムは組織固有の環境下において細胞外に存在するリン脂質を分解することにより、多彩な生命現象に関わることがわかってきた。sPLA₂ の機能のひとつとして血管の代謝性慢性炎症疾患である動脈硬化との関連が指摘されていたが (*J Biol Chem.* 283:33483, 2009)、sPLA₂ が全身の脂質代謝異常であるメタボリックシンドロームに関わるという知見は極めて限られていた。最近になって、唾液酵素である sPLA₂-IB の欠損マウスでは食餌リン脂質消化が低下するため高脂肪食下で体脂肪が蓄積しにくいこと (*Diabetes*, 55:935, 2006)、通常食下で sPLA₂-X 欠損マウスは対照マウスと比べて体脂肪が増加すること (*FASEB J*, 24:4313, 2010) が報告されたが、再現性に問題があり、sPLA₂ とメタボリックシンドロームの関係については殆ど定見が得られていない状況であった。

2. 研究の目的

膜リン脂質代謝に関わる酵素ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) には 30 種類以上の分子種が同定されている。このうち、細胞外分泌性 PLA₂ (secreted PLA₂) は 11 種類のアイソザイムからなり、最近の研究から各アイソザイムは固有の生体内機能を持つことが明らかとなってきた。申請者は sPLA₂ 分子群の遺伝子改変マウスの解析を進める過程で、異なる部位に時空間的に発現する複数の sPLA₂ アイソザイムが代謝性慢性炎症疾患であるメタボリックシンドロームを正または負に調節している可能性を見出した。本研究では、部位特異的に発現している sPLA₂ アイソザイムのメタボリックシンドロームへの関与を総合的に解析し、そのネットワークの全貌を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、sPLA₂ 群の時空間的な発現パターンと遺伝子欠損マウスの表現型の相関をもって、メタボリックシンドロームに関わる

sPLA₂ アイソザイムとその作用メカニズムを分子レベルで解明する。各 sPLA₂ 遺伝子改変マウスに高脂肪食負荷を施し、メタボリックシンドロームの表現型を精査する。具体的には、以下の項目について解析を行う。

- (1) *Pla2g2e*^{-/-}マウスに高脂肪食負荷を行い、血漿リポタンパク質を分画し、リポタンパク質の解析を行った。さらに質量分析により低密度リポタンパク質 (LDL) のリン脂質組成を解析した。
- (2) *Pla2g2d*^{-/-}マウスに高脂肪食負荷し、体重をモニタリングするとともに、インスリン抵抗性、血漿代謝パラメーター、脂肪組織の炎症、リポタンパク質代謝を解析した。
- (3) 前脂肪細胞と *Pla2g3*^{-/-}マウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC) を共培養し、BMMC の成熟について検証した。マスト細胞欠損マウスに *Pla2g3*^{+/+}または *Pla2g3*^{-/-}より調整した BMMC を移植再構成し、高脂肪食負荷を施し、体重をモニタリングするとともに、インスリン抵抗性、血漿代謝パラメーター、脂肪組織の炎症、リポタンパク質代謝を解析した。
- (4) *Pla2g10*^{-/-}マウスに高脂肪食負荷し、体重をモニタリングするとともに、インスリン抵抗性、血漿代謝パラメーター、脂肪組織の炎症、リポタンパク質代謝を解析した。

4. 研究成果

(1) sPLA₂-IIE のリポタンパク質代謝における寄与の解明

HFD 負荷 *Pla2g2e*^{-/-}マウスは WT マウスと比べて体重が減少傾向を示し、体脂肪率が減少していた。また HFD 負荷 *Pla2g2e*^{-/-}マウスでは WT マウスと比べて肝臓への脂肪滴の貯留が少なく、血清中の ALT や AST が有意に減少しており、脂肪肝が軽減していることがわかった。体脂肪の減少の一つの要因として、脂質の取込みに影響を与えるリポタンパク質の解析を行った。HFD 負荷 *Pla2g2e*^{-/-}マウスの血漿では、WT と比べてリン脂質、中性脂質が有意に減少していた。さらに HFD 負荷時の血漿リポタンパク質を分画すると、VLDL、LDL および HDL においてこれらの脂質が減少していた。LDL 画分について、質量分析によりリン脂質のプロファイリングの結果、HFD 負荷 *Pla2g2e*^{-/-}マウスの LDL ではホスファチジルコリン (PC) に差は見られなかったが、ホスファチジルエタノールアミン (PE) とホスファチジルセリン (PS) が WT と比べて増加していた。このことから sPLA₂-IIE はリポ蛋白質中の PE、PS を選択的に、脂肪酸非選択的に分解していること

が示唆された。一般に、酸性リン脂質が増加したりリポ蛋白質粒子は小型化することが知られており、これが *Pla2g2e*^{-/-} マウスにおいてリポ蛋白質の総脂質量が減少する要因と考えられた。

(2) sPLA₂-IIDの脂肪組織慢性炎症に対する抗炎症性作用メカニズムの解明

HFD 負荷 *Pla2g2d*^{-/-} マウスは WT マウスと比べて体重が増加を示し、体脂肪率が増加していた。また HFD 負荷 *Pla2g2d*^{-/-} マウスでは WT マウスと比べてインスリン抵抗性が増悪していた。脂肪組織において炎症性の M1 マクロファージのマーカ―遺伝子の発現が増加していたことから HFD 負荷 *Pla2g2d*^{-/-} マウスにおけるインスリン抵抗性の増悪の一部は脂肪組織の炎症の増悪に起因するものと考えられた。

(3) マスト細胞に発現している sPLA₂-III のメタボリックシンドロームへの寄与の解明

HFD 負荷 *Pla2g3*^{-/-} マウスは WT マウスと比べてマスト細胞の脂肪組織への遊走および活性化が著しく低下していた。また共培養系において、前脂肪細胞は WT BMMC の成熟を促進したが、*Pla2g3*^{-/-} BMMC の成熟は不十分であった。マスト細胞の sPLA₂-III の寄与についてマスト細胞欠損マウスに *Pla2g3*^{+/+} または *Pla2g3*^{-/-} より調整した BMMC を移植再構成し、高脂肪食負荷を施すと、脂肪組織へのマスト細胞の遊走は *Pla2g3*^{-/-} で減少していた。マスト細胞マーカ―の発現は *Pla2g3*^{+/+} BMMC の移植により通常の半分程度まで回復したが、*Pla2g3*^{-/-} 移植群では低下傾向を示した。また、*Pla2g3*^{-/-} 移植群では炎症マーカ―の発現の回復が減少した。マスト細胞欠損マウスではインスリン抵抗性が改善する。マスト細胞欠損マウスに *Pla2g3*^{+/+} BMMC を移植すると部分的に回復するが、*Pla2g3*^{-/-} BMMC を移植してもその影響は見られなかった。以上のことより、マスト細胞の sPLA₂-III はマスト細胞の脂肪組織への浸潤に重要であり、脂肪組織の炎症に部分的に関与しますが、インスリン抵抗性には影響しない事がわかった。

(4) sPLA₂-Xのメタボリックシンドロームに寄与の解明

HFD 負荷 *Pla2g10*^{-/-} マウスでは肥満、脂肪肝の増悪、脂肪細胞が肥大化していた。また脂肪組織における炎症やインスリン抵抗性が増悪していた。血漿リポタンパク質の粒子径を測定した結果、HFD 負荷 *Pla2g10*^{-/-} マウスでは VLDL, LDL が有意に増加していた。sPLA₂-X 欠損により引き起こされる肥満とインスリン抵抗性は、(1)高脂肪食負荷による脂肪組織の炎症の亢進、(2)脂質過多のリポタンパク質の分

解異常による脂質の蓄積に起因するものと考えられた。

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7件)

- (1) Murakami, M., Miki, Y., Sato, H., Yamamoto, K., Taketomi, Y. Emerging roles of secreted phospholipase A₂ enzymes: the 3rd edition. *Biochimie* 107PA, 105-113 (2014) Review. doi: 10.1016/j.biochi.2014.09.003. (査読有り)
- (2) 佐藤弘泰, 村上誠: ホスホリパーゼ A₂ による脂質代謝シグナル制御. 実験医学 32(15), 2359-2365 (2014) (査読なし)
- (3) Sato, H., Taketomi, Y., Ushida, A., Isogai, Y., Kojima, T., Hirabayashi, T., Miki, Y., Yamamoto, K., Nishito, Y., Kobayashi, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Hara, S., Ida, S., Miyamoto, Y., Watanabe, M., Baba, H., Miyata, K., Oike, Y., Gelb, M.H., Murakami, M. The adipocyte-inducible secreted phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E play distinct roles in obesity. *Cell Metab.* 20, 119-132 (2014). doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.002. (査読有り)
- (4) Udagawa, O., Ito, C., Ogonuki, N., Sato, H., Lee, S., Tripvanuntakul, P., Ichi, I., Uchida, Y., Nishimura, T., Murakami, M., Ogura, A., Inoue, T., Toshimori, K., Arai, H. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking ORP4, a sterol-binding protein in the OSBP-related protein family. *Genes Cells.* 19, 13-27 (2014) doi: 10.1111/gtc.12105. (査読有り)
- (5) Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y., Sato, H., Shimo, K., Kobayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakanishi, H., Ikeda, K., Taguchi, R., Kabashima, K., Arita, M., Arai, H., Lambeau, G., Bollinger, J.M., Hara, S., Belb, M.K., Murakami, M. Lymphoid tissue phospholipase A₂ group IID resolves contact hypersensitivity by driving anti-inflammatory lipid mediators. *J. Exp. Med.* 210, 1217-1234 (2013). doi: 10.1084/jem.20121887 (査読有り)
- (6) Taketomi, Y., Ueno, N., Kojima, T., Sato, H., Murase, R., Yamamoto, K.,

Tanaka, S., Sakanaka, M., Nakamura, M., Nishito, Y., Kawana, M., Kambe, N., Ikeda, K., Taguchi, R., Nakamizo, S., Kabashima, K., Gelb, M.H., Arita, M., Yokomizo, T., Nakamura, M., Watanabe, K., Hirai, H., Nakamura, M., Okayama, Y., Ra, C., Aritake, K., Urade, Y., Morimoto, K., Sugimoto, Y., Shimizu, T., Narumiya, S., Hara, S., Murakami, M. Mast cell maturation is driven via a novel group III phospholipase A₂-prostaglandin D₂-DP1 receptor paracrine axis. *Nat. Immunol.* 14, 544-563 (2013). doi: 10.1038/ni.2586 (査読有り)

[学会発表](計 29 件)

- (1) 池田さや, 佐藤弘泰, 武富芳隆, 田中弘文, 村上誠: メタボリックシンドロームにおける分泌性ホスホリパーゼ A₂ 受容体の機能. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 26-28 日. 神戸学院大 (兵庫・神戸)
- (2) Sato H, Taketomi Y, Yamamoto K, Hara S, Murakami M. Deficiency of group III sPLA₂ protects from metabolic disorders. *PLM2015*. 10-12 Feb 2015, 京王プラザホテル (東京・新宿)
- (3) Sato H, Taketomi Y, Yamamoto K, Hara S, Miyata K, Oike Y, Gelb M.H, Murakami M. Adipocyte-inducible group V and IIE sPLA₂s play distinct roles in metabolic disorders. *PLM2015*. 10-12 Feb 2015. 京王プラザホテル (東京・新宿)
- (4) Taketomi, Y, Miyazaki T, Sato H, Murakami M. Deficiency of group III sPLA₂ protects from atherosclerosis. *PLM2015*. 10-12 Feb 2015. 京王プラザホテル (東京・新宿)
- (5) Murase R, Taketomi Y, Sato H, Yamamoto K, Yamamoto T., Murakami, M. Group X sPLA₂ protects from colitis by mobilizing ω3 polyunsaturated fatty acid metabolites. *PLM2015*. 10-12 Feb 2015. 京王プラザホテル (東京・新宿)
- (6) 佐藤弘泰, 武富芳隆, 池田さや, 村上誠: V 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は「Th2/M2-prone sPLA₂」である. 第 87 回日本生化学会. 2014 年 10 月 15-18 日. 国立国際会館 (京都・京都)
- (7) 村瀬礼美, 武富芳隆, 佐藤弘泰, 山本圭, 山元俊憲, 村上誠. 炎症性腸疾患における分泌性ホスホリパーゼ A₂ の機能解析. 第 87 回日本生化学会. 2014 年 10 月 15-18 日. 国立国際会館 (京都・京都)
- (8) 佐藤弘泰, 村上誠: 代謝性慢性炎症を制御するメタボリック sPLA₂. 第 35 回日本炎症・再生医学会. 2014 年 7 月 1-4 日. 万国津梁館 (沖縄・名護). 【招待講演】
- (9) 佐藤弘泰, 武富芳隆, 山本圭, 原俊太郎, 村上誠: III 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ はメタボリックシンドロームを制御する. 第 35 回日本炎症・再生医学会. 2014 年 7 月 1-4 日. 万国津梁館 (沖縄・名護).
- (10) Murakami M, Taketomi Y, Sato H, Miki Y, Yamamoto K. Phospholipase A₂ and Lipid Mediators in Health and Disease. *医学研・延世大学 Joint Symposium, Yonsei・CBSM Joint Conference*, 19-22 June 2014. Seoul, Korea.
- (11) 佐藤弘泰, 武富芳隆, 牛田絢子, 山本圭, 小島卓巳, 原俊太郎, 村上誠: III 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ はメタボリックシンドロームを制御する. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 27-30 日. 熊本大 (熊本・熊本).
- (12) 武富芳隆, 宮崎拓郎, 佐藤弘泰, 村上誠: III 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は動脈硬化を制御する. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 27-30 日. 熊本大 (熊本・熊本).
- (13) 村上誠, 三木寿美, 佐藤弘泰, 武富芳隆: sPLA₂ と免疫抑制. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 27-30 日. 熊本大 (熊本・熊本). 【招待講演】
- (14) 佐藤弘泰, 武富芳隆, 牛田絢子, 山本圭, 宮田敬士, 尾池雄一, 村上誠: 脂肪過栄養により誘導される sPLA₂-V と sPLA₂-IIE は全身性脂質代謝を制御する. 第 8 回炎症・脂質代謝・メタボリサーチフォーラム. 2014 年 2 月 22 日. 東京大 (東京・文京).
- (15) Sato H, Taketomi Y, Ushida A, Yamamoto K, Gelb M. H, Murakami M. Two secreted phospholipase A₂ enzyme, PLA2G5 and PLA2G2E, are induced in hypertrophic adipocytes and distinctly regulate obesity. *13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases*, Nov 3-6, 2013. San Juan, Puerto Rico.
- (16) 村上誠, 佐藤弘泰, 武富芳隆: 脂質メディエーターの観点から捉えた慢性炎症と肥満症. 第 34 回日本肥満学会 2013 年 10 月 11-12 日. 東京国際フォーラム (東京・千代田). 【招待講演】
- (17) 村上誠, 武富芳隆, 佐藤弘泰, 三木寿美, 山本圭: sPLA₂ の新しいパラダイム. シンポジウム生体膜リン脂質研究の最前線. 第 86 回日本生化学会. 2013 年 9 月 11-13 日. パシフィコ横浜 (神奈川・横浜). 【招待講演】
- (18) 佐藤弘泰, 武富芳隆, 牛田絢子, 山本圭, 小島卓巳, 原俊太郎, 村上誠: III 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ の欠損はメタボリックシンドロームを改善する. 第 86

- 回日本生化学会．2013年9月11-13日．
パシフィコ横浜（神奈川・横浜）．
- (19) 武富芳隆, 宮崎拓郎, 佐藤弘泰, 村上誠:
III型分泌性ホスホリパーゼA₂は動脈硬化を制御する．第86回日本生化学会．
2013年9月11-13日．パシフィコ横浜
（神奈川・横浜）．
- (20) 村瀬礼美, 武富芳隆, 佐藤弘泰, 三木寿
美, 山本圭, 山元俊憲, 村上誠: 炎症性
腸疾患における分泌性ホスホリパーゼ
A₂の機能解析．第86回日本生化学会．
2013年9月11-13日．パシフィコ横浜
（神奈川・横浜）．
- (21) 佐藤弘泰, 武富芳隆, 牛田絢子, 小島卓
巳, 山本圭, 原俊太郎, 宮田敬士, 尾池
雄一, 村上誠: 脂肪過栄養により誘導さ
れるsPLA₂-VとsPLA₂-IIEは全身性脂質
代謝を制御する．第55回日本脂質生
化学会 2013年6月6-7日 松島大観荘（宮
城・松島）．
- (22) Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato
H, Yamamoto K.: Deciphering the
physiological functions of sPLA₂s. **5th
International Conference on
Phospholipase A₂ Mediated Signaling
in Translational Medicine**. 20-21 May
2013. New Orleans, LA, USA. 【招待講
演】
- (23) Taketomi Y, Ueno N, Sato H, Yamamoto
K, Murakami M. Group III phospholipase
A₂ regulates mast cell maturation and
anaphylaxis through a novel paracrine
PGD₂ loop. **5th International
Conference on Phospholipase A₂
Mediated Signaling in Translational
Medicine**, 20-21 May 2013. New Orleans,
LA, USA.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤 弘泰 (SATO, Hiroyasu)

公益財団法人東京都医学総合研究所・

生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号：50546629