

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461179

研究課題名(和文) II型肺胞上皮特異的Elovl6欠損マウス作製による新たな肺気腫進展機序の解明

研究課題名(英文) An analysis of new mechanisms of pulmonary emphysema using Elovl6 deficient mice.

研究代表者

横山 知行 (Yokoyama, Tomoyuki)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：70312890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺胞上皮細胞の脂肪酸組成を制御するElongation of long chain fatty acid member 6 (Elovl6)の発現と肺気腫との関係をElovl6遺伝子欠損マウスを用いて検討した。肺気腫の初期段階では、肺組織のII型肺胞上皮細胞でのElovl6の発現が増加することで脂肪酸の鎖長伸長が進み、炭素数16の脂肪酸が減少、炭素数18の脂肪酸が増加することで、肺気腫の病態に影響することが推察された。一方、肺気腫の慢性期では、肺組織のII型肺胞上皮細胞におけるElovl6は肺気腫発症前の発現レベルに戻り、肺組織における脂肪酸組成にも変化が認められないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of Elongation of long chain fatty acid member 6 (Elovl6) which is a rate-limiting enzyme catalysing the elongation of saturated and monounsaturated fatty acids on the development of pulmonary emphysema using Elovl6-deficient mice. In the early stage of emphysema, the expression of Elovl6 was increased in alveolar type II epithelial cells, and increased Elovl6 induced derangement of fatty acid profile and exacerbated pulmonary emphysema. On the other hand, in the chronic phase of emphysema, the expression of Elovl6 returned to the level of normal mice, and the fatty acid profile of lung was similar to normal mice. Our findings demonstrate a previously unappreciated role for Elovl6 in the pathogenesis of pulmonary emphysema.

研究分野：循環器内科

キーワード：Elovl6 肺気腫 飽和脂肪酸 不飽和脂肪酸

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) と肺気腫はいずれも慢性的な経過を経て死に至る予後不良な呼吸器疾患であるが、近年、増加の傾向をたどっている。IPF と肺気腫の発症、進展には遺伝的因子および環境因子等様々な因子の関与が報告されているが、肺線維症と肺気腫に共通した因子の検索は病態を解明する上で重要であり、新たな治療や予防法の開発につながると期待される。遊離脂肪酸は、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸を含むが、これら脂肪酸分画の呼吸器系における生体内での作用についてはほとんど明らかになっていない。飽和脂肪酸はアポトーシスを誘導し、細胞の機能障害を起こすことが知られる。一方、不飽和脂肪酸のオレイン酸は細胞の増殖と遊走を亢進させるとの報告がある。したがって、肺胞上皮での脂肪酸分画の変化が肺胞上皮細胞の脱落、増殖および肺サーファクタント産生の低下、あるいは間質の増殖を引き起こす可能性がある。しかし、呼吸器疾患での飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の相互作用については報告がない。

申請者らはこれまでに遊離脂肪酸が心血管疾患の発症、進展に与える影響について検討してきた。SCD1 は細胞内に取り込まれた飽和脂肪酸を単価不飽和脂肪酸に変換し、脂肪を蓄積させる働きを有している。申請者らの実験では、飽和脂肪酸を心筋細胞へ添加すると、アポトーシスが誘導されるが、SCD1 を心筋細胞に過剰発現させると、飽和脂肪酸による心筋傷害を抑制することを認めた (Matsui H. *et al.* PLoS One. 2012;7:e33283)。一方、Elovl6 は飽和脂肪酸あるいは不飽和脂肪酸の脂肪酸鎖長を延長する酵素で、島野らにより生活習慣病との関連が初めて報告された (Matsuzaka T. *et al.* Nat Med. 2007;13:1193-1202)。申請者らは Elovl6 が動脈硬化初期の新生内膜で著明に発現が増加し、動脈硬化形成に促進的に作用すること

を明らかにした。以上より、SCD1、Elovl6 の局所的な活性の亢進または低下が、細胞内の脂肪酸組成のバランスを変化させることで、心血管病の発症に強く影響していることが示された。

次に、SCD1 と Elovl6 は共に肺組織にも発現していることから、肺における SCD1 と Elovl6 の発現および病態意義について検討を行った。その結果、SCD1、Elovl6 とともに型肺胞上皮細胞に発現が認められ、IPF 患者の肺でその発現が減弱すること、また、Elovl6 欠損マウスにプレオマイシン気管支投与を行い肺線維症モデルを作成したところ、野生型マウスと比較して著明な肺線維症の増悪を認めた。さらに、マウスの肺から脂質を抽出し、脂肪酸分画を測定したところ、飽和脂肪酸であるパルミチン酸の増加、不飽和脂肪酸であるオレイン酸の減少を認め、増加したパルミチン酸が型肺胞上皮細胞における酸化ストレスの亢進や、線維化の重要な因子である TGF- $\beta$ 1 の発現やアポトーシスを誘導することも明らかにし、これらの結果を Nature Communications に発表した (Sunaga H. *et al.* Nat Commun. 2013;4:2563)。

したがって、肺においても Elovl6 の発現低下が、細胞内の脂肪酸組成のバランスを変化させることで、肺線維症の発症、進展に強く作用していることが示された。さらに、大変興味深いことに、Elovl6 欠損マウスでは間質の線維化だけでなく、肺胞の破壊による気腫性変化も伴っていた (図 1)。

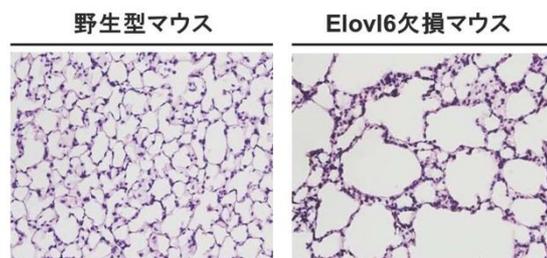


図1 Elovl6欠損マウスでの気腫化

## 2. 研究の目的

本研究では肺気腫の新たな発症・進展機序を明らかにするため、以下の3つの課題を主目的に研究を進める。

(1)肺気腫の病態モデル動物を作製し、肺組織での Elovl6 の発現と活性および脂肪酸分画の変化と病態との関係を比較検討する。

(2)Elovl6 遺伝子発現を培養 II 型肺胞上皮細胞でノックダウンさせ、Elovl6 の作用とその機序を細胞レベルで解明する。

(3)II 型肺胞上皮特異的に SCD1 発現あるいは Elovl6 発現を欠損したコンディショナルノックアウトマウスを作製して、II 型肺胞上皮の脂肪酸組成バランスと病態との関係を検討する。

## 3. 研究の方法

(1)マウス喫煙モデルの作成方法および採取

C57BL/6J(クレア)メスの8週齢(15-20g)に、マウス用喫煙装置を用いてフィルターレスの実験用タバコ(ケンタッキー大学)を1日2本ずつ、週6日で2ヶ月間もしくは6ヶ月間喫煙させた。この間、マウスはタバコの煙による毒性に対して耐性を示し、致死的な状態には至らなかった(カルボキシヘモグロビンレベル10%程度)。コントロールとして、喫煙を曝露させずに同一の飼育室にて飼育し、喫煙モデルと同じ週齢のマウスを用いた。それぞれの喫煙曝露後、マウスはペントバルビタールナトリウム(共立製薬、50-75mg/kg、腹腔内投与)にて麻酔をかけ、気管内挿管をした後に、生理食塩水で肺胞洗浄を行い、肺胞内のマクロファージなどを除去した。その後、肺を摘出し、液体窒素にて凍結保存した。また、組織標本用のサンプルはマウスに同様に麻酔をかけて気管内挿管をした後に、10%ホルマリンを25 cm H<sub>2</sub>Oの圧で10分間、肺へ注入し、気管を結紮して肺を摘出して、10%ホルマリンで24時間固定後に、パラフィン包埋した。

マウスを用いた動物実験に関しては、群馬大学動物実験安全管理委員会の承認のもとに行った(許可番号 動15-027)。

(2)免疫組織化学染色

病態モデルおよび特発性肺線維症(IPF)患者の剖検標本から薄切標本を作成し、Elovl6 の発現局在を免疫組織化学染色によって検討した。

(3)マウス肺組織からの RNA およびタンパク抽出、定量的 PCR 法およびウェスタンブロット法

病態モデルマウスの肺組織から RNA およびタンパクを抽出し、定量的 PCR 法およびウェスタンブロット法により、Elovl6、SCD1、SP-C、Bax、Bcl-2、IL1、TNA、マトリックスメタロプロテアーゼ9の発現を mRNA およびタンパクレベルで検討した。

(4)マウス肺組織からの脂質抽出と脂肪酸分画の測定

Bligh and Dyer の方法に従って肺組織から脂質を抽出し、脂肪酸分画をガスクロマトグラフィー法にて測定した。

(5)培養 II 型肺胞上皮細胞を用いた検討

培養 II 型肺胞上皮細胞(LA-4)細胞に small interfering RNA (siRNA)を用いて Elovl6 をノックダウンまたは脂肪酸(パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸 各 250μM)を添加することで、病態に関与する遺伝子群の発現を比較検討した。

(6) II 型肺胞上皮特異的に Elovl6 を欠損したコンディショナルノックアウトマウスの作製

Elovl6 を loxP 遺伝子で挟んだ Elovl6 flox マウスを作製し、これと II 型肺胞上皮特異的遺伝子である SP-C プロモーターを Cre 遺伝子につないだ SP-C promoter-Cre rtTA トランスジェニックマウス(PLoS ONE 7:e46076:2012)とを掛け合わせ、ドキシサイクリン誘導型の II 型肺胞上皮特異的 Elovl6 ノックアウトマウスを作製した。これ

らのマウスに喫煙負荷(1~6カ月)を施し、肺気腫の病態モデルを作成する。

#### 4. 研究成果

我々は、Elov16欠損マウスの肺組織で肺腔径の著明な拡大や弾性線維の破壊を認めるなど、気腫化を自然発症していることを見出した。X線CT装置による解析から、低吸収領域(LAA)の割合が大きく、肺気腫病変が進行している傾向が確認された。また、このマウスの肺では野生型マウスと比較して、アポトーシス促進因子Baxの発現上昇とアポトーシス抑制因子Bcl-2の発現減少を認めた。さらに、肺気腫の発症に関与することが報告されている炎症性サイトカインIL-1やマトリックスメタロプロテアーゼ9の産生上昇を認めた。

そこで我々は、野生型マウスに対して、マウス用喫煙曝露装置により2ヶ月および6ヶ月間、喫煙曝露を行うことで、肺気腫モデルマウスを作成し、このマウスにおけるElov16の発現と脂肪酸組成について検討を行った。免疫組織化学染色の結果から、喫煙曝露2ヶ月の標本では、型肺胞上皮細胞におけるElov16の明らかな発現増加が認められたが、喫煙曝露6ヶ月の標本では、2ヶ月の標本と比較すると発現は減少し、喫煙無処置の標本とほぼ同等のElov16の発現レベルであった。定量的PCR法により、Elov16 mRNAの発現変化を検討したところ、2ヶ月の喫煙曝露によりElov16の発現は2.7倍と有意に増加していた一方、6ヶ月の喫煙曝露ではElov16の発現は0.9倍と、発現レベルに明らかな差は認められなかった(図2、3)。また、型肺胞上皮細胞のマーカーであるSP-Cの発現に関しては、喫煙無処置、2ヶ月、6ヶ月の標本で顕著な変化は認められなかった。

次に、Elov16の発現変化に伴い、肺における脂肪酸組成に変化が認められるか検討したところ、2ヶ月の喫煙曝露によりパルミチ

図2

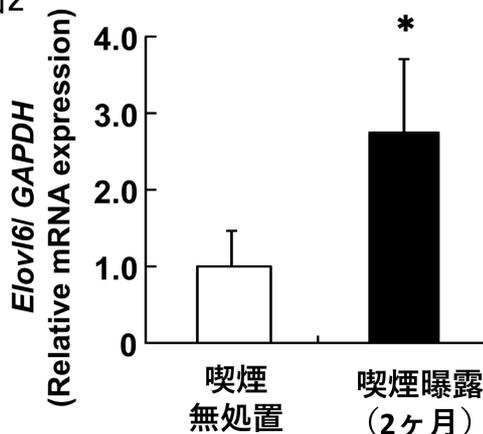
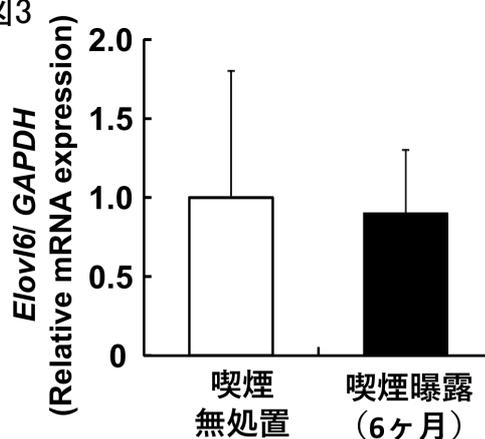


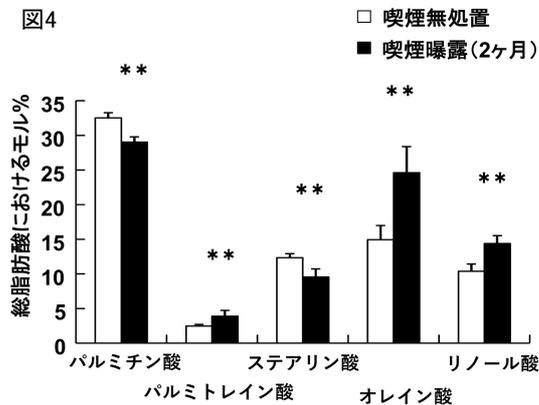
図3



ン酸(C16:0)およびステアリン酸(C18:0)の有意な減少と、パルミトオレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:1n-9)およびリノール酸(C18:2n-6)の有意な増加が確認された(図4)。しかし、6ヶ月の喫煙曝露では、いずれの脂肪酸分画においても両群間に有意な差は認められなかった。以上の結果から、肺気腫の初期段階では、肺組織の型肺胞上皮細胞でのElov16の発現が増加することで脂肪酸の鎖長伸長が進み、炭素数16の脂肪酸が減少、炭素数18の脂肪酸が増加することで、肺気腫の病態に影響することが推察された。一方、肺気腫の慢性期では、肺組織の型肺胞上皮細胞におけるElov16は肺気腫発症前の発現レベルに戻り、肺組織における脂肪酸組成にも変化が認められないことが示唆された。

現在、テトラサイクリン誘導性の型肺胞

図4



上皮細胞特異的 Elov16 欠損マウスを作成し、型肺胞上皮細胞における脂肪酸組成と肺気腫、肺線維症の病態形成との関連性について、解析を進めている。

本研究結果から、我々は肺における飽和・不飽和脂肪酸組成の不均衡が肺線維症や肺気腫の病態形成に重要な役割をしており、その組成を調節している Elov16 は呼吸器疾患の重要な標的因子であることを明らかにした。これらの結果から、食事中的脂肪酸の組成やバランス、肥満や痩せ、糖尿病などに伴う体内の脂肪酸組成の変化が病態発症に関わる可能性が考えられ、今後は臨床研究や疫学調査などからその因果関係を解明していく。さらに、脂肪酸組成の変化に伴う肺サーファクタントの量的・質的な変化と肺線維症・肺気腫との関わりや、Elov16 の発現や活性を制御する食事成分、薬剤の解明など、肺疾患予防・治療の新しいアプローチの可能性を検討していきたい。

#### 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 5 件)

(1) Obokata M, Iso T, Ohyama Y, Sunaga H, Kawaguchi T, Matsui H, Iizuka T, Fukuda N, Takamatsu H, Koitabashi N, Funada R, Takama N, Kasama S, Kaneko Y, Yokoyama T, Murakami M, Kurabayashi M Early increase in serum fatty acid binding protein 4 levels in patients with acute myocardial

infarction. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*. 査読有 2017 in press

DOI:10.1177/2048872616683635

(2) Nakahara T, Kawai-Kowase K, Matsui H, Sunaga H, Utsugi T, Iso T, Arai M, Tomono S, Kurabayashi M. Fibroblast growth factor 23 inhibits osteoblastic gene expression and induces osteoprotegerin in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 査読有 253:102-110. 2016.

DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.010

(3) Sunaga H, Matsui H, Anjo S, Syamsunarno MR, Koitabashi N, Iso T, Matsuzaka T, Shimano H, Yokoyama T, Kurabayashi M. Elongation of Long-Chain Fatty Acid Family Member 6 (Elov16)-Driven Fatty Acid Metabolism Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Through AMP-Activated Protein Kinase/Krüppel-Like Factor 4 (AMPK/KLF4) Signaling. *J Am Heart Assoc*. 査読有 5(12). e004014. 2016.

DOI:10.1161/JAHA.116.004014

(4) Putri M, Syamsunarno MR, Iso T, Yamaguchi A, Hanaoka H, Sunaga H, Koitabashi N, Matsui H, Yamazaki C, Kameo S, Tsushima Y, Yokoyama T, Koyama H, Abumrad NA, Kurabayashi M. CD36 is indispensable for thermogenesis under conditions of fasting and cold stress.

*Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 457(4):520-5. 2015

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.12.124

(5) Syamsunarno MR, Iso T, Yamaguchi A, Hanaoka H, Putri M, Obokata M, Sunaga H, Koitabashi N, Matsui H, Maeda K, Endo K, Tsushima Y, Yokoyama T, Kurabayashi M. Fatty Acid Binding Protein 4 and 5 Play a Crucial Role in Thermogenesis under the

Conditions of Fasting and Cold Stress.  
*PLoS One*. 査読有 9(6): e90825. 2014  
DOI: 10.1371/journal.pone.0090825

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 大島奈緒美、松井弘樹、須永浩章、磯達也、倉林正彦、横山知行

Genetic Deletion of Fatty Acid Synthase in Vascular Smooth Muscle Cell Suppresses Injury-induced Neointima Formation in Mice. 第 81 回日本循環器学会総会・学術集会, 金沢, 2017 年 3 月 19 日

(2) Naomi Oshima, Hiroki Matsui, Hiroaki Sunaga, Tatsuya Iso, Clay F. Semenkovich, Tomoyuki Yokoyama, Masahiko Kurabayashi.

Inhibition of fatty acid synthase plays a protective role in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal

formation. American Heart Association Scientific Session 2016. アメリカ(ニューオーリンズ), 2016 年 11 月 14 日

(3) Hiroki Matsui, Hiroaki Sunaga, Tatsuya Iso, Norimichi Koitabashi, Takashi Matsuzaka, Hitoshi Shimano, Tomoyuki Yokoyama, Masahiko Kurabayashi.

Intracellular fatty acid balance regulated by Elovl6 plays a notable phenotypic response of vascular smooth muscle cells via AMPK-KLF4-dependent signaling. American Heart Association Scientific Session 2016. アメリカ(ニューオーリンズ), 2016 年 11 月 13 日

(4) 小出 泰暉、松井 弘樹、須永 浩章、磯 達也、小板橋 紀通、松坂 賢、島野 仁、横山 知行、倉林 正彦.

Disrupted fatty acid composition by Elovl6 regulates phenotypic response of vascular smooth muscle cells: Novel intracellular role of AMPK-KLF4-dependent signaling. 第 80 回日本循環器学会総会・学術集会, 仙台, 2016 年 3 月 20 日

(5)小出 泰暉、松井 弘樹、須永 浩章、磯 達也、倉林 正彦、横山 知行.

Elovl6-modulated long chain fatty acid composition suppresses pulmonary artery smooth muscle cell proliferation.

第 80 回日本循環器学会総会・学術集会, 仙台, 2016 年 3 月 19 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横山 知行 (YOKOYAMA, Tomoyuki)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号: 70312890

### (2) 研究分担者

松井 弘樹 (MATSUI, Hiroki)

群馬大学・大学院保健学研究科・講師

研究者番号: 20431710

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )