

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07041

研究課題名(和文) 心血管病におけるホスホリパーゼA2受容体の役割解明と創薬を目指した基盤研究

研究課題名(英文) Role of phospholipase A2 receptor in cardiovascular disease and drug development

研究代表者

久木山 清貴 (Kugiyama, Kiyotaka)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：00225129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Group V secretory phospholipase A2 (sPLA2)が大動脈解離・破裂およびマクロファージにおけるacetyl LDLのエンドサイトーシスに関与していることを見出した。さらに、sPLA2受容体が自己免疫性心筋炎の発症に関与していること、soluble type sPLA2受容体がcollagen-1刺激性の細胞遊走を抑制することを明らかにした。ヒトsoluble type PLA2受容体の血中濃度測定用の独自のELISAキットを開発した。本キットを用いて、soluble type PLA2受容体血中濃度が心不全の独立したバイオマーカーであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PLA2受容体を標的とする薬剤は線維化・リモデリングを制御することでこれらの疾患の治療薬となることが期待される。さらに可溶性PLA2受容体血中濃度が心血管病の新たなバイオマーカーとなることが期待される。炎症後の急性期線維化による組織修復と慢性期の線維化による臓器リモデリングは、心血管病のみならず他臓器疾患にも広く関与しており、本研究によって得られる知見を他臓器疾患にも応用できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated the role and mechanism of action of secretory phospholipase A2 (sPLA2) and its receptor, PLA2 receptor, in the onset and pathophysiology of cardiovascular disease. That is, we found that Group V sPLA2 is involved in aortic dissection / rupture and endocytosis of acetyl LDL in macrophages. Furthermore, it was clarified that the sPLA2 receptor is involved in the development of autoimmune myocarditis, and that the soluble type sPLA2 receptor suppresses collagen-1-stimulated cell migration. We have developed a unique ELISA kit for measuring the blood concentration of human soluble type PLA2 receptor. Using this kit, it was revealed that soluble PLA2 receptor blood concentration is an independent biomarker of heart failure.

研究分野：循環器内科

キーワード：炎症 心血管病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

Secretory Phospholipase A2 (sPLA₂)によって産生されるアラキドン酸カスケード関連脂質は動脈硬化、血栓、炎症の惹起因子・増悪因子であり多くの心血管病の発症・病態に広く密接に関与している。よってPLA₂のクリアランス作用を有すると考えられているPLA₂受容体の機能を制御することで心血管病の発症を抑制できる可能性がある。PLA₂受容体は膜1回貫通型の糖蛋白質であり、マクロファージマンノース受容体と約70%の高い相同性を示す。PLA₂受容体はヒトでは諸臓器の線維芽細胞、肺胞上皮細胞、腎podocyteに強く発現している。長年PLA₂受容体の生物学的役割は不明であったが、我々によって以下の2つの機能を有することが明らかにされた。1、PLA₂受容体はPLA₂のクリアランス受容体として働きPLA₂の催炎症作用を抑制する。2、PLA₂受容体はPLA₂のクリアランス作用とは無関係に線維化を促す。我々はPLA₂受容体が梗塞部位の線維芽細胞に発現し心筋梗塞後の局所線維化を促すことを発見した。この作用はコラーゲンを介するインテグリンとの共役作用で発揮されているも明らかにした。このようにPLA₂受容体は炎症を抑えるとともに炎症後の線維化を促す作用を有している。炎症とそれに引き続き生じる線維化は急性期の組織修復に必須である。しかしながら慢性期の過度な線維化は組織の破壊と構築の変化につながり様々な臓器障害を惹起する。よってPLA₂受容体機能を時間軸で制御することで、急性期に炎症を抑制し線維化による修復過程を促し、慢性期に過度な線維化促進作用を抑制することができれば、臓器障害の治療薬開発につながる可能性がある。この仮説を心血管病にて検証することを今回の研究の目的とした。PLA₂受容体は炎症を抑えるとともに炎症後の線維化を促す作用を有する。炎症とそれに引き続き生じる線維化は様々な心血管病の共通の病態であり、この一連のプロセスには極めて多数の機能分子が関与し治療標的となる分子は限りなく存在するが、有効な治療薬は未だ開発されてない。そこで、我々はPLA₂受容体のたった1つの分子機能を制御とすることで、炎症と引き続く過度な線維化を予防できると考えた。即ち、急性期にPLA₂受容体機能を強めることで炎症を抑制し線維化を促進させることで組織修復を促し、慢性期にはPLA₂受容体機能をブロックすることで過度な線維化促進作用を抑制することができれば、これらの臓器障害の治療薬開発に繋がると考えた。

2. 研究の目的

- (1) 炎症に引き続く線維化による組織リモデリングが病態の基盤となっている心筋梗塞後心不全、圧負荷後心不全、動脈硬化、肺高血圧症における PLA₂ 受容体の役割を PLA₂ 受容体遺伝子改変マウスモデルを用いて解明する。
- (2) PLA₂ 受容体を標的とする新規の心血管病治療薬を開発するための研究基盤の創出。
- (3) 可溶性 PLA₂ 受容体血中濃度の心血管病バイオマーカーとしての臨床的意義の検討。

3. 研究の方法

- (1) 心血管疾患マウスモデルを作成し、各疾患 phenotype を PLA₂ 受容体遺伝子改変マウスと対照マウスで比較検討することで、PLA₂ 受容体の心血管病における役割を解明する。心筋梗塞後心不全、圧負荷左室肥大、内頸動脈内膜肥厚、肺線維化による肺高血圧症のマウスモデルを作成し、PLA₂ 受容

体遺伝子改変マウスと野生型マウスにおいて病状の程度を比較検討する。tet-ON/OFF システムを有するトランスジェニックマウスを用いて、炎症から線維化の時間軸を考慮してそれぞれのタイミングで PLA2 受容体を過剰発現した場合の効果を検討する。また、線維芽細胞の特異的マーカーである FSP1 遺伝子のプロモーター下に Cre-ERT2 を配置したマウスと PLA2 受容体-flox マウスの交配で作成したタモキシフェン誘導型の PLA2 受容体の conditional KO マウスを用いて、時間軸を考慮した PLA2 受容体のノックダウンの効果も検討する。疾患 phenotype に違いが確認された場合、その機序を細胞および動物個体レベルで明らかにする。

(2) PLA2 受容体を標的とする心血管病治療薬の開発を行う。in vitro および上記心血管病マウスモデルを用いて有効性を検討する。候補薬として以下を検討する。

可溶性 PLA2 受容体の急性期投与が炎症を低下させ線維化を促進することで心血管病の重症度を軽減するかどうかを検討する。PLA2 受容体による線維化促進作用はコラーゲンを介するインテグリンとの共役作用で発揮されていることから、PLA2 受容体 - コラーゲン - インテグリンの crosslink 阻害剤の探索を行い、見出した候補薬の慢性期投与が、PLA2 受容体機能をブロックし慢性期の過度な線維化を抑制するかどうかの検討を、上記心血管疾患マウスモデルを用いて行う。

(3) ヒト血中の可溶性 PLA2 受容体濃度測定のための ELISA を開発し、心血管病におけるバイオマーカーとしての意義を検討する。細胞膜表面の PLA2 受容体は MMP などのプロテアーゼにより shedding され体液中に放出される。可溶性 PLA2 受容体は血中に存在しているが、その意義は不明である。まず血中可溶性 PLA2 受容体濃度の測定のための ELISA キットを開発する。血中可溶性 PLA2 受容体濃度の臨床的意義に関して以下を調べる。1、各心血管疾患に対する特異性、2、重症度を反映するかどうか、3、生命予後の予知因子であるかどうか。上記検討により、各臓器障害のバイオマーカーとしての意義が確立されることが期待される。約 2000 例の心血管症例の血液サンプルを既成しており、これを研究に供する

4. 研究成果

(1) 可溶性 PLA2R は PLA2R 発現による細胞遊走能を抑制することを明らかにした。その機序として、PLA2R-collagen-integrin を基盤とする遊走システムの中で、架橋となる collagen 1 の PLA2R への binding を sPLA2R が competitive に抑制することが関与する。PLA2R は内皮、平滑筋細胞などの血管壁細胞にも発現している。これらの細胞の遊走は動脈硬化病態に重要な役割を有している。よって、可溶性 PLA2R がこれらの血管壁細胞の遊走を制御することで動脈硬化に関与している可能性があり、可溶性 PLA2R は抗動脈硬化薬開発の標的になる。

(2) PLA2R1 欠損の BALB/c マウスを用いた自己免疫性心筋炎モデルを解析した結果、sPLA2 が心筋炎を惹起すること、PLA2R1 が sPLA2 をクリアランスすることで心筋炎を抑制することを見出した。心筋炎の病態に sPLA2 - PLA2R1 が重要な役割を有することを示した。

(3) 大動脈解離は脆弱化した大動脈壁の中膜が突然破断する疾患であり、突然死の原因となるこ

とから、その診断・予防・治療法の開発は解決すべき喫緊の課題である。現状では大動脈解離の対処は発症後の外科的処置に限られており、必ずしも予後良好とは言えず、発症機序の解明と予防法の開発が急務である。sPLA2 群の欠損マウスのうち、sPLA2-V の欠損が大動脈解離を発症しやすいことを見出した。すなわち、アンジオテンシン (Ang-II) を投与しただけでは野生型マウスの動脈は見かけ上影響を受けないが、sPLA2-V 欠損マウスは数日のうちに高頻度で大動脈解離を発症した。sPLA2-V は大動脈内皮細胞に発現しており、Ang-II 刺激依存的に不飽和脂肪酸を遊離してコラーゲン架橋酵素リジロキシダーゼ (LOX) の発現を増強すること、欠損マウスではこの応答が低減するため LOX 発現が低下して大動脈が脆弱化することが明らかとなりつつある。現在、ヒト臨床検体の解析を視野に入れつつ表現型を更に精査中である。更に、sPLA2-III 欠損マウスにおいて CaCl₂ 誘導大動脈瘤モデルが改善することを見出している。

(4) 約 600 例の心疾患症例の血漿を用いて解析した結果、の尿中アルブミン量が多いほど可溶性 PLA2R1 血中濃度が高い傾向を示し、ネフローゼ症候群のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。これらの臨床研究により、本分子がヒト線維芽細胞や podocyte に発現し、その血中濃度が心不全またはネフローゼ症候群のバイオマーカーとなることを発見したことは、当初の想定以上の大きな成果である。この成果を基盤に、PLA2R1 を標的とする循環器疾患の診断および創薬研究を継続する。また、PLA2R1 は組織の線維化促進作用や sPLA2 のクリアランス作用を有していることが明らかとなっている。そこで、炎症に引き続く線維化による組織リモデリングが病態の中心となっている心筋梗塞後心不全、圧負荷心不全、動脈硬化、肺線維症、腎線維症において、血中可溶性 PLA2R1 濃度が診断マーカーとなり得るかどうか検証するとともに、これらの疾患に対する PLA2R1 を標的とする治療薬開発の基盤となった。

(5) sPLA2-V 欠損マクロファージにおいて acetyl LDL のエンドサイトーシスが低下していることを見出した。今回、この細胞生物学的機序を解明した。即ち、sPLA2-V は核内に移行し、phosphoglycerate kinase 1 (Pgk1) 遺伝子の転写領域に結合し Pgk1 発現を増強し、Pgk1-beclin1-class III PI3-kinase pathway の活性化を惹起した。この pathway に c-Src 活性も関与している。その結果、エンドサイトーシスに重要な役割を果たす actin polymerization を増強することによって sPLA2-V は acetyl LDL のエンドサイトーシスを制御していることが判明した。これらの sPLA2-V の作用は非酵素学的活性に依存していることも明らかにした。Pgk1 は低酸素条件下においてはミトコンドリアにおけるピルビン酸の酸化的リン酸化を抑制し、Warburg 効果を促進することが知られている。元来 sPLA2-V はマクロファージにおいて免疫反応に関わっていることを考慮すると、sPLA2-V と Pgk1 の共同作用は immunometabolism 制御における新たな機序を提供するものであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe Y, Watanabe K, Fujioka D, Nakamura K, Nakamura T, Uematsu M,	4. 巻 34
2. 論文標題 Protein S-glutathionylation stimulate adipogenesis by stabilizing C/EBP in 3T3L1 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 5827-5837
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201902575R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujioka D, Watanabe Y, Nakamura T, Yokoyama T, Miyazawa K, Murakami M,	4. 巻 -
2. 論文標題 Group V Secretory Phospholipase A ₂ Regulates Endocytosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.62216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kishi H, Yamaguchi K, Watanabe K, Nakamura K, Fujioka D, Kugiyama K	4. 巻 43
2. 論文標題 Deficiency of Phospholipase A ₂ Receptor Exacerbates Autoimmune	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 1097-1109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10753-020-01195-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe K, Watanabe K, Watanabe Y, Fujioka D, Nakamura T, Nakamura K, Obata	4. 巻 315
2. 論文標題 Human soluble phospholipase A ₂ receptor is an	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 C398-C408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00239.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 和人 (Nakamura Kazuto) (30456488)	山梨大学・大学院総合研究部・助教 (13501)	
研究分担者	渡辺 一広 (Watanabe Kazuhiro) (50535549)	山梨大学・大学院総合研究部・臨床助教 (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------