

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590880

研究課題名（和文） COPDにおける体重減少の原因探究

研究課題名（英文） Research for the mechanism of the body weight loss in patients with chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

高島 典明（TAKABATAKE NORIAKI）

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80344795

研究成果の概要：慢性閉塞性肺疾患（COPD）においては体重が経年的に減少していくことが知られている。これまで我々は secretory Phospholipase A2-II D (PLA2G2D) の遺伝子多型によって COPD の体重が規定されることを報告した (Takabatake et al. 2006)。しかし何故、この遺伝子多型によって、本疾患の体重が規定されるのかは不明であった。本研究によって、この遺伝子の多型によりサイトカイン産生能に有意な差がもたらされることが解明された。これが全身炎症の差に結びつき、結果として体重に差をもたらす可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：COPD、体重減少、PLA2、SNP、喫煙

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は肺機能にて一秒率が70%未満に低下する疾患であり、肺胞壁の破壊および肺胞マクロファージ数の増加を病理的特徴とする。その9割は喫煙が原因であると考えられ、heavy smokerの15%がCOPDに罹患すると言われている。また40歳以上の成人男性の約8%に潜在的なCOPD患者がいるという報告がなされており、統計

学的な予測においても患者数は増加の一途を辿ると考えられている。現在に至っても根治的な治療法は確立されておらず、本疾患の病態を理解し新しい治療法を確立することが急務である。

COPDにおいては悪性疾患のごとく、体重が減少していくことが日常診療では観察され、当疾患における極めて重要な臨床上的特徴となっている。これまでは呼吸筋の仕事量の

増加が摂食の低下と相まってその体重減少が惹起されると考えられてきたが、近年の研究ではそれだけでは体重減少の原因を説明しきれないことが分かってきた。

近年、体質は遺伝子（DNA）の塩基配列の違いによって規定されると考えられており、特にアミノ酸置換をともなう single nucleotide polymorphisms (SNPs)や遺伝子発現制御部位(プロモータ)でのSNPsが様々な疾患の病態を規定することが報告されている。そこで我々は COPD の痩せを規定する原因遺伝子が何であるのかを知るために、山形県内の医療機関において276名の男性 COPD 患者より研究の同意を得た上で血液から DNA を分離し、いくつかの体重を規定する候補遺伝子の SNPs を解析した。その結果、secretory Phospholipase A2-IIID (PLA2G2D)の遺伝子における SNP(NCBI SNP reference: rs584367) のアリルの違いによって COPD の体重が規定されることを発見した。それは PLA2G2D の 80 番目のアミノ酸をグリシンからセリンへの置換をもたらし、COPD 患者に有意な体重減少をもたらすものである。

2 . 研究の目的

本研究は PLA2G2D 遺伝子多型(NCBI SNP reference: rs584367) がどのようにして、COPD 患者の体重減少を規定しているのかという分子生物学的機序を解明することとした。そのために、当 PLA2G2D 遺伝子多型が本酵素の活性に影響を与えるかどうか、当 PLA2G2D 遺伝子多型が体重減少に影響を与えるサイトカインの産生に影響を及ぼすかどうかという点を検討した。

3 . 研究の方法

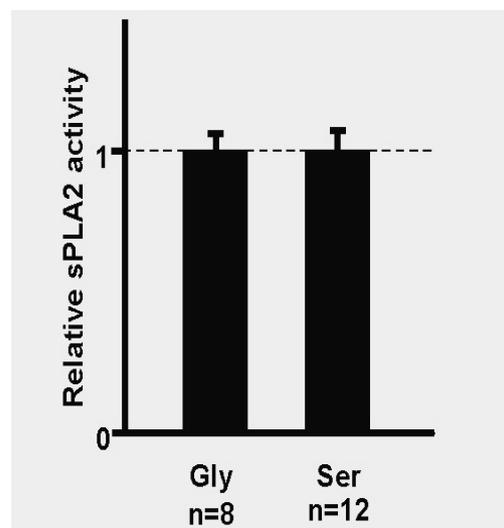
グリシン型蛋白質をコードした PLA2G2D 遺伝子とセリン型蛋白質をコードした PLA2G2D 遺伝子は各々プラスミドベクターに組み込まれた (pPLA2G2D-Gly, pPLA2G2D-Ser)。これらを A549 細胞に GenePotter Transfection

Regent を用いて遺伝子導入した。続けて、ネオマイシンにてセレクションをかけ、プラスミドの遺伝子がゲノムにインテグレートされたクローンのみを拾い上げた。さらに、限界希釈法にて PLA2G2D の高発現細胞株のみ選択し、安定発現細胞株 (A549-PLA2G2D-Gly, A549-PLA2G2D-Ser) を樹立した。この二つの細胞の PLA2 酵素活性と、サイトカインの誘導能を以下の方法で比較検討した。

PLA2 酵素活性の測定

pPLA2G2D-Gly および pPLA2G2D-Ser は各々その open reading frame (ORF) の C 末端側に 6 x Histidine がコードされている。そのため上清中に分泌されたプラスミド由来の PLA2G2D 蛋白質は、Histidine tag にて濃縮することが可能であった。濃縮した PLA2G2D は Cayman 社の soluble PLA2 assay kit にて活性の測定を行った。この assay kit は diheptanoyl-Thio-Phosphatidylcholine を sn-2 位で PLA2 が分解する活性を測定するもので、その分解産物が基質と反応し発色するので、マイクロプレートリーダーで測定した。

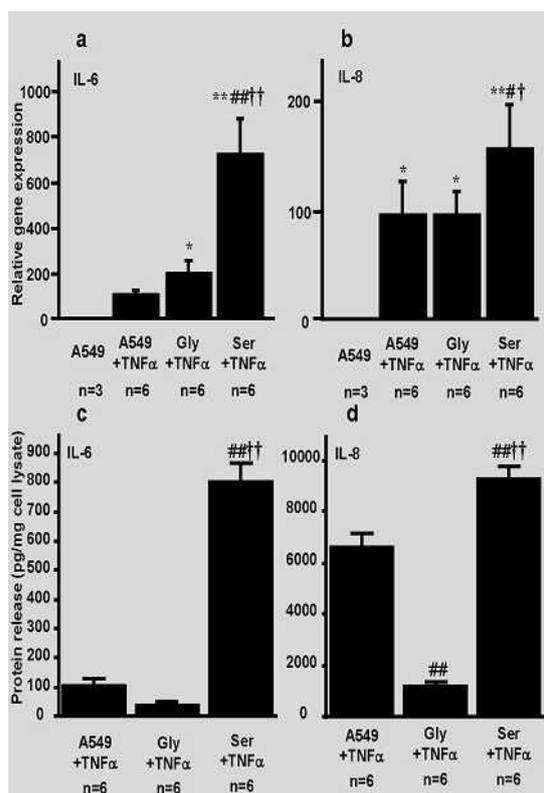
図 1 pPLA2G2D-Gly および pPLA2G2D-Ser に酵素活性の差はなし



PLA2G2D発現A549細胞のTNF- α 産生能の検討

A549-PLA2G2D-Gly と A549-PLA2G2D-Ser より、無刺激下で産生される培養上清中 interleukin (IL)-6, IL-8 をリアルタイム PCR, ELISA にて測定し比較した。また、炎症性の刺激 (TNF- α) および酸化ストレス (H_2O_2) で細胞を刺激したときの IL-6, IL-8 産生量もリアルタイム PCR, ELISA にて測定し、グリシン型とセリン型でどのような差が生じるかを評価した。

図2 pPLA2G2D-Ser は TNF 刺激後のサイトカイン産生を亢進する



4. 研究成果

グリシン型、セリン型細胞株における上清中の PLA2G2D のホスホリパーゼ活性には有意差はなかった。

無刺激の状態におけるセリン型細胞株の自発的 IL-8 の発現はグリシン型細胞株に比べ有意に亢進していた。さらに TNF- α の

刺激を加えることにより、セリン型細胞株において IL-6、IL-8 の発現がグリシン型細胞株に比べ有意に亢進した。 H_2O_2 の刺激では、セリン型細胞株において IL-8 の発現がグリシン型細胞株に比べ有意に亢進した。

COPD 患者では体重減少が進行するが、この体重減少は独立した予後規定因子であり、その原因を理解しコントロールすることは、将来的に COPD 患者に対する治療ターゲットとなりうるものである。以前はこの体重減少は、呼吸仕事量の増加や患者の摂食量の減少に求められたが、近年の研究では、それだけでは、COPD 患者に生じてくる病的なやせを完全には説明できないことが示された。COPD 患者では肺局所以外にも、全身に慢性的な炎症が生じていることが知られており、そのために様々な併存症を生じてくるとされている。そしてこの全身炎症の程度と COPD のやせとの間には強い相関があることが知られていた。

今回の研究では、以前に我々が、COPD 体重減少の規定遺伝子として発見した PLA2G2D 遺伝子が何故そのような体重減少効果を発揮するのかを分子生物学的に検討を加えた。

PLA2G2D はリン脂質分解に関与する酵素である。さらに分泌型のホスホリパーゼであるため、細胞表面のレセプターに結合し、炎症反応を修飾する機能を有している。そのため、PLA2G2D 遺伝子多型が体重減少をもたらす機序として、遺伝子多型の差により酵素活性に差が生じてリン脂質の分解に影響が生じるかどうかということ、並びに炎症反応を修飾する効果が変化してくるかどうかということの評価する必要があった。

今回の検討の結果、PLA2G2D の 80 番目のアミノ酸をもたらす遺伝子多型は、ホスホリパーゼ活性には影響をもたらさないが、ひとつのアミノ酸がグリシンからセリンへ置換されることによって、細胞から産生される炎症性サイトカインの発現が大きく亢進されることが理解された。

以上より、PLA2G2D 第 80 番アミノ酸セリン型のアレルの保有により、COPD 患者では全身炎症が惹起されやすい状態にあることが

示唆され、COPD 患者の体重減少の一機序であると推測された。

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 3 件)

Igarashi A, Shibata Y, Yamauchi K, Osaka D, Takabatake N et al. Gly80Ser Polymorphism of Phospholipase A2-IIID Is Associated with Cytokine Inducibility in A549 Cells. 2009 *Respiration In Press* 査読有

Shibata Y, Abe S, Inoue S, Takabatake N et al. Altered expression of antimicrobial molecules in cigarette smoke-exposed emphysematous mice lungs. 2008 *Respirology* 13:1061-5 査読有

Yamauchi K, Ishikawa T, Shibata Y, Abe S, Inoue S, Tababatake N et al. Enhanced interleukin-10 signaling with 14-member macrolides in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. 2008 *EXCLI J* 7:169-176 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

五十嵐朗、柴田陽光、高嶋典明ら肺細胞における分泌型ホスホリパーゼ A2-IIID の第 80 番目のアミノ酸多型とサイトカイン誘導能との関係 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 2008.06.15 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高嶋 典明 (TAKABATAKE NORIAKI)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80344795

(2) 研究分担者

二藤部 丈司 (NITOBE JOJI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：30400542

高崎 聡 (TAKASAKI SATOSHI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：20400541

宮本 卓也 (MIYAMOTO TAKUYA)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：20447204

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

五十嵐 朗 (IGARASHI AKIRA)

山形大学・医学部・大学院生

木村 友美 (KIMURA TOMOMI)

山形大学・医学部・大学院生

小坂 太祐 (OSAKA DAISUKE)

山形大学・医学部・大学院生