

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08597

研究課題名(和文) 肺胞内脂質の“質”的な環境変化による呼吸器疾患形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) The quality of lipid component of pulmonary surfactant in lung diseases

研究代表者

高宮 里奈 (Takamiya, Rina)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：70365419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、種々の肺疾患モデルマウス(肺胞微石症、喫煙曝露、肺線維症)における脂質や肺サーファクタントの変化を検証することを目的とし、検証を行った。肺胞微石症モデルでは、肺胞に微石の蓄積とCOX-2の発現上昇に伴う炎症性メディエーターの産生の亢進をもたらすが、これらはリン吸着剤の投与により抑制できることを示した。喫煙曝露モデル肺では肺サーファクタント中のSP-Dがカルボニル修飾を受け、これによりタバコ煙による自然免疫機能の低下の一因になることを見出した。プレオマイシン誘発全身強皮症モデルの線維化を受けた肺では、線維化に関わる肺胞II型上皮細胞で特異なPLA2の発現の亢進がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回ターゲットとした肺胞微石症、喫煙曝露モデル、特発性肺線維症は、これまで根本的な治療法が開発されていない難治性呼吸器疾患です。肺胞微石症では、リン吸着剤を用いた治療法や、炎症性の脂質メディエーターが病態の改善のマーカーとなりうる可能性を見出しました。また、喫煙曝露モデルでは、喫煙による自然免疫機能の低下に、肺サーファクタントへのアルデヒドによる修飾が関わることを示しました。特発性肺線維症モデルでは、肺と肺胞洗浄液中での脂質環境変化の違い、また線維化に特異なPLA2の発現があることを見出しました。以上の結果は、今後の治療標的、新たなバイオマーカーの開発につながる研究になると考えます。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed various respiratory diseases models (pulmonary alveolar microlithiasis (PAM), cigarette smoke exposure, and pulmonary fibrosis) to clarify the specific changes of lipid profile and pulmonary surfactant. In PAM model, Npt2b deficient enhanced COX-2 expression, and also induced the production of PGE2. After administration of ferric citrate, the accumulation of microliths and the induction of COX-2 were significantly reduced. In cigarette smoke (CS) exposure model, CS induced aldehyde modification in surfactant protein (SP)-D, which in turn induced structural and functional defects in SP-D. In bleomycin induced systemic sclerosis model in lung, specific PLA2 were induced in the alveolar epithelial type II cells.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺胞微石症 COPD 特発性肺線維症 リピドミクス解析 肺サーファクタント

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外界からの直接的な侵襲を受ける気道や肺は、80%のリン脂質と10%の中性脂質、10%のタンパク質で構成された肺サーファクタントで覆われている。肺サーファクタント量は、II型肺胞上皮細胞による合成・分泌と肺胞マクロファージによる分解のバランスで調節され、そのバランスの異常が呼吸器疾患形成につながることから、様々な呼吸器疾患のバイオマーカーとして使用されてきたが、疾患形成過程におけるサーファクタントの構成成分や機能変化などの“質”の変化に関しては、十分に理解されていなかった。肺サーファクタントの他の主成分であるリン脂質とその代謝産物は多彩な分子種から構成され、その多様性の破綻は呼吸器疾患の形成に影響を及ぼすことが示唆されている。一方で肺胞マクロファージは、3種類のリン脂質代謝酵素、分泌型 PLA₂ (sPLA₂)、リソソーム型 PLA₂ (LPLA₂)、細胞質型 PLA₂ (cPLA₂) を発現している。肺胞マクロファージは、sPLA₂ を放出し、細胞外のリン脂質を代謝し、細胞内に貪食したリン脂質は LPLA₂ により分解する。そしてさらに、肺胞内の病的な環境変化は、cPLA₂ を活性化させ、多様な脂質メデイエーターの産生を亢進させる。そのため、肺胞マクロファージの機能異常は、各 PLA₂ の発現や機能に影響を与えることにより肺サーファクタントの構成成分に変化をもたらし、呼吸器疾患形成に関与することが想定されるが、肺サーファクタントを中心とした肺胞内脂質環境の“質”の変化の分子機構は、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

肺サーファクタントの主成分であるリン脂質の PLA₂ 群による代謝調節機構に着目し、肺胞内脂質環境の“質”的变化が難治性呼吸器疾患の形成過程に与える影響について検証することにより、新たな病態解明や治療標的分子の発見に繋がる基盤研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種肺疾患モデルマウス

Npt2b 欠損マウス (肺胞微石症モデルマウス肺)、喫煙曝露モデルマウス (1日2回、2本ずつ1週間喫煙曝露したマウス肺)、特発性肺線維症モデルマウス (ブレオマイシン塩酸塩をアルゼット浸透圧ポンプを用いて 100mg/kg (0.5 μl/hour) で投与し、肺内に線維化が認められる4週間後の肺) を用い各種検討を行った。

(2) リピドミクス解析

トリプル四重極型高速液体クロマトグラフ質量分析計 (4000Q TRAP LC/MS/MS system) を用いたリピドミクス解析を行った。

(3) 喫煙曝露モデルマウスを用いた aldehyde 修飾を受けた SP-D の検出

カルボニル基に特異的に結合する Aldehyde reactive probe を添加し、ARP 反応蛋白を NeutroAvidine アガロースで ARP 反応タンパクを回収後、抗 SP-D 抗体で western blot を行った。

4. 研究成果

(1) Npt2b 欠損マウスを用いた検証

Npt2b 欠損マウスでは、COX-2 の発現が上昇し、リポドミクス解析の結果からアラキドン酸、EPA、DHA の産生量が亢進していることがわかった (図 1 A)。そこで、次にリン吸着剤である Ferric citrate (1.0 mg/kg) で 35 日間投与したところ、微石の蓄積が改善され、COX-2 の発現も低下していることがわかった (図 1 B)。以上の結果より、リン酸吸着剤は肺胞微石症の病態を改善し、炎症性メディエーターの産生を抑制する効果がある可能性が示唆された。

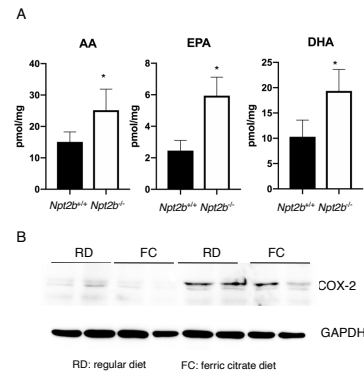


図 1 Npt2b 欠損による COX-2 の発現と、リン吸着剤による治療効果

(2) 喫煙曝露モデルマウスを用いた検証

喫煙曝露後、1 週間の肺では ARP probe を用い ARP に反応したタンパクを回収後、抗 SP-D 抗体で western blot を行った結果、喫煙により ARP 陽性の SP-D が亢進していることがわかった。アルデヒド化した SP-D の機能を調べるため、hSP-D タンパクを精製し、タバコ煙中に含まれる不飽和アルデヒドの中で最もサイズが小さく反応性の高いアルデヒドであるアクロレインや、タバコ煙抽出液 (CSE 10%) を添加し、SP-D による大腸菌の増殖抑制能、マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞の貪食能への影響について検証を行った。その結果、アクロレイン、CSE で曝露した SP-D を添加し、7 時間後の大腸菌の増殖を確認したところ、SP-D は大腸菌増殖抑制能があるのに対し、acrolein や CSE で曝露した SP-D は約 10% 程度にまで抑制能が低下していた (図 2 B)。また、SP-D の RAW264.7 に対する通常の約 1.8 倍の貪食能亢進も、約 1.1~1.2 倍程度にまで低下していた (図 2 C)。これらの結果は、喫煙による自然免疫機能の低下や、自然免疫機能の低下による COPD の発症や増悪に影響を与える可能性があると考えられる。

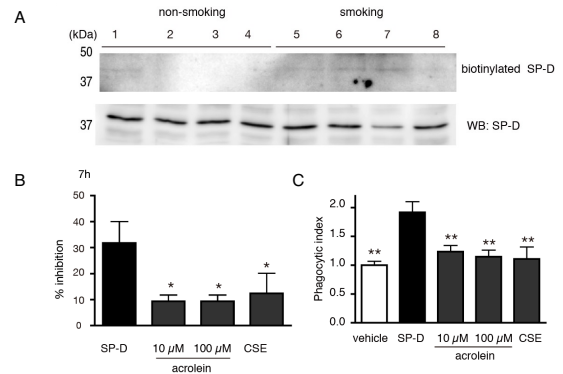


図 2 タバコ煙、アクロレインによる SP-D への修飾と機能への影響

(3) 特発性肺線維症モデルマウスを用いた検証

ブレオマイシン誘発全身強皮症モデルの 4 週間の肺では胸膜直下から肺の線維化が認められた (図 3 A)。この肺を用いリポドミクス解析を行った。その結果、肺組織では、細胞膜の中心的な構成成分であるホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) の全般的な低下と、その代謝産物である遊離脂肪酸 (FFAs)、リゾホスファチジルコリン (LPC)、リゾホスファチジルイノシトール (LPE) の低下が認められた。また、遊離脂肪酸からの炎症性脂質メディエーターである PGE₂、PGD₂、PGJ₂、LXA₄ の産生が亢進していた (図 3 B)。一方、肺胞洗浄液中 (BALF) の解析からは、PC、PE の全般的な低下が認められた一方で、FFAs、LPC、LPE の産生の亢進が認められた。HA または、ブレオマイシン投与後の肺におけるホスホリパーゼ A2 の発現を検証したところ、PC の分解からコリン合成に関わるリン脂質分解酵素の Pnpl6 の発現が高いことがわかった。

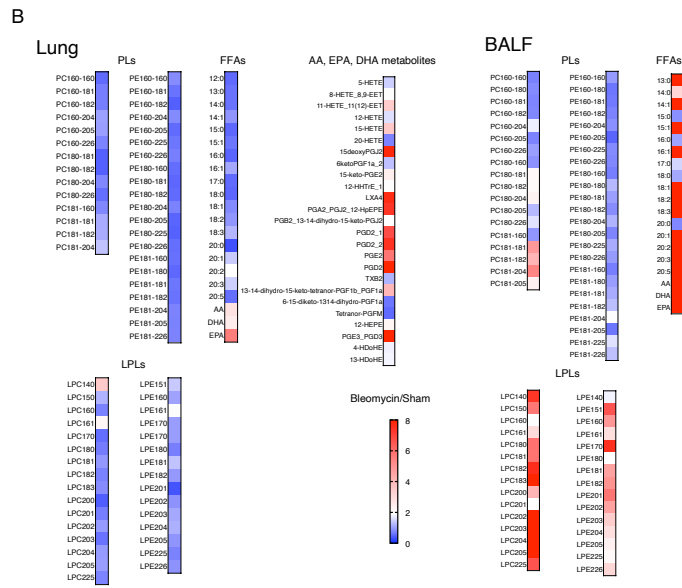
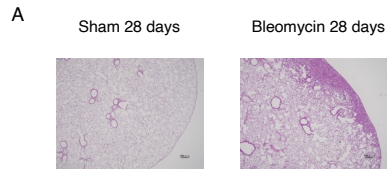


図3 ブレオマイシン誘発全身強皮症モデルの4週間の肺での脂質の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Takamiya Rina, Takahashi Motoko, Maeno Toshitaka, Saito Atsushi, Kato Masaki, Shibata Takahiro, Uchida Koji, Ariki Shigeru, Nakano Miyako	4. 巻 1864
2. 論文標題 Acrolein in cigarette smoke attenuates the innate immune responses mediated by surfactant protein D	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129699 ~ 129699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2020.129699	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 Liang Luyiyun, Takamiya Rina, Miki Yoshimi, Heike Kanako, Taketomi Yoshitaka, Sugimoto Nao, Yamaguchi Midori, Shitara Hiroshi, Nishito Yasumasa, Kobayashi Tetsuyuki, Hirabayashi Tetsuya, Murakami Makoto	4. 巻 36
2. 論文標題 Group IVE cytosolic phospholipase A2 limits psoriatic inflammation by mobilizing the anti-inflammatory lipid N acylethanolamine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101958R	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 Murakami Makoto, Takamiya Rina, Miki Yoshimi, Sugimoto Nao, Nagasaki Yuki, Suzuki-Yamamoto Toshiko, Taketomi Yoshitaka	4. 巻 203
2. 論文標題 Segregated functions of two cytosolic phospholipase A2 isoforms (cPLA2 and cPLA2) in lipid mediator generation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115176 ~ 115176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2022.115176	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6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉本奈央、高宮里奈、三木寿美、宇山徹、上田夏生、李賢哲、横溝岳彦、村上誠
2. 発表標題 cPLA2eは抗炎症性脂質NAEの産生に関わる
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高宮里奈 三木寿美 村上誠 高橋弘毅 齋藤充史
2. 発表標題 肺胞微石症I1b型ナトリウムリン酸共輸送体(Npt2b)欠損マウスを用いた臨床応用に向けた肺胞微石症の病態解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takamiya R, Miki Y, Murakami M, Takahashi H, Saito A
2. 発表標題 The Phosphate Binder Ferric Citrate Attenuates Microlith Formation and COX-2 Induction in a Mouse Model of Pulmonary Alveolar Microlithiasis
3. 学会等名 ICBL2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高宮里奈、有木茂、前野敏孝、齋藤充史、高橋広毅、高橋素子、中の三弥子
2. 発表標題 タバコ煙中のアクロレインが肺サーファクタントタンパク質D(SP-D)の構造、機能への影響
3. 学会等名 第18回肺サーファクタント分子病態研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高宮里奈、有木茂、前野敏孝、齋藤充史、高橋広毅、高橋素子、中の三弥子
2. 発表標題 タバコ煙中のacroleinによる肺サーファクタントタンパク質D (SP- D)の構造、機能への影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高宮里奈、三木寿美、梁陸伊韻、村上誠
2. 発表標題 乾癬時増加する生理活性脂質(NAE)の産生機構と乾癬炎症抑制効果
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

〔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	齋藤 充史 (Saito Atsushi) (00768939)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	

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
---------	---------