

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860051

研究課題名(和文)免疫抑制性sPLA2の機能に関する基盤構築とその創薬に向けた展開

研究課題名(英文)Construction of foundation on the function of the immune suppressive sPLA2 and toward its drug discovery

研究代表者

三木 寿美(MIKI, Yoshimi)

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：00632499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では様々な皮膚疾患におけるsPLA2-IIDの機能を解析し、病態制御における本酵素の免疫抑制作用の普遍性を検討した。IID欠損マウスのリンパ節では構成的に 3脂肪酸代謝物が減少し、乾癬(Th17応答)モデルが増悪したが、IID過剰発現マウスでは真逆の表現型を示した。活性化樹状細胞やリンパ節細胞のTh17サイトカイン産生は 3脂肪酸やその代謝物により抑制された。皮膚癌モデルを適用したIID欠損マウスでは抗腫瘍免疫が賦活化して癌が抑制された。以上より、IIDはリンパ組織において構成的に 3脂肪酸代謝物を動員して炎症病態を改善する一方、癌病態を促進する二面性的役割を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that psoriasis was exacerbated in Pla2g2d-null mice, whereas it was ameliorated in Pla2g2d-overexpressing transgenic mice, relative to littermate wild-type mice. These phenotypes were associated with concomitant alterations in the tissue levels of omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites, which had the capacity to reduce the expression of Th17-type cytokines in dendritic cells or lymph node cells. In the context of cancer, however, Pla2g2d deficiency resulted in marked attenuation of skin carcinogenesis, likely because of the augmented anti-tumor immunity. Altogether, these results underscore a general role of sPLA2-IID as an immunosuppressive sPLA2 that allows the microenvironmental lipid balance toward an anti-inflammatory state, exerting beneficial or detrimental impact depending upon distinct pathophysiological contexts in inflammation and cancer.

研究分野：脂質生化学

キーワード：脂質 ホスホリパーゼ 抗炎症 皮膚疾患 免疫 オメガ3 樹状細胞 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

リン脂質代謝酵素ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) は、脂質メディエーター産生や生体膜リモデリングなどの機能を介して、生体の恒常性の維持や様々な病態において重要な役割を担っている。このうち、細胞外分泌性 PLA₂ (sPLA₂) に属する 11 種の分子種はそれぞれ、特徴的な組織分布を示し、多様なリン脂質に対して異なる基質特異性を持つ。歴史的に sPLA₂ 研究は、そのプロトタイプである sPLA₂-IIA の研究に基づき、“炎症増悪因子”としての概念が定着していた。しかしながら申請者のグループでは、この既成概念にとらわれない sPLA₂ の新しい生体内機能を明らかにしてきた。申請者は従来機能未知であった sPLA₂ 分子種「sPLA₂-IID」に着目し、その発現と機能を明らかとするための研究を行ってきた。その結果、リンパ節の樹状細胞に発現する本酵素はリン脂質のホスファチジルエタノールアミン (PE) から主に 3 脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (DHA) を遊離し、抗炎症性脂質メディエーターの産生を制御することで Th1 免疫応答を抑制することが明らかとなった。

2. 研究の目的

先行研究の結果から、sPLA₂-IID の免疫抑制作用は免疫応答のタイプによらず普遍的であること、sPLA₂-IID の欠損は免疫抑制作用の抑制により癌免疫を賦活化して腫瘍形成を遅らせることが想定される。そこで本研究では、sPLA₂-IID による免疫抑制の普遍性を明らかにし、その欠損による癌免疫賦活化のメカニズムを解明して、本酵素が新たな創薬標的となり得るかについて検討することを目的とした。様々な疾患に対する sPLA₂-IID の欠損または過剰発現の効果を検証すると共に、免疫抑制・癌免疫賦活化を指標とした新規治療戦略を模索した。

3. 研究の方法

本研究では、以下の方法で申請者がこれまでに推進してきた sPLA₂-IID の機能解析をさらに展開した。

(1) sPLA₂-IID の免疫抑制作用の普遍性

sPLA₂-IID 遺伝子欠損 (KO) および全身性過剰発現 (TG) マウスに対し、Th2 応答依存的な喘息・Th17 応答依存的な乾癬・慢性炎症を反映するメタボリックシンドロームモデルなどを適用することで、sPLA₂-IID 依存的な炎症抑制性脂質 (特に 3 脂肪酸) の産生に着目した本酵素の免疫抑制作用の全貌を解明する。

(2) sPLA₂-IID 欠損による癌免疫賦活化

sPLA₂-IID KO および TG マウスに皮膚癌・大腸癌・癌転移モデルなどを適用し、sPLA₂-IID による脂質代謝と免疫応答・腫瘍形成・癌転移の関連を検証する。

(3) ヒト免疫疾患との関連性および臨床治療への検討

各種ヒト炎症免疫疾患における sPLA₂-IID の発現を調べ、病態の進行度との相関性を明らかにする。さらに、ヒト初代培養細胞または疾患モデルマウスに sPLA₂-IID あるいはその脂質代謝産物や阻害薬を投与し、病態に対する薬効・治療予防効果を調べる。

4. 研究成果

(1) sPLA₂-IID KO マウス乾癬モデル

sPLA₂-IID と Th17 免疫応答との関連を検証するため、Th17 応答依存的な慢性皮膚疾患であるイミキモド (IMQ) 誘導乾癬モデルを sPLA₂-IID KO マウスに適用してその表現型を精査した。その結果、KO マウスでは乾癬誘導後の皮膚の肥厚が野生型マウスと比較して増悪し、皮膚及びリンパ節における Th17 サイトカイン発現の誘導が亢進し、野生型マウスで見られる Th17 産生 T 細胞の割合の皮膚への浸潤が亢進した。皮膚のリピドミクス解析を行うと、6 脂肪酸のアラキドン酸代謝物は野生型と KO とで差が無いのに対し、エイコサペンタエン酸 (EPA) や DHA といった 3 脂肪酸由来の代謝物は野生型マウスと比べて KO マウスで減少していた。

(2) sPLA₂-IID TG マウス乾癬モデル

(1) の結果をさらに検証するため、全身性 sPLA₂-IID TG マウスに乾癬モデルを適用した。定常状態における TG マウスのリンパ節のリピドミクス解析を行うと、構成的に高度不飽和脂肪酸および 3 脂肪酸代謝物が選択的に増加しており、6 脂肪酸代謝物には差が認められなかった。乾癬を誘導した TG マウスの皮膚では、皮膚肥厚と Th17 サイトカインの発現および Th17 サイトカイン産生 T 細胞の増加が野生型マウスと比べて抑制され、KO マウスとは真逆の表現型を示すことが分かった。

(3) Th17 応答に対する脂質メディエーターの効果

sPLA₂-IID により産生される各種脂質メディエーターの効果を検討するため、乾癬を誘導したマウスのリンパ節細胞を *ex vivo* で培養した結果、3 脂肪酸代謝物の 1 つである RvD1 によって Th17 サイトカイン産生が有意に抑制された。また、骨髄由来樹状細胞を *ex vivo* で IMQ 刺激した際の炎症マーカー (IL-23) の発現を見ると、多くの 3 脂肪酸代謝物で発現誘導が抑制され、高度不飽和脂肪酸によっても抑制傾向が見られたが、ほとんどの 6 脂肪酸代謝物は効果が無かった。

これらの結果から、sPLA₂-IID は 3 脂肪酸由来の抗炎症性脂質メディエーターを動員して Th17 免疫応答を抑制することで、炎症病態を改善することが明らかとなった。

(4) sPLA₂-IID KO マウス皮膚癌モデル

皮膚化学発癌モデルを KO マウスに適用した結果、癌誘導後 24 週における腫瘍形成数が野生型より減少し、腫瘍体積が有意に抑制され、腫瘍形成時期が遅延した。腫瘍形成早期の 4 週の KO マウスでは、野生型マウスと

比較して皮膚の炎症が减弱し、腫瘍形成抑制に働く M1 様マクロファージ細胞障害性 T 細胞が増加し、M1 マクロファージの増加は定常状態から見られることが分かった。一方、腫瘍形成促進に働く M2 様マクロファージは定常状態の K0 マウスで減少したことから、sPLA₂-IID は M2 マクロファージを増やす作用があるものと考えられた。この結果から、sPLA₂-IID K0 マウスでは、構成的に 3 脂肪酸が減少することで抗腫瘍免疫が賦活化し、腫瘍形成が抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、sPLA₂-IID は主な発現組織であるリンパ組織において 3 脂肪酸のバランスを構成的に調節することで、炎症性疾患を抑制することで炎症病態の改善に、抗腫瘍免疫を抑制することで癌病態の増悪に働く二面性をもつものと結論した。この二面性を応用すれば、sPLA₂-IID リコンビナントタンパクまたはその代謝産物は免疫抑制薬として炎症性疾患の治療に、本酵素の阻害薬あるいは中和抗体は免疫賦活薬として癌治療に展開できるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- (1) Miki Y, Kidoguchi Y, Sato M, Taketomi Y, Taya C, Muramatsu K, Gelb MH, Yamamoto K, and Murakami M. (2016) Dual roles of group IID phospholipase A₂ in inflammation and cancer. doi: 10.1074/jbc.M116.734624. *J. Biol. Chem.*, in press
- (2) Yamamoto K, Miki Y, Sato H, Nishito Y, Gelb MH, Taketomi Y, and Murakami M. (2016) Expression and function of group IIE phospholipase A₂ in mouse skin. doi: 10.1074/jbc.M116.734657. *J. Biol. Chem.*, in press
- (3) Yamamoto K, Miki Y, Sato M, Taketomi Y, Nishito Y, Taya C, Muramatsu K, Ikeda K, Nakanishi H, Taguchi R, Kambe N, Kabashima K, Lambeau G, Gelb MH, and Murakami M. (2015) The role of group IIF-secreted phospholipase A₂ in epidermal homeostasis and hyperplasia. doi: 10.1084/jem.20141904. *J. Exp. Med.*, 212, 1901-1919 (査読有)
- (4) Vijay R, Gelb MH, Miki Y, Yamamoto K, Murakami M, and Perlman S. (2015) Critical role for secreted Phospholipase A₂ group IID in age-related susceptibility to infection with the severe acute respiratory syndrome coronavirus. doi:10.1084/jem.20150632. *J. Exp. Med.*, 212, 1851-1868 (査読有)
- (5) Murakami M, Sato H, Miki Y, Yamamoto K, and Taketomi Y. (2015) A New Era of Secreted Phospholipase A₂ (sPLA₂).

doi: 10.1194/jlr.R058123. *J. Lipid Res.*, 56, 1248-1261 (Review) (査読有)

- (6) 三木 寿美, 山本 圭, 村上 誠. (2015) 接触皮膚炎と抗炎症脂質メディエーター. **臨床免疫・アレルギー科**, 63, 156-163 (総説)(査読有)
- (7) Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Yamamoto K, and Lambeau G. (2014) Emerging roles of secreted phospholipase A₂ enzymes: the 3rd edition. doi: 10.1016/j.biochi.2014.09.003. *Biochimie.*, 107 Pt A, 105-113 (Review) (査読有)
- (8) 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 MH, and Murakami M. (2014) The adipocyte-inducible secreted phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E play distinct roles in obesity. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.002. *Cell Metab.*, 20, 119-132 (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

- (1) 城戸口 優, 山本 圭, 三木 寿美, 村上 誠. 癌病態における IID 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ の役割. **BMB2015**, 2015.12.1-4, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) (共著).
- (2) Yamamoto K, Miki Y, Taketomi Y, Kambe N, Kabashima K, Lambeau G, Gelb MH, and Murakami M. Plasmalogen-lysophosphatidylethanolamine driven by group IIF sPLA₂ underlies epidermal-hyperplastic disorders. **The 14th International Conference on Bioactive Lipids in Inflammation, Cancer and Related Diseases**, 2015.7.12-15, Budapest (Hungary) (coauthor).
- (3) 山本 圭, 三木 寿美, 村上 誠. IIF 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ により産生されるアルケニル型リゾホスファチジルエタノールアミンは表皮肥厚性疾患の新規バイオマーカーである. **第 57 回日本脂質生化学会**, 2015.5.28-29, 一橋大学一橋講堂 (東京都千代田区) (共著).
- (4) 三木 寿美, 山本 圭, 村上 誠. IID 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は乾癬を抑制する. **日本薬学会第 135 年会**, 2015.3.25-28, 神戸学院大学他 (兵庫県神戸市).
- (5) Miki Y, Yamamoto K, and Murakami M. Group IID phospholipase sPLA₂ resolves psoriasis by driving anti-inflammatory pro-resolving lipid mediators. **The 6th international conference on**

- Phospholipase A₂ and Lipid Mediators from bench to translational medicine.***
2015.2.10-12, Keio Plaza Hotel (Shinjuku, Tokyo).
- (6) Yamamoto K, Miki Y, Taketomi Y, Kambe N, Kabashima K, Lambeau G, Gelb MH, and Murakami M. A unique lipid pathway driven by group IIF sPLA₂ underlies epidermal-hyperplastic disorders. ***The 6th international conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators from bench to translational medicine.*** 2015.2.10-12, Keio Plaza Hotel (Shinjuku, Tokyo) (coauthor).
- (7) Yamamoto K, Miki Y, Sato H, and Murakami M. Group IIF sPLA₂ promotes skin carcinogenesis. ***The 6th international conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators from bench to translational medicine.*** 2015.2.10-12, Keio Plaza Hotel (Shinjuku, Tokyo) (coauthor).
- (8) Murakami M, Taketomi Y, Sato H, Miki Y, Hirabayashi T, and Yamamoto K. New insights into PLA₂s: from outside and inside. ***The 6th international conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators from bench to translational medicine.*** 2015.2.10-12, Keio Plaza Hotel (Shinjuku, Tokyo) (coauthor).
- (9) Yamamoto K, Miki Y, Taketomi Y, Murakami M. Secreted phospholipase PLA2G2F regulates epidermal homeostasis and hyperplastic diseases by mobilizing unique lipid products. ***2014 YONSEI BK21 PLUS-IGAKUKEN Joint Symposium "Transnational Exchange of Science between Korea and Japan"***. 2014.6.19-22, Seoul (Korea) (coauthor).
- (10) Murakami M, Taketomi Y, Sato H, Miki Y, and Yamamoto K. Phospholipase A₂ and Lipid Mediators in Health and Disease. ***2014 YONSEI BK21 PLUS-IGAKUKEN Joint Symposium "Transnational Exchange of Science between Korea and Japan"***. 2014.6.19-22, Seoul (Korea) (coauthor).

〔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〕

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 寿美 (MIKI, Yoshimi)

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：00632499

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし