

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09643

研究課題名(和文) 脂肪酸組成バランスとストレス誘導因子Sestrinによる肺気腫化・線維化の解明

研究課題名(英文) The role of fatty acid composition and Sestrin in progression of pulmonary emphysema.

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) 3,600,000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欠損マウスを用いて検討した。Elovl6欠損マウスでは肺でのSestrin-1,2,3発現はいずれも野生型マウスと比較して低下し、喫煙曝露によりその低下は顕著となった。一方、RNAシーケンスによる遺伝子発現の網羅的スクリーニングを行った結果、SerpinA1に着目し、Elovl6欠損マウスの肝臓においてSerpinA1のタンパク発現が著明に低下し、血中の1-アンチトリプシンの濃度も著明に低下することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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欠損マウスを用いて検討した。Elovl6欠損マウスでは1-アンチトリプシンの血中濃度低下に伴って先天性の肺気腫様病変を呈し、さらに、喫煙曝露によって、1-アンチトリプシンの活性が低下して肺気腫病変が増悪した可能性がある。したがって、肝臓での脂肪酸バランス変化が血中の1-アンチトリプシン活性を制御することで肺疾患の発症・進展に起因することが示唆され、肺気腫の新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

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 lung tissues of Elovl6-deficient mice, the expressions of Sestrin-1, -2 and -3 were reduced in Elovl6-deficient mice, and those reductions were more significant in mice exposed to tobacco. Meanwhile, as a result of comprehensive screening of gene expression by RNA sequence, we pay attention on SerpinA1. We found that the expression of SerpinA1 in the liver of Elovl6-deficient mice was significantly reduced, and the serum concentration of Elovl6-deficient mice was also decreased in comparison with those in control mice.

研究分野：循環器内科

キーワード：遊離脂肪酸 Elovl6 肺気腫 Sestrin 1アンチトリプシン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遊離脂肪酸は飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸を含むが、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。しかし、肺胞上皮細胞での脂肪酸分画の質的变化と呼吸器疾患との関わりについては報告がない。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)。Elovl6 は肺組織にも発現することから、申請者らは肺における 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、Elovl6 はII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で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、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II型肺胞上皮細胞における酸化ストレスの亢進や、TGF- β 1 の発現やアポトーシスを誘導することも明らかにした(Sunaga H. et al. *Nat Commun.* 2013)。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。そこで、喫煙による肺気腫モデルマウスを作製したところ、肺胞上皮での Elovl6 発現亢進とパルミチン酸の減少、オレイン酸の増加を認めた。したがって、肺においても Elovl6 の発現亢進・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、肺気腫および肺線維症の発症、進展に強く作用していることが示された。

一方、申請者らは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も検討してきた。Elovl6 欠損マウスの大腿動脈ではワイヤー傷害後の新生内膜肥厚が著明に抑制され、培養血管平滑筋細胞での Elovl6 発現を枯渇させると、p53, p21 の発現誘導および mTOR の発現低下を介した増殖能の著明な抑制とともに、活性酸素種(ROS)の産生増加、ストレス誘導因子 Sestrin1,2 の発現増加および AMPK の活性化が認められた。一方、Sestrin3 の発現は低下していた。したがって、Elovl6 欠損による細胞増殖能抑制の機序として細胞内脂肪酸組成の変化による ROS の産生亢進と Sestrin/AMPK 経路の活性化が重要と考えられた。

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、4つの課題を主目的に研究を進める。

- ① II型肺胞上皮特異的に Elovl6 発現を欠損したマウスを用いて肺気腫の病態モデル動物を作製し、肺での Sestrin の発現局在/AMPK 活性/mTOR 活性と脂肪酸分画、酸化還元状態および病態との関係を比較検討する。
- ② Elovl6 あるいは Sestrin 遺伝子発現を培養II型肺胞上皮細胞で過剰発現あるいはノックダウンさせ、Elovl6 と Sestrin の相互作用を細胞レベルで解明する。
- ③ Elovl6 欠損マウスおよびコントロールマウス肺から RNA を抽出して、RNA シークエンスによる遺伝子発現の網羅的スクリーニングを行い、肺気腫進展に関わる遺伝子を明らかにする。
- ④ 上記の網羅的スクリーニングから明らかになった Elovl6 と肺気腫進展に関わる遺伝子の発現を病態モデルおよび培養II型肺胞上皮細胞で詳細に検討し、Sestrin 発現との関連および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。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 H₂O 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 マウス肺組織からの RNA 抽出

マウス肺組織から以下の方法で RNA を抽出した。2.0ml チューブに ISOPLUS 試薬(TaKaRa)を 1.5ml ずつ分注し、粉碎した肺組織を、スパチュラを用いて約 2 杯分ずつ加えて、軽くボルテックスした。20～30 秒間ソニケーションを行った後、クロロホルム 300 μ l を添加し、約 20 秒ボルテックスをかけ、室温 3 分静置した。これを 14,000rpm、4 $^{\circ}$ C、20 分遠心分離し、上清(約 800 μ l)を新たな 1.5ml チューブに移し、さらにイソプロパノール 600 μ l を加えてボルテックスし、室温 5 分静置した。その後 14,000rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分遠心分離し、デカンテーション後、75%エタノール 1ml を加えて 14,000rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分遠心分離した。再び上清をデカンテーションし、RNA の沈殿物を風乾させ、適量の蒸留水で溶解し、吸光度計(260nm)により RNA 濃度測定を行った

③ マウス肺組織からの脂質抽出と脂肪酸分画の測定

氷冷した 1M NaCl 250 μ l を 1.5ml チューブに分注し、粉碎した肺組織をスパチュラ 3～4 杯分ずつ加えて、軽くボルテックスをかけ懸濁させた。氷冷したクロロホルム、メタノール混合液(クロロホルム:メタノール=1:2)を 750 μ l 添加し、20 秒間で約 2 回、細胞塊が確認できなくなるまでソニケーションを行った。各サンプルに 1M NaCl 250 μ l を添加し、ボルテックスしてよく混和した。さらに、分離した水層と油層にクロロホルム 250 μ l を添加し、転倒混和した。氷上で 10 分間静置し、5,000rpm、室温、5 分間遠心した後、上層である水層をピペットにて吸い取った。さらに、2,000rpm、室温、1 分間遠心し、下層であるクロロホルムを新しい試験管に移した。窒素ガスを用いてサンプルを乾固させ、試験管に栓をした状態で-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。脂肪酸分画の測定(ガスクロマトグラフィー法)は、SRL(東京)に委託した。

④ Elovl6 のアデノウイルス発現ベクターの作成

まず、マウスの肝臓の RNA を用いて、RT-PCR 法により目的の cDNA を得た。次に、NCBI より検索したマウス Elovl6 (Accession No. NM_130450) のコード配列から、PCR に用いるプライマーの設計を行った。5' 末端の開始コドンの前に Nhe I サイト、3' 末端の停止コドンの後に Xba I サイトを設定し、プライマーを設定した。

⑤ Elovl6 の過剰発現による検討

アデノウイルスによる過剰発現のため、Ad-Elovl6、コントロールとして Ad-LacZ をそれぞれ培養細胞へ添加した。48 時間培養した後、RNA を抽出し、定量的 PCR を行った。

⑥ siRNA を用いた Elovl6 ノックダウンによる実験

siRNA を用いて、MLE12 の内因性 Elovl6 がノックダウンした状態における LPCAT1 の mRNA 発現変化を検討した。Elovl6 の siRNA の作製は、株式会社ボナック (福岡、日本)にデザインおよびカスタム siRNA(21 塩基)の合成を依頼した。コントロールには siGFP を用いた。

⑦ RNA シークエンス

野生方マウスおよび Elovl6 欠損マウスに、6ヶ月の喫煙曝露処置を施した群、施していない群の肺サンプル、それぞれ2検体ずつ合計8検体を用いて、RNAシークエンスを実施した。まず、それぞれのマウス肺組織から上述の方法でRNAを抽出した後、RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN USA)を用いて、RNA を精製した。NanoDrop および BioAnalyzer の測定結果により、使用サンプルの Total RNA の QC が A260/280 1.5～2.0, A260/230 1.0 以上、RNA Integrity Number(RIN 値)7以上であることを確認した。RNA サンプルは株式会社 DNA チップ研究所(東京)へ依頼し、シークエンス用のライブラリ

一作成から HiSeq によるシーケンス、バイオインフォマティクス解析によるデータの正規化、発現変動遺伝子の抽出まで解析していただいた。

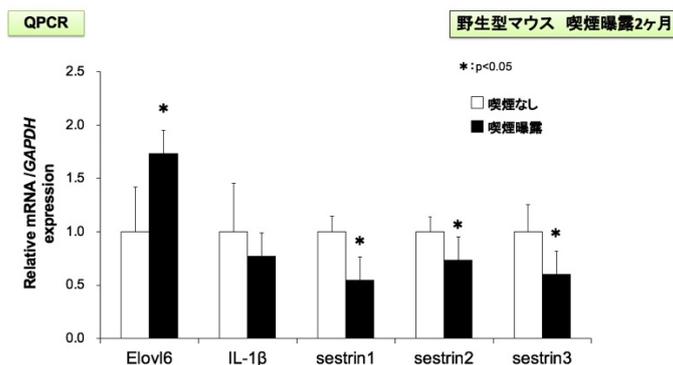
⑧ 酵素結合免疫吸着測定法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay : ELISA)

酵素結合免疫吸着測定法は、Mouse Alpha1 Antitrypsin ELISA Kit (Abcam:米国)を用いて行った。

4. 研究成果

まず、正常マウス肺のⅡ型肺胞上皮細胞に Elov16 の発現を認めた。さらに、喫煙曝露 2 ヶ月のマウス肺では Elov16 の発現増加を認め、喫煙曝露 6 ヶ月では Elov16 の発現増加は認められず、正常なマウス肺組織での発現とほぼ同等であった。また、喫煙曝露 2 ヶ月のマウス肺では Elov16 mRNA の著明な発現増加が認められたのに対し、喫煙曝露 6 ヶ月では Elov16 mRNA の発現は非喫煙群とでは差が認められなかった。さらに、喫煙曝露 2 ヶ月のマウス肺では、パルミチン酸分画の減少、オレイン酸分画の増加が認められたのに対し、喫煙曝露 6 ヶ月ではパルミチン酸分画、オレイン酸分画ともに非喫煙群と変化は認められなかった。喫煙曝露により Elov16 の発現や脂肪酸組成が変化することから、Elov16 欠損マウスに喫煙曝露させたところ、野生型マウスよりも早期に肺気腫様病変を発症し、かつ病変も増悪していた。本研究では、その作用機序を明らかにするため、ストレス誘導因子の Sestrin 発現と AMP-activated protein kinase (AMPK)、mammalian target of rapamycin (mTOR) 活性に着目した。Elov16 欠損マウスでは肺での Sestrin-1,2,3 発現はいずれも野生型マウスと比較して、Elov16 欠損マウスで低下し、喫煙曝露によりその低下は顕著になった(図 1)。

図 1



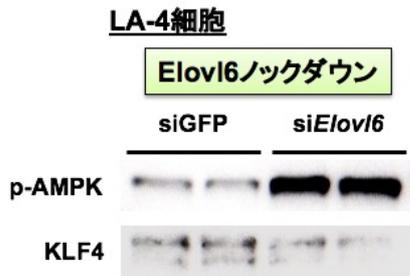
一方、肺でのリン酸化 AMPK および KLF4 発現は喫煙曝露で亢進し、Elov16 欠損マウスでも亢進していた(図 2,3)。

図 2,3



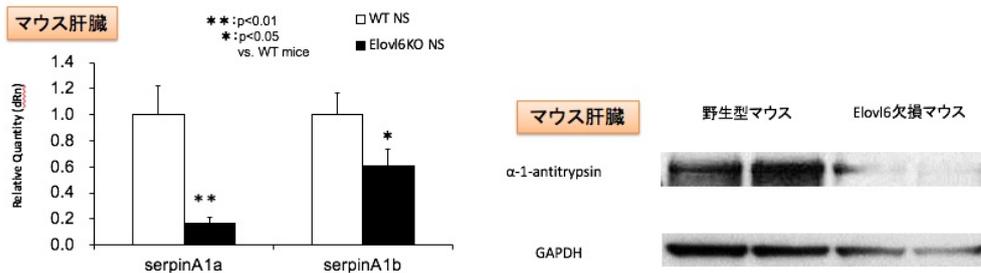
また、培養肺胞上皮細胞で Elov16 発現をノックダウンすると AMPK 活性は著増しており、病態との関係を検討中である(図 4)。

図 4



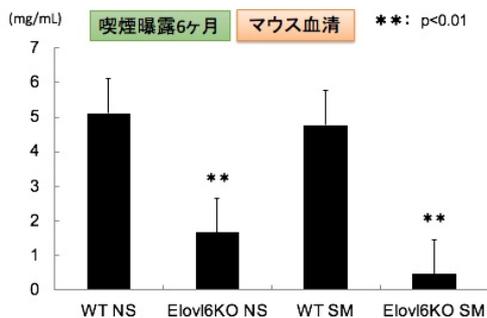
また、Elov6 の欠損により、野生型マウスに比して炭素数 16 の脂肪酸が増加、炭素数 18 の脂肪酸が減少するが、野生型マウスと Elov6 欠損マウスの両群で、喫煙による脂肪酸組成の変化は認められず、長期喫煙曝露による Elov6 欠損マウスでの肺気腫増悪と脂肪酸組成の変化との関連性については明らかではなかった。そこで、両群のマウス肺から RNA を抽出して、RNA シークエンスによる遺伝子発現の網羅的スクリーニングを行った。その結果、喫煙の有無に関わらず野生型マウスと比較して、Elov6 欠損マウスで SerpinA1 という遺伝子発現が著明に増加していた。しかし、今回の実験では、マウスの肺での SerpinA1 の遺伝子発現を定量することが出来なかった。一方、 α 1-アンチトリプシンの主要な産生臓器である肝臓では Elov6 欠損マウスで SerpinA1 の発現が著明に低下していることが明らかとなった(図 5,6)。

図 5,6



また、血中の α 1-アンチトリプシンの濃度も Elov6 欠損マウスで著明に低下していた(図 7)。

図 7



以上の結果から、Elov6 欠損マウスでは α 1-アンチトリプシンの血中濃度の低下に伴って先天性の肺気腫様病変を呈し、さらに、Elov6 欠損マウスに喫煙曝露をさせることで、 α 1-アンチトリプシンの活性がさらに低下してより肺気腫が悪化する可能性が示唆された。今後は、Elov6 による脂肪酸組成バランス変化が肝臓での α 1-アンチトリプシン産生と肺での作用に与える影響を検討することで、肝臓を標的とした新たな肺気腫の病態メカニズムを解明し新規の予防・治療戦略を構築する。

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 2件）

1. 著者名 Iso, T. Haruyama, H. Sunaga, H. Matsui, H. Matsui, M. Tanaka, R. Umbarawan, Y. Syamsunarno, Mraa Putri, M. Yamaguchi, A. Hanaoka, H. Negishi, K. Yokoyama, T. Kurabayashi, M.	4. 巻 6
2. 論文標題 CD36 is indispensable for nutrient homeostasis and endurance exercise capacity during prolonged fasting	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiol Rep	6. 最初と最後の頁 e13884
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.13884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masaru Obokata, Tatsuya Iso, Yoshiaki Ohyama, Hiroaki Sunaga, Tomoka Kawaguchi, Hiroki Matsui, Takashi Iizuka, Nobuaki Fukuda, Hiroto Takamatsu, Norimichi Koitabashi, Ryuichi Funada, Noriaki Takama, Shu Kasama, Yoshiaki Kaneko, Tomoyuki Yokoyama, Masami Murakami and Masahiko Kurabayashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Early increase in serum fatty acid binding protein 4 levels in patients with acute myocardial infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur Heart J; Acute Cardiovasc Care	6. 最初と最後の頁 561-569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2048872616683635	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 Iso T, Sunaga H, Matsui H, Kasama S, Oshima N, Haruyama H, Furukawa N, Nakajima K, Machida T, Murakami M, Yokoyama T, Kurabayashi M.	4. 巻 50
2. 論文標題 Serum levels of fatty acid binding protein 4 and fat metabolic markers in relation to catecholamines following exercise	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 896-902
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.clinbiochem.2017.05.021	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 Sunaga H, Koitabashi N, Iso T, Matsui H, Obokata M, Kawakami R, Murakami M, Yokoyama T, Kurabayashi M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Activation of cardiac AMPK-FGF21 feed-forward loop in acute myocardial infarction: Role of adrenergic overdrive and lipolysis byproducts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41598-019-48356-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Sunaga,H. Iso,T.MKoitabashi,N. Shimano,H.Yokoyama,T.Kurabayashi,M.
2. 発表標題 Elov16-driven Fatty Acid Metabolism Regulates Hypertrophic Response in the Heart Subjected to Pressure Overload in Mice
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mtsui,H. Sunaga,H. Umrarawan,Y. Iso,T. Koitabashi,N. Matsuzaka,T, Shimano,H. Yokoyama,T. Kurabayashi,M.
2. 発表標題 Genetic Deletion of Elov16 in Cardiac Myocytes Suppresses Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Remodeling Through Activation of AMPK/KLF4 Signaling
3. 学会等名 American Heart Association, Scientific Sessions, 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井 弘樹, 須永 浩章, 倉林 正彦, 横山 知行.
2. 発表標題 肺気腫病変にもたらず脂肪酸組成と調節酵素Elov16の病態意義
3. 学会等名 第64回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井 弘樹, 須永 浩章, 齊藤 美希, 前野 敏孝, 磯 達也, 倉林 正彦, 横山 知行.
2. 発表標題 喫煙曝露の肺における脂肪酸組成およびElov16の発現変化と病態意義
3. 学会等名 第24回日本未病システム学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井 弘樹, 須永 浩章, 上野 学, 前野 敏孝, 磯 達也, 松坂 賢, 島野 仁, 倉林 正彦, 横山 知行
2. 発表標題 肺線維症・肺気腫の発症における脂質バランス異常の意義
3. 学会等名 第53回サーファクタント関連医学会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroaki Sunaga, Norimichi Koitabashi, Hiroki Matsui, Tatsuya Iso, Nozomi Furukawa, Ryo Kawakami, Tomoyuki Yokoyama, Masahiko Kurabayashi.
2. 発表標題 Serum Free Fatty Acid Composition as a Critical Regulator for Cardiac Fibroblast Growth Factor 21 Production in Patients with Acute Myocardial Infarction.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session (AHA) 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayaka Tadaki, Hiroki Matsui, Hiroaki Sunaga, Yogi Umbarawan, Nozomi Furukawa, Tatsuya Iso, Norimichi Koitabashi, Takashi Matsuzaka, Hitoshi Shimano, Masahiko Kurabayashi, Tomoyuki Yokoyama.
2. 発表標題 Changes in fatty acid composition by Elovl6 ameliorates pressure overload-induced cardiac remodeling through maintenance of mitochondrial integrity in cardiac myocyte.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session (AHA) 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須永 浩章, 齊藤 美希, 松井 弘樹, 前野 敏孝, 増淵 裕朗, 磯 達也, 倉林正彦, 横山 知行.
2. 発表標題 喫煙曝露肺気腫モデルにおける脂肪酸組成および脂肪酸伸長酵素Elovl6の病態意義.
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayaka Tadaki, Hiroki Matsui, Hiroaki Sunaga, Yogi Umbarawan, Nozomi Furukawa, Tatsuya Iso, Norimichi Koitabashi, Takashi Matsuzaka, Hitoshi Shimano, Tomoyuki Yokoyama, Masahiko Kurabayashi.
2. 発表標題 Deranged fatty acid composition by Elovl6 regulates cardiac inflammation and fibrosis after pressure overload in mice.
3. 学会等名 第83回日本循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yurie Kon, Hiroki Matsui, Hiroaki Sunaga, Nozomi Furukawa, Norimichi Koitabashi, Tatsuya Iso, Tomoyuki Yokoyama, Masahiko Kurabayashi.
2. 発表標題 AMPK-KLF4 signaling activated by the change of intracellular FA composition regulates mitochondrial integrity.
3. 学会等名 第83回日本循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2019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	前野 敏孝 (Maeno Toshitaka) (00436297)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 (12301)	
研究分担者	須永 浩章 (Sunaga Hiroaki) (10760077)	群馬大学・大学院医学系研究科・研究員 (12301)	
研究分担者	松井 弘樹 (Matsui Hiroki) (20431710)	群馬大学・大学院保健学研究科・准教授 (12301)	