

令和元年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16043

研究課題名(和文)炎症時に活性化される脂質生成酵素LPCAT2の気管支喘息における役割の検討

研究課題名(英文)The role of LPCAT2 in asthma

研究代表者

垂井 愛 (TARUI, MEGUMI)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：40727749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性リン脂質の血小板活性化因子(PAF)は強力な平滑筋収縮作用や炎症細胞の遊走作用をもち、PAFの生成酵素であるリソホスファチジルコリンアシル転移酵素(LPCAT)2は炎症時に活性化される。このLPCAT2の気管支喘息に対する疾患治療標的としての可能性を探ることを目的とした。LPCAT2抑制により細胞レベルではPAFによる平滑筋細胞活性化の抑制が示唆されたが、LPCAT2遺伝子欠損マウスでの気管支喘息抑制は明らかではなかった。生体内では複数の経路や気道上皮細胞など他の細胞が病態に関与しているため、統計学的に十分な効果が認められなかった可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管支喘息は死に至ることのある疾患である。気管支喘息の治療薬は、近年の分子標的薬の発展が目覚ましいが、一方で、病態については未だ解明されていないことも多い。そのためコントロール不良な重症喘息で治療に難渋する人も多い。新しい分子を検討することは、気管支喘息の機序に迫り、補助的治療薬としての可能性につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：Platelet-activating factor (PAF) is a potent pro-inflammatory phospholipid mediator, which induces a smooth muscle cell contraction. Lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT)2 biosynthesizes PAF, and this is activated by PAF itself. We hypothesized that the inhibition of the PAF biosynthetic activity by LPCAT2 provided a novel target for the regulation of inflammatory disorders including bronchial asthma. We showed the inhibition of LPCAT2 using micro-RNA suppressed the activation of smooth muscle cells. However, using ovalbumin (OVA)-induced allergic asthma model in LPCAT2 deficient transgenic mice, it was not statistically significant that the lack of LPCAT2 suppressed asthma induction.

研究分野：呼吸器

キーワード：気管支喘息

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、気道の閉塞性変化による気流制限を特徴とする疾患であるが、そのメカニズムとして、気道炎症や気管支平滑筋収縮が関与することが知られている。血小板活性化因子 (platelet-activating factor: PAF) は、強力な生理活性リン脂質であり、強い平滑筋収縮作用や炎症細胞の遊走、血管透過性亢進作用などを有する。G タンパク質共役受容体である PAF 受容体のノックアウトマウスや PAF 受容体拮抗薬によるマウスの気管支喘息の軽減が認められており、PAF 受容体を介して、PAF は気管支喘息において重要な役割を果たすことが知られている (1)。しかし、PAF 受容体拮抗薬は効果不十分などにより実用化には至っていない。その一因として、ヒトの細胞における PAF 受容体非依存的な PAF の作用が考えられた (2)。

近年、誘導型 PAF 生合成酵素である LPCAT2 が同定された。LPCAT2 はリポ多糖 (LPS) で誘導され活性化するが、一方でポジティブフィードバック機構をもち、その産物である PAF によっても活性化されることが報告されている (3)。しかしながら、気管支喘息における LPCAT2 の役割は未だ解明に至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、炎症時に活性化される PAF の生合成酵素である LPCAT2 の、気管支喘息における役割とその機序について検討し、疾患治療標的としての可能性を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ex vivo: primary のヒト気管支喘息患者の初代気道平滑筋細胞 (Lonza, Walkersville, MD, USA) を用い、気道平滑筋細胞における LPCAT2 の機能および治療ターゲットとしての展望を検討した。

### (1) LPCAT2 ノックダウンによる $\alpha$ -SMA 発現測定

気道平滑筋細胞に LPCAT2 の siRNA をトランスフェクション法にて導入し、LPCAT2 ノックダウンした細胞 (siLPCAT2 群) およびコントロール (siNC 群) を作成した。これらの細胞に対し PAF で刺激後、24 時間後の  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) mRNA の発現を RT-PCR 法で測定した。

### (2) Gel contraction assay による気道平滑筋収縮能の評価

気道平滑筋細胞を用い、PAF、LPS、TGF- $\beta$  による気道平滑筋収縮能の評価を gel contraction assay にて行った。ゲルの大きさは ATTO 社の画像解析ソフトウェアを用い、直径で評価した。

### (3) PAF 刺激による発現亢進分子の探索と、LPCAT2 ノックダウンによる影響の評価

気管支喘息における重要なサイトカイン・ケモカイン、および分子が、PAF 刺激により発現が変動するか検討した。CCL26、periostin、IL-5、IL-33、Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) などに着目し、PAF 刺激 24 時間後の上記分子の mRNA 発現を測定した。発現が亢進した分子に関しては、LPCAT2 siRNA をトランスフェクションし、その発現変動を評価した。

in vivo: 卵白アルブミンを用いた喘息モデルを作成し、野生型と LPCAT2 欠損マウスのメサコリン下での気道過敏性を測定比較した。また、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 回収を行い、解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) ヒト気管支喘息患者の気道平滑筋細胞を用いて、LPCAT2 の役割を検討した。

培養した気道平滑筋細胞に LPCAT2 の siRNA を遺伝子導入し、PAF 刺激を行った。気道収縮を引き起こす平滑筋細胞のマーカである  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の mRNA 発現は PAF 投与により上昇するが、siLPCAT2 群では上昇が認められなかった (図 1)。これより LPCAT2 が PAF 刺激による気道平滑筋活性化に必要な因子である可能性が示唆された。

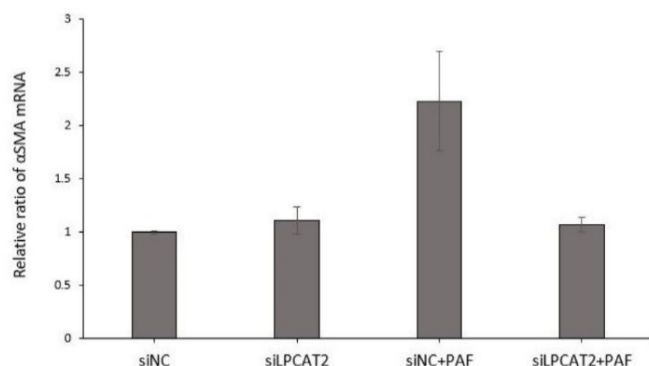


図1  $\alpha$  SMA mRNA発現

(2) 気道平滑筋収縮能における LPCAT2 の役割を検討するため、ヒト気管支喘息患者の気道平滑

筋細胞を用いて Gel contraction assay を行った。PAF、LPS 刺激により、気道平滑筋収縮することが予測されたが、本研究では、PAF 群、LPS 群いずれにおいても、無刺激群と比較し有意な差が認められず、既存報告の再現ができなかったため、方法および手技を見直している。

(3) ヒト気管支喘息患者の気道平滑筋細胞において、PAF 刺激 24 時間後の CCL26、periostin、IL-5、IL-33、TSLP 等の mRNA の発現を評価した。

これら分子のうち、TSLP は PAF 刺激による発現亢進を示した。

そこで LPCAT2 siRNA トランスフェクションによる TSLP の発現変動を評価したところ、TSLP の mRNA 発現は低下した(図 2)。このことから、PAF および LPCAT2 が TSLP 産生に関与することが示唆された。

PAF は気管支喘息発症メカニズムにおける重要な起因物質と想定されているが、自然免疫との関連は現時点で明らかになっていない。自然免疫には ILC2(Group 2 innate lymphoid cell)といった自然リンパ球の存在が重要であり、その ILC2 活性化には IL-33、TSLP といったサイトカインを必要とする。TSLP は気道上皮から産生され、ILC2 や NKT 細胞からの Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) を誘導し、喘息の重症化に与する重要な分子である。今後、TSLP との関連についても検討を行いたい。

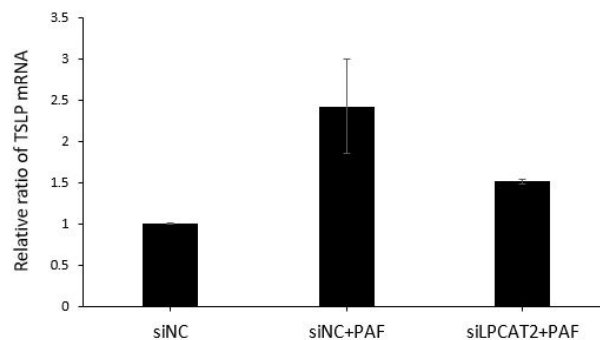


図2 TSLP mRNA発現

(4) マウスの気管支喘息誘発モデルを用いて、LPCAT2 の気道閉塞性への影響を解析した。

野生型、LPCAT2 遺伝子欠損マウスを用い、卵白アルブミンによる喘息モデルを作成、麻酔下にメサコリン投与による気道過敏性の評価を行った。中枢気道抵抗は野生型、LPCAT2 欠損マウスにおける差は認められなかった。LPCAT2 欠損マウスにおいて、高濃度メサコリン投与下では、気道抵抗の上昇が抑制される傾向が認められた(図 3)。肺胞洗浄液から回収した総細胞数および白血球分画の測定を行ったが野生型、LPCAT2 欠損マウス間の有意差は認められなかった。

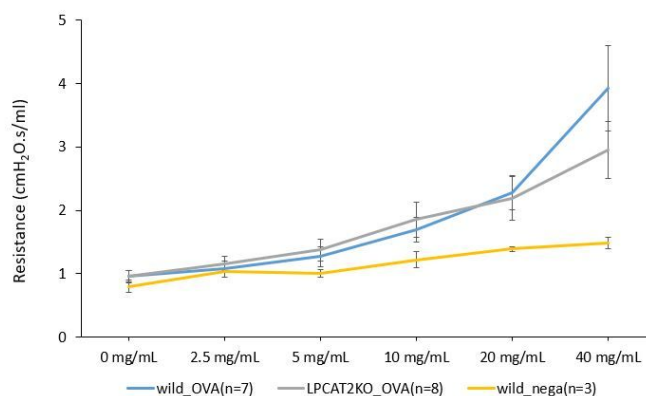


図3 野生型マウスおよびLPCAT2欠損マウスでの気道抵抗

LPCAT2 抑制により細胞レベルでは PAF による平滑筋細胞活性化の抑制が示唆されたが、マウスモデルでは気管支喘息抑制効果は明らかとは言えなかった。マウスモデルでは複数の経路や気道上皮細胞など他の細胞が病態に関与しているため気道抵抗という生理学的なアウトプットでは改善の傾向は示せたが、統計学的に十分な効果が認められなかったと考えた。

近年喘息治療は抗 IgE や IL-5 モノクローナル抗体さらには抗 TSLP モノクローナル抗体といった分子標的治療薬の発展が目覚ましい。それらとの併用による補助的治療薬としての可能性や、気道のリモデリングといった中長期的なアウトプットに対しての影響などについて、更なる検討が必要である。

#### <引用文献>

1. Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res*;39(1):41-82. 2000.
2. Dyer KD, et. al., Mouse and human eosinophils degranulate in response to platelet-activating factor (PAF) and lysoPAF via a PAF-receptor-independent mechanism: evidence for a novel receptor. *J Immunol*;184(11):6327-34. 2010.

3. Shindou H, et. al., A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA: lyso-PAF acetyltransferase. J Biol Chem;282(9):6532-9. 2007.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

発表準備中

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号:

##### (2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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、研究者個人に帰属されます。