

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09452

研究課題名(和文) 眼内炎症における酸化リン脂質の細胞障害性とその代謝の解明

研究課題名(英文) The cytotoxicity of oxidized phospholipids in intraocular inflammation

研究代表者

平岡 美紀 (HIRAOKA, Miki)

北海道医療大学・予防医療科学センター・准教授

研究者番号：80246983

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、眼内炎症における酸化リン脂質の代謝と細胞障害性の関係の解明を目的とする。

まずラットのぶどう膜炎モデルで、眼内の酸化リン脂質を質量分析(LC-MS)にて分析を行なったところ、6種の短鎖型酸化リン脂質が検出され、いずれも炎症群で多い傾向にあった。次に網膜色素上皮細胞株に短鎖型酸化リン脂質を添加すると細胞障害性が示された。一方、マクロファージで酸化リン脂質を前処理すると、この細胞障害が抑制された。このことは、活性型マクロファージにより酸化リン脂質が代謝され、炎症に伴う細胞障害を抑制すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ぶどう膜炎に代表される眼内炎症で、炎症が鎮静した後も眼組織に障害が残ると重篤な視機能低下をきたす。これまで眼内炎症を防ぐ、あるいは軽症化させる試みは基礎研究、臨床応用の場面でも多くなされてきた。しかし、炎症によって不可逆な細胞障害を起こす機序とその防御については十分に解明されていない。本研究では眼内炎症で生じる酸化リン脂質がどのように細胞障害をきたすか、またそれを防ぐためにマクロファージがどのように関与しているかを示した。この結果から、酸化リン脂質の代謝を促進させることで、眼内炎症に続発する細胞障害から防御する新たな治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：The present study was conducted to examine the profile of oxidized phospholipids in uveitis using rat model and clinical specimens, and to elucidate the role of macrophages in the metabolism of oxidized phospholipids. Six species of oxidized phospholipids were detected in the aqueous humors of rats and humans. The content of each oxidized phospholipids was higher in the uveitis group of rat uveitis model and clinical uveitis samples. The oxidized phospholipids showed cytotoxicity to retinal epithelial cell line. The cytotoxicity was reduced by pretreatment of oxidized phospholipids with macrophages. The oxidized phospholipids formed by intraocular inflammation could induce cytotoxicity. The present findings suggest that the phagocytic macrophages eliminate oxidized phospholipids and prevent from tissue damage following intraocular inflammation.

研究分野：眼科

キーワード：眼内炎症 細胞障害 酸化リン脂質 マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

眼内手術後の虹彩炎や外傷性前房出血などの房水混濁は速やかに消退するが、これには優れた房水浄化機構が働いている。眼内の不要物質、特に水に溶けない脂質などの不溶物の分解には、リソゾーム由来の加水分解酵素が担っており、この浄化機構の障害が難治性ぶどう膜炎や開放隅角緑内障などの眼疾患の病因になっていることが示されてきた。我々は、この房水内のリン脂質代謝にリソゾーム・ホスホリパーゼ A2(以下 LPLA2)が関わっていることを明らかにしてきた。

難治性の眼内炎では炎症が重度で遷延化した場合に、消炎後にも不可逆的な網膜などの障害をきたし視機能が回復しない例もある。このような病態についてサイトカインやケモカインなどの関与が明らかにされ、眼内炎症では酸化ストレスが増加することも知られている。特にスーパーオキシドのようなフリーラジカルは眼内炎症と呼応して変化するが、これらは水溶性で代謝が早く、また種々の抗酸化作用を持つ分子によってコントロールされる。一方、酸化ストレスにより細胞内のリン脂質が酸化されると酸化リン脂質が生成されるが、その代謝については不明な部分が多い。

In vitro では酸化リン脂質が末梢マクロファージの増殖と活性化を誘導し、さらなる貪食をもたらすことが示されている。これはマクロファージによる酸化リン脂質の貪食と分解が組織内での酸化リン脂質の蓄積を防ぎ、細胞障害から防御していると考えられる。一方、マクロファージ内に取り込んだ酸化リン脂質を分解できないと泡沫化して、動脈硬化などを引き起こす。そこでマクロファージ内での酸化リン脂質の効率的な代謝が、炎症による細胞障害の抑止に重要なカギとなる。眼疾患では加齢性黄斑変性症で酸化リン脂質の関与が示されている。しかし、眼内炎症と酸化リン脂質に関する国内外の研究は現在まで全くなされていない。

本研究では、眼内炎症で生じる酸化ストレスによって産生される酸化リン脂質がどのように細胞障害をきたすか、またその際のリン脂質分解酵素の動態を明らかにすることにより、酸化リン脂質代謝を介した眼内炎症に続発する細胞障害を防ぐような新たな治療法開発を目指すことである。

## 2. 研究の目的

眼内炎症での酸化リン脂質代謝と細胞障害性の関係を解明するため、以下4点を課題とする。

- ① 臨床検体のぶどう膜炎症例の房水中の酸化リン脂質成分と LPLA2 の活性を分析し、病型に特徴的な酸化リン脂質の分布や LPLA2 活性との関係を明確にする。
- ② 眼内炎症モデルで、房水中の酸化リン脂質の定量と定性（組成分析）を行い、炎症に特異的な変動を示す酸化リン脂質を同定し、またその酸化リン脂質を効率的に代謝できるリン脂質分解酵素(LPLA2を含む)を明らかにする。
- ③ 網膜色素上皮株に酸化リン脂質を添加し、細胞障害を評価する。また、マクロファージで酸化リン脂質を反応させた際の、細胞障害についても調べる。
- ④ Ex vivoにてマウスのマクロファージに種々の酸化リン脂質を添加し、その代謝速度を野生型マウスとLPLA2欠損型を比較して、酸化リン脂質代謝におけるLPLA2の役割を解明する。

### 3. 研究の方法

- ① 研究参加に同意を得られた症例から、白内障手術時に前房水を採取した。コントロール群としては、白内障以外の眼疾患がなく、また眼外傷や眼手術の既往がない症例を選択した。眼内炎症群としては、ぶどう膜炎に罹患している症例を選択した。それぞれの症例について、房水中の酸化リン脂質成分を液体クロマトグラフィー質量分析器 (LC-MS) を用いて行い、LPLA2の活性を薄層クロマトグラフィーで分析した。
- ② ルイスラットに完全フロイトアジュバントと網膜抗原ペプチドを混和したものを皮下注射して自己免疫性ぶどう膜炎モデル (EAU) を作成した。EAUは免疫後2週で炎症極機を示すモデルである。コントロール群としては、網膜抗原ペプチドを含まない完全フロイトアジュバントを免疫した。この群では眼内炎症をきたさない。この2群のラットについて、免疫2週後の前房水を採取した。それぞれの検体について、房水中の酸化リン脂質成分を液体クロマトグラフィー質量分析器 (LC-MS) を用いて行い、LPLA2の活性を薄層クロマトグラフィーで分析した。
- ③ 網膜色素上皮細胞株ARPE-19を用いて、酸化リン脂質の細胞障害性を調べた。用いた酸化リン脂質は以下の4種である。  
POVPC (1-palmitoyl-2-(5' -oxo-valeroyl)-*sn*-glycero-3-PC)  
PONPC (1-palmitoyl-2-(9' -oxo-nonanoyl)-*sn*-glycero-3-PC)  
PGPC (1-palmitoyl-2-glutaryl-*sn*-glycero-3-PC)  
PAzPC (1-palmitoyl-2-azelaoyl-*sn*-glycero-3-PC)  
この酸化リン脂質を ARPE-19 細胞に添加し、16 時間後に WST-1 アッセイを行った。  
また、マクロファージの酸化リン脂質代謝での役割を調べるために、以下の実験も行った。  
まず、C57BL/6 マウスの肺胞マクロファージを採取し、培養シャーレに付着させる。その後、培養液を無血清培地に変えて4時間 incubation する。この際、上記4種の酸化リン脂質をそれぞれ添加し、4時間 incubation したのも用意した。次にこの培養上清を ARPE-19 に移して、16 時間後に WST-1 アッセイを行った。
- ④ 野生型とLPLA2欠損マウスのそれぞれから肺胞マクロファージを採取し、培養シャーレに付着させる。その後に培養液を無血清培地に変えた。その際にPAzPCを添加し、4時間後に細胞と培養液を回収し、PAzPCの量を薄層クロマトグラフィーで分析した。

### 4. 研究成果

- 1) 臨床検体の前房水中に6種の短鎖型酸化リン脂質が検出された。その6種は、POVPC、PONPC、PGPC、PAzPC、POBPC (1-palmitoyl-2-(4' -oxo-butanoyl)-*sn*-glycero-3-PC)、PMPC (1-myristoyl-2-azelaoyl-*sn*-glycero-3-PC)であった。そのいずれも眼内炎症群で高い傾向を示した。
- 2) EAUを誘導したルイスラットの前房水中に6種の短鎖型酸化リン脂質が検出された。それらは臨床検体で検出されたものと同じであった。またこれらは眼内炎症群で、高値を示した。この2つの結果から、眼内炎症によって酸化リン脂質の産生が増えることが明らかになった。
- 3) 入手可能な4種の酸化リン脂質、POVPC、PONPC、PGPC、PAzPC、について、それぞれARPE-19細胞に添加したところ、いずれも濃度依存性に細胞障害を示した。これらの酸化リン脂質について、マウスの肺胞マクロファージで前処理するとその細胞障害性は抑制された。このことから、房水中に検出された酸化リン脂質によって細胞障害が起きること、そしてマクロファージが酸化リン脂質を代謝することにより細胞障害から防御していることが明らかになった。
- 4) 肺胞マクロファージにPAzPCを添加し、4時間後の細胞、培養液中のPAzPCを測定すると、LPLA2

欠損マクロファージでは、PAzPCが高値であった。このことは、マクロファージでの酸化リン脂質の代謝にLPLA2が寄与していることが明らかになった。

以上のことから、眼内炎症に引き続いて起きる細胞障害に酸化リン脂質が関わっていること、そしてその代謝を活性型マクロファージが担っていることが判明した。さらにマクロファージでの酸化リン脂質の代謝はLPLA2などのリン脂質分解酵素が働いていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiraoka Miki, Abe Akira	4. 巻 61
2. 論文標題 An Increase of Oxidized Phospholipids and the Role of Macrophages in Intraocular Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 23 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.61.6.23	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 Abe Akira, Hiraoka Miki, Matsuzawa Fumiko, Aikawa Sei-ichi, Niimura Youichi	4. 巻 1865
2. 論文標題 Esterification of side-chain oxysterols by lysosomal phospholipase A2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 158787 ~ 158787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2020.158787	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平岡 美紀、阿部 晃
2. 発表標題 酸化リン脂質による細胞障害と肺胞マクロファージによる抑制効果
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
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	大黒 浩  (OHGURO Hiroshi)  (30203748)	札幌医科大学・医学部・教授    (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	阿部 晃  (ABE Akira)  (70136927)	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