

平成22年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790248  
 研究課題名 (和文) マウス病態モデルにおける生体内脂質メディエーターの網羅的解析  
 研究課題名 (英文) Comprehensive analysis of lipid mediators in murine disease models  
 研究代表者  
 北 芳博 (Kita Yoshihiro)  
 東京大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：20401028

## 研究成果の概要 (和文)：

研究代表者が確立した LC-ESI-MS による高感度ハイスループット一斉定量法を用いて、炎症モデルを含む複数の実験動物モデルにおいて詳細な脂質メディエーター産生プロファイリングを行った。マウス多発性硬化症モデル、敗血症モデル等において、病態に特徴的な脂質メディエータープロファイルを抽出することに成功し、従来断片的に評価されてきた脂質メディエーターと疾患の関係を包括的に解析する新たな方法論を確立した。

## 研究成果の概要 (英文)：

Quantitative lipid mediator profiling strategy developed by the investigator was applied to several murine disease models that include inflammatory disease models. Lipid mediator profiles that characterize disease status were successfully determined in murine models of multiple sclerosis, sepsis, etc., which paved the way for a comprehensive analysis of lipid mediators in diseases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：代謝異常学・脂質メタボロミクス

## 1. 研究開始当初の背景

ホスホリパーゼ A2 (PLA2) は、グリセロ

リン脂質の sn-2 位の脂肪酸を加水分解する酵素である。膜リン脂質に PLA2 が働くことにより生じる遊離脂肪酸 (FFA) は、代謝を

受けることにより様々な生理活性を示す脂質メディエーターを生じる。また、脂肪酸と同時に生成するリゾリン脂質も近年脂質メディエーターとしての機能が注目されている。

これらさまざまな脂質メディエーターのうち、これまで最も研究の進んでいるものは、アラキドン酸及びその代謝物である。プロスタグランジン類やロイコトリエン類はアラキドン酸に由来する代表的な脂質メディエーターであり、炎症や免疫、生殖機能など、病態や生理機能に関わることが知られている。脂質メディエーターの多くは、細胞膜受容体を介してその多彩な生理活性を発揮すると考えられており、この点ではペプチドホルモンやサイトカイン等に類似していると言えるが、脂質メディエーターは脂質分子であるため遺伝子によってコードされておらず、必要時に一連の脂質代謝酵素の働きにより産生されるといった点において非常に特徴的である。

病態・生理における脂質メディエーターの役割の研究は、従来、個々の脂質メディエーターの産生量や、関連する個々の脂質代謝酵素の活性や発現量、脂質メディエーター受容体の機能の評価などにより行われてきた。しかし、特定の病態・生理に関わる脂質メディエーターは単一ではない場合がほとんどである。研究代表者は、脂質メディエーター産生関連酵素群の活性のバランスにより、個々に生理活性の異なる一群の脂質メディエーターの産生プロファイルが規定されるという観点に基づき、病態・生理機能における脂質メディエーターの役割を理解する上で、脂質メディエーター産生を統合的に評価する手法とその応用が不可欠であると考えに至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、研究代表者が確立した LC-ESI-MS による高感度ハイスループット一斉定量法を用いて、炎症モデルを含む複数の実験動物モデルにおいて詳細な脂質メディエーター産生プロファイリングを行うことにより、従来断片的に評価されてきた脂質メディエーターと疾患の関性に新たな視点を導入することを目的とした。

## 3. 研究の方法

複数の異なるマウス病態モデルにおいて組織サンプルを取得し、脂質メディエーターを網羅的に測定する。得られた脂質メディエーターのプロファイル解析により、各病態を特徴づける脂質メディエーターを決定する。

## 4. 研究成果

(1) マウス多発性硬化症モデル (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) における脊髄中脂質メディエータープロファイリング

マウスに EAE を発症させる処置を施し、未発症、誘導期、急性期、慢性期における脊髄組織サンプルを採取した。それらのサンプルを研究代表者のエイコサノイド高感度一斉定量システムにより測定し、定量的脂質メディエータープロファイルを取得した。

データをクラスタリング解析した結果、それぞれの病期は脂質メディエータープロファイルによって特徴付けられることが分かった。

PGE2 を含む脂質メディエータークラスターは、急性期を特徴付けることが示唆されたため、PGE2 合成酵素である mPGES1 の遺伝子欠損マウスを用いて EAE の病態を評価した。その結果、mPGES1 欠損マウスでは、EAE の症状が軽減することが確認された。

本結果は、脂質メディエータープロファイルを解析することで、疾患において重要な役割を示す脂質メディエーターの発見が可能であることを示すものである。

(2) マウス敗血症モデル (cecal ligation and puncture, CLP) における腹腔内および血漿中脂質メディエータープロファイリング

細胞質型ホスホリパーゼ A2 $\alpha$  (cPLA2 $\alpha$ ) 欠損マウスおよび野性型マウスに CLP を施行し、手術後 1.5 時間および 5 時間後の腹腔洗浄液サンプルを採取した。それらのサンプルをエイコサノイド高感度一斉定量システムにより測定し、定量的脂質メディエータープロファイルを取得した。また、血中および腹腔洗浄液中の炎症性サイトカインを酵素免疫法 (EIA) により測定し、脂質メディエータープロファイルとの相関解析を実施した。本モデルにおいては、cPLA2 $\alpha$  欠損マウスは野性型マウスと比較して、体重減少の抑制、プロスタグランジンおよびロイコトリエン B4 産生の減少、IL-6 および CCL2 の減少が見られたにも関わらず、CLP 後の生存率の改善は見られなかった。予想外の結果として、アラキドン酸代謝物の一つである 12-HETE は CLP により産生が上昇するが、これら cPLA2 $\alpha$  欠損によって影響を受けないことが分かった。また、サイトカインと脂質メディエーターの経時データの比較から、炎症性サイトカインの産生に先立って脂質メディエーター産生がおこることが明らかとなり、cPLA2 $\alpha$  依存的に産生される脂質メディエーターが炎症性サイトカイン産生に対して制御的に働くことも示唆された。

## まとめ

研究代表者は、マウス多発性硬化症モデルおよび敗血症モデルにおいて脂質メディエーターの包括的定量プロファイリング解析を応用し、病態が脂質メディエータープロファイルにより特徴付けられるというコンセプトに基づいて、疾患における脂質メディエーターの機能解析にあらたな手法が適用可能であることを示した。

本研究課題は疾患研究における新しい脂質メディエーター解析手法の概念実証が主たる目的であり、その点において目標は達成されたと考えられる。本研究成果により、今後、様々な疾患モデルや臨床検体を用いた解析を行うための基盤がととのったと考えられる。一方、本研究課題では、アラキドン酸カスケードの代謝物群および血小板活性化因子の迅速網羅解析に特化したシステムを用いたため、今回プロファイリング対象としなかった他の様々な脂質群（中性脂質、リン脂質、糖脂質、コレステロール、等）の包括的解析手法の開発と、望ましくはそれらを包括する解析手法の開発により、本研究課題のコンセプトはさらに大きく発展させることが可能であると考えられ、今後の重要な課題と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Oga, T., Matsuoka, T., Yao, C., Nonomura, K., Kitaoka, S., Sakata, D., Kita, Y., Tanizawa, K., Taguchi, Y., Chin, K., Mishima, M., Shimizu, T., and Narumiya, S. (2009) Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  receptor signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor- $\beta$ . *Nature Med.* 12, 1426-1430. (査読有)
2. Kihara, Y., Matsushita, T., Kita, Y., Uematsu, S., Akira, S., Kira, J.-i., Ishii, S., and Shimizu, T. (2009) Targeted lipidomics reveals mPGES-1-PGE2 as a therapeutic target for multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21807-21812. (査読有)
3. Matsumoto, T., Inoue, H., Sato, Y., Kita, Y., Nakano, T., Noda, N., Eguchi-Tsuda, M., Moriwaki, A., Kan-O,

K., Matsumoto, K., Shimizu, T., Nagasawa, H., Sakuda, S., and Nakanishi, Y. (2009) Demethylallosamidin, a chitinase inhibitor, suppresses airway inflammation and hyperresponsiveness. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 103-108. (査読有)

4. Kihara, Y., Yanagida, K., Masago, K., Kita, Y., Hishikawa, D., Shindou, H., Ishii, S., and Shimizu, T. (2008) Platelet-Activating Factor Production in the Spinal Cord of Experimental Allergic Encephalomyelitis Mice via the Group IVA Cytosolic PLA2-LysoPAFAT Axis. *J. Immunol.* 181, 5008-5014. (査読有)
5. Uozumi, N., Kita, Y., and Shimizu, T. (2008) Modulation of lipid and protein mediators of inflammation by cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  during experimental sepsis. *J. Immunol.* 181, 3558-3566. (査読有)
6. Li, Y., Yamada, H., Kita, Y., Suzuki, M., Endo, Y., Horita, S., Yamazaki, O., Shimizu, T., Seki, G., Fujita, T. (2008) Arachidonic acid metabolites inhibit the stimulatory effect of angiotensin II in renal proximal tubules. *Hypertens. Res.* 31, 2155-2164. (査読有)

[学会発表] (計4件)

1. Yoshihiro Kita, Yasuyuki Kihara, Satoshi Ishii, Keisuke Yoshikawa, Atsuyoshi Shimada and Takao Shimizu  
QUANTITATIVE LIPIDOMICS STRATEGY BY LC-ESIMS: METHODOLOGY AND APPLICATION IN BIOLOGICAL STUDIES  
4th International Congress on Phospholipase A2 and Lipid Mediators  
2009年5月28日  
東京 (学術総合センター)
2. 北 芳博、東 知宏、清水 孝雄  
UPLC-ESIMSによるリン脂質ディファレンシャル解析法の開発および膜リン脂質代謝酵素解析への応用  
BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会・合同大会)  
2008年12月9日  
神戸ポートアイランド

3. Kita, Y., Azuma, C., and Shimizu, T.  
UPLC-ESIMS lipidomics strategy for in vitro and in vivo characterization of cytosolic phospholipase A2 enzymes  
FASEB Summer Research Conferences  
2008年7月21日・22日 (ポスター)  
アメリカ・コネチカット州・ニューヘブ  
ン
  
4. 北 芳博、清水 孝雄  
LC-MS による脂質メデイエーターの定量的  
プロファイリング ～ 開発から応用ま  
で  
第 35 回 BMS コンファレンス (BMS2008)  
(質量分析学会)  
2008年7月8日  
裏磐梯ロイヤルホテル (福島県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北 芳博 (Kita Yoshihiro)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20401028

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし