

機関番号：82609

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890310

研究課題名（和文） 新規分泌性ホスホリパーゼ A2（Ⅲ型）の欠損が引き起こす
脂質代謝異常と病態研究課題名（英文） Abnormal lipid metabolism and disease caused by
deficiency of atypical secretory phospholipase A2 (sPLA₂-Ⅲ)

研究代表者

佐藤 弘泰 (SATO HIROYASU)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員

研究者番号：50546629

研究成果の概要（和文）：

本研究において sPLA₂-Ⅲ は、精巣上体起始部から頭部の管腔上皮細胞に強く発現し、*Pla2g3*^{-/-}マウスは精子成熟および生殖難を示した。sPLA₂-Ⅲ の欠損により引き起こされる生殖異常は、精巣上体における精子の膜リン脂質の再構成障害に起因することがわかった。また、sPLA₂-Ⅲ は白色脂肪組織の間質細胞である前脂肪細胞に発現し、高脂肪食負荷した *Pla2g3*^{-/-}マウスは、肥満、脂肪肝、高血糖、高脂血症、インスリン抵抗性の改善が認められた。*Pla2g3*^{-/-}マウスでは脂肪組織及び肝臓において脂肪分化、脂肪合成、炎症マーカー関連遺伝子の発現が減少し、脂肪組織の LPC が減少していた。

研究成果の概要（英文）：

We have shown that group III phospholipase A₂ (sPLA₂-Ⅲ), a member of the secreted phospholipase A₂ (sPLA₂) family, is expressed in the mouse proximal epididymal epithelium and that targeted disruption of the gene encoding this protein (*Pla2g3*) leads to defects in sperm maturation and fertility. Our results reveal a role for the atypical sPLA₂ family member sPLA₂-Ⅲ in epididymal lipid homeostasis and indicate that its perturbation may lead to sperm dysfunction. Additionally, sPLA₂-Ⅲ was expressed constitutively in preadipocytic cells in the stromal vascular fraction of white adipose tissue. High-fat diet induced obesity, steatohepatitis, hyperlipidemia, hyperglycemia and insulin resistance were ameliorated in *Pla2g3*^{-/-} mice. Adipose or hepatic expression of lipogenic, adipogenic and proinflammatory genes and adipose level of lysophosphatidylcholine were significantly reduced in *Pla2g3*^{-/-} mice compared with wild-type mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	622,000	2,662,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：脂質、ホスホリパーゼ A2、生殖、メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

膜グリセリン脂質から脂肪酸とリン脂質を生成する酵素 PLA₂ には多数の分子種が同定されており、細胞内に存在する細胞質 PLA₂ (cPLA₂) とカルシウム非依存性 PLA₂ (iPLA₂) 群、ならびに細胞外に分泌される sPLA₂ (secreted PLA₂) 群に大別される。PLA₂ は従来、細胞膜中のリン脂質の分解を制御することによりアラキドン酸代謝物に代表される脂質メディエーターの産生や細胞膜の新陳代謝に関わるものと認識されてきた。しかしながら、細胞膜リン脂質代謝における細胞内 PLA₂ (cPLA₂ 群や iPLA₂ 群) の重要性が広く認知されつつあるのに対し、細胞外に分泌される sPLA₂ 群が実際に生体内でどのような存在状態のリン脂質を基質としているのか、どのような生体応答に関わるのかについては未解明であった。

細胞内 PLA₂ 群とは異なり sPLA₂ 群は分泌型の酵素であるため、その基質となるリン脂質は細胞外に存在するはずである。実際に、sPLA₂ は *in vitro* において細胞膜のリン脂質を標的とするだけでなく (*J Biol Chem.* 276, 10083-10096, 2001)、細胞外に存在する血漿リポタンパク質 (*J Biol Chem.* 274: 4203-34211, 1999)、肺サーファクタント (*J Biol Chem.* 281: 36420-36433, 2006)、あるいは細菌膜 (*J Immunol.* 166:4029-4034, 2001) のリン脂質も分解することから、これらの反応を介して炎症、動脈硬化症、急性呼吸窮迫症候群、細菌感染防御などに関与する可能性が指摘されている。また、比較的各組織に普遍的に発現している cPLA₂ や iPLA₂ とは異なり、sPLA₂ は各アイソザイムが異なる組織分布を示す。そのため、sPLA₂ 群のそれぞれのアイソザイムは、生体内でそれぞれの発現部位に応じて固有の機能を担うことが予想される。

このような背景のもと、大学院在籍時に、所属研究室が推進していた sPLA₂ 群の網羅的遺伝子改変マウスの解析プロジェクトに参加し、sPLA₂ 群の網羅的な過剰発現ならびに欠損マウスの解析に貢献してきた。特に、新しいタイプの sPLA₂ アイソザイムとして同定された III 型酵素 (sPLA₂-III) について、世界に先駆けて過剰発現マウス (*Pla2g3^{tg/+}* マウス) と欠損マウス (*Pla2g3^{-/-}* マウス) を作出し、その表現型解析を通じて本酵素の生体内機能を明らかにしてきた。このうち過剰発現マウスの研究成果については最近、国際学術誌に論文発表した (*J Biol Chem.* 2008, *Biochem J.* 2009: 研究業績の項)。本研究は、*Pla2g3^{-/-}* マウスの表現型解析を更に推進するものである。

2. 研究の目的

本研究では、sPLA₂ ファミリーのうち新しいタイプのアイソザイムである sPLA₂-III にフォーカスを当て、その生体内機能について、欠損マウスの表現型解析を通じて解明することを目的とする。申請者がこれまでに作出導入した sPLA₂-III 遺伝子改変マウスの表現型解析から浮上してきた以下にリストアップする生命現象について焦点を当て、本酵素の機能とその分子メカニズムの全体像、ならびにそのヒト病態との関連を解明することを目標とする。

(1) 精子無力症: *Pla2g3^{-/-}* マウスは精子の運動性が極めて悪く、雄性不妊となる。そこで、本酵素の欠損が精子不全を引き起こすメカニズムについて、雄性生殖器のリン脂質代謝に及ぼす影響を中心に精査し、これを解明する。

(2) メタボリックシンドローム: *Pla2g3^{tg/+}* マウスに高脂肪食負荷を施すと肥満が増悪し、*Pla2g3^{-/-}* マウスでは逆に肥満・脂肪肝が改善することを見出している。そこで本研究では、本酵素とメタボリックシンドロームの関係について、その分子メカニズムを含めて明らかにする。

(3) 動脈硬化: sPLA₂-III は *in vitro* でリポタンパク質のリン脂質を分解して変性悪玉 LDL の生成を促進し、またこれと合致して sPLA₂-III 過剰発現マウスでは動脈硬化が増悪することを見出している (*J. Biol. Chem.* 283: 33483-33497, 2008)。そこで本研究では、この現象の生理的妥当性を検証するために、*Pla2g3^{-/-}* マウスに動脈硬化モデルを施行する。

3. 研究の方法

(1) sPLA₂-III と精子機能

① 精巣上体より調整した精子細胞及び精液の脂質成分の網羅的質量分析を行い、*Pla2g3^{-/-}* マウスと対照マウスの間で差が認められるリン脂質分子種ならびに脂質代謝産物を同定する。

② *Pla2g3^{-/-}* マウスならびに対照マウスの雄性生殖器に発現している分子群のマイクロアレイによる遺伝子プロファイリングを行う。精子の成熟や運動性に関わることが知られている遺伝子群を抽出し、sPLA₂-III の欠損がその発現にどのような影響を及ぼしているかを調べる。必要に応じて、定量的 RT-PCR やウェスタンブロットによりマイクロアレイの結果の妥当性を検証する。

③ *Pla2g3^{-/-}* マウスならびに対照マウスの精子の超微細構造の形態学的観察を行うとともに、精子の機能に必要なとされるシグナル伝達経路 (例えば Ca²⁺ 応答、cAMP 産生、ATP 産生、タンパク質リン酸化など) を精査し、*Pla2g3^{-/-}* マウスの精子に生じている異常の全

体像を明らかにする。

④ 精子は卵子と相互作用すると、アクロソーム反応、膜融合、卵活性化などの一連のステップを経て、受精卵を胚発生に導く。これらのステップが sPLA₂-III の欠損によりどのような影響を受けているかについて検討する。

以上の解析により、精巣上体管腔上皮細胞より分泌される sPLA₂-III によって制御されるリン脂質代謝と精子機能の関連についての分子メカニズムを解明する。

(2) sPLA₂-III とメタボリックシンドローム
メタボリックシンドロームの病態生理学的解析を以下の項目に添って実施する。

PlA2g3^{-/-}マウスに高脂肪食負荷を施し、肝臓、脂肪組織、筋肉など脂肪代謝に関わる組織の組織学的所見を精査するとともに、血漿のアディポカイン、脂質代謝関連ホルモン、肝機能マーカーなどの分析を行う。耐糖性試験・インスリン感受性試験を実施して血中のインスリン濃度と血糖値をモニターし、個体または組織のインスリン応答性を調べる。体温、行動量、エネルギー代謝率などを測定し、脂肪燃焼を評価する。更に、摂食量ならびに摂食行動を調節する視床下部ホルモンの発現などを判定する。以上の解析により sPLA₂-III のメタボリックシンドロームへの関与とその分子メカニズムの全体像を解明する。

(3) sPLA₂-III と動脈硬化

動脈硬化モデルマウスである LDL 受容体 (LDLR) 欠損マウスを用いて sPLA₂-III/LDLR ダブルノックアウトマウスを作成し、これに高コレステロール負荷を施した時の動脈硬化の進展について、対照マウス (LDLR 欠損マウス) と比較検討する。具体的な解析項目として、以下の検討を行う。

①血漿リポタンパク質を VLDL, LDL, HDL などに分離し、脂質成分をモニターする。

②大動脈を縦方向切開あるいは輪切りにし、その組織切片を Oil red O で染色することにより、脂肪蓄積部位を定量する。さらに、大動脈洞の組織切片を組織学的に観察し、動脈硬化の程度を評価する。必要に応じて、切片をマクロファージ、血管平滑筋、コラーゲン間質などのマーカーで免疫染色し、細胞浸潤の観点からも動脈硬化の進展を評価する。

4. 研究成果

(1) sPLA₂-III と精子機能

PlA2g3^{-/-}マウスは精子の運動性の低下により雄性不妊になることを見出した。精巣と精巣上体のマイクロアレイ解析の結果、PlA2g3^{-/-}マウスでは精巣上体における精子の運動性、形態、受精能に関わる遺伝子が一括的に減少していた。これと合致して、PlA2g3^{-/-}マウスの精子では鞭毛軸索やアクロソーム

の超微細構造、ならびに運動に関わるシグナル伝達に異常が見られた。PlA2g3^{-/-}マウスの精子は受精が起こりにくく、受精が成立しても、その後の胚発生が低下していた。III 型 sPLA₂ はリン脂質代謝酵素であることから、PlA2g3^{-/-}マウスの精巣上体では脂質代謝に何らかの変化があることが予想し、質量分析により脂質成分を網羅的に解析した。その結果、以下の3点の異常所見を見出した。

①野生型の精子は精巣上体を通ずる間に膜リン脂質 (PC) の脂肪酸の不飽和度が増し、オレイン酸やアラキドン酸からドコサヘキサエン酸やドコサペンタエン酸への再編成が起こったが、PlA2g3^{-/-}マウスではこのプロセスが損なわれていた。

②PlA2g3^{-/-}マウスでは 12/15 リポキシゲナーゼによる脂肪酸代謝産物が減少していた。

③PlA2g3^{-/-}マウスでは精巣上体液の PC が増加していた。精子のドコサヘキサエン酸含有率の低下がヒトやマウスの精子不全と相関する従来の知見を踏まえると、sPLA₂-III の欠損により引き起こされる精子の成熟不全は、精巣上体における①精子の膜リン脂質の不飽和脂肪酸リモデリングの障害に起因するものと考えられる。

(2) sPLA₂-III とメタボリックシンドローム

高脂肪食負荷した PlA2g3^{-/-}マウスは、体重および内臓脂肪サイズの減少、脂肪肝の抑制、血中レプチン、グルコース、総コレステロール、LPC濃度の低下、インスリン抵抗性の改善が認められた。PlA2g3^{-/-}マウスは WT マウスと比べて摂食量が有意に少ないことが判明した。一方、行動量や酸素消費量については、PlA2g3^{-/-}マウスと WT マウスの間に差は認められなかった。PlA2g3^{-/-}マウスでは脂肪組織の LPC が減少するとともにマクロファージの炎症マーカーが減少していた。血漿リポタンパク質の粒子径の測定を行った結果、PlA2g3^{-/-}マウスでは悪玉小径 LDL が減少していることがわかった。免疫組織化学染色および定量的 PCR の結果、内在性 sPLA₂-III は脂肪組織の間質に存在し、前脂肪細胞が発現細胞のひとつであると考えられた。また脂肪組織間質の細胞を in vitro で脂肪細胞に分化させる系を行ったところ、WT マウスからは脂肪滴を蓄えた細胞が多く見られたが、PlA2g3^{-/-}マウスからはそのような細胞は認められなかった。逆に sPLA₂-III を前脂肪細胞に過剰発現すると酵素活性依存的に脂肪滴の増加が観察された。以上の結果より sPLA₂-III は前脂肪細胞の形成や維持をコントロールすることにより、最終的に全身の脂質代謝に影響を与えていると考えられる。

(3) sPLA₂-III と動脈硬化

現在、動脈硬化モデルマウスである LDL 受容体 (LDLR) 欠損マウスを用いて sPLA₂-III/LDLR ダブルノックアウトマウスを作成中である。

今後、これに高コレステロール負荷を施した時の動脈硬化の進展について、対照マウス (LDLR欠損マウス) と比較検討する予定である。

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) Yamamoto K, Taketomi T, Isogai Y, Miki Y, Sato H, Masuda S, Nishito Y, Morioka K, Ishimoto Y, Suzuki N, Yokoya Y, Hanasaki K, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Fukami K, Ikeda K, Nakanishi H, Taguchi R, and Murakami M. Hair follicular expression and function of group X secreted phospholipase A₂ in mouse skin. *J Biol Chem*. 286:11616-11631. (2011) (査読有り)
- (2) Sato H, Isogai Y, Masuda S, Taketomi Y, Miki Y, Kamei D, Hara S, Kobayashi T, Ishikawa Y, Ishii T, Ikeda K, Taguchi R, Ishimoto Y, Suzuki N, Yokota Y, Hanasaki K, Suzuki-Yamamoto T, Yamamoto K, and Murakami M. Physiological roles of group X secreted phospholipase A₂ in reproduction, gastrointestinal phospholipid digestion, and neuronal function. *J Biol Chem*. 286:11632-11648 (2011) (査読有り)
- (3) Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, and Yamamoto K. Recent progress in phospholipase A₂ research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res*. 50:152-192. (2011) (査読有り)
- (4) Sato H, Taketomi T, Isogai Y, Miki Y, Yamamoto K, Masuda S, Hosono T, Arata S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Nakanishi H, Ikeda K, Taguchi R, Hara S, Kudo I, and Murakami M. Group III secreted phospholipase A₂ regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. *J Clin Invest*. 120: 1400-1414 (2010) (査読有り)
- (5) Escoffier J, Jemel I, Tanemoto A, Taketomi Y, Payre C, Coatrieux C, Sato H, Yamamoto K, Masuda S, Pernet-Gallay K, Pierre V, Hara S, Murakami M, De Waard M, Lambeau G, and Arnoult C. Group X phospholipase A₂ is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. *J Clin Invest*. 120:1415-1428 (2010) (査読有り)
- (6) Sato H, Taketomi Y, Isogai Y, Masuda S,

Kobayashi T, Yamamoto K, and Murakami M. Group III secreted phospholipase A₂ transgenic mice spontaneously develop inflammation. *Biochem J*. 421:17-27 (2009) (査読有り)

[学会発表] (計 16 件)

- (1) 佐藤 弘泰, 村上 誠. 「生命薬学における精子バイオロジーと脂質ネットワーク」ホスホリパーゼ A₂ による精子成熟と活性化の制御 **日本薬学会第 131 年会シンポジウム** 2011.3.29、静岡市
- (2) 原俊太郎、種本明生、加藤洋幸、佐藤弘泰、武富芳隆、村上誠：フタル酸モノエステル類のホスホリパーゼ A₂ 活性阻害を介したマウス精子受精能の抑制. **第 81 回日本衛生学会学術総会**、2011.3.28、東京
- (3) Hara S, Taketomi Y, Sato H, and Murakami M. Suppression of sperm fertility by monophthalate via inhibiting spermatozoal phospholipase A₂ activity. *SOT Annual Meeting*, Washington DC, USA (2011)
- (4) 佐藤弘泰、武富芳隆、山本圭、石川由紀雄、石井寿晴、原俊太郎、村上誠：sPLA₂-V, an adipocyte-inducible metabolic sPLA₂, controls systemic lipid metabolism. **BMB2010**、2010.12.10、神戸
- (5) 武富芳隆、佐藤弘泰、田中智之、中村正則、上野紀子、西藤泰昌、山本圭、杉本幸彦、原俊太郎、村上誠：sPLA₂-III, a mast cell-derived anaphylactic sPLA₂, regulates mast cell-dependent anaphylactic response. **BMB2010**、2010.12.10、神戸
- (6) Sato H, Taketomi Y, Yamamoto K, Arnoult C, Lambeau G, and Murakami M.: New insights into the functions of secreted phospholipase A₂s: sPLA₂ in reproduction. **7th GERLI Lipidmics Congress**, 2010, France
- (7) 佐藤弘泰、磯貝有紀、武富芳隆、山本圭、石川由紀雄、石井壽晴、小林哲幸、中西広樹、池田和貴、田口良、原俊太郎、村上誠：III 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ の欠損はメタボリックシンドロームを改善する. **第 52 回日本脂質生化学会**、2010.6.15、群馬
- (8) Sato H, Taketomi Y, Yamamoto K, and Murakami M. Group III secreted phospholipase A₂ regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. **Keystone Symposia**. Kyoto, Japan (2010)
- (9) Lambeau G, Jemel J, Escoffier J, Ait-Oufella H, Hiromi Li H, Guillaume C, Gora S, Surrel F, Coatrieux C, Payré C, Taketomi Y, Sato H, Yamamoto K,

Arnoult C, Mallat Z, Gelb M.H, Deregnacourt C, Ninio E, Karabina S, and Murakami M.: Recent insights into the multiple molecular and functional properties of group X sPLA₂. *Keystone Symposia*, Kyoto, Japan (2010)

- (10) 佐藤弘泰、武富芳隆、山本圭、磯貝有紀、三木寿美、小林哲幸、池田和貴、中西広樹、田口良、原俊太郎、村上誠：III型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は精子成熟を制御する。第 82 回日本生化学会大会、2009.10.22、神戸
- (11) 武富芳隆、佐藤弘泰、田中智之、上野紀子、山本圭、原俊太郎、村上誠：III型分泌性ホスホリパーゼ A₂ はマスト細胞の分化成熟を制御する。第 82 回日本生化学会大会、2009.10.22、神戸
- (12) 佐藤弘泰、武富芳隆、磯貝有紀、三木寿美、山本圭、石川由紀雄、石井壽晴、小林哲幸、中西広樹、池田和貴、田口良、原俊太郎、村上誠：III型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は精子成熟を制御する。第 29 回日本脂質生化学会、2009.7.31、名古屋
- (13) 武富芳隆、佐藤弘泰、田中智之、上野紀子、山本圭、田口良、工藤一郎、原俊太郎、村上誠：III型分泌性ホスホリパーゼ A₂ はマスト細胞依存性の即時性アレルギーに関わる。第 29 回日本脂質生化学会、2009.7.31、名古屋
- (14) Sato H, Taketomi Y, Isogai Y, Yamamoto K, and Murakami M.: Impaired sperm maturation and fertility in group III phospholipase A₂-deficient mice. *The 4th International Conference on Phospholipase A₂s and Lipid Mediators*, Tokyo, Japan (2009)
- (15) Isogai Y, Sato H, Taketomi Y, Yamamoto K, Kobayashi T, and Murakami M.: Group III phospholipase A₂ in stromal fraction of adipose tissue controls systemic lipid metabolism. *The 4th International Conference on Phospholipase A₂s and Lipid Mediators*, Tokyo, Japan (2009)
- (16) Taketomi Y, Sato H, Ueno N, Yamamoto K, and Murakami M.: Group III secreted phospholipase A₂, an endogenous bee venom phospholipase A₂ homolog, is a crucial regulator of mast cell maturation and functions. *The 4th International Conference on Phospholipase A₂s and Lipid Mediators*, Tokyo, Japan (2009)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 弘泰 (SATO HIROYASU)
財団法人東京都医学研究機構・
東京都臨床医学総合研究所・
研究員
研究者番号：50546629

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし