

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790084

研究課題名（和文）炎症刺激により産生される新奇生理活性リン脂質の同定とその機能に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the bioactive phospholipids that regulate various proinflammatory responses.

研究代表者

桑田 浩 (KUWATA HIROSHI)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：80286864

研究成果の概要（和文）：

本研究では、1) 新奇生理活性脂質 Phospholipid X (PLX)の逆相 HPLC による分画の結果、Ccl ケモカインや Cxcl ケモカインを誘導する PLX 活性は比較的極性が高い可能性、2) 複数存在する PLX うち、過塩素酸処理（エポキシドの水解）により活性が低下したことから、PLX の構造中にエポキシドが存在する可能性、さらに 3) PLX によるケモカイン遺伝子発現制御機構が存在する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

This research found that 1) the polarity of chemokine-inducible PLX was high compared to sPLA₂-IIA inducible PLX, 2) some of the PLX molecules were sensitive to treatment of perchloric acid. Furthermore, 3) the PLX is also involved in the regulation of chemokine expression in LPS-induced septic shock model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：生理活性脂質、ホスホリパーゼ A₂、ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

プロスタグランジン(PG)・ロイコトリエン(LT)をはじめとするエイコサノイドは、アラキドン酸カスケードと呼ばれる多段階からなる一連の酵素反応により産生される。アラキドン酸は、種々の細胞外刺激により活性化されたホスホリパーゼ A₂(PLA₂)により生体膜グリセリン脂質より遊離され、シクロオキシゲナーゼ (COX) あるいは 5-リポキシゲ

ナーゼ (LOX) により酸素分子が添加されたのち、各種エイコサノイド合成酵素により PG 類や LT 類にそれぞれ変換される。これらのエイコサノイドは、細胞外に放出された後、細胞表面に存在する各エイコサノイドに特異的な 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体に作用することで、平滑筋の弛緩・収縮作用、血小板凝集作用やその抑制作用、白血球の遊走、発熱・発痛、胃粘膜保護や胃酸分

泌抑制、睡眠・覚醒などの様々な生命現象を調節することが明らかとされている。また、近年 PLA₂ 反応の副産物として考えられていたリゾリン脂質群にもそれぞれに特異的な G タンパク質共役型受容体が同定されてきており、これらの受容体を介して血管新生や細胞遊走など様々な現象に関与していることが明らかとされている。一方、これまでの活発な解析にも関わらず、生体内には前述の既知の脂質メディエーター群以外にも、化学構造や受容体が未だに不明な脂質が複数存在し、これらの解明は新たな創薬の標的となり得る。

申請者は、炎症性サイトカインで刺激したラット線維芽細胞 3Y1 における PGE₂ 産生機構を解析してきた結果、PGE₂ 産生がサイトカイン刺激後誘導される IIA 型分泌性 PLA₂ (sPLA₂-IIA) と同じく誘導型の COX-2 により調節されること、sPLA₂-IIA の mRNA 誘導が VIB 型カルシウム非依存性 PLA₂ (iPLA₂γ) 及び 12/15-LOX により制御を受けることを見いだした。この結果は、iPLA₂γ と 12/15-LOX により産生される何らかの脂質代謝物が sPLA₂-IIA の発現を調節している可能性を示している。この脂質代謝物を同定することを目指し、その活性測定系を構築し、sPLA₂-IIA 発現を誘導する脂質が実際に存在するかを検討した。その結果、sPLA₂-IIA を発現誘導する脂質は、炎症性サイトカイン刺激後、一過的に産生されることを見いだした。さらに、この脂質各分を HPLC で分画したところ、興味深いことに sPLA₂-IIA を誘導する活性は、脂肪酸誘導体やリゾリン脂質が溶出される画分には存在せず、ホスファチジルコリン (PC) が溶出される画分に存在した。さらに、この PC 画分を逆相 HPLC により分離精製したところ、sPLA₂-IIA を誘導する活性は少なくとも 3 種存在することが明らかとなった。これらの結果は、sPLA₂-IIA を誘導する脂質は、iPLA₂γ により遊離された脂肪酸が 12/15-LOX により代謝されたのち、リン脂質の再アシル化反応により再構成された一群の酸化型 PC 分子 (Phospholipid Xs: PLX) である可能性を示している。以上から、申請者が見いだした PLX は、その性質から判断して、エイコサノイドやリゾリン脂質などの脂質メディエーターとは異なるタイプの新奇メディエーターである可能性が高い。

2. 研究の目的

エイコサノイドに代表される生理活性脂質は、特異的な受容体に作用し、それぞれ特徴的な生命現象や病態の進展に関わる。申請者は、合成経路・酵素との反応性から判断して、既知の生理活性脂質とは化学構造の異なる『リン脂質性生理活性脂質 (Phospholipid

Xs: PLX)』が炎症性刺激に伴って産生され、これらがケモカイン等の複数の遺伝子発現を調節することを見いだした。しかし、この生理活性脂質の構造、合成経路、作用機構、生体内での機能は不明である。本研究では、1) この PLX の化学構造・合成経路及びその受容体を同定すること、2) 生体内での役割を明らかとすることで、新たな創薬のターゲットを発見することを目指した。

3. 研究の方法

(1) PLX(s) の同定: 炎症性サイトカインで刺激した 12/15-LOX 過剰発現 3Y1 細胞由来の脂質を出発材料とし、得られた活性画分を順相および逆相 HPLC により分離し、sPLA₂-IIA 及びケモカイン群の発現制御に関わる脂質を検索した。

(2) (1) の方法で部分精製した各フラクションについて、過塩素酸処理を行った。具体的には、50% アセトニトリル溶液に溶解した活性脂質に終濃度 1% となるように過塩素酸を添加し、30 分間 37°C で震盪した。Bligh & Dyer 法により脂質画分を回収し、一部は sPLA₂-IIA 発現誘導に対する効果を、一部は LCMS により解析した。

(3) 4 週齢雄性 C57BL/6 マウスに細胞内 PLA₂ 阻害剤を 10 mg/kg で腹腔内投与した。1 時間後、リポ多糖を 5 mg/kg で投与し炎症を惹起した。24 時間後に各臓器におけるケモカイン mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR により解析した。

4. 研究成果

平成 22 年度は、IIA 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ (sPLA₂-IIA) およびケモカイン群の発現を調節するリン脂質性生理活性脂質 (Phospholipid X) の同定とこの Phospholipid X の生体における機能を明らかとすることを目指し検討を行った。

ケモカイン群の発現を制御する Phospholipid X の検出するため、炎症性サイトカインで刺激した 12/15-リポキシングナーゼ過剰発現 3Y1 細胞より調製した総脂質画分を逆相高速液体クロマトグラフィーにより分離し、各フラクションにおけるケモカイン群の誘導活性を定量的 PCR により解析した。その結果、Ccl1 ケモカインや Cxcl1 ケモカイン中の一部を誘導する活性が、これまで検出していた Phospholipid X 活性 (sPLA₂-IIA の発現誘導を指標に検出していた) と比較して、より極性の高い溶出画分に溶出されることを見いだした。従って、これらのケモカインの発現は、sPLA₂-IIA の発現を調節する Phospholipid X とは異なる生理活性脂質により制御を受ける可能性が考えられた。現在、

これらの生理活性脂質の同定を目指してさらに検討を続けている。

生体内における Phospholipid X の機能を解析することを目的とし、LPS 投与マウス各臓器にケモカイン mRNA 発現に対する AACOCF₃ (PLX の生合成を阻害する) の効果を検討した。その結果、肺、肝臓、胸腺で誘導される一部のケモカインで、AACOCF₃ 処理により部分的に抑制される傾向があることが示された。今後は、これらの事象について、組織学的・細胞生物学的・脂質生化学的に解析して行きたいと考えている。

平成 23 年度は、sPLA₂-IIA 及びケモカイン群の発現を制御する PLX の同定を第一の目標とし、さらに、生体内での機能についても追加実験を行った。PLX の同定については、12/15-リポキシゲナーゼ過剰発現 3Y1 細胞より総脂質を調製し、逆相高速液体クロマトグラフィーで分離後、各溶出画分の sPLA₂-IIA の発現に対する効果を検討した。その後、活性溶出画分について、過塩素酸処理(エポキシドの水解)を行い、活性の変化と分子量の変化する分子を検索した。その結果、複数存在する PLX 活性のうち、逆相 HPLC 分画において比較的溶出時間のはやい画分で過塩素酸処理により活性が低下するものが存在した。この画分に存在するホスファチジルコリン(PC)の分子種を LCMS により解析を行ったが、過塩素酸処理により、1, 2-グリコール構造を有する化合物、すなわち水解反応により分子量が 18 増加し、且つこの処理後のアセチル化により分子量 84 (CH₃CO x 2 分子) 増加するものは検出できなかった。従って、PLX 活性を示す活性本体は、低濃度しか存在しないか、あるいは PC 以外のヘッドグループを有しているリン脂質である可能性が考えられた。

PLX の生体内での機能について、LPS 投与による全身性炎症マウスモデルの各臓器でのケモカイン発現に対する PLA₂ 阻害剤 AACOCF₃ の効果を検討した。その結果、ATK 処理により、肝臓、肺、胸腺において、一部のケモカインの誘導が有意に抑制されることが明らかとなった。

この期間での解析で、sPLA₂-IIA やケモカイン遺伝子発現に関わる新奇生理活性脂質 PLX の少なくとも一部は、構造中にエポキシ基を有している可能性があることが明らかとなった。しかしながら、現在のところ PLX の本体の同定までに至っていない。今後、本研究の手法をさらに改良し、PLX の構造を明らかにしなければならない。さらに、PLX によるケモカインの発現調節機構が、*in vivo* の実験モデルにおいても一部の組織で機能している可能性が高いことが明らかとなった。従って、このケモカインの誘導機構の全

容を明らかとすることができれば、炎症反応における白血球遊走ばかりでなく、ガン細胞の転移機構の解明などにも関連する可能性があり、創薬の標的となることが期待される。

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 1 件)

① Mitochondrial dysfunction and reduced prostaglandin synthesis in skeletal muscle of Group VIB Ca²⁺- independent phospholipase A₂γ-deficient mice (2010) Yoda E, Hachisu K, Taketomi Y, Yoshida K, Nakamura M, Ikeda K, Taguchi R, Nakatani Y, Kuwata H, Murakami M, Kudo I, Hara S. *J. Lipid Res.* **51** 3003-3015.

[学会発表] (計 1 2 件)

① 細胞内ホスホリパーゼ A₂ による走化性因子産生の制御 桑田浩、原田和佳、譲原千尋、滝雄貴、依田恵美子、中谷良人、原俊太郎 (第 5 2 回 日本脂質生化学会)

② Studies on a mechanism of chemotaxis by intracellular phospholipase A₂ Hiroshi Kuwata, Chihiro Yuzurihara, Kazuyoshi Harada, Yuki Taki, and Shuntaro Hara (BMB2010)

③ 細胞内ホスホリパーゼ A₂ 依存的なケモカイン発現機構の解析 原田和佳、木下夏海、桑田浩、依田恵美子、原俊太郎 (日本薬学会第 1 3 1 回年会)

④ ヒト線維芽細胞における走化性因子産生機構の解析 譲原千尋、滝雄貴、原田和佳、桑田浩、原俊太郎 (日本薬学会第 1 3 1 回年会)

⑤ 炎症性サイトカイン刺激線維芽細胞における細胞内ホスホリパーゼ A₂ 依存的な遺伝子発現調節機構の解析 桑田浩、滝雄貴、原田和佳、大石貴代、原俊太郎 (第 8 4 回日本生化学会大会)

⑥ ヒト線維芽細胞における走化性因子産生機構の解析 譲原千尋、原田和佳、桑田浩、原俊太郎 (第 8 4 回日本生化学会大会)

⑦ ケモカイン発現を制御する生理活性脂質の解析 渡邊顕義、大石貴代、桑田浩、原俊太郎 (第 55 回日本薬学会関東支部大会)

⑧ 細胞内ホスホリパーゼ A₂ によるケモカイン産生機構の解析 池上悠貴、原田和佳、木下夏海、依田恵美子、桑田浩、原俊太郎 (第 55 回日本薬学会関東支部大会)

⑨ 塩化コバルト処理の炎症反応に及ぼす効果の検討 轟木秀吾、宇津木冬枝、桑田

浩、原俊太郎（第55回日本薬学会関東支部大会）

⑩ 細胞内ホスホリパーゼ A₂ によるケモカインの発現調節機構 桑田浩、原田和佳、木下夏海、池上悠貴、依田恵美子、原俊太郎（フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー）

⑪ 炎症反応を司る新奇生理活性脂質に関する研究 桑田浩（フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー）

⑫ 細胞内ホスホリパーゼ A₂ による走化性因子産生の制御 桑田浩、讓原千尋、池上悠貴、木下夏海、吉岡由理、原田和佳、依田恵美子、原俊太郎（日本薬学会第132年会）

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑田 浩 (Kuwata Hiroshi)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：80286864

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：