

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16207

研究課題名(和文)原子間力顕微鏡-ラマン法の脂質可視化によるリン脂質変動が呼吸機能に果たす機序解明

研究課題名(英文)Characterization of altered phospholipid composition in respiratory system by visualization using AFM and Raman spectroscopy

研究代表者

鈴木 知之 (Suzuki, Tomoyuki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・脂質生命科学研究部・研究員

研究者番号：60911112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、呼吸機能に必須の生理活性物質である肺サーファクタントの個々のリン脂質成分の機能を明らかにすることを目的とした。我々は、リン脂質合成酵素であるリゾリン脂質アシル基転移酵素に着目し、その遺伝子改変マウスを用いて脂質解析と呼吸機能解析を行った。解析の結果、著明な変動を呈するリン脂質を複数認め、呼吸機能変動を示す可能性があるリン脂質成分を挙げる事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺線維症や急性呼吸切迫症候群の患者さん由来の検体で特定脂質クラスの減少が報告されている。また、肺非結核性抗酸菌症の治療として抗生剤入り吸入剤の基剤としてリン脂質が使用されるなど、肺疾患とリン脂質の関連が示されている。マウス実験では、糖尿病誘発食餌によって飽和脂肪酸含有リン脂質が低下することが報告され、食事療法のターゲットとなる可能性もある。本研究の将来的な展望として、特定脂質と疾患の関連を明らかにすることで新規創薬ターゲット開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：Although it has been implicated that pulmonary surfactant plays essential roles in various lung functions, molecular mechanisms how phospholipids (PLs) in pulmonary surfactant are synthesized and how these molecules cooperate to play respiratory functions are still unclear. The aim of this study is to clarify the biosynthetic pathway and the respiratory function of PL species enriched in pulmonary surfactant. To fulfill these aims, I focused on the lysophospholipid acyltransferases (LPLATs) which biosynthesize membrane PLs. Now, 14 LPLATs are identified. In this study, I measured surfactant PLs and analyzed respiratory functions of 12 kinds of LPLAT deficient mice. Lipidomics revealed that LPLAT1 biosynthesizes surfactant PLs containing saturated fatty acids, and LPLAT3 and LPLAT12 produce surfactant PLs containing omega-3 and omega-6 fatty acids, respectively.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：サーファクタント リピドミクス リン脂質 呼吸機能

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺サーファクタントは脂質に富む界面活性剤で、酸素/二酸化炭素交換の場である肺胞を薄く覆っている。水が持つ高い表面張力を下げることで、肺を虚脱から守っている。その他にも肺サーファクタント中の一部のサーファクタント脂質やサーファクタントタンパク質が抗炎症作用を呈することが知られている。肺サーファクタント中のリン脂質は、2型肺胞上皮細胞の小胞体で合成され、ラメラ小体という器官に蓄積され、肺胞内腔に放出される。肺サーファクタントの脂質成分には、リン脂質、コレステロールや中性脂質があり、リン脂質が約80%を占める。特に二重結合を持たない脂肪酸である飽和脂肪酸のみをもつリン脂質が密集することで表面張力を低下させると考えられていたが、この構造を作成するには数十秒要するため、生理的条件下では現実的には起こり得ない。このため新たに、脂質蛋白相互作用を介した多層的で動的な気液境界モデルが提唱され、検証が待たれている。

(2) リゾリン脂質アシル転移酵素 (LPLAT) は、リン脂質を生合成する酵素を新たに整理した命名法で14酵素から成り、1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase family と membrane-bound O-acyltransferase (MBOAT) family に含まれる酵素で構成されている。これまで、LPLAT8/LPCAT1 は飽和脂肪酸含有ホスファチジルコリン (PC) のリモデリング経路を担い、人工呼吸器誘発性肺障害モデルにおいて防御的に働くことが報告されている。一方で、同PC以外のPC種、加えて他の脂質クラスのリン脂質が呼吸機能にどのように関わっているかは未だ不明である。

### 2. 研究の目的

肺サーファクタントは呼吸機能に必須であり、肺サーファクタント補充療法は新生児呼吸切迫症候群の治療法として広く受け入れている。しかし、肺サーファクタントの個々のリン脂質成分の機能は不明である。そこでリン脂質の生合成酵素であるLPLATに着目した。LPLATs欠損マウスを用いることで、各脂質成分の合成酵素を明らかにし、呼吸機能における各脂質成分の機能を明らかにすることを研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 気管支肺胞洗浄液 (BALF)

マウスの頸部を切開し気道を露出させ、気道にカニューレを挿入し、生理食塩水を溶媒としてBALFを採取した。遠心分離させ細胞成分を除いた上清を回収し、脂質測定に用いた。

#### (2) リピドミクス

得られたBALFをBligh&Dyer法により脂質抽出し、LC-MS/MSを用いて測定した。測定した脂質クラスは、PC、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルグリセロール (PG)、スフィンゴミエリン (SM)であった。PCとSMはコリン基、PGはジアシルグリセロール、他の脂質クラスニュートラルロスキャンで測定を行った。リン脂質中の脂肪酸を測定する際にはネガティブモードを用いた。

#### (3) 呼吸機能測定

BALF回収時の手順と同様に気道にカニューレを挿入し、肺機能解析装置に接続して呼吸機能の測定を行った。別の手法として、呼吸・肺機能評価システム (Noninvasive Airway Mechanics) と呼ばれる非侵襲的な器具を用いて、呼吸数や分時換気能といった生理機能も評価した。

#### (4) 原子力顕微鏡 (AFM) - ラマン法による脂質観察

AFMとラマン顕微鏡を組み合わせ、固相試料をナノスケールの解像度で撮影する手法である。ラマン散乱光は分子の固有振動数に対応しており、原理的には標識化を必要とせず分子を検出可能である。金などに覆われたAFMの針 (カンチレバー) の先端にレーザー光を照射することでラマン散乱光を増強することができる。得られたラマン散乱光とAFMによるナノスケールの空間解像度を組み合わせることで高解像度の脂質の可視化を可能とする。

### 4. 研究成果

#### (1) BALFの包括的脂質解析

まず、肺サーファクタントの脂質分子の概観を捉えるべく、マウスから BALF を採取した。脂質分画（脂肪酸・リン脂質・中性脂質画分）を行い、脂肪酸測定を GC-FID を用いて行った。リン脂質画分の脂肪酸が全脂肪酸の 95%以上を占めており、リン脂質が主成分であることを確認した。続いて、ノンターゲットリポドミクスにて、BALF 中のリン脂質 119 種を同定した。なお、PC がリン脂質種が最も多い脂質クラスであり、次いで PG だった。PC 中ではパルミチン酸を 2 つ有する飽和脂肪酸含有 PC が 40%程度、PG 中ではオレイン酸含有 PG とリノール酸含有 PG がそれぞれ 25%程度ずつ占めていた。

## (2) LPLAT 欠損マウスの BALF リン脂質解析

次に、リン脂質生合成酵素としてリゾリン脂質アシル基転移酵素（LPLAT）に注目し、肺サーファクタントの各リン脂質の合成責任酵素の同定を試みた。リゾリン脂質アシル転移酵素（LPLATs）の全 14 種類のうち 12 種（LPLAT1/AGPAT1, LPLAT3/AGPAT3, LPLAT5/AGPAT5, LPLAT6/LCLAT1, LPLAT7/LPGAT1, LPLAT8/LPCAT1, LPLAT9/LPCAT2, LPLAT10/LPCAT4, LPLAT11/MBOAT7, LPLAT12/LPCAT3, LPLAT13/MBOAT2, LPLAT14/MBOAT1）の欠損マウスにおいて、BALF のリン脂質測定（ターゲットリポドミクス）を実施した。このうち、全身性の遺伝子欠損では生後数日で死亡してしまう LPLAT12 欠損マウスについては、2 型肺胞上皮細胞特異的欠損マウスを作成した。

LPLAT8 が飽和脂肪酸含有 PC の合成を担うことは当研究室から報告されている。他に、LPLAT1 欠損マウスが飽和脂肪酸含有 PC の低下を示した。不飽和脂肪酸含有リン脂質については、-6 脂肪酸含有 PC・PS の合成を LPLAT12、-3 脂肪酸含有 PC・PG の合成を LPLAT3 が担うことが示唆された。

## (3) LPLAT 欠損マウスの呼吸機能解析

呼吸機能に関して、LPLAT8 の欠損がエラストランス低下を引き起こすことが、やはり当研究室から報告されている。現時点では、作成した遺伝子改変マウスで呼吸機能変動の表現型が確定されたマウスは認めていない。LPLAT1 欠損マウスは生後数週間で死亡してしまうため、2 型肺胞上皮細胞特異的欠損マウスを現在作成中である。LPLAT1 以外の残る 11 種の遺伝子改変マウスにおいてパイロットスタディを行い、その中で LPLAT12（2 型肺胞上皮細胞特異的欠損マウス使用）において静肺コンプライアンスの低下が見られた。-6 脂肪酸含有 PC・PS の減少がサーファクタント膜の流動性を失わせ、呼吸機能低下を引き起こす可能性が示唆された。

## (4) AFM-ラマン法による脂質観察

最後に、肺サーファクタントの可視化手段として原子間力顕微鏡-ラマン法を試みた。標準資料であるマラトグリーンのラマンシフトの検出には成功したものの、標準脂質から作成したリポソーム膜では残念ながらシグナルを検出することができなかった。原因として、蛍光顕微鏡と比較してレーザー強度が非常に強いことが一つ挙げられ、また標準資料とは異なりリポソーム膜はリン脂質の二重層であり熱で変性しやすいことも一因として考えられた。細胞観察においては溶液中ではあり熱を吸収できなためか測定は容易である。ラマン顕微鏡単独では 1 ピクセル当たり 1  $\mu\text{m}$  以下で測定することができ、溶液中の細胞撮影において脂肪滴や小胞の観察も可能であった。2 型肺胞上皮細胞を肺組織から回収し、同方法で脂質局在を観察することで、ラメラ小体へのリン脂質輸送経路を解明することが可能と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木知之、柳田圭介、清水孝雄、進藤英雄	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 8
3. 書名 The Lipid	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------