

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790071

研究課題名（和文）生理活性脂質リゾホスファチジン酸の様々な線維症における機能解析

課題名（英文）Roles of Lysophosphatidic Acid in Various Fibrotic Diseases

研究代表者

奥平 真一（OKUDAIRA SHINICHI）

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90570060

研究成果の概要（和文）：

最近、様々な線維症において生理活性脂質リゾホスファチジン酸（LPA）が重要な機能を持っていることが明らかになってきたが、LPAの産生機構やその制御はほとんど明らかになっていなかった。本研究においてわれわれは様々な線維症におけるLPA産生酵素オートタキシン（ATX）の発現解析や、その基質のLC/MSによる解析を通じて、線維症においてLPA産生がどのように活性化するのかを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Lysophosphatidic acid (LPA) has recently been implicated in various fibrotic disease, including pulmonary fibrosis, renal fibrosis and peritoneal fibrosis. It is, however, not clear in which way LPA is produced and how LPA production is regulated in these fibrotic diseases. In this study, by studying expression of LPA-producing enzyme, autotaxin (ATX), and quantifying substrate of ATX using LC/MS, we found that LPA in fibrotic diseases is regulated by up-regulation of both ATX and its substrate, lysophosphatidylcholine (LPC).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生化学

キーワード：リゾホスファチジン酸、オートタキシン、線維症

1. 研究開始当初の背景

断続的に障害を受けた組織や慢性的に炎症が起きている組織では線維芽細胞が集積し、コラーゲン等の細胞外マトリックスを過剰に産生・蓄積することで線維化が進行する。線維化を主徴とする疾患には、肺線維症、腎線維症、肝硬変など様々な疾患があるが、その発症に関わる分子の実体の理解は十分ではない。現在の線維症の治療法は炎症過程をターゲットとした抗炎症薬を用いたものが主であり、それらは十分な治療効果をあげているとは言えない。従って、線維症の組織線維化に直接関わる因子の理解は新たな治療

薬の開発につながることを期待される。

私たちの研究室では、生理活性脂質の一種であるリゾホスファチジン酸（LPA）に関し、その代謝酵素および受容体に着目し、生理・病理機能の解明を目的とした解析を行っている。オートタキシン（ATX）は、2002年に血中のLPA産生酵素としてリゾリン脂質よりLPAを産生するリゾホスホリパーゼDとして当研究室で同定された。その後、ATXはLPA受容体LPA1を介して線維芽細胞の運動を活性化することが明らかとなったが、その生体内における意義は不明であった。私たちはKOマウスの解析を行ない、ATX KOマウスは血管

形成の異常により胎生致死であることを明らかにした (JBC 2006)。また、私たちは ATX に対するモノクローナル抗体を確立し (JBC 2006)、ATX のサンドイッチ ELISA による定量系を確立した (CCA 2008)。その結果、ATX が肝硬変 (JCG 2007)、妊娠末期 (AJRI 2009)、B リンパ腫 (BJH 2008) など種々の疾患、生理的条件下で発現が上昇することがわかった。その過程で私たちは難治性疾患である特発性肺線維症患者で血中 ATX が上昇していることに着目した。そこで、肺胞洗浄液 (BAL) 中の ATX レベルを調べたところ、健常人の BAL には ATX がほとんど検出されないが、患者の BAL 中の ATX は著しく上昇していることを見いだした。次に、個体内で ATX の機能を阻害するモノクローナル抗体を確立し、肺線維症マウスモデルに投与したところ、肺の線維化が顕著に抑制された。これらの解析を通じ、ATX が肺線維症の進行に極めて重要な役割を持つことが初めて明らかとなった。興味深いことに LPA 1 KO マウスにおいてもマウスモデルで肺線維化が顕著に抑制されることが示されており、ATX が LPA1 を介して線維芽細胞の運動を活性化させる機構が肺線維化において重要な役割を持つことが示された。さらに、ATX を阻害すると LPA1KO では見られなかった炎症過程の抑制も見られ、ATX が線維芽細胞の集積を促進するのみならず、他の LPA 受容体を介して炎症の促進にも寄与していることも示唆された。以上のことは ATX が LPA 産生を介して、肺線維化の炎症過程および線維芽細胞活性化の過程の双方に機能していることを示唆しているものである。ところで、ATX の血中レベルは肝硬変の患者で通常時の、数倍から 10 倍程度上昇しており (JCG 2007)、ATX が肝硬変においても何らかの関連があることが示唆されている。また、最近、私たちはマウス腎線維症モデルに対して抗 ATX 抗体を投与すると線維化の抑制が見られることを見いだしている。以上のことから ATX/LPA 経路が線維症一般に重要な因子であることが示唆されており、その詳細な解析は線維症の新たな治療ターゲットの同定につながっていくものと期待される。

2. 研究の目的

本研究で私たちはまず、生体内において ATX によって産生される LPA が肺のみならず、腎線維症、肝硬変など様々な線維症の進行に関与することを私たちが樹立した抗 ATX モノクローナル抗体を用いて個体レベルで明らかにする。また、腎線維症において ATX/LPA 経路がどのように活性化され、LPA がどの細胞にどのように作用しているかを特に脂質代謝酵素および脂質の解析を通して明らかにし

ていく。

3. 研究の方法

肺線維症モデルとしてはブレオマイシン誘導型肺線維症モデル、腎線維症モデルとしては片側尿管結紮モデル、腹膜線維症モデルとしてはグルコン酸クロルヘキシジン投与モデルを作製し、ATX の発現解析や、LC/MS を用いた脂質解析を行った。ATX の発現解析のために、新たにギニアビッグを用いてポリクローナル抗体の作製を行った。

4. 研究成果

これまでに我々は ATX が肺の線維症に機能していることを明らかにしてきたが ATX がどのような細胞に発現しているかについては明らかになっていなかった。そこで我々は最近新たに確立した抗体を用いて ATX の肺線維症、腎線維症、腹膜線維症における発現解析を行った。

(1) 肺線維症モデルにおける ATX の発現

ブレオマイシン誘導型マウス肺線維症モデルにおいて ATX の発現を調べたところ、mRNA レベルでは ATX の発現は低下していた。しかし、抗 ATX 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、ATX の発現は増加傾向にあった。そこでさらに、免疫組織染色を行ったところ、ブレオマイシン投与後 1 週間の炎症期において、マクロファージ様細胞に ATX の陽性シグナルが認められることがわかった (図 1)。一方で *in situ* hybridization による解析では ATX の発現増加は認められなかった。また肺胞洗浄液中の ATX の変動を調べたところ、ブレオマイシン投与後 2 週間をピークに ATX が顕著に増加することがわかった。ATX は mRNA レベルでは増加せず、タンパクレベルで増加していたことから、ATX は炎症に

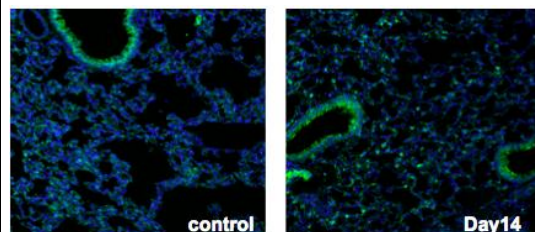


図1 肺線維症モデルにおけるATXの発現変動

よる血管透過性の亢進に伴って血中から肺組織内へ移行していることが想定された。そこで tag で標識したリコンビナント ATX をマウス血中に投与し、還流した後に、肺組織を

回収したところ、肺組織内に ATX が移行していることがわかった。以上のことから ATX は炎症時に血管透過性の亢進に伴って肺組織内へ移行していることが強く示唆された。

(2) 腹膜線維症モデルにおける ATX の発現
腹膜線維症モデルとして、グルコン酸クロロヘキシジン を 2 日おきに 3 週間、マウスに腹腔内投与した。このとき腹膜において ATX の mRNA レベルの有意な上昇は認められなかった。しかし、免疫組織染色を行ったところ、通常の腹膜には全く陽性シグナルが認められなかったが、線維化した腹膜において線維芽細胞に強いシグナルが認められた (図 2)。

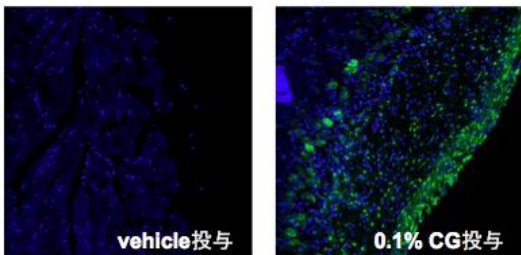


図2 腹膜線維症モデルにおけるATXの発現変動

(3) 腎線維症モデルにおける ATX の発現
腎線維症モデルにおいて ATX は mRNA レベルで低下しており、タンパクレベルでの変動はほとんどなかった。線維化腎臓における ATX の局在を調べたところ、一部の尿管の管腔内において、および浸潤細胞の表面で強い染色像が認められた (図 3)。

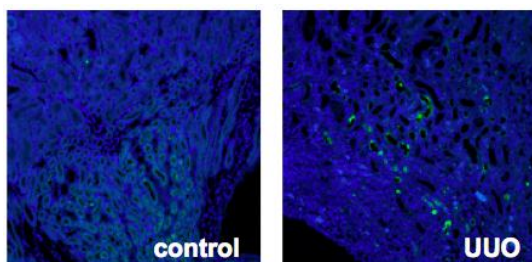


図3 腎線維症モデルにおけるATXの発現変動

(4) ATX の基質の変動

私たちは最近、LPA を含む様々なリゾリン脂質の LC/MS による定量系を確立した。肺線維症モデルにおける肺胞洗浄液中の LPC 量を定量したところ、ブレオマイシン投与後 2 週間後をピークに LPC が増加することがわかった。また LPA の増加も確認された (図 4)。腎線維化モデルにおいて結紮した側の腎臓に蓄積した尿の脂質解析を行ったところ、ATX の基質であるリゾホスファチジルコリン (LPC)

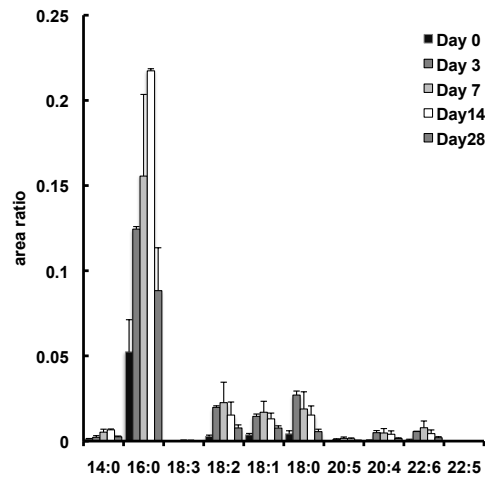


図4 肺線維症モデルにおけるBAL中LPCの変動

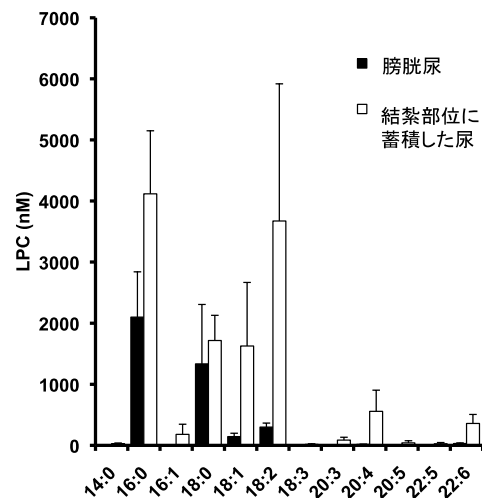


図5 腎線維症モデルにおける尿中LPC

が増加していることを見出した。特に ATX のよい基質となる不飽和脂肪酸含有 LPC が顕著に増加していた (図 5)。以上のことより線維化疾患においては LPA 産生酵素 ATX そのものが増加するだけでなく、基質 LPC も何らかの機構で増加することが明らかとなった。

(5) まとめと考察

以上の結果から私たちは「線維症疾患では、ATX が何らかの機構で局在化し、さらにその基質が増えることで ATX は局所で LPA を産生し、線維症病態発現に寄与する」と想定した。われわれが最近明らかにした ATX の結晶構造より、ATX は細胞膜成分と相互作用しうる特定の領域を持ち、細胞膜上の LPA 受容体に効率よく LPA を受け渡しているモデルが示されたが、このことも上述のわれわれの仮説を支持する。とくに肺線維症において ATX は、血管透過性の亢進に伴って、血中より肺組織内へ移行し、マクロファージなどの炎症細胞上に局在化し、さらに基質 LPC が増加することで効率よく LPA 産生が行われ、線維化の進行に寄与していることが考えられた (図 6)。今

後は、ATX の受容機構の実体を明らかにすること、基質 LPC の誘導がかかるメカニズムを明らかにすることが課題であると考えている。炎症時には様々なホスホリパーゼ A2 分子の関与が言われており、LPC の産生増加に対するこれらの関与を検討していきたい。

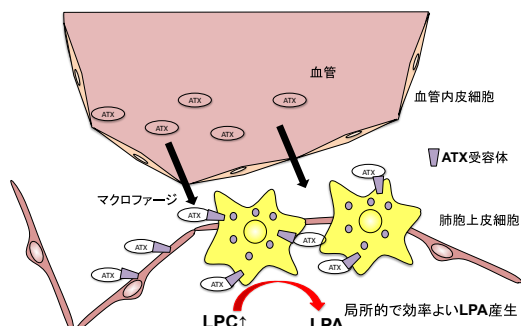


図6 本研究のまとめ図

ATXは何らかの機構で炎症局所に集積し、さらに基質LPCが増えることで、効率よくLPA産生を行い、線維化に寄与している

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 5 件)

- ① Bai Z, Cai L, Umemoto E, Takeda A, Tohya K, Komai Y, Veeraveedu PT, Hata E, Sugiura Y, Kubo A, Suematsu M, Hayasaka H, Okudaira S, Aoki J, Tanaka T, Albers HM, Ovaa H, Miyasaka M, Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis, *J Immunol.*, 査読有, 190(5)巻, 2013年, 2036-2048
DOI: 10.4049/jimmunol.1202025.
- ② Hashimoto T, Okudaira S, Igarashi K, Hama K, Yatomi Y, Aoki J, Identification and biochemical characterization of a novel autotaxin isoform, ATX δ , with a four-amino acid deletion, *J Biochem.*, 査読有, 151(1)巻, 2012年, 89-97
DOI: 10.1093/jb/mvr126.
- ③ Yukiura H, Hama K, Nakanaga K, Tanaka M, Asaoka Y, Okudaira S, Arima N, Inoue A, Hashimoto T, Arai H, Kawahara A, Nishina H, Aoki J, Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors

in zebrafish, *J Biol Chem.*, 査読有, 286(51)巻, 2011年, 43972-43983
DOI: 10.1074/jbc.M111.301093.

- ④ Masuda A, Fujii T, Iwasawa Y, Nakamura K, Ohkawa R, Igarashi K, Okudaira S, Ikeda H, Kozuma S, Aoki J, Yatomi Y, Serum autotaxin measurements in pregnant women: application for the differentiation of normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension, *Clin Chim Acta.*, 査読有, 412(21-22)巻, 2011年, 1944-1950
DOI: 10.1016/j.cca.2011.06.039.
- ⑤ Kawaguchi M, Okabe T, Okudaira S, Hanaoka K, Fujikawa Y, Terai T, Komatsu T, Kojima H, Aoki J, Nagano T, Fluorescence probe for lysophospholipase C/NPP6 activity and a potent NPP6 inhibitor, *J Am Chem Soc.*, 査読有, 133(31)巻, 2011年, 12021-12030
DOI: 10.1021/ja201028t.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 奥平真一、久保裕司、青木淳賢、線維症におけるリゾホスファチジン酸の解析、日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日、横浜
- ② 奥平真一、西増弘志、濱弘太郎、三原恵美子、堂前直、井上飛鳥、石谷隆一郎、高木淳一、濡木理、青木淳賢、リゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの結晶構造解析、第 53 回日本脂質生化学会、2011 年 7 月 23 日、仙台
- ③ 奥平真一、西増弘志、濱弘太郎、三原恵美子、堂前直、井上飛鳥、石谷隆一郎、高木淳一、濡木理、青木淳賢、リゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの結晶構造解析、第 53 回日本脂質生化学会、2011 年 5 月 11 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥平 真一 (OKUDAIRA SHINICHI)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90570060