

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890014

研究課題名(和文)生理活性脂質リゾホスファチジン酸による新規迷走神経制御機構の解析

研究課題名(英文)New function of LPA3 receptor that regulates vagal afferent nerves activation

研究代表者

可野 邦行(KANO, KUNIYUKI)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50636404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性脂質リゾホスファチジン酸(LPA)の受容体の1つであるLPA3の迷走神経興奮作用について、心筋梗塞時の機能に着目した解析を行った。その結果、有機化学的に合成したLPA3アゴニストは心筋梗塞の壊死面積を減少させることが明らかとなった。また臨床検体において心筋梗塞患者の血中LPAレベルは、特にLPA3に活性の強い不飽和型LPAが選択的に上昇していることを見出した。さらにこのメカニズムとしてLPA産生酵素オートタキシンの基質となる不飽和型リゾリン脂質の産生亢進による可能性が新たに示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we assessed the functional effects of LPA3 signal-induced vagal excitation and quantifying LPA and other lysophospholipids level in myocardial infarction. We found that injection of LPA3 agonist named T13, which is 2-acyl LPA analog, significantly decreased infarct area in acute ischemic injury model. We analyzed clinical specimen (plasma) from acute coronary syndrome (ACS) patients by LC-MS/MS, and found unsaturated LPA, which show potent agonist activity for LPA3, were selectively elevated in ACS. In addition, other unsaturated lysophospholipids (LPC, LPE, LPG, LPI, LysoPS) were also increased. These results suggest that unsaturated LPA are produced by increased substrates of autotaxin in myocardial infarction.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：リゾホスファチジン酸 虚血性心疾患

1. 研究開始当初の背景

迷走神経(副交感神経)は脳神経系中で唯一内臓組織まで到達する神経であり、血圧や心拍数の調節などに重要な役割を果たす。また迷走神経は様々な疾患とも関連しており、例えば心筋梗塞を始めとする虚血性心疾患において迷走神経機能とその後の生存率に正の相関性があることが臨床的知見として報告されているが、こういった疾患において何の因子が迷走神経機能を調節しているのかはよく判ってはいなかった。

リゾホスファチジン酸(LPA)は代表的な生理活性脂質の1つであり、LPA 特異的な6種類の受容体を介して多彩な作用を発揮する。LPA 受容体の1つであるLPA₃は着床における重要な機能が明らかになっているが、近年申請者は薬理的なアプローチからLPA₃の新たな機能として迷走神経興奮作用を見出した。有機化学的に合成したLPA₃選択的アゴニストを血中に投与すると迷走神経の興奮を通じて動物個体の血圧及び心拍数は顕著に減少する。またLPA₃ KOマウスの通常時の迷走神経機能を、圧反射を指標として解析したところ圧反射の感受性が一部低下していることから、LPAがLPA₃を介して個体の迷走神経機能を調節することが考えられた。

一方で、血液中のLPAレベルは様々な病態時に変動することが知られており、その中には上述のような迷走神経機能が病態の進展に影響を与えることが知られている虚血性心疾患や妊娠高血圧などが含まれている。よってこのような病的状況下では、LPA産生が変動することでLPA₃が活性化し迷走神経の感受性に影響を与える可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、血中LPAレベルが変動する疾患、特に虚血性心疾患に着目し、病態時のLPA産生メカニズムと産生されたLPAがLPA₃を介して迷走神経を興奮させる可能性とその意義を検討することを目的とした。そこで心筋梗塞動物モデルを作製し、この際の血中リゾリン脂質の測定と産生酵素阻害時の脂質変動を評価した。また虚血時にLPA₃アゴニストを血中に投与することで、虚血による心筋壊死がどのように変化するかを評価した。

また研究の過程でLPA₃が治療ターゲットとなり得る可能性が新たに示唆されたため、低分子化合物型の新規LPA₃アゴニスト及びアンタゴニストをライブラリー化合物中から探索することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 虚血性心疾患におけるLPA₃の機能解析
虚血性心疾患モデルとしてマウスまたは

ラットの左前下行枝結紮による心筋梗塞モデルを用いた。三種混合麻酔下においてマウスを開胸し、冠動脈を結紮後、数十分後に解放し、再灌流を行った。再灌流24時間後に心臓を摘出し、TTC染色を行うことで梗塞巣(心筋壊死部分)を評価した。

(2) 血中リゾリン脂質の解析

血漿サンプルは内標準物質(17:0 LPA, 17:0 LPC)含有メタノールを添加・遠心することで除蛋白を行い、これをトリプル四重極型LC-MSを用いて各種リゾリン脂質(LPA, LPC, LPE, LPG, LPI, LysoPS)を解析した。LCのカラムはCAPCELL PAK C-18カラムを、移動相はギ酸アンモニウム/アセトニトリルを用いた。結果は、内標準物質に対する比で表した。

(3) 新規LPA₃アゴニスト・アンタゴニストの探索

1次スクリーニングはLPA₃安定発現Rh7777細胞を用いたカルシウムアッセイで行った。対象化合物は東北大学オリジナルライブラリー化合物約5400個と、OCDDライブラリー化合物(coreライブラリー及びGPCRフォカスライブラリー)約1万9000個とした。

2次スクリーニングは最近当研究室で確立された新規GPCRアッセイ法ではTGF-shedding assayを用いて行った(Inoue et al, Nature Methods, 1021-1029, (2012))

4. 研究成果

(1) 虚血性心疾患におけるLPA₃の機能解析

マウス心筋梗塞モデルマウスを作製し、冠動脈結紮、解放時にそれぞれLPA₃特異的アゴニスト(T13)を左心室内投与した。その結果、再灌流24時間後の虚血部位の壊死面積がLPA₃アゴニスト投与群では有意に低下することを見出した(下図)。この作用はLPA₃ KOマウスでは全く認められなかった。このことはLPA₃を介した迷走神経興奮作用が、心筋梗塞の新規治療ターゲットとして有望である

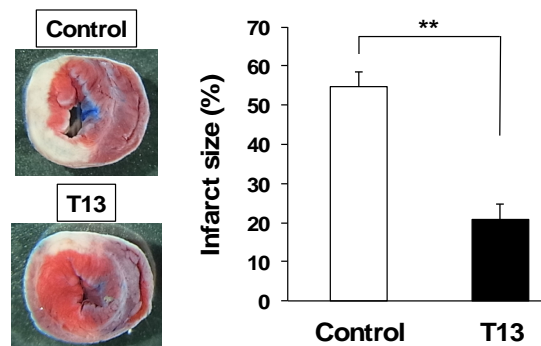


Figure LPA₃ agonistの虚血性心疾患に対する作用

虚血再灌流モデルマウスに対してT13を投与した。図の白い部分が梗塞巣を表す。T13投与によって、梗塞部位が有意に減少した。

可能性を示唆している。

今後は長期的な観点から、急性心筋梗塞に伴う心不全への移行を LPA₃ アゴニストが改善させるかを評価する予定である。

(2) 心筋梗塞時の LPA 産生変動

ヒト急性冠症候群 (ACS) 患者の冠動脈由来血漿サンプル中の LPA を解析した。その結果、ACS 患者の血中では健常者や安定型狭心症の患者と比較して LPA レベルが上昇していた。興味深いことに産生亢進しているのは不飽和型 LPA のみであった。またその他のリゾリン脂質も同様に評価したところ、LPA と同様に LPC、LPE、LPG、LPI、LysoPS といったリゾリン脂質も不飽和型のみが上昇していた。なお、リゾリン脂質から LPA を産生する酵素であるオートタキシンの活性は各サンプル間で変化無かった。以上の結果は、心筋梗塞時の LPA 産生亢進メカニズムが ATX の基質であるリゾリン脂質の産生亢進によるものであることを示唆している。またこういった不飽和型 LPA の LPA 受容体選択性を調べると、6 種類の LPA 受容体の中でも特に LPA₃ に対して活性が強いことから、心筋梗塞時に産生される LPA が LPA₃ を介して心筋保護に働く可能性が考えられた。

次にこの不飽和型リゾリン脂質の産生メカニズムを探るべく、マウス・ラット心筋梗塞モデルを用いた評価を行ったが、これら動物モデルでは少なくとも末梢血においてはリゾリン脂質の有意な産生変動が認められなかったため、現時点では達成できていない。今後、病巣部 (冠動脈付近) からの採血を検討していく予定である。

(3) 新規 LPA₃ アゴニスト・アンタゴニストの探索

上述 (1) の結果から LPA₃ アゴニストが新規治療ターゲットとなり得ることが予想された。しかし本研究で用いた LPA₃ agonist T13 は LPA の構造類似体のため生体内での安定性が十分とはいえない。また一般に LPA₃ 選択的な化合物は存在していない。そこで、LPA₃ 安定発現細胞を用いて低分子型の化合物ライブラリーのスクリーニングを行い新規アゴニストの探索を試みた。この際に東北大に設置された HTS 機器を使用することでオートメーション化を行った。

確立したスクリーニング系によって、計 2 万 4407 化合物をスクリーニングした所、1 次スクリーニングヒット化合物として 37 種類の化合物を見つけることができた。またこの際に同時にアンタゴニストのスクリーニングも並行して行った所、76 種類のヒット化合物が得られ、更に 2 次スクリーニングで LPA₃ 選択的な化合物を同定した。現在これら化合物の構造最適化を進めると共に、マウス心筋梗塞モデルにおける治療効果 (または増悪効

果) を検討している。

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 1 件)

Nakanaga, Keita; Hama, Kotaro; Kano, Kuniyuki; Sato, Takanao; Yukiura, Hiroshi; Inoue, Asuka; Saigusa, Daisuke; Tokuyama, Hidetoshi; Tomioka, Yoshihisa; Nishina, Hiroshi; Kawahara, Atsuo; Aoki, Junken.

Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardiac bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo.

The Journal of Biochemistry vol. 155 issue 4 April 2014. p. 235-241

doi: 10.1093/jb/mvt114.

査読有

[学会発表](計 7 件)

1. 可野 邦行、濱 直人、岩淵 好治、青木 淳賢

リゾホスファチジン酸受容体 LPA₃ をターゲットとした創薬のためのハイスループットスクリーニング、公開シンポジウム東北からの創薬

仙台、平成 25 年 10 月 26 日

2. 可野 邦行

迷走神経の新規制御因子としてのリゾホスファチジン酸、医療系薬学若手研究者セミナー

仙台、平成 25 年 10 月 19 日

3. 可野 邦行、青木 淳賢

New function of LPA₃ receptor that regulates vagal afferent nerves activation

日本生化学会、横浜、平成 25 年 9 月 11-13 日

4. Junken Aoki, Kuniyuki Kano

Lysophosphatidic acid in blood regulates vagal afferent nerves through LPA₃ receptor

FASEB Summer Research Conference, Niseko, Japan, August 5, 2013

5. 可野 邦行

リゾホスファチジン酸の新規迷走神経調節機能

新学術領域研究若手ワークショップ、鳴門、平成 25 年 7 月 2 日

6. 可野邦行, 遠藤智子, 濱弘太郎, 新井洋由, Jerold Chun, 青木淳賢
リゾホスファチジン酸受容体 LPA3 の活性化は迷走神経刺激の感受性を亢進させる
第 85 回日本生化学会大会 (平成 24 年 12 月 14-16 日、福岡、福岡国際会議場)

7. 可野邦行, 遠藤智子, 濱弘太郎, 山田哲也, 片桐秀樹, 新井洋由, Jerold Chun, 青木淳賢、
リゾホスファチジン酸受容体 LPA3 を介した迷走神経活性化作用の解析
第 78 回日本生化学会東北支部会例会 (平成 24 年 5 月 26 日、山形、山形大学医学部)

〔図書〕(計 1 件)

可野邦行, 井上飛鳥, 石黒純, 青木淳賢
リゾリン脂質に対する受容体
遺伝子医学 MOOK (2013), 24, pp. 154-161

〔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
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H24/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

可野 邦行 (KANO KUNIYUKI)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号 : 50636404

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :