

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82609

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890296

研究課題名(和文)炎症免疫応答の収束を制御する sPLA2 の新機能

研究課題名(英文)Nobel roles of sPLA2 that resolves inflammatory immune response

研究代表者

三木 寿美 (MIKI, Yoshimi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号：00632499

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)：炎症の寛解には抗炎症性脂質メディエーターが関与するが、その産生に関わるPLA2サブタイプは不明であった。本研究により、リンパ節のCD11c陽性細胞(樹状細胞およびマクロファージ)に発現しているIID型分泌性PLA2(sPLA2-IID)が高度不飽和脂肪酸のプールを供給することでリゾルビンD1や15-deoxy-PGJ2などの抗炎症性脂質メディエーターの産生を制御する「resolving sPLA2」であることが明らかとなり、本酵素は炎症性疾患の治療に有効である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The molecular entity of PLA2 subtypes acting upstream of antiinflammatory lipid mediators remains unknown. We show that secreted PLA2 group IID (PLA2G2D) is preferentially expressed in CD11c+ dendritic cells and macrophages and contributes to mobilization of a pool of polyunsaturated fatty acids that could serve as precursors for antiinflammatory/pro-resolving lipid mediators such as resolvin D1 and 15-deoxy-PGJ2. Our results highlight PLA2G2D as a "resolving sPLA2" and point to a potential use of this enzyme for treatment of inflammatory disorders.

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：脂質メディエーター 抗炎症 自己免疫疾患 生体分子 モデルマウス ホスホリパーゼ 皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

脂質代謝酵素ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) は脂質メディエーター産生や生体膜リモデリングなどの機能を介して、生体の恒常性の維持や様々な病態において重要な役割を担っている。細胞外分泌性 PLA₂ (sPLA₂) はこれまでの解析から、各分子種に特徴的な組織分布を示し、多様なリン脂質に対して異なる基質特異性を持ち、固有の生体内機能を有することが示されてきている。

不飽和脂肪酸の 1 つであるアラキドン酸 (6 脂肪酸) から産生されるプロスタグランジン (PG) やロイコトリエン (LT) は炎症促進性の脂質メディエーターとして広く認識されており、PLA₂ によるアラキドン酸遊離機構については盛んに研究されてきた。一方でごく最近、体に良い不飽和脂肪酸と言われるエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの 3 脂肪酸あるいはその代謝物が炎症収束性の脂質メディエーターとして機能することが分かってきたが、3 脂肪酸をリン脂質から遊離する PLA₂ の実体は不明であった。

申請者はこれまで、従来機能未知であった sPLA₂ 分子種である sPLA₂-IID に着目し、その発現と機能を明らかにするための研究を行ってきた。その結果、以下の新しい知見を得た。

(1) sPLA₂-IID は二次リンパ組織の常在性樹状細胞や炎症組織に浸潤する炎症性樹状細胞に特異的に発現していることが分かった。

(2) sPLA₂-IID 欠損 (KO) マウスにハプテン誘導接触性皮膚炎モデル (Th1 応答モデル) を適用し、炎症誘導が正常に起こる一方で炎症収束が抑制され炎症が持続すること、樹状細胞が恒常的に活性化状態にあることを見出した。

(3) sPLA₂-IID KO マウスでは、所属リンパ節における 3 脂肪酸 DHA の産生量が減少することが明らかとなった。

これらの結果から、sPLA₂-IID は樹状細胞を介してリンパ節の DHA 産生を制御することで免疫応答を制御していることが想定されたが、その詳細な制御機構については未解明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、脂質代謝の観点から sPLA₂-IID による接触性皮膚炎の収束メカニズムの全貌を解明すると共に、ヒト疾患への展開を視野に樹状細胞が関与する様々な炎症免疫疾患における本酵素の炎症収束因子としての役割の普遍性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

免疫炎症疾患のモデル系として、従来進めてきた接触性皮膚炎 (Th1 応答) に加え、乾癬 (Th17 応答) を適用する。マウスとしては、sPLA₂-IID 過剰発現 (TG) および KO マウスを用い、具体的には以下の解析を行う。

(1) 接触性皮膚炎 (Th1 応答)

ハプテン抗原をマウスに反復塗布して耳介に接触性皮膚炎を誘導する。皮膚厚の経時的モニタリング、皮膚所属リンパ節における免疫細胞の割合と炎症性細胞の活性化マーカー分子の FACS、定量的 PCR による評価、質量分析によるリンパ節脂質メディエーターの網羅的プロファイリング、で同定した抗炎症性脂質の免疫細胞培養系に対する効果の検討。

(2) 乾癬 (Th17 応答)

イミキモド (IMQ) を反復投与して耳介に乾癬を誘導する。皮膚厚の経時的モニタリング、皮膚における炎症性細胞の割合と活性化マーカー分子の FACS、定量的 PCR による評価、質量分析による皮膚脂質メディエーターの網羅的プロファイリング、で同定した抗炎症性脂質を免疫細胞培養系に対する効果の検討。

以上の解析を通じ、各炎症免疫疾患における sPLA₂-IID の炎症収束における役割の普遍性を検証するとともに、sPLA₂-IID 依存的に産生される責任代謝物質 (炎症抑制性脂質分子) を同定する。

4. 研究成果

(1) 接触性皮膚炎 (Th1 応答)

接触性皮膚炎における本酵素の詳細な制御機構を解明するため、リンパ節の脂質メタボローム解析を行った。その結果、sPLA₂-IID はリン脂質のホスファチジルエタノールアミンに選択的に作用し、主に 3 脂肪酸である DHA を遊離した。また、sPLA₂-IID KO マウスでは resolvin D1 (RvD1) や 15-deoxy-12,14-PGJ₂ (15d-PGJ₂) などの抗炎症性脂質メディエーターの産生量が野生型に比べて減少したことから、本酵素は、二次リンパ組織の高度不飽和脂肪酸プールの供給に参与しており、RvD1 や 15d-PGJ₂ などの抗炎症性脂質メディエーターの産生を制御することが明らかとなった。さらに、sPLA₂-IID により代謝制御される DHA や 15d-PGJ₂、RvD1 は樹状細胞やリンパ節細胞の Th1 サイトカイン産生を低下させ、樹状細胞の活性化マーカーである MHC class II の発現を抑制した。以上の結果から、sPLA₂-IID は抗炎症性脂質メディエーターを動員する「抗炎症性 sPLA₂」であることが明らかとなり、sPLA₂-IID による接触性皮膚炎の収束メカニズムの全貌が解明された。

(2) 乾癬 (Th17 応答)

(1) の成果をふまえ、sPLA₂-IID の炎症収束因子としての役割の普遍性を検討するため、sPLA₂-IID KO マウスに乾癬 (Th17 応答) モデルを適用した。その結果、IMQ を塗布した野生型マウスでは炎症誘導 3 日後までのラグタイムの後に経時的な皮膚の肥厚が観察されたのに対し、sPLA₂-IID KO マウスではラグタイム後の皮膚肥厚が増悪する推移を示した。この皮膚における各種炎症マーカーの

発現を定量的 PCR で検討したところ、Th17 応答に特徴的な IL-17 や IL-22、CCL20 などが IMQ によって誘導されており、sPLA₂-IID KO マウスではこの誘導がさらに亢進した。一方、ケラチノサイトから産生される IL-36 や表皮増殖マーカーであるケラチン 1 および表皮炎症マーカーである S100a9 の誘導は差が認められなかった。sPLA₂-IID KO マウスの皮膚所属リンパ節では IL-17 および IL-22 の誘導が著しく増加しており、野生型マウスでは IMQ 刺激により sPLA₂-IID の発現が有意に減少した。マウス皮膚を表皮と真皮に分画し、各皮膚局所に浸潤した免疫細胞を FACS で解析した結果、sPLA₂-IID KO マウスの真皮では活性化型樹状細胞の割合がコントロールから増加しており、IMQ 刺激によって著しく増加することが分かった。乾癬病態に深く関わるとされる表皮の T 細胞においても、コントロールおよび IMQ 刺激のどちらの場合でも sPLA₂-IID KO マウスで増加または増加傾向が認められた。乾癬を誘導したマウスのリンパ節細胞を *ex vivo* で培養すると、sPLA₂-IID KO マウスのリンパ節細胞では野生型に比べて IL-17 の産生が増加しており、この結果は先の定量的 PCR の結果と一致していた。さらに、この炎症応答は 15d-PGJ₂ とその前駆体 PGD₂、並びに RvD1 により有意に抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、sPLA₂-IID による抗炎症作用は Th1 応答のみならず Th17 応答においても重要であることが示唆された。一般に sPLA₂ は炎症免疫応答の促進を制御するとされてきたが、本成果は sPLA₂-IID が従来の sPLA₂ 概念とは異なる新しい役割を持つことを示している。

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2件)

- (1) *Miki, Y., *Yamamoto, K., Taketomi, Y., Sato, H., Shimo, K., Kobayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakanishi, H., Ikeda, K., Taguchi, R., Kabashima, K., Arita, M., Arai, H., Lambeau, G., Bollinger, J.M., Hara, S., Gelb, M.H., and Murakami, M.: Lymphoid tissue phospholipase A₂ group IID resolves contact hypersensitivity by driving antiinflammatory lipid mediators. *J. Exp. Med.*, 210, 1217-1234 (2013) *equally contributed. (査読有)
- (2) 三木 寿美, 山本 圭, 村上 誠: 疾病における脂質代謝ネットワークの機能, *オレオサイエンス*, 13, 485-492 (2013) (査読有)

[学会発表](計11件)

- (1) Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y.,

Gelb, M.H., Lambeau, G. and Murakami, M.: Group IID phospholipase A₂ resolves contact hypersensitivity and psoriasis by driving antiinflammatory lipid mediators. *13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases*, 2013.11.3-6, San Juan, Puerto Rico

- (2) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Gelb, M. H., Lambeau, G. and Murakami, M.: Epidermal phospholipase A₂ group IIF regulates keratinocyte differentiation and skin barrier through driving a unique set of lipid products. *13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases*, 2013.11.3-11.6, San Juan, Puerto Rico
- (3) 三木 寿美, 山本 圭, 村上 誠: IID 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は抗炎症性脂質メディエーターを動員して皮膚炎を寛解する. *第 86 回日本生化学会大会*, 2013.9.11-13, 横浜
- (4) 山本 圭, 三木 寿美, 佐藤 真利子, 椛島 健治, 石川 由起雄, 石井 壽晴, 村上 誠: IIF 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は皮膚疾患の進行に寄与する. *第 86 回日本生化学会大会*, 2013.9.11-13, 横浜
- (5) Miki, Y., Yamamoto, K. and Murakami, M.: Lymphoid tissue phospholipase A₂ group IID resolves contact hypersensitivity by driving antiinflammatory lipid mediators. *FASEB Science Reserch Confernces, Lysophospholipid and Other Related Mediators - From Bench to Clinic*, 2013.8.4-9, Niseko, Japan
- (6) Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H. and Yamamoto, K.: Emerging roles of secreted phospholipase A₂s. *FASEB Science Reserch Confernces, Lysophospholipid and Other Related Mediators - From Bench to Clinic*, 2013.8.4-9, Niseko, Japan
- (7) 山本 圭, 三木 寿美, 佐藤 真利子, 武富 芳隆, 池田 和貴, 中西 広樹, 田口 良, 村上 誠: IIF 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は表皮の恒常性維持および病態に寄与する. *第 55 回日本脂質生化学会*, 2013.6.6-7, 宮城県松島
- (8) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Gelb, M. H., Lambeau, G. Murakami, M.: Group IIF phospholipase A₂ maintains skin homeostasis. *5th International Conference on Phospholipase A₂ Mediates Signaling in Translational Medicine*, 2013.5.20-21, New Orleans, USA

- (9) 三木 寿美, 山本 圭, 村上 誠: IID 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ の欠損は接触性皮膚炎の感作相後期においてリンパ節の炎症を増悪する. **第 85 回日本生化学会大会**, 2012.12.14-16, 福岡
- (10) 山本 圭, 佐藤 弘泰, 佐藤 真利子, 三木 寿美, 武富 芳隆, 村上 誠: 皮膚病態生理機能における IIE 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ の役割. **第 85 回日本生化学会大会**, 2012.12.14-16, 福岡
- (11) 三木 寿美: リン脂質代謝酵素 IID 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ (sPLA₂-IID) は炎症の寛解を制御する. **平成 24 年度東京大学医学総合研究所ポスター発表会**, 2012.10.3, 東京

〔その他〕

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

雑誌論文 (1) プレス発表: 東京都医学研など、脂質成分が炎症にブレーキをかける仕組みを解明. **マイナビニュース**, 2013.5.27, <http://news.mynavi.jp/news/2013/05/27/112/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 寿美 (MIKI, Yoshimi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号: 00632499

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし