

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504002

研究課題名(和文)呼吸器疾患の発症における脂肪酸分画および脂肪酸代謝酵素の病態意義

研究課題名(英文) Pathophysiological significance of fatty acid composition and catalytic enzyme in pulmonary diseases.

研究代表者

松井 弘樹 (MATSUI, HIROKI)

群馬大学・保健学研究科・講師

研究者番号：20431710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：型肺胞上皮細胞は肺サーファクタントの生成に関与し、肺機能の維持に重要な役割を示すことが知られている。肺サーファクタントは約90%が脂質で構成されているが、脂質組成の変化と呼吸器疾患の病態意義に関してはほとんど知られていない。我々は肺における脂肪酸組成と、飽和脂肪酸を不飽和脂肪酸に変換するSCD1、飽和、不飽和脂肪酸の鎖長伸長に関与するElovl6という、2つの脂肪酸触媒酵素に着目した。我々の結果から、型肺胞上皮細胞における脂質組成の変化が肺線維症や肺気腫の発症・進展に重要な役割を示すことが明らかとなり、SCD1、Elovl6が新規の予防・治療のターゲットになりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The alveolar epithelial type II cells is indispensable for the maintenance of pulmonary function because these cells synthesize pulmonary surfactant. Approximately 90 percent of pulmonary surfactant consists of lipids, however, little is known about the deregulation of lipid composition in the pathogenesis of pulmonary diseases. We have focused on the fatty acid composition in lung and two major fatty acid catalytic enzymes, Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), that catalyzes the synthesis of monounsaturated fatty acids (MUFA) from saturated fatty acids (SFA), Elongase of long chain fatty acids 6 (Elovl6), that catalyzes the elongation of long-chain SFA and MUFA. Collectively, our results suggest that deranged fatty acid composition in alveolar type II epithelial cells leads to the onset and development of idiopathic pulmonary fibrosis or pulmonary emphysema, and also suggest that SCD1 and Elovl6 as the novel preventive or therapeutic target for these disease.

研究分野：脂質代謝学

キーワード：脂肪酸分画 触媒酵素 肺線維症 肺気腫

1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患は肺癌や間質性肺炎、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、呼吸器感染症、喘息、睡眠時無呼吸症候群など多彩な病気から成り立っている。いずれの疾患も近年、増加の傾向をたどっており、厚生労働省が行った平成23年人口動態統計における死因順位の結果では、肺炎が脳血管疾患を抜いて悪性新生物、心疾患に次ぐ第3位に入り、COPDも9位に入ること、また悪性新生物の中では肺癌が第1位になるなど、呼吸器疾患に対する予防や治療などの対策が急務とされている。肺癌や肺気腫は喫煙との関連性、睡眠時無呼吸症候群は肥満との関連性が示唆されているが、その他の生活習慣と呼吸器疾患との関連性は明らかでない点が多く、また、原因不明の肺線維症や肺炎なども増加傾向にあるため、速やかな病態機序の解明が望まれている。

我々はこれまで、食習慣と心血管病との関連性、特に遊離脂肪酸が心血管に及ぼす影響について研究を行ってきた。その結果、細胞内に取り込まれた飽和脂肪酸を不飽和脂肪酸へ変換する作用を有する SCD1 (図1参照) という酵素が、心臓や血管に発現しており、飽和脂肪酸の種々の悪玉作用に対して保護的に働いていることを見出した。また、飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸の脂肪酸鎖長を伸長させる酵素である Elovl6 (図1参照) も心臓や血管に発現しており、動脈硬化初期の新生内膜で著明に発現が増加することで、病態の形成に促進的に働くことも明らかにした。以上より、SCD1、Elovl6 の局所的な活性の亢進または低下が、細胞内の脂肪酸分画のバランスを変化させることで、心血管病の発症に強く影響していることが示唆された。

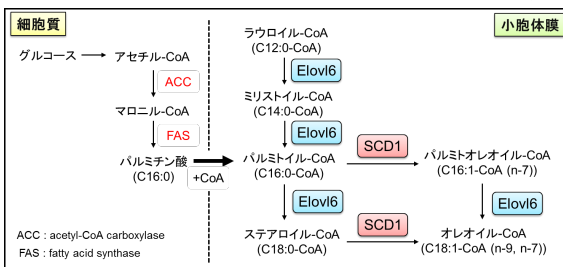


図1 脂肪酸合成系における各酵素の役割

さらに我々は、肺における SCD1 と Elovl6 の発現および病態意義について検討を行った。その結果、SCD1、Elovl6 とともに型肺胞上皮細胞に発現が認められ、肺線維症の標本で発現が減弱すること、また、肺気腫の標本では発現が増加することを見出した。さらに、SCD1 および Elovl6 欠損マウスの肺から脂質を抽出し、脂肪酸組成を測定したところ、飽和脂肪酸であるパルミチン酸の増加、不飽和脂肪酸であるオレイン酸の減少を認め、この脂肪酸組成の変化が、病態に關与する遺伝子やタンパク発現の変化に關与することも見出した。したがって、肺においても Elovl6 の発現変化が、細胞内の脂肪酸分画のバランスを変化させることで、呼吸器疾患の発症に影響していることが示唆された。

2. 研究の目的

これまでの背景から、肺組織や血液中の脂肪酸分画と、その調節因子としての SCD1、Elovl6 の発現や活性が呼吸器疾患の発症予防や治療に重要であると考えられる。そこで本研究では、以下の4つの課題を主目的に研究を進める。

- (1) 呼吸器疾患の病態モデル動物を作成し、肺組織・血中脂肪酸分画と SCD1、Elovl6 の活性を比較検討する
- (2) SCD1、Elovl6 欠損マウスを用いて同様の病態モデルを作成し、肺組織・血中脂肪酸分画のバランスと病的変化との関連性を比較検討する
- (3) 呼吸器疾患患者における肺組織・血中脂肪酸分画と SCD1、Elovl6 の活性を比較検討する
- (4) 脂肪酸分画および SCD1、Elovl6 を標的とした呼吸器疾患の予防・治療戦略を構築する

3. 研究の方法

(1) 呼吸器疾患の病態モデル動物を作成し、肺組織・血中脂肪酸分画と SCD1、Elovl6 の活性を比較検討する

野生型マウスに長期喫煙曝露や、マイクロスプレイヤーを用いて経気道的にエラストラーゼ、プレオマイシンを散布することで、肺気腫、肺線維症モデルを作成する。経時的に体重、摂食量、肺コンプライアンスやエラストランスなどの呼吸機能 (flexiVent)、動物用 CT による低吸収域 (LAA: 気腫性変化を反映) などを計測する。さらに、病態モデルおよびコントロール動物より血液、肺を採取し、それぞれの組織から薄切標本を作成して、病理変化を調べるとともに、SCD1、Elovl6 の発現局在を免疫組織染色によって同定し、病理標本と比較検討する。また、Bligh and Dyer の方法に従って肺組織から脂質を抽出し、組織中の脂肪酸分画をガスクロマトグラフィーにて測定することで、局所における SCD1、Elovl6 活性を求める。各組織から mRNA およびタンパクを抽出し、SCD1、Elovl6 の発現と、肺気腫や肺線維症のマーカーとなる遺伝子群 (MMP-2, 9, TGF- $\beta$ 、IL-6 など) を定量的 PCR 法やウェスタンブロットティング法にて比較検討する。

(2) SCD1、Elovl6 欠損マウスを用いて同様に病態モデルを作成し、肺組織・血中脂肪酸分画のバランスと病的変化との関連性を比較検討する

SCD1 欠損マウス、Elovl6 欠損マウス、さらにダブル欠損マウスを作成して、このマウスに (1) と同様に肺気腫、肺線維症の病態モデルを作成することで、野生型マウスの病態モデルと比較して、病理組織学的に変化が生じているか検討する。変化が生じていた場合、その部位の脂肪酸分画を解析し、分画バランスとしてどの状態が病態の発症・進展に影響するのか検討する。さらに、培養型肺

胞上皮細胞、肺胞マクロファージ細胞、気管支上皮細胞を用い、欠損マウスで認められた脂肪酸分画の変化と SCD1、Elovl6 の活性の程度、および病態に関わる遺伝子やタンパク発現が動物実験の結果と比較して再現性が認められるか、アデノウイルス発現ベクターによる SCD1、Elovl6 の過剰発現、もしくは siRNA によるノックダウンにより検討する。  
(3) 呼吸器疾患患者における肺組織・血中脂肪酸分画と SCD1、Elovl6 の発現動態との関係を比較検討する

群馬大学医学部附属病院および関連病院の患者から採取した正常標本と患者標本を用いて、SCD1 および Elovl6 の免疫組織化学染色を行い、それぞれの発現部位と病理組織形態を比較検討する。また、組織内の脂肪酸分画比を測定して SCD1、Elovl6 活性を求め、発現動態と比較検討する。

(4) 脂肪酸分画および SCD1、Elovl6 を標的とした呼吸器疾患の予防・治療戦略を構築する

(1) ~ (3) の結果より得られた脂肪酸分画組成および SCD1、Elovl6 の発現動態・活性と肺気腫、肺線維症との関連性から、肺組織もしくは血中における適切な脂肪酸分画組成と SCD1、Elovl6 活性を検討する。肺における SCD1、Elovl6 活性が脂肪酸分画比を調節し、呼吸器疾患の重要な因子であることを見出せたら、この分画比をもとにした予防、治療戦略を構築する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 脂肪酸組成と肺線維症に関する検討

我々は、肺線維症の病態における脂肪酸組成と Elovl6 の関わりについて、検討を行った。免疫染色の結果から、野生型マウス肺の型肺胞上皮細胞に Elovl6 の発現を認め、プレオマイシン(BLM)を気管内投与した肺線維症モデルマウスでは Elovl6 の著明な発現低下と Elovl6 活性の低下を認めた。同様に、ヒト正常肺の型肺胞上皮細胞にも Elovl6 の発現を認めたが、特発性肺線維症 (IPF) 患者の標本において、著明な Elovl6 の発現減少を認めた。そこで、Elovl6 が肺線維症の病態発症および進展に関わっているか検討するため、Elovl6 欠損マウスに BLM を投与して肺線維症モデルを作成したところ、野生型マウスと比べて線維化面積の亢進や、組織中コラーゲン量の増加、線維化に関わる procollagen $\alpha$ 1(I)、procollagen $\beta$ 1(I)、SM $\alpha$ -actin の mRNA 発現の増加など、肺線維症の増悪が認められた。次に、Elovl6 欠損マウスで BLM による肺線維症が増悪した機序について調べるため、野生型および Elovl6 欠損マウスの肺から脂質を抽出し脂肪酸分画を測定したところ、C16 飽和脂肪酸であるパルミチン酸の増加および C18 不飽和脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸の減少が認められた。さらに、野生型マウスに BLM を投与すると、Elovl6 欠損マウスに近い脂肪酸分画の変化

が認められた。パルミチン酸はアポトーシスを誘導することが知られていることから、Elovl6 欠損マウスの肺における TUNEL 染色、ROS 産生および Caspase3 タンパクの発現を検討した。その結果、Elovl6 欠損マウスの肺では型肺胞上皮細胞に TUNEL 陽性細胞が認められ、BLM 投与により TUNEL 陽性細胞、活性型 Caspase3 のさらなる増加と ROS 産生の亢進が認められた。また、線維化に密接に関与する TGF- $\beta$ 1 発現に関して、野生型マウスと比較して Elovl6 欠損マウスで増加していた。

これらの現象を in vitro で確認するため、培養マウス型肺胞上皮細胞 (LA-4) に Elovl6 をノックダウンさせると、Elovl6 欠損マウスと同様に、パルミチン酸分画の増加およびオレイン酸、リノール酸分画の減少を認め、アポトーシスの亢進、TGF- $\beta$ 1 発現の増加および酸化ストレスの亢進が認められた。さらに、この細胞に外的にパルミチン酸を添加すると、TUNEL 陽性細胞、活性型 Caspase3、ROS 産生、TGF- $\beta$ 1 発現の増加を認め、オレイン酸、リノール酸の同時添加により、これらの作用がキャンセルされた。

以上、我々の結果から、BLM の投与により型肺胞上皮細胞における Elovl6 の発現が減少すること、Elovl6 欠損に伴い、肺における飽和脂肪酸の増加および不飽和脂肪酸の減少が認められた。さらに、Elovl6 欠損による酸化ストレスの増加からアポトーシス、TGF- $\beta$ 1 の発現が誘導された (図 2 参照)。従って、本研究結果から Elovl6 は肺線維症の発症・進展に深く関与していると考えられ、肺における脂質代謝および脂肪酸分画のバランスが肺のホメオスタシスの維持に重要であることが示唆された。[Nat Commun. 2013 にて発表]

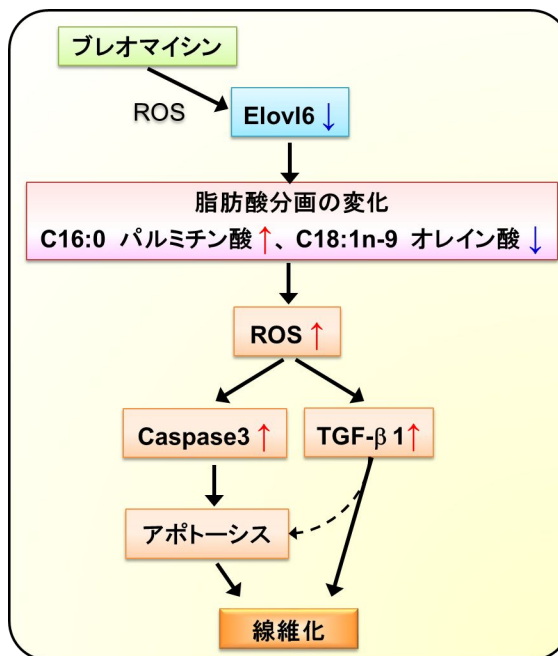


図2 肺線維症におけるElovl6の病態意義

## (2) 脂肪酸組成と肺気腫に関する検討

我々は、喫煙曝露（6ヶ月）やエラストラーゼの気管内投与による肺気腫モデルにおいて、コントロールと比較して型肺胞上皮細胞やマクロファージに Elovl6 が強く発現することを見出した。さらに、Elovl6 欠損マウスの肺組織において、肺胞径の著明な拡大や弾性線維の破壊など、肺気腫を自然発症していることを見出した。X線CT装置による解析から、特に体重減少の強いマウスにおいて、低吸収領域（Low Attenuation Area : LAA）の割合が大きく、肺気腫病変が進行している傾向が確認された。また、このマウスの肺では野生型マウスと比較して、肺気腫の病態に關与する IL-1 や Bax の発現増加、Bcl-2 の発現低下を認め、さらに型肺胞上皮細胞に TUNEL 陽性が認められた。

興味深いことに、Elovl6 欠損マウスの肺組織で、細胞の初期化を誘導する重要な転写因子 Kruppel 様因子 4 (KLF4) の発現が著明に低下することを見出した。KLF4 の発現低下は、肺気腫標本における型肺胞上皮細胞においても確認され、脂肪酸組成の変化によっても KLF4 の発現が低下することを見出した。さらに、培養型肺胞上皮細胞に KLF4 をノックダウンさせると、アポトーシスが誘導され、これが肺気腫の病態に關与する可能性が明らかとなった。

以上の結果から、型肺胞上皮細胞における脂肪酸組成の変化は、KLF4 の発現を増減させ、それに伴って型肺胞上皮細胞の分化度や細胞死に影響することで、肺線維症、肺気腫の病態形成に重要な役割を持つ可能性が考えられた。今後は、テトラサイクリン誘導性の型肺胞上皮細胞特異的 Elovl6 欠損マウスを詳細に解析し、型肺胞上皮細胞の脂質組成と病態との関連性を検討するとともに、種々の肺気腫リスク因子と Elovl6 発現や酵素活性、それに伴う脂質組成の変化を検討することで、新規の肺気腫予防・治療戦略を検討していく予定である。

## 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 12 件)

1. Lee B, Matsui H. (他 7 名, 6 番目) A plan for embedding an interprofessional education initiative into an existing program in a Southeast Asian university. *J Interprof Care.* 査読有 30(3):401-3. 2016.  
doi: 10.3109/13561820.2016.1149156.
2. Kururi N, Matsui H. (他 13 名, 8 番目) Professional Identity Acquisition Process Model in Interprofessional Education Using Structural Equation Modelling: 10-Year Initiative Survey. *J Interprof Care.* 査読有 30(2):175-83. 2016.  
doi: 10.3109/13561820.2015.1092117.
3. Makino T, Matsui H. (他 5 名, 4 番目) Attitudes of nursing school deans toward interprofessional education in Western Pacific Region countries. *J Interprof Care.* 査読有 29(5), 518-9, 2015.  
doi: 10.3109/13561820.2015.1027337.
4. Putri M, Matsui H., Yokoyama T., Kurabayashi M. (他 11 名, 8 番目) CD36 is indispensable for thermogenesis under conditions of fasting and cold stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 457(4):520-5. 2015.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.124.
5. Kururi N, Matsui H. (他 11 名, 5 番目) Repeated cross-sectional study of the longitudinal changes in attitudes toward interprofessional health care teams amongst undergraduate students. *J Interprof Care.* 査読有 28(4), 285-91, 2014.  
doi: 10.3109/13561820.2014.891977.
6. Syamsunarno MR, Matsui H., Yokoyama T., Kurabayashi M. (他 10 名, 9 番目) Fatty Acid Binding Protein 4 and 5 Play a Crucial Role in Thermogenesis under the Conditions of Fasting and Cold Stress. *PLoS One.* 査読有 9(3): e90825, 2014.  
doi:10.1371/journal.pone.0090825
7. Sunaga H\*, Matsui H\*, Yokoyama T., Kurabayashi M. (\*Equal contribution) (他 7 名, 2 番目) Deranged fatty acid composition causes pulmonary fibrosis in Elovl6-deficient mice. *Nat Commun.* 査読有 4:2563, 2013.  
doi: 10.1038/ncomms3563
8. Kageyama A, Matsui H., Yokoyama T., Kurabayashi M. (他 5 名, 2 番目) Palmitic Acid Induces Osteoblastic Differentiation in Vascular Smooth Muscle Cells through ACSL3 and NF- $\kappa$ B, Novel Targets of Eicosapentaenoic acid. *PLoS One.* 査読有 8(6):e68197, 2013.  
doi: 10.1371/journal.pone.0068197
9. Syamsunarno MR, Matsui H., Kurabayashi M. (他 19 名, 10 番目) A Critical Role of Fatty Acid Binding Protein 4 and 5 (FABP4/5) in the Systemic Response to Fasting. *PLoS One.* 査読有 8(11): e79386, 2013.  
doi:10.1371/journal.pone.0079386
10. Iso T, Matsui H., Kurabayashi M. (他 14 名, 9 番目) Capillary Endothelial Fatty Acid Binding Proteins 4 and 5 Play a Critical Role in Fatty Acid Uptake in Heart and Skeletal Muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 査読有 33:2549-57, 2013.  
doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301588
11. Goto K, Matsui H., Yokoyama T., Kurabayashi M. (他 14 名, 9 番目)

- Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  in Capillary Endothelia Promotes Fatty Acid Uptake by Heart During Long-Term Fasting. *J Am Heart Assoc*. 査読有 2(1):e004861, 2013. doi: 10.1161/JAHA.112.004861
12. Makino T, Matsui H. (他 14 名, 5 番目) Attitudes toward interprofessional health care teams in undergraduate students and the alumni. *J Interprof Care*. 査読有 27(3):261-8. 2013. doi: 10.3109/13561820.2012.751901

[学会発表](計 24 件)

1. Koide T, Matsui H. Disrupted fatty acid composition by Elovl6 regulates phenotypic response of vascular smooth muscle cells: Novel intracellular role of AMPK-KLF4-dependent signaling. 第 80 回日本循環器学会総会・学術集会, 2016/3/20, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)
2. Koide T, Matsui H. Elovl6-modulated long chain fatty acid composition suppresses pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. 第 80 回日本循環器学会総会・学術集会, 2016/3/19, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)
3. Matsui H. Induction of a distinct phenotype of vascular smooth muscle cells in Elovl6-deficient mice: Therapeutic implication for diabetic atherosclerosis. 第 80 回日本循環器学会総会・学術集会, 2016/3/18, 仙台市民会館(宮城県・仙台市)
4. Sunaga H, Matsui H. The fatty acid metabolism regulates phenotype of vascular smooth muscle cells via AMPK-KLF4 axis: Therapeutic implication for diabetic atherosclerosis. 第 32 回国際心臓研究学会日本部会総会, 2015/12/12, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
5. 須永 浩章, 松井 弘樹. 脂肪酸結合タンパク FABP4 は急性心筋梗塞の早期診断マーカーとして有用である. 第 22 回日本未病システム学会学術総会, 2015/10/11, 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)
6. Matsui H. Long chain fatty acid composition modulated by Elovl6 plays a critical role in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation, American Heart Association (AHA) Scientific Session 2014, 2014/11/17, マコーミックプレイス(アメリカ・シカゴ)
7. Sunaga H, Matsui H. Early Increase in Serum Fatty Acid Binding Protein 4 Levels in Patients with Acute Myocardial Infarction: Lipolysis as a novel marker for myocardial ischemia, American Heart Association (AHA) Scientific Session 2014, 2014/11/16, マコーミックプレイス(アメリカ・シカゴ)
8. 須永 浩章, 松井 弘樹. 心血管イベント時のダイナミックな血中 FABP4 濃度変化のメカニズムの解明, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2014/7/10, 京王プラザホテル(東京都・新宿区)
9. 須永 浩章, 松井 弘樹. 脂肪酸伸長酵素 Elovl6 は血管平滑筋細胞の脂肪酸組成を調節することで増殖に関与する, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2014/7/10, 京王プラザホテル(東京都・新宿区)
10. Ishii T, Matsui H. Fatty acid binding protein 4 and 5 differentially regulate formation of abdominal aortic aneurysm induced by calcium chloride in mice. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会, 2014/3/23, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
11. Kawaguchi T, Matsui H. Circulating FABP4 is released from adipocytes and capillary endothelial cells by sympathetic activation via beta3 receptor during acute cardiovascular event. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会, 2014/3/23, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
12. Kawaguchi T, Matsui H. Fatty Acid Binding Protein 4 is a direct target gene of Dll4-Notch1 pathway in Capillary Endothelial Cells in Heart. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会, 2014/3/23, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
13. Anjo S, Matsui H. Effects of long chain fatty acid composition regulated by Elovl6 on the proliferation of vascular smooth muscle cells. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会, 2014/3/22, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
14. 松井 弘樹. 食事が血管依存性血管拡張反応(FMD)にもたらす影響について. 第 20 回日本未病システム学会学術総会, 2013/11/9, 学術総合センター(東京都・千代田区)
15. 須永 浩章, 松井 弘樹. 肺線維症における脂質代謝の変化と病態意義に関する検討. 第 20 回日本未病システム学会学術総会, 2013/11/9, 学術総合センター(東京都・千代田区)
16. Matsui H. Fatty acid catalytic enzymes in vascular smooth muscle cells play a crucial role in the pathogenesis of atherosclerosis, European Society of Cardiology (ESC) Congress 2013, 2013/9/2, ライコンベンションセンター(オランダ・アムステルダム)

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

群馬大学大学院保健学研究科

生体情報検査科学講座 横山・松井研究室

<http://heart.health.gunma-u.ac.jp>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

松井 弘樹 (MATSUI HIROKI)

群馬大学・大学院保健学研究科・講師

研究者番号：20431710

### (2)研究分担者

横山 知行 (YOKOYAMA TOMOYUKI)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：70312890

### (3)連携研究者

倉林 正彦 (KURABAYASHI MASAHIKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00215047