

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860591

研究課題名(和文) 分泌型ホスホリパーゼA2とその受容体を基盤とする心血管再生の機序解明と治療薬開発

研究課題名(英文) A study of role of phospholipase A2 and phospholipase A2 receptor in cardiovascular regeneration and development of new drug for cardiovascular disease

研究代表者

渡辺 一広 (WATANABE, Kazuhiro)

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：50535549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホリパーゼA2(PLA2)とその受容体は、様々な形で生体応答に深く関与していることが示唆されている。本研究では、分泌型ホスホリパーゼA2(PLA2)とその受容体の心血管再生への関与を解明し、PLA2受容体を標的とする有用な心血管病予防・治療薬を開発する論理基盤の構築を目的とした。その結果、PLA2受容体がPLA2とは独立して線維芽細胞の遊走促進機能を介して心筋梗塞後の心破裂を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to examine a possible role of secretory PLA2 and PLA2 receptor in cardiovascular regeneration, and to develop a new drug for prevention from cardiovascular diseases. As a result, PLA2R inhibit cardiac rupture after myocardial infarction by increasing migrations of fibroblasts to the infarcted lesion.

研究分野：循環器疾患と脂質代謝

キーワード：ホスホリパーゼA2受容体 心血管病

## 1. 研究開始当初の背景

分泌型ホスホリパーゼ A2 (secretory phospholipase A2; sPLA2) は、アラキドン酸カスケードの最上流に位置する酵素である。sPLA2 によって産生されるアラキドン酸カスケード関連脂質メディエーターは炎症、血管新生、細胞遊走、細胞増殖に関与している。

近年、sPLA2 に対する受容体の存在が明らかとなった。sPLA2 には複数のサブタイプが存在するが、その一部は酵素活性による作用に加え、PLA2 が PLA2 受容体を介して酵素活性非依存的に脂質メディエーターを産生し、細胞遊走・増殖促進作用を発揮することが示唆されており (sPLA2-PLA2 受容体システム) sPLA2-PLA2 受容体システムが心血管再生に関与している可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

sPLA2-PLA2 受容体システムが酵素活性非依存的に脂質メディエーター産生作用を有することが示唆されているものの、sPLA2-PLA2 受容体システムの心血管再生への関与は明らかにされていなかった。よって、本研究では以下のことを目的とする。

sPLA2-PLA2 受容体システムの心血管再生への関与を明らかにする。

その分子レベルの機序を解明する。

sPLA2-PLA2 受容体システムを基盤とした心血管再生治療薬開発の基盤を構築する。

## 3. 研究の方法

### 心筋再生

PLA2 受容体 K0 マウスと WT マウスに心筋梗塞モデルを作成し、生存率、心筋梗塞領域、心エコーによる心機能、ヒストロジー等を比較検討する。

PLA2 受容体を発現する責任細胞を特定し、PLA2 受容体 K0 マウスと WT マウスから PLA2 受容体発現細胞を単離培養し、その機能を比

較検討する。

心筋梗塞病態モデルにおいて PLA2 受容体のリガンドとなる sPLA2 を特定し、*in vitro* の実験系において sPLA2-PLA2 受容体システムの機能を明らかにする。

PLA2 受容体 K0 マウスの心筋に WT マウス由来の PLA2 受容体発現責任細胞を移植することで、梗塞領域の改善効果を調べる。

### 血管新生

PLA2 受容体 K0 マウスと WT マウスに下肢虚血モデル、マトリゲルプラグアッセイ、大動脈リングアッセイを行い、血管新生の程度を比較検討する。

## 4. 研究成果

PLA2 受容体 K0 マウスと WT マウスに心筋梗塞モデルを作成したところ、PLA2 受容体 K0 マウスにおける梗塞サイズ、左室収縮能、血圧は WT マウスと同様であったが、K0 マウスでは心筋梗塞後の心破裂発症率が WT マウスに比べて有意に高値であった。

PLA2 受容体は梗塞部位の線維芽細胞に発現しており、PLA2 受容体 K0 マウスにおける梗塞領域では、WT マウスの梗塞領域に比べて線維芽細胞浸潤の低下を認めた。さらに、PLA2 受容体 K0 マウスの梗塞領域では、WT マウスの梗塞領域に比べて、Tgfb1、Collagen 1、Collagen 3、Ctgf 等の線維化関連マーカーの発現低下を認めた。また、シリウスレッド染色やヒドロキシプロリン定量による線維化の定量評価においても、PLA2 受容体 K0 マウスの梗塞領域では、WT に比べて線維化の程度が減少していることが示された。

PLA2 受容体 K0 マウスと WT マウスの心臓から線維芽細胞を単離培養し、その機能を比較検討したところ、PLA2 受容体 K0 マウス由来の心臓線維芽細胞は WT マウス由来の心臓線維芽細胞に比べて遊走能が低下していた。

さらに、PLA2 受容体 K0 マウスの心筋梗塞領

域周辺部心筋内に PLA2 受容体 K0 マウス由来線維芽細胞を移植した場合と WT マウス由来の線維芽細胞を移植した場合とを比較したところ、WT マウスの線維芽細胞を移植した場合の方が心筋梗塞後の心破裂を防ぐ効果が高いという結果が得られた。

心筋梗塞病態モデルの病変局所において、PLA2 受容体と親和性の高い sPLA2 サブタイプの発現は極めて低く、上記の表現型は sPLA2-PLA2 受容体システムによるものではなく、sPLA2 とは独立した PLA2 受容体の作用によるものであると考えられた。

以上より、PLA2 受容体は、sPLA2 とは独立した作用により心筋梗塞部位への心臓線維芽細胞の遊走を促進することで、心筋梗塞領域での細胞外マトリックスの合成・分泌を促し、障害組織の癒着を促進して心破裂を防ぐ作用を有するものと考えられた。

引き続き、PLA2 受容体過剰発現細胞を用いて PLA2 受容体と遊走に関する詳細なメカニズムの解析を行ったところ、PLA2 受容体の c-type lectin domain および fibronectin-like type II domain がコラーゲン依存的な遊走に関与することが明らかとなった。

以上の結果は、sPLA2-PLA2 受容体システムによるものではなく、sPLA2 とは独立した PLA2 受容体の働きを明らかにしたものである。

一方、PLA2 受容体の血管新生における役割を調べるため、PLA2 受容体 K0 マウスと WT マウスに、下肢虚血モデル、マトリゲルプラグアッセイ、大動脈リングアッセイを施したが、いずれも K0 と WT で血管新生の程度に有意差は認められなかった。この3種類の実験系においては、リガンドとなる sPLA2 の発現が不十分であったために sPLA2-PLA2 受容体システムが作動していない可能性が考えられた。

## 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) Soichiro Takahashi, Kazuhiro Watanabe, Yosuke Watanabe, Takamitsu Nakamura, Kazuto Nakamura, Jun-ei Obata, Kiyotaka Kugiyama. c-type lectin domain and fibronectin-like type II domain of phospholipase A2 receptor 1 modulate binding and migratory responses to collagen. FEBS Letter. 2015; 589: 829-835, DOI: 10.1016/j.febslet.2015.02.016, ( 査読あり )

- 2) Hideto Mishina, Kazuhiro Watanabe, Shun Tamaru, Yosuke Watanabe, Daisuke Fujioka, Soichiro Takahashi, Koji Suzuki, Takamitsu Nakamura, Jun-ei Obata, Kenichi Kawabata, Yasunori Yokota, Osamu Inoue, Makoto Murakami, Kohji Hanasaki, Kiyotaka Kugiyama. Lack of Phospholipase A2 Increases Susceptibility to Cardiac Rupture after Myocardial Infarction. Circulation Research. 2014; 114: 493-504, DOI:10.1161/CIRCRESAHA.114.302319 ( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

- 1) Group IIA, IVA and V PLA2 in coronary thrombi were associated with recurrent cardiac events and the development of atherosclerosis after

acute myocardial infarction. Kazuhiro Watanabe, Soichiro Takahashi, Koji Suzuki, Daisuke Fujioka, Kiyotaka Kugiyama, et al.

2015年2月10-12日、6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2015), Keio Plaza Hotel, Shinjuku, Tokyo.

- 2) The expression of group IIE and VSPLA2 is associated with an increased expression of osteogenic molecules in human calcified aortic valves. Kazuhiro Watanabe, Koji Suzuki, Soichiro Takahashi, Daisuke Fujioka, Kiyotaka Kugiyama, et al.

2015年2月10-12日、6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2015), Keio Plaza Hotel, Shinjuku, Tokyo.

- 3) Mice Lacking Phospholipase A2 Receptor are Susceptible to Cardiac Rupture After Myocardial Infarction through the Impaired Healing of the Infarct Region due to Myofibroblasts Dysfunction. Hideto Mishina, Kazuhiro Watanabe, Kiyotaka Kugiyama, et al.

2013年11月16-20日、米国心臓病学会, Dallas, America.

- 4) Deficiency of Phospholipase A2 Receptor Exacerbates Airway Inflammation and Pulmonary Vessel Remodeling After Ovalbumin Treatment Through Impaired Clearance of Secretory Phospholipase A2. Shun Tamaru, Hideto Mishina, Kazuhiro Watanabe, Kiyotaka Kugiyama, et al.

2013年11月16-20日、米国心臓病学会, Dallas, America.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

渡辺 一広 (WATANABE, Kazuhiro)  
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：50535549

### (2)研究分担者 なし