

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462665

研究課題名(和文) 脂質分解酵素による眼内浄化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of intraocular clearance system by lipid-degrading enzyme

研究代表者

平岡 美紀 (HIRAOKA, MIKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80246983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、lysosomal phospholipase A2(LPLA2)を軸に、眼疾患のリン脂質代謝を解析した。

自己免疫性ぶどう膜炎ラットで炎症と呼応して房水中LPLA2活性が増減した。また、炎症での眼内浸潤マクロファージにLPLA2と酸化リン脂質が発現した。LPLA2欠損マウスでエンドトキシンによる眼内炎症が遷延した。臨床検体では緑内障で房水中LPLA2が高かった。In vitroでは、LPLA2が非酸化型に比べ、一部の酸化リン脂質を効率良く分解した。LPLA2過剰発現細胞で酸化リン脂質による細胞障害が軽減した。

以上、眼疾患のリン脂質代謝でLPLA2の役割が示された。

研究成果の概要(英文)：The goal of this project is to clarify the involvement of phospholipids metabolism in ocular disease focusing the lysosomal phospholipase A2 (LPLA2).

In experimental autoimmune uveitis (EAU) model rats, the LPLA2 activity and the amount of phospholipids of the aqueous humor were concomitant with the extent of inflammation. The expression of LPLA2 and the production of oxidized phospholipid were observed in infiltrated macrophages. The LPLA2 deficient mice showed prolonged inflammation in endotoxin-induced uveitis. The clinical samples of aqueous humor from open-angle glaucoma patients showed higher LPLA2 activity than control group. In vitro, the hydrolysis of some truncated oxidized phospholipid (ox-PL) by LPLA2 was efficient compared to the non-oxidized phospholipids. Additionally, LPLA2 overexpressed cells catabolized truncated ox-PL and were protected from cell growth inhibition by ox-PL.

研究分野：眼の生化学・分子生物学

キーワード：房水浄化機構 眼内炎症 リン脂質 リン脂質分解酵素 自己免疫性ぶどう膜炎 酸化リン脂質

1. 研究開始当初の背景

毛様体で産生された房水は、線維柱帯から排出され、恒常的に眼球へ安定した内圧と透明性をもたらす。一方、ぶどう膜炎に伴う前房炎症、眼の手術後や外傷等で見られる前房内の多量の炎症細胞・出血など、いわゆる「不要物」は前房内の自浄作用によって速やかに消退することは臨床の場でよく見られる。このような様々な眼内の不要物の迅速な浄化作用は、眼内の透明性を保ち良好な視機能を維持するために必須である。しかしこの分子機構については、房水循環で線維柱帯の濾過機構以外その詳細は明らかではない。

この眼内の不要物質の分解代謝に関しては、リゾソーム由来の加水分解酵素が眼内に豊富に存在し、これらが眼内不要物質の分解消化を担っていること、およびこの浄化機構の障害が治療抵抗性の慢性ぶどう膜炎や開放隅角緑内障をはじめ多くの眼疾患の病因になっている可能性が示唆された(Hayasaka S, Surv Ophthalmol.1983)。生理的老化や病的に生じる眼内不要物はいわゆる変性または死滅した細胞やその断片である。中でも最も豊富に含まれる細胞膜由来のリン脂質は、水に不溶性なため、その分解代謝は眼内の浄化機構の中で必須かつ重要である。しかし本領域に関係する研究のほとんどが水溶性成分の蛋白質等に関するもので、脂質代謝に関しては現在までなかった。

これまで申請者の研究グループは、リゾソームに存在する脂質分解酵素であるリゾソームホスホリパーゼ A2(以下 LPLA2)について、以下の結果を報告してきた。

- 1) LPLA2のクローニングおよび単離の結果、LPLA2は分子量約45kDaの水溶性糖タンパク質で、グリセロリン脂質を基質とし、活性中心はtriadのセリン残基にある。(Hiraoka M, et al. J Biol Chem. 2002、J Lipid Res. 2005)。

- 2) LPLA2は全身の臓器に分布するが、特に肺泡マクロファージに高発現(Hiraoka M, et al. J Biol Chem.)。

- 3) 申請者が作成したLPLA2欠損マウスの肺泡マクロファージで、著明なリン脂質の貯留がみられ、LPLA2が肺泡サーファクタントのリン脂質代謝を司る(Hiraoka M, et al. Mol. Cell Biol. 2006)。

一方、眼とLPLA2について、これまで得られた知見は、

- 1) 房水中のLPLA2活性は高く、血清の約2倍あり、眼組織では線維柱帯・ぶどう膜の順に活性が高かった(Abe, Hiraoka, Ohguro, IOVS 2012)。
- 2) ルイスラットのエンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデルで、房水中のLPLA2活性は眼内炎症と比例して増減を示した。さらにぶどう膜炎患者の臨床検体では正常群に比して房水中のLPLA2活性が優位に高かった(Hiraoka, Abe, Ohguro, Exp. Eye Res. 2013)。これらのことから、LPLA2が眼内において房水のクリアランスシステムに大きな役割を果たしていると考えられる。

2. 研究の目的

眼内炎症を鎮静化や眼の透明化維持に、LPLA2によるリン脂質代謝が関わることを証明し、眼疾患への関与を解明する。

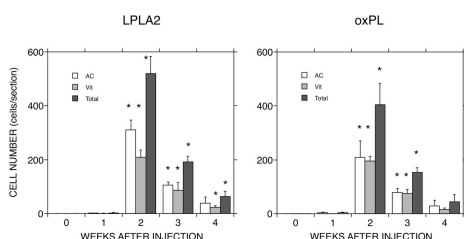
3. 研究の方法

- 1) 7週齢のルイスラットに、網膜抗原(IRBP)の合成ペプチドと完全フロイト・アジュバントで免疫し、ぶどう膜炎(EAU)を誘導した。免疫前と免疫2週後のラット房水を収集し、LPLA2活性を測定した。さらに、免疫前と免疫後1週毎に眼球を摘出し、組織内の酸化リン脂質の局在とLPLA2発現を免疫組織学的手法で検出した。

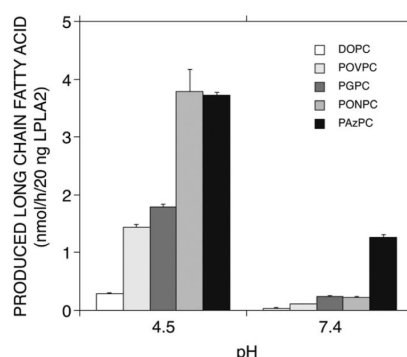
- 2) LPLA2 欠損マウスにエンドトキシンを腹腔投与してぶどう膜炎を誘導し、野生型と病型を組織学的に解析した。
- 3) 臨床検体の房水を収集し、正常群、緑内障群、ぶどう膜炎群、網膜疾患群で LPLA2 活性を統計学的に比較した。
- 4) *in vitro* で、LPLA2 を恒常的に過剰発現させた COS7 培養細胞に酸化リン脂質を添加し、細胞障害性を比較した。また、LPLA2 による酸化リン脂質の分解を検討した。

4. 研究成果

- 自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) ラットにおいて、炎症と呼応して房水中の LPLA2 活性が増減し、炎症の極期では房水中のリン脂質が増加した。また、炎症で眼内に浸潤したマクロファージに LPLA2 と酸化リン脂質が発現しており、その要請細胞の数は炎症の程度と並行して増減した。



- LPLA2 欠損マウスではエンドトキシンによる眼内炎症が遷延した。
- 臨床検体の房水中の LPLA2 活性を眼疾患ごとに比較すると、正常群と網膜疾患群では有意差がなかったが、緑内障群およびぶどう膜炎群では正常群と比べ、優位に LPLA2 活性が高かった。
- In vitro* では、LPLA2 が非酸化型に比べ、ある種の酸化リン脂質では効率良く分解した。また、LPLA2 過剰発現細胞では酸化リン脂質による細胞障害の軽減が見られた。さらにこの恒常的過剰発現細胞では、投与した酸化リン脂質の分解が著明に亢進していた。



DOPC: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-PC

POVPC: 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-sn-glycero-3-PC

PGPC: 1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-PC

PONPC: 1-palmitoyl-2-(9'-oxo-nonanoyl)-sn-glycero-3-PC

PAzPC: 1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-PC

以上から、眼疾患、特にぶどう膜炎や緑内障の房水で、LPLA2 活性が高く、特にぶどう膜炎では炎症によって浸潤したマクロファージが主になって LPLA2 活性が強くなると考えられた。この眼炎症時の LPLA2 活性の亢進が眼内のリン脂質代謝を促進させて、炎症の沈静化に導くと考えられた。反対に LPLA2 活性不全は眼内炎症の遷延をもたらした。さらに眼炎症での LPLA2 は炎症によって生成され、その蓄積によって細胞障害を引き起こす酸化リン脂質の分解に重要であることが示された。これらのことから、眼炎症や緑内障でのリン脂質および酸化リン脂質の変化とその代謝での LPLA2 の関与が明らかになった。

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 7 件)

- 1) Abe A, Hiraoka M, Ohguro H, Tesmer JJ, Shayman JA. Preferential hydrolysis of truncated oxidized glycerol-phospholipids by lysosomal phospholipase A2. *J Lipid Res.* 2017;58(2):339-349. (査読あり)

- 2) Sawada K, Hiraoka M, Abe A, Kelly R, Shayman JA, Ohguro H. Prolonged ocular inflammation in endotoxin induced uveitis in lysosomal phospholipase A2 deficient mice. *Curr Eye Res*. 2017年;42(4):611-616. (査読あり)
- 3) Ohkawa E, Hiraoka M, Abe A, Murata M, Ohguro H. Fluctuation of lysosomal phospholipase A2 in experimental autoimmune uveitis in rats. *Exp Eye Res*. 2016年;149:66-74. (査読あり)
- 4) 平岡美紀, 青木悠, 大黒浩 新しい評価法を用いた前部強膜炎の病態解析の検討 臨床眼科 2016年70巻3号 Page337-341. (査読あり)
- 5) Sawada K, Hiraoka M, Ohguro H. Effect of Antiglaucoma Medicine on Intraocular Pressure in DBA/2J Mice. *Ophthalmic Res*. 2016;55(4):205-11. (査読あり)
- 6) Hiraoka M, Abe A, Inatomi S, Sawada K, Ohguro H. Augmentation of lysosomal phospholipase A2 activity in the anterior chamber in glaucoma. *Curr Eye Res*. 2015年19:1-6. (査読あり)

[学会発表](計 11 件)

- 1) 平岡美紀, 阿部晃, 大黒浩 実験的自己免疫性ぶどう膜炎における過酸化リン脂質の代謝 日本眼科学会雑誌 121巻臨増 Page171会議録 第121回日本眼科学会総会 2017年4月6日～9日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)
- 2) 阿部晃, 平岡美紀, 大黒浩, Tesmer JJ, Shayman JA. リソソーム・ホスホリパーゼ A2 による短鎖酸化リン脂質の

- 優先的加水分解 第39回 日本分子生物学会年会 2016年11月30日～12月2日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 3) 平岡美紀 房水浄化機構におけるリソソームホスホリパーゼの役割 第20回 眼科分子生物学研究会 2016年6月25日～26日 登別温泉第一滝本館(北海道登別市)
- 4) 平岡美紀, 阿部晃, 大黒浩 実験的自己免疫性ぶどう膜炎における過酸化リン脂質の産生 第120回日本眼科学会総会 2016年4月7日～10日 仙台国際センター(宮城県仙台市)
- 5) 平岡美紀, 青木悠, 大黒浩 新しい評価法を用いた前部強膜炎の病態解析の検討 ステロイドパルス療法が著効した網膜剥離を合併した後部強膜炎の一例 第69回 日本臨床眼科学会 2015年10月22日～25日 名古屋国際会議場他(愛知県名古屋市)
- 6) 平岡美紀, 阿部晃, 大黒浩 蛍光標識したラテックスビーズを用いた豚眼の線維柱帯細胞の貪食能評価 第119回日本眼科学会総会 2015年4月16日～19日 ロイトン札幌他(北海道札幌市)
- 7) 大川映, Lennikov Anton, 平岡美紀, 阿部晃, 大黒浩 実験的自己免疫性ぶどう膜炎モデルラットにおけるリソソームホスホリパーゼ A2 の役割 第119回日本眼科学会総会 2015年4月16日～19日 ロイトン札幌他(北海道札幌市)
- 8) 澤田 奏子, 阿部晃, 平岡美紀, Shayman J, Kelly R, 大黒浩 マウスぶどう膜炎モデル(EIU)におけるリソソームホスホリパーゼ A2(LPLA2) の関与 第119回日本眼科学会総会 2015年4月16日～19日 ロイトン札幌他(北海道札幌市)

9) 日景 史人、平岡 美紀、阿部 晃、大黒 浩 ラット光障害モデルにおける黄色フィルターの網膜保護作用の検討
第 119 回日本眼科学会総会 2015 年 4 月 16 日～19 日 ロイトン札幌他(北海道札幌市)

10) 阿部 晃、平岡 美紀、大黒 浩 リソソーム・ホスホリパーゼ A2 による酸化リン脂質の優先的加水分解 第 37 回日本分子生物学会年 2014 年 11 月 25 日～27 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

11) 平岡 美紀、阿部 晃、大川 映、澤田 奏子、Kelly R、Shayman J、大黒 浩 眼内炎症におけるリソゾームホスホリパーゼ A2(LPLA2) の役割 第 48 回 日本眼炎症学会 2014 年 7 月 4 日～5 日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 美紀(HIRAOKA, Miki)

札幌医科大学・眼科学講座・講師

研究者番号: 80246983

(2) 研究分担者

大黒 浩(OHGURO, Hiroshi)

札幌医科大学・眼科学講座・教授

研究者番号: 30203748

阿部 晃(ABE, Akira)

札幌医科大学・眼科学講座・講師

研究者番号: 70136927