

研究課題別評価書

1. 研究課題名

分泌性ホスホリパーゼA₂群の分子種固有の機能の解明

2. 氏名

村上 誠

3. 研究のねらい

膜グリセロリン脂質の *sn*-2 位を加水分解して脂肪酸とリゾリン脂質を生成する酵素ホスホリパーゼA₂ (PLA₂)には多数の分子種が存在し、細胞内に存在するcPLA₂、iPLA₂群と、細胞外に分泌されるsPLA₂ (secreted PLA₂)群に大別される。細胞内のリン脂質代謝における細胞内PLA₂群の役割については多くの解析がなされてきたが、異なる組織分布を示す多数のsPLA₂分子種が、①細胞外環境の如何なる局面で、②どのようなリン脂質代謝反応を制御するのか、③その結果としてどのような生体応答と関連し、④その破綻が如何なる病態と結びつくのかについては、一部の分子種を除いて殆ど未解明であった。本研究では、遺伝子改変マウスを用いて6種の機能未知の sPLA₂ アイソザイムの生理的・病理的機能を解明し、脂質メタボロームの見地から各酵素の生体内基質を同定することを目指す。

4. 研究成果

1) sPLA₂と生殖

6種類のsPLA₂アイソザイムのKOマウスのうち、sPLA₂-III KOマウスのみが著明な繁殖異常を示した。この表現型は雄側に起因しており、sPLA₂-III KOマウスの精巣上体尾部より得た精子は、数は正常であったが運動性が著しく低下しており、このためKO精子は卵子の透明体を通過する推進力が弱く、受精率が顕著に低下することがわかった。電子顕微鏡により精子の超微細形態を観察したところ、KO精子は鞭毛軸索の対照リング構造が損なわれていた。マイクロアレイによる遺伝子プロファイリングの結果、KOマウスでは精巣の遺伝子発現に異常は認められなかったが、精巣上体において精子の機能(鞭毛の軸索構造、運動性、透明体結合など)に関わる遺伝子群の発現が一括的に減少していた。雄性生殖器の免疫組織染色の結果、sPLA₂-IIIは精子の機能的成熟に関わる組織である精巣上体の起始部管腔上皮細胞に強く発現していた。更に、脂質質量分析により生殖器の脂質成分の網羅的プロファイリングを行ったところ、KOマウスの精巣上体においてアラキドン酸、ドコサヘキサエン酸などの高度不飽和脂肪酸、ならびにそのリボキシゲナーゼ代謝産物が減少傾向にあること、KOマウスでは精巣上体液中にリン脂質の異常蓄積が見られること、が明らかとなった。これらの結果から、sPLA₂-IIIは精巣上体起始部の上皮細胞から内腔に分泌されて精子の細胞膜あるいは液中のリン脂質輸送体の脂質ホメオスタシスの制御に関わっており、この代謝系の破綻が精子機能不全を導くものと推察される。

2) sPLA₂とアレルギー

6種類のsPLA₂アイソザイムのKOマウスのうち、sPLA₂-III KOマウスにおいてのみ、IgE/抗原依存的な受動皮膚感作アレルギー(PCA)反応の著しい軽減が観察された。逆に、sPLA₂-III TgマウスではPCA反応の増悪が見られた。また、sPLA₂-III KOマウスに全身性アナフィラキシー反応を施行すると、血中へのヒスタミンの遊離がWTマウスと比べて顕著に減少した。免疫組織染色の結果、sPLA₂-IIIはマウス皮下組織のマスト細胞に局限して発現していた。更に、WTおよびKOマウスより調整した骨髓由来培養マスト細胞(BMMC)をマスト細胞欠損 *W/W*マウスに移植再構成したところ、KOマウス由来BMMCを移植した群はWT移植群と比べてPCA反応に不応答であった。これらの結果から、KOマウスのアレルギー不応答性はマスト細胞の異常に起因するものと結論した。KOマウス皮下組織中のマスト細胞は、数は正常(すなわち前駆細胞の分化と組

織への遊走定着は正常)であったが、分泌顆粒が未発達で、IgE/抗原刺激に伴う脱顆粒反応が起こりにくいことが判明した。また、KOマウス由来のBMMCは、繊維芽細胞との共培養により誘導されるヒスタミンの増加(分化成熟の指標)が見られなかった。更に、KOマウス由来のBMMCでは、IgE/抗原刺激した際に惹起される膜リン脂質からのアラキドン酸の遊離とそれに引き続くPGD₂、LTC₄の産生が有意に低下していた。以上の結果から、sPLA₂-IIIは組織中のマスト細胞の最終成熟ならびにそれに付随するエフェクター機能に関わるものと考えられる。sPLA₂-IIIがアレルギー惹起物質として知られるハチ毒PLA₂の唯一の哺乳動物ホモログであることを踏まえると、今回の結果は、sPLA₂-IIIが内因性のマスト細胞調節因子であることを強く示唆している。

3) sPLA₂と動脈硬化・メタボリックシンドローム

全sPLA₂アイソザイムのうち、sPLA₂-III, V, Xがリポタンパク質粒子(LDL, HDL)のホスファチジルコリン(PC)を分解してリゾホスファチジルコリン(LPC)を生成することを見いだした。これらのsPLA₂が作用したLDLは小径(変性)LDLの性質を示し、マクロファージの泡沫化を*in vitro*で促進した。sPLA₂-III Tgマウスでは血中の変性LDLが増加し、動脈硬化発症モデル動物である*apoE* KOマウスと交配後に高コレステロール食を負荷すると、動脈硬化の増悪が観察された。また、ヒト動脈硬化巣にはsPLA₂-III, V, Xなどの複数のsPLA₂アイソザイムの発現増加が認められた。以上のことから、動脈硬化病巣におけるsPLA₂依存的なリポタンパク質の代謝異常が動脈硬化の進展を促進するものと予想している。

一方、sPLA₂-III Tgマウスを高脂肪食下で飼育すると、予期せぬことに肥満の表現型を発症することを見いだした。Tgマウスの内臓脂肪組織(WAT)ではWTマウスと比べて個々の脂肪細胞が肥大化し、間質へのマクロファージ浸潤の増加、炎症性サイトカインの発現増加が認められた。肝臓では脂肪肝増悪の組織所見が見られ、肝機能マーカーであるALTの血中濃度が顕著に増加した。また、脂質の合成、取り込み、代謝に関わる遺伝子群の発現がTgマウスの肝臓で一括的に増加していた。更に、Tgマウスの血中ではレプチンの増加が見られたほか、総コレステロール、血糖値、LPCなどのメタボリックシンドロームのマーカーが増加していた。一方、高脂肪食負荷を施したsPLA₂-III KOマウスではWTマウスと比べてWATならびに褐色脂肪(BAT)の縮小、肝機能の改善、血中レプチン、総コレステロール、血糖値、LPCなどの低下が認められ、Tgマウスとは全く逆の表現型を示した。また、高脂肪食負荷KOマウスはWTマウスと比べてインスリン感受性の改善傾向が認められた。脂肪代謝に関わる種々の組織より総脂質を抽出し、質量分析により網羅的な脂質プロファイリングを行った結果、WATのLPC含量がKOマウスにおいて有意に減少し、反対にTgマウスでは増加していた。また、血漿リポタンパク質の粒径測定を行った結果、小径LDLがKOマウスでは減少、Tgマウスでは増加傾向を示すことがわかった。更に、免疫組織染色ならびに定量的PCRの結果、内在性sPLA₂-IIIの発現はWAT間質で非常に高く、前脂肪細胞マーカーであるPref-1の発現と一致した。以上の結果から、sPLA₂-IIIはWAT間質の前脂肪細胞から構成的に分泌されてリポタンパク質粒子中のPCのLPCへの変換=小径LDLの生成に関わり、この代謝系の長期に渡る亢進または低下がメタボリックシンドロームの進行に正負の影響を及ぼすものと推察している。

4) sPLA₂と皮膚

sPLA₂-Xを全身に過剰発現したTgマウスは皮膚に際立った異常を発症し、第一毛周期に相関して一過的な全身脱毛、表皮角質化、皮脂腺肥大などの表現型を示した。sPLA₂-X Tgマウスの皮膚ではPUFAを含むPEが選択的に減少し、アラキドン酸代謝物としてPGE₂、ドコサヘキサエン酸の代謝物としてProtectin D₁の産生が亢進していた。しかしながら、野生型マウスの皮膚における内在性sPLA₂-Xの発現は体毛増殖期の毛胞外根鞘に局限しており、sPLA₂-X KOマウスの皮膚では体毛関連遺伝子群の部分的な発現減少を認める以外に目立った所見は現在までに観察されていない。したがって、sPLA₂-Xは本質的に体毛の増殖分化の制御に関わると考えられる。では、先に述べたsPLA₂-X Tgマウスに発症する表皮肥厚と皮脂腺肥大は何を意味しているのだろうか? WTマウスとsPLA₂-X Tgマウスの皮膚の間でマイクロアレイ解析を

行った結果、Tgマウスの皮膚において別のsPLA₂アイソザイムであるsPLA₂-IIFの内因性発現が顕著に上昇していることを発見した。免疫組織化学染色および*in situ* hybridizationの結果、sPLA₂-IIFは表皮と皮脂腺に発現している主要なアイソザイムであり、様々なヒト皮膚疾患で発現が顕著に増加することが判明した。そこで、sPLA₂-IIFを全身性および皮膚特異的に過剰発現したTgマウスを作出したところ、双方ともに著しい皮膚異常を発症した。また、sPLA₂-IIFマウスの皮膚ではドコサヘキサエン酸を含むPEが顕著に減少し、Protectin D₁の産生が亢進していた。更に、sPLA₂-IIF KOマウスの皮膚の超微細構造を電子顕微鏡で観察した結果、皮膚異常を示唆する予備的所見を得ている。したがって、皮膚の病態生理にメインに関わるアイソザイムはsPLA₂-IIFであると考えられる。

5) sPLA₂と樹状細胞

sPLA₂-IIDはマウス臓器の中で脾臓とリンパ節に特に発現が高いアイソザイムであるが、その発現細胞や機能については全く不明であった。sPLA₂-IIDの特異抗体を用いた免疫組織染色とautoMACSとFACSによるソーティングの結果、この酵素はCD11c⁺樹状細胞に特異的に発現しているsPLA₂であることが明らかとなった。sPLA₂-IIDを全身に過剰発現したTgマウスは肺、腸管のリンパ節肥大を伴う自己免疫様の症状を自然発症した。更に、OVAの免疫による抗体産生モデルをsPLA₂-IID KOマウスに施行したところ、WTマウスと比べてOVA特異的IgMの血中濃度の低下が認められた。以上の結果から、sPLA₂-IIDは樹状細胞を中心とする免疫ネットワークの調節に関与しているものと考えられる。

5. 自己評価

従来、sPLA₂が生体内でどのような生命応答に関与しているのかについては、一部のものを除いて殆ど未解明であった。本研究を通じて、sPLA₂のそれぞれのアイソザイムが多様な生命現象に関わることを実証することができた。更に、当初目標であったアイソザイム固有の機能の解明に加えて、特定の生命現象において複数のsPLA₂が異なる作用点で機能することを示唆するという予想外の成果が得られ、「微小組織環境におけるsPLA₂群の時空間ネットワーク」という新しい概念を提唱するに至ったことは大いに評価できる。

6. 研究総括の見解

sPLA₂遺伝子ファミリーについて、KOマウス、TGマウスを作製して、網羅的に解析を行った。さらに、精子成熟、アレルギーに関連する免疫、表皮の形態・機能に係る新たな知見を見出した。多くのsPLA₂アイソザイムのKOマウス、TGマウスを用いて、広く生理機能を解析した実績を高く評価したい。ただし、もう少し分子機序に踏み込めるとよりインパクトが高くなると考えられる。病態との関わりも深く、治療の基礎研究や診断にも貢献できると期待できるので、今後は疾患モデルや生理的意義の解析を進め、さらにはヒトの疾患との関連などに発展させて欲しい。

7. 主な論文等

(A) さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表 * Corresponding author

1. Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Arata, S., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Yamamoto, K., Kudo, I., and **Murakami, M.*** Transgenic expression of group V, but not group X, secreted phospholipase A₂ in mice leads to neonatal lethality because of lung dysfunction. *J. Biol. Chem.* 281, 36420–36433, 2006
2. Masuda, S., Yamamoto, K., Hirabayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kudo, I., and **Murakami, M.*** Human group III secreted phospholipase A₂ promotes neuronal outgrowth and survival. *Biochem. J.* 409, 429–438, 2008
3. Sato, H., Kato, R., Isogai, Y., Saka, G., Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Yamamoto, K., Tsutsumi, K., Yamada, J., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kobayashi, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Hatakeyama, S., Hara, S., Kudo, I., Itabe, H., and **Murakami, M.*** Analyses of group III

secreted phospholipase A₂ transgenic mice reveals potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 283, 33483–33497, 2008

(2)特許

なし

(3)受賞

1. 東京都医学研究機構職員表彰 (2008年10月21日)

(4)著書(監修)

1. 村上誠: 脂質の新たな機能を追う. *細胞工学*, 11 (26), 2007

(5)総説

1. 村上誠: 脂質メディエーター研究の現状と展望. *細胞工学*, 11 (26), 1218–1220, 2007
2. 山本圭、平林哲也、村上誠: ホスホリパーゼA₂の多様性と機能. *細胞工学*, 11 (26), 1221–1226, 2007
3. 村上誠: メタボリックシンドロームにおける脂質代謝異常と血管障害／ホスホリパーゼA₂群の代謝機能を中心に. *血管医学*, 8 (1), 17–24, 2007
4. 村上誠: 脂質メタボロームから見た動脈硬化. *BioClinica*, 22 (5), 80–85, 2007
5. 村上誠: sPLA₂群の生体内機能と脂質メタボロミクス: 炎症・再生, 28 (5), 454–460, 2008

(6)招待講演

1. **Murakami, M.** Diverse functions of sPLA₂ isozymes; insights from transgenic mice: *FASEB Summer Research Conferences on Phospholipases*. Saxtons River, VT, USA (2006)
2. **Murakami, M.** Transgenic and knockout mice for group V, X and III sPLA₂s: *The 3^d Conference on Phospholipases A₂ and Lipid Mediators*, Sorrento, Italy (2007)
3. **Murakami, M.** Diverse functions of sPLA₂s: from cells to transgenics and knockouts. *FASEB Summer Research Conference on Phospholipid Metabolism: disease, signal transduction and membrane dynamics*, New Haven, CT, USA (2008)
4. 村上誠: 細胞外分泌性ホスホリパーゼA₂と病態. *日本薬学会(東京)*, 2008年3月
5. 村上誠: ホスホリパーゼA₂分子群の新しい機能. *BMB2008(神戸)*, 2008年12月

(7)学会シンポジウム・ワークショップオーガナイザー

1. 村上誠、横溝岳彦: 脂質シグナリング研究の最前線／新たなる世代へ: *日本脂質生化学会(東京)*, 2006年6月
2. 村上誠、杉本幸彦: 脂肪酸に由来する脂質メディエーターの最前線: *BMB2007(横浜)*, 2007年12月
3. 横溝岳彦、村上誠: 脂質の新機能: *BMB2008(神戸)*, 2008年12月

(B)その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

1. Taketomi, Y., Sunaga, K., Tanaka, S., Nakamura, M., Arata, S., Okuda, T., Moon, T. C., Chang, H. W., Sugimoto, Y., Kokame, K., Miyata, T., **Murakami, M.**, and Kudo, I. Impaired mast cell maturation and degranulation and attenuated allergic responses in *Ndr1*-deficient mice. *J. Immunol.* 178, 7042–7053, 2007
2. Kuwata, H., Fujimoto, C., Yoda, E., Nakatani, Y., Hara, S., **Murakami, M.**, and Kudo, I. A novel role of group VIB calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂γ) in the inducible

expression of group IIA secretory phospholipase A₂ in rat fibroblastic cells. *J. Biol. Chem.*
282, 20124–20132, 2007