

分泌性ホスホリパーゼ A₂ 群の分子種固有の機能の解明

村上 誠

東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所

1. 研究のねらい

膜グリセリン脂質の sn-2 位を加水分解して脂肪酸と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機能未知の sPLA₂ アイソザイムの生理的・病的機能を解明し、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。本研究のねらいと概略を図 1 に示す。



2. 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 マウスの精巣上部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 マウスの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、精巣上部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部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 マウスでは精巣上部精子の高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 含有リン脂質の組成に変化が見られた。これらの結果から、sPLA₂-III は精巣上部起始部の上皮細胞から分泌されて内腔の精子細胞の膜ホメオスタシスの制御に関わっており、この代謝系の破綻は精子機能不全を導くものと推察される。

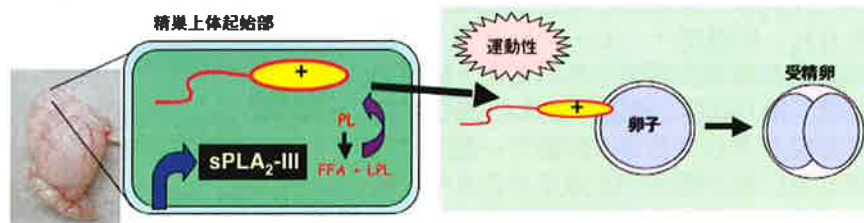


図 2 sPLA₂-III は精巣上部における精子の機能的成熟を制御する。

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髄由来培養マスト細胞(BMMC)をマスト細胞欠損 μ/μ 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。

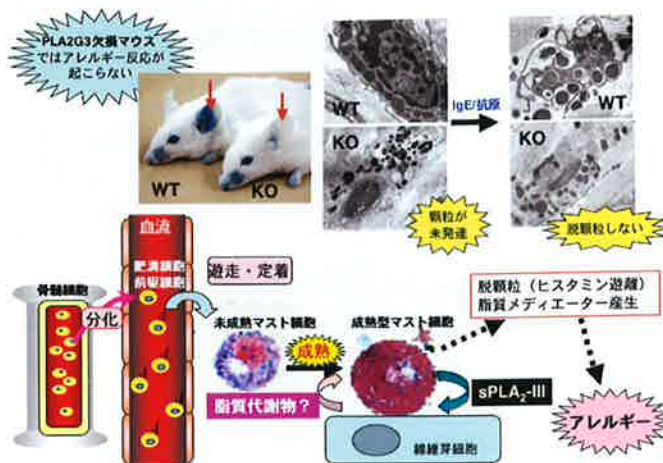


図3 sPLA₂-IIIはマスト細胞依存的アレルギー応答を制御する

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の浸潤の増加、炎症性サイトカインの発現の増加が認められた。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

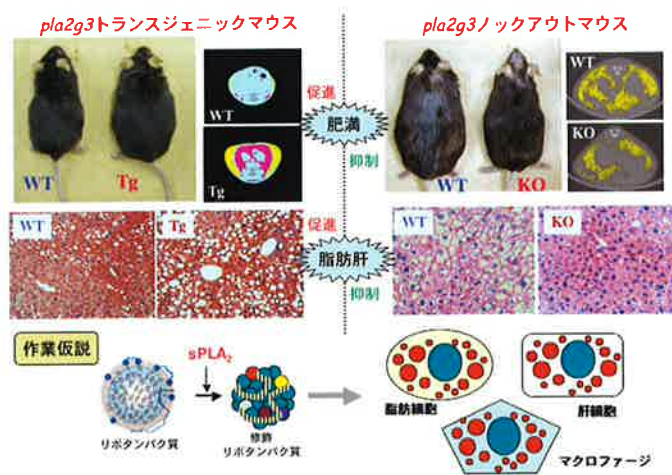


図4 sPLA₂-IIIはメタボリックシンドロームに関わる

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 マウスと比べて内臓脂肪および褐色脂肪の縮小、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。脂肪代謝に関わる組織（脂肪、肝臓、心臓、骨格筋）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、脂肪組織の 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 は脂肪組織の間質画分に発現していることが判明した。以上の結果から、sPLA₂-III は脂肪組織間質において血漿リポタンパク質粒子中の PC の LPC への変換に関わり、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。

sPLA₂-III 以外の sPLA₂ アイソザイムについてもメタリックシンドロームとの関連を示唆する予備的知見を得ている。通常飼育環境下において、sPLA₂-X KO マウスでは加齢に伴う皮下脂肪、内臓脂肪の貯留が起こりにくく、血中レプチンの濃度が有意に低い。しかしながら、このマウスでは血中リポタンパク質、インスリン、血糖値などに異常は認められていない。また、野生型マウスに高脂肪食を負荷すると、内臓脂肪細胞において sPLA₂-V の発現が顕著に誘導されることがわかった。このことは、sPLA₂-V が脂肪蓄積のマーカーとなることを示唆している。

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、第一毛周期に関連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。



図5 sPLA₂-X, -IIFの過剰発現マウスは皮膚異常を発症する

5) その他の表現型所見

- ① 呼吸器：これまでに樹立した Tg マウスの中で、sPLA₂-V Tg マウスのみが呼吸障害のために出生直後に死亡した。この表現型は、sPLA₂-V による肺サーファクタントの過剰分解に起因していた。内因性の sPLA₂-V は気管支上皮細胞と肺泡マクロファージに発現しており、重度肺炎患者の肺組織では本酵素の発現が顕著に増加していた。したがって、sPLA₂-V はヒト重症呼吸器障害においてしばしば観察される肺サーファクタントの分解亢進に関与している可能性がある。
- ② 神経系：sPLA₂-X は末梢組織の神経線維に発現しており、培養系において神経細胞の神経突起

伸長を LPC の産生依存的に促進した。sPLA₂-X KO マウスは末梢性疼痛応答に対して部分的な抵抗性を示し、逆に sPLA₂-X Tg マウスでは痛覚過敏が認められた。sPLA₂-X による痛覚の調節はプロスタグランジンの産生とは相関しないことから、むしろリゾリン脂質を介した微小神経ネットワークの調節を介するものと考えている。

③ 免疫系：sPLA₂-IID は脾臓とリンパ節に特に発現が高いアイソザイムであり、免疫染色と FACS 解析の結果、CD11c⁺樹状細胞に特異的に発現していることが判明した。また、sPLA₂-IID は皮下の樹状細胞に強く発現しており、DNFB 連続塗布によるアトピー性皮膚炎のモデルにおいて発現が顕著に増加した。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発症した。更に、sPLA₂-IID KO マウスに OVA を免疫するモデルにおいて、OVA 特異的 IgM の血中濃度の低下が認められた。したがって、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、現在更に検討を進めている。

本研究により、組織・細胞に特異的に発現している各 sPLA₂ アイソザイムは、それぞれ異なるリン脂質に作用し、多様な生命応答に関わることが明らかとなってきた。今後は本研究で導入した遺伝子改変マウスのラインアップを駆使して各 sPLA₂ が制御する生命現象を更に探索するとともに、それぞれの生命応答の要因となるリン脂質代謝反応の分子メカニズムの全貌を解明し、更にはヒト疾患との関連を明らかにしていきたい。

3. 主な発表

論文

- 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.* in press
- 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)
- 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)
- 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)

招待講演

- 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)
- Murakami, M. Transgenic and knockout mice for group V, X and III sPLA₂s: The 3rd Conference on Phospholipases A₂ and Lipid Mediators, Sorrento, Italy (2007)
- Murakami, M. Diverse functions of sPLA₂ isozymes; insights from transgenic mice: *FASEB Summer Research Conferences on Phospholipases*. Saxtons River, VT, USA (2006)

4. 受賞

- 東京都医学研究機構職員表彰 (2008年10月21日)