

## 論文内容の要旨

### 論文題目

#### 炎症におけるリゾホスファチジン酸およびその産生酵素オートタキシンの機能解析

氏名 奥平 真一

#### 【序】

炎症は生体組織に何らかの障害をもたらす侵襲が加わったときに、生体が障害因子の除去、障害組織の再生や修復などの防御反応をもって応答する過程と定義される。組織に創傷が加わると血管障害とそれに続く血小板活性化、血管透過性の亢進、炎症性サイトカインの産生、白血球の浸潤等の一連の反応が連続的に起こり、これらの過程が正常に起きることがその後の組織修復において重要である。しかし、一方で過度の炎症が起きると組織破壊や線維化などによる機能障害を生じ、逆に生体にとって有害となる場合もある。

リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA) は、細胞の増殖促進、運動性の促進、アポトーシスの抑制などの多彩な機能を有する生理活性脂質である。その機能は細胞膜上の G タンパク質共役型受容体を介することが知られ、これまでに6つの LPA に対する受容体が同定されている。一方、私の在籍する研究室では LPA の産生機構の解析が行われ、血液中においてリゾホスファチジ

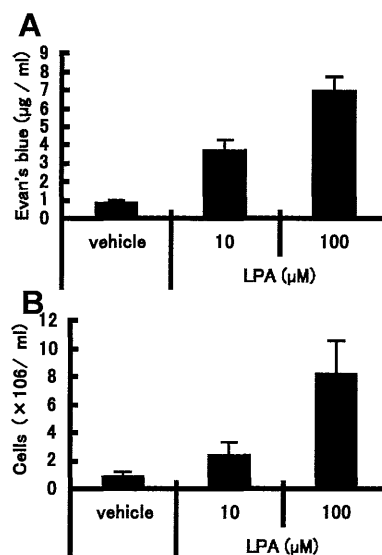


Fig. 1 空気嚢モデルにおけるLPAによる血管透過性の亢進 (A) および細胞浸潤の増加 (B)

ルコリンから LPA を産生するリゾホスホリパーゼ D (lysoPLD) を精製同定し、本酵素が癌細胞運動促進因子であるオートタキシン (autotaxin、ATX) と同一であることを見いだした。

LPA は血管内皮細胞やマクロファージを活性化し、IL-8、TNF- $\alpha$  などの炎症性メディエーターの産生を亢進させることが報告されている。また LPA は皮膚の創傷モデルにおいて創傷治癒を促進するという報告もある。一方で ATX は活性化した血小板より産生されるリゾリン脂質をよい基質として LPA を産生する。このような結果から LPA や ATX が炎症に関わることが示唆されてきたが、LPA が個体レベルで炎症に寄与しているかどうかはこれまで全く明らかにされてこなかった。そこで本研究は生体における LPA および ATX の炎症における機能を明らかにすることを目的とした。

## 【方法と結果】

### 1. 空気嚢モデルによる LPA の起炎物質としての評価

空気嚢型炎症モデルを用い LPA および ATX の炎症反応惹起効果を検討した。まず、血管透過性の亢進を検討したところ、LPA は投与後 30 分後に血管透過性を亢進させ (Fig. 1A)、このときの滲出液中のヒスタミン量が有意に増加していた。また LPA 投与後 8 時間後の空気嚢中では顕著な白血球 (主に好中球) の浸潤数の増加が認められた (Fig. 1B)。また浸潤細胞数の増加と相関して滲出液中の TNF- $\alpha$  が増加していた。よって、LPA は炎症の初期反応である血管透過性亢進と白血球浸潤促進作用を持つことが明らかとなった。

### 2. 皮内投与による LPA の血管透過性亢進作用の解析

LPA が血管透過性を亢進するメカニズムをさらに調べる目的で、次に LPA の皮内投与を行った。LPA をマウス背部に皮内投与したところ投与量依存的な血管透過性亢進作用が認められた (Fig. 2A)。この血管透過性亢進作用は LPA<sub>1</sub> antagonist Ki16425 の同時投与により抑制された。次にマスト細胞欠損 W/W<sup>v</sup> マウスに LPA を投与したところ LPA の血管透過性亢進作用は著しく減弱した (Fig. 2B)。またヒスタミン産生酵素 histidine decarboxylase KO マウスでは LPA による血管透過性亢進作用が見られなかった。これらのことから LPA が LPA<sub>1</sub> 受容体を介してマスト細胞の脱顆粒を促進して血管透過性を亢進させることが示唆された。

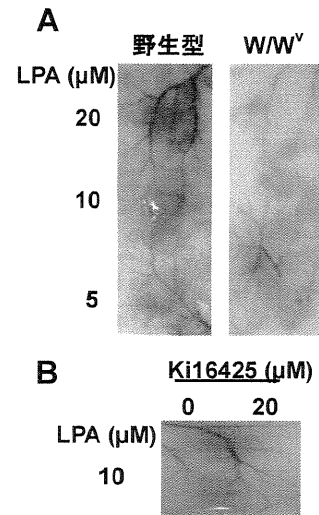


Fig. 2 LPAによって血管透過性が亢進するがマスト細胞欠損マウスではその作用は見られない(A)。またLPA<sub>1</sub> antagonistで作用は減弱する(B)。

### 3. ATXにより産生されるLPAの炎症に対する効果

血漿を加温すると時間依存的にLPAの産生が認められるがATXを除去した血漿ではLPAは産生されない(Fig. 3A)。そこでATXを除去した血漿を空気嚢および皮内に投与しATXにより産生されるLPAの炎症反応における寄与を検討した。空気嚢型炎症モデルにおいて、加温血漿の投与ではLPAの投与で見られた血管透過性、ヒスタミン産生、白血球の浸潤およびTNF- $\alpha$ 産生の増加が観察されたが、これらの効果はATX除去血漿では見られなかった(Fig. 3B)。また、皮内投与においてもATX除去血漿は血管透過性の亢進作用が減弱することがわかった(Fig. 3C)。以上のことよりATXにより産生されるLPAが血管透過性の亢進、血球浸潤等の炎症初期反応に関与していることが示唆された。

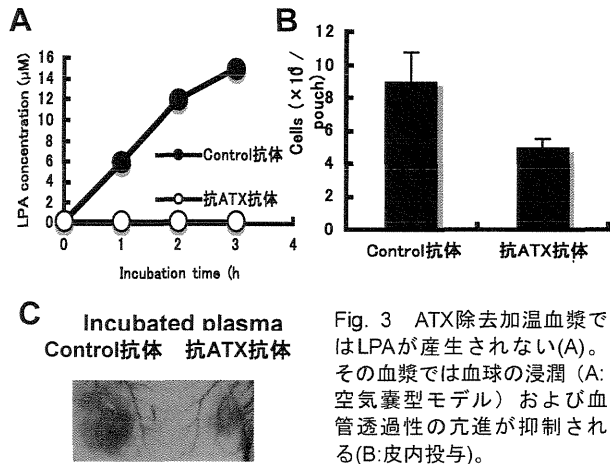


Fig. 3 ATX除去加温血漿ではLPAが産生されない(A)。その血漿では血球の浸潤(A: 空気嚢型炎症モデル)および血管透過性の亢進が抑制される(B: 皮内投与)。

### 4. 急性肝炎、間質性肺炎におけるATXの発現上昇

ATXの炎症反応への関与をさらに検討している過程で四塩化炭素誘導肝炎モデル、bleomycin誘導型間質性肺炎モデルにおいて血中ATXのレベル

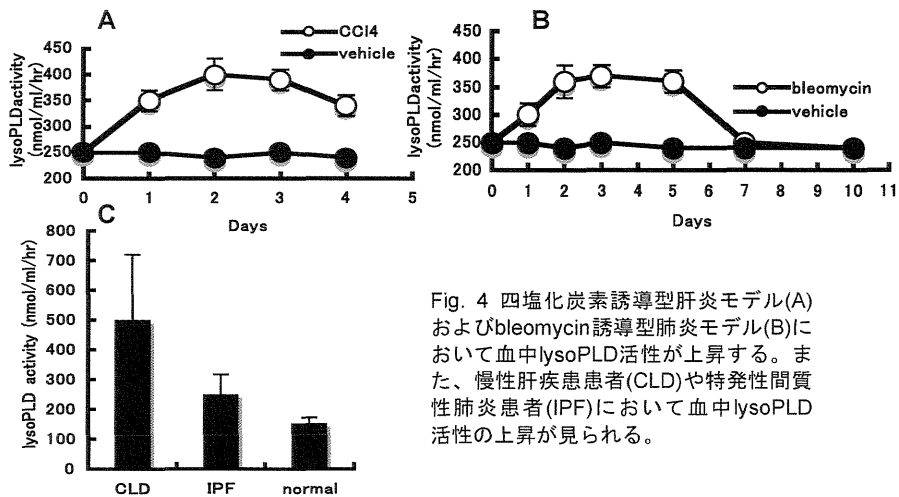


Fig. 4 四塩化炭素誘導型肝炎モデル(A)およびbleomycin誘導型肺炎モデル(B)において血中lysoPLD活性が上昇する。また、慢性肝炎患者(CLD)や特発性間質性肺炎患者(IPF)において血中lysoPLD活性の上昇が見られる。

が上昇することに気付いた(Fig. 4A, B)。ATXの上昇は、誘発剤投与後1〜3日と比較的早い時期に観察された。このATX上昇は慢性肝炎患者、間質性肺炎患者においても観察された(Fig. 4C)。また、Western blottingによりATXのタンパク質レベルでの発現上昇であることがわかった。これらのことからATXが慢性肝炎や間質性肺炎において機能している

ことが予想された。

## 5. 抗 ATX モノクローナル抗体による ATX 機能抑制系の確立

ATX の炎症における機能を解析する上で ATX のノックアウト (KO) マウスは有用であると考えられた。しかし ATX KO マウスは血管形成異常のため胎生致死であることがわかり、ATX KO マウスを炎症における機能解析には使用できなかった。そこでこれまで確立した抗マウス ATX モノクローナル抗体をマウス個体に投与し血中 ATX 活性を検討した結果、ATX 機能を個体レベルで阻害する系を確立することができた (Fig. 5A)。また、ATX 機能を阻害すると、通常 100nM 程度あるマウス血中 LPA をほぼ 0 に抑制することができた (Fig. 5B)。

### 【まとめと考察】

本研究で、LPA が炎症反応の初期過程で見られる血管透過性、炎症性細胞浸潤を亢進する作用を持つことを示した。また、血管透過性の亢進にはマスト細胞の活性化とそれに伴うヒスタミンの放出が関与することを明らかにした。

一方、マウスモデルを用い ATX が肝炎、肺炎モデル等の急性炎症期に発現上昇してくること、ヒト病態でも実際同様の ATX の上昇が観察されることを示した。肝炎や肺炎は慢性化すると、肝硬変、肺線維症等の重篤な疾患へと進行する。最近、LPA<sub>1</sub> KO マウスをもちいた研究により LPA が LPA<sub>1</sub> を介して肺の線維化に関与することが示された。ATX が LPA の産生を介して肺線維化に関与していることが予想される。現在、肺線維化モデルにおける ATX 機能阻害抗体の効果を検討している。

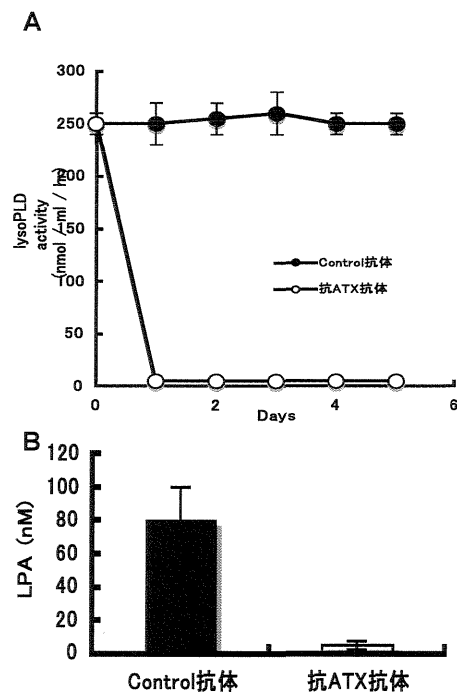


Fig. 5 抗ATX抗体の投与により血中 lysoPLD活性は抑制され(A)、このときの血中LPA濃度は0になる(B)。