

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791138

研究課題名(和文)ステロイドによるリゾリン脂質合成酵素の発現制御機構の解析

研究課題名(英文)Studies on expression regulation of lysophospholipid synthesis enzymes by steroids

研究代表者

住田 隼一 (SUMIDA, Hayakazu)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30609706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：リゾリン脂質合成酵素の一つであるAutotaxin(以下ATX)は、リゾフォスファチジン酸を合成することで、多種多様な役割を發揮している。本研究では、ATXを高発現する細胞において、ステロイドホルモンによりATX mRNAが低下することを発見した。さらに、ステロイドを内服する患者では、内服開始前と比較して血中ATXの低下を認め、ステロイド内服量と血中ATX濃度は有意な逆相関を示した。また、マウスの精巣上体脂肪組織を用いた実験からは、これらの変化が脂肪組織からのATX産生低下によるものである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autotaxin (ATX) is the enzyme responsible for the production of lysophosphatidic acid with diverse functions. This study revealed that mRNA expression level of ATX was decreased by steroid treatment in ATX-expressing cells. Furthermore, decreased serum ATX antigen levels were observed after the initiation of treatment with steroids for patients. The decreased levels recovered during tapering of PS L dose in a dose-dependent manner. In addition, considering the results of experiments using murine epididymal adipose tissue, decrease of serum ATX levels by steroids might be due to the decrease of ATX production from adipose tissue.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：脂質 リゾリン脂質合成酵素 ステロイド

1. 研究開始当初の背景

リゾホスファチジン酸 (以下 LPA) は最も単純な化学構造をもつリゾリン脂質であり、脂質メディエーターとして、様々な生理作用、病態での役割を發揮している。LPA に対してはこれまでに少なくとも6つのLPA特異的受容体が同定されており、LPA はこれらの受容体を介して、細胞レベルでは増殖・運動・形態変化など、生体レベルでは癌細胞の増殖・遊走・浸潤、創傷治癒、脳の形態形成、大腸炎・大腸癌、生殖、血小板凝集など多種多様かつ極めて重要な役割を果たしている。また、研究代表者は、LPA₄ ノックアウトマウスを用いた解析にて、LPA が発生段階における血管・リンパ管形成に重要であることを世界に先駆けて明らかにしている (Sumida H et al., Blood, 2010)。LPA は、リゾホスファチジルコリン (以下 LPC) からオートタキシン (以下 ATX) という酵素によって合成されるが、この ATX についても LPA と同様に、癌など各種細胞の増殖・遊走など多岐にわたる作用が報告されている。しかしながら、ATX の発現制御機構については、十分に解明されているとは言えず、特にステロイドホルモンとの関係については報告されていなかった。リンパ球などの免疫細胞と ATX-LPA に関する報告が多くみられており、また、数多くの自己免疫疾患においてステロイドホルモンが有効であり、臨床において使用されている。こららのことを考慮すると、ステロイドホルモンと ATX の関係について研究を行うことは、臨床的に重要と言える。

2. 研究の目的

本研究では、ATX がステロイドの下流で様々な生理作用・薬理作用を發揮しているというステロイドの新規作用機序を明らかにできるのみならず、自己免疫疾患・悪性腫瘍等における新規治療ターゲットとしての ATX の重要性を提唱することも研究目的としている。

3. 研究の方法

(1) ATX が高発現していることが知られている細胞株にステロイドホルモンの一種であるデキササゾンやプレドニゾロンを添加し、ATX mRNA 発現量がどのように変化するか定量 PCR を用いて調べる。ステロイドによる ATX 発現量の変化がみられた場合には、ステロイド受容体の関与についても検討を加える。

(2) 東京大学医学部の倫理委員会での承認を得た上で、55 人の自己免疫疾患患者から 198 の血清サンプルを得た。患者の内訳は、全身性強皮症 20 例、皮膚筋炎/多発性筋炎 6 例、全身性エリテマトーデス 18 例、モルフェア 4 例、好酸球性筋膜炎 5 例、水疱性類天疱瘡 13 例 (これらの合併症例あり) となつて

いる。さらに、13 例の悪性黒色腫の患者の血清も得た。一部の患者では時系列の血清サンプルを得た。

(3) 血清中の ATX 抗原濃度を以前報告された方法 (Nakamura, K, et al. Clin Chim Acta 2008;388:51-8) を用いて測定した。具体的に、血清中 ATX 抗原濃度測定は、自動免疫測定装置 AIA シリーズ (東ソー株式会社製) を用い実施した。

(4) 血清中の ATX 活性を lysoPLD 活性として、以前報告された方法 (Umezū-Goto, M, et al. J Cell Biol 2002;158:227-33) を用いて測定を行った。

(5) マウス精巣上体脂肪組織を以前報告された方法 (Viguerie, N, et al. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:630-4) に基づいて実施した。得られた脂肪組織を培養し、ステロイド (プレドニゾロン) を投与した群としない群に分けて培養を行った。24 時間刺激後、浮遊する脂肪組織を回収し、凍結し、RNA を回収した。

(6) 上記で得られた RNA を用いて cDNA を調整し、定量的 PCR を行い、ATX の mRNA 発現量について比較検討を行った。なお、この際、adiponectin、lipoprotein lipase (LPL) といった脂肪細胞マーカーについても同時に検討を行った。

4. 研究成果

(1) ATX 高発現細胞株に対してグルココルチコイドやプレドニゾロンを添加したところ、その mRNA 発現量は低下した。また、ステロイド受容体を介していることも確認できた。

(2) 自己免疫疾患患者のステロイド治療前後で血中の ATX 抗原量を比較したところ、治療後の抗原量が、ステロイド内服量依存的に減少することがわかった (図 1, 図 2)。血清の lysoPLD 活性も同様の变化を示した。これらの変化は、疾患活動性とは無関係であった。なお、これらの解析においては、健常人において、血中 ATX 抗原値が、女性が男性よりも高値を示すという既知の事項を考慮し、男女別に分けて解析をおこなったが、それぞれ、同様の結果が得られた (図 2)。各個人の患者の時系列の変化についても、詳細に解析したところ、内服開始後にステロイドの内服量依存的に血中 ATX 抗原量は速やかに減少したが、ステロイド内服量を減量するに伴って上昇傾向となり、ステロイド内服が終了すると、治療開始前の値のレベルにまで回復した。

(3) 血清中の ATX の産生細胞が脂肪細胞であるという報告が他グループよりなされたため (Dusaulcy, R, et al. J Lipid Res

2011;52:1247-55)、マウス精巣上体脂肪組織を用いた組織培養系を用いて、ステロイド刺激による ATX mRNA の発現量の変化を検討したところ、ステロイド(プレドニゾン)添加により、脂肪組織の ATX mRNA の発現量が低下した。この結果から、患者血清中の ATX 抗原量がステロイド内服で低下理由として、ステロイドによって脂肪組織からの ATX 産生が低下したことが関与している可能性が示唆された。なお、脂肪細胞のマーカーに関しては、既報告通り adiponectin の mRNA は低下していた。なお、他の脂肪細胞マーカーである LPL には変化がみられなかった(図3)。

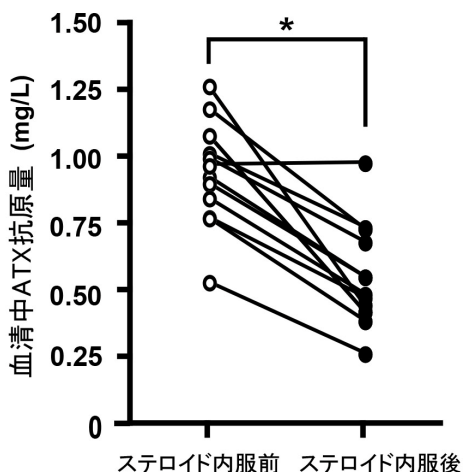


図1 ステロイド内服前後における自己免疫疾患患者の血清中ATX抗原量の変化

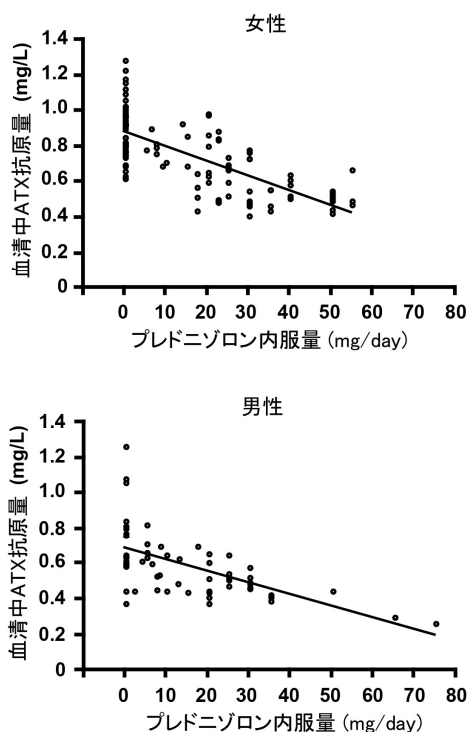


図2 血清中 ATX 抗原量とプレドニゾン内服量との相関

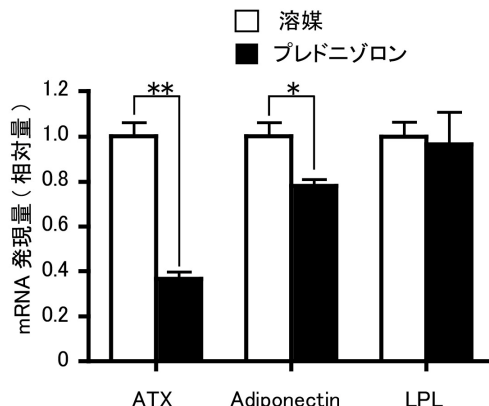


図3 マウス精巣上体脂肪組織のプレドニゾンによる ATX, adiponectin, LPL の mRNA 発現量の変化

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 1件)

Sumida H*, Nakamura K, Yanagida K, Ohkawa R, Asano Y, Kadono T, Tamaki K, Igarashi K, Aoki J, Sato S, Ishii S, Shimizu T, Yatomi Y.

Decrease in circulating autotaxin by oral administration of prednisolone.

Clin Chim Acta. 査読有 2012;415C:74-80.

*Correspondence

[産業財産権]

取得状況(計 1件)

名称: オートタキシン測定によるステロイド服用効果の検査方法

発明者: 石井聡、住田 隼一、矢富 裕、中村和宏、佐藤 伸一、門野 岳史、五十嵐 浩二
権利者: 国立大学法人東京大学、東ソー株式会社

種類: 特許

番号: 特開 2012-2588

取得年月日: 2012年1月5日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

研究代表者

住田 隼一 (SUMIDA, Hayakazu)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30609706