

特集：リン脂質代謝と脂質メディエーター研究の最新の成果
第1部 リン脂質代謝酵素

ホスホリパーゼ A₂

山 本 圭, 村 上 誠

ホスホリパーゼ A₂ (phospholipase A₂; PLA₂) はグリセロリン脂質を加水分解し、遊離脂肪酸とリゾリン脂質を産生する酵素群の総称である。従来、PLA₂ の機能としてはアラキドン酸代謝を介して脂質メディエーターの産生を促す作用が注目されてきたが、最近の遺伝子改変マウスの解析やヒト遺伝子多型の解析から、PLA₂ はアラキドン酸代謝に起因する現象に留まらず、各酵素が発現部位に応じて様々な生命現象に関与することが明らかとなってきた。本稿では、PLA₂ の多様性と生体内機能について、筆者らが見出した知見を中心に最近の研究を中心に紹介する。

1. はじめに

ホスホリパーゼ A₂ (phospholipase A₂; PLA₂) は生体膜主要成分であるグリセロリン脂質の2位のアシル鎖を加水分解し、遊離脂肪酸とリゾリン脂質を産生する酵素群の総称である。最近では、PLA₂ は30種類以上の分子種が認められ、構造上の特徴、触媒メカニズム、局在および進化的関係から複数のグループに大別される。PLA₂ の筆頭格は細胞膜リン脂質からアラキドン酸を遊離する細胞質型 PLA₂ (cPLA₂α) であり、プロスタグランジン (PG) やロイコトリエン (LT) などの脂質メディエーターへの代謝につながっていくことから、cPLA₂α 遺伝子欠損マウス (KO) による知見は、細胞膜情報伝達に関連したアラキドン酸遊離のかなりの部分を説明するものであった。しかしながら cPLA₂α 以外の細胞外分泌性 PLA₂ (sPLA₂) 群や細胞内 Ca²⁺ 非依存性 PLA₂ (iPLA₂) 群は、それぞれが PLA₂ ファミリー全体の約3分の1を占める最大のサブグループ

であるのにも関わらず、一部を除いて機能が不明であった。ここ数年来、sPLA₂ 群や iPLA₂ 群のアイソザイムの遺伝子過剰発現マウス (Tg) や KO マウスの樹立、ならびに質量分析等による脂質分子種の網羅的解析技術の進歩により、PLA₂ 分子群の機能は「アラキドン酸代謝」の既成概念に留まらず、細胞内外に存在する様々なリン脂質の代謝を制御する多様な生命応答に関与することが明らかになってきた (表1)。本稿ではこれまでに筆者らが sPLA₂ の遺伝子改変マウスを用いて見出してきた知見を中心に概説する。個々の詳細については他の総説を参照して頂きたい^{1,2)}。

2. sPLA₂ の酵素学的性質

sPLA₂ は一般に約14-18 kDa の低分子量の分泌酵素で、分子内ジスルフィドに富み、His-Asp 触媒モチーフと Ca²⁺ 結合部位が高度に保存されており、酵素活性には通常 mM 濃度の Ca²⁺ を要求する。これまでに哺乳動物では10種類の活性型分子種 (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA) が同定されており、それぞれの酵素が異なる組織、細胞に発現分布を示す (図1)。1980年代初頭まで、哺乳動物には膵臓の PLA₂ (sPLA₂-IB) のみが知られ、その機能は食餌中のリン脂質の消化であると考えられてきた。1989年に慢性関節リウマチの患者滑膜滲出液から sPLA₂-IIA が単離され、炎症との関わりが盛んに研究されるようになった。sPLA₂-IIA はヒトを含む多くの動物種で最も主

(財)東京都医学総合研究所, 生体分子先端研究分野, 脂質代謝プロジェクト (〒156-8506 東京都世田谷区上北沢2丁目1番6号)

Phospholipase A₂

Kei Yamamoto and Makoto Murakami (Lipid Metabolism Project, Department of Advanced Science for Biomolecules, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6, Kamikitazawa, Setagaya, Tokyo 156-8506, Japan)

表1 PLA₂ ファミリーの遺伝子改変マウスの表現型

ファミリー	分類	一般名	遺伝子欠損マウス	遺伝子過剰発現マウス
sPLA ₂	IB	脾臓 sPLA ₂	食餌リン脂質消化分解の低下、それに伴う肥満や糖尿病への抵抗性	
	IIA	炎症性 sPLA ₂	腸管ポリープ形成の増加 (先天的 KO), 自己免疫性関節炎の軽減	永久的な脱毛と角質肥厚, 細菌膜リン脂質分解による感染防御, 動脈硬化の増悪, 小腸および大腸癌の発生低下, 自己免疫性関節炎の増悪
	III		精子成熟異常による雄性繁殖不全	動脈硬化の増悪 (リボタンパク質に動脈硬化促進性の変化), 加齢マウスにアトピー性皮膚炎症状を伴う全身炎症
	V		ザイモザン誘導腹膜炎の軽減, ファゴサイトーシスの抑制, カンジダ感染に対する抵抗性低下, 動脈硬化の軽減 (血球特異的 KO), アレルギー喘息の軽減, 急性肺障害の軽減, エイコサノイド産生低下, 自己免疫性関節炎の増悪	肺サーファクタントの過剰分解による致死的肺障害
cPLA ₂	X		体毛異常と外根鞘細胞の形成不全, 精子アクロソーム反応の減弱, アレルギー喘息の軽減, 気道エイコサノイド産生の低下, 虚血性心筋障害の軽減, 副腎コルチコステロンの分泌増加, 動脈瘤の抑制, 肥満, 食餌リン脂質消化分解の低下, 末梢性疼痛の軽減	致死的肺障害 (マクロファージ特異的 Tg), 脱毛と表皮肥厚などの皮膚異常, 血漿リボタンパク質の低下, 末梢性疼痛の軽減
	IVA	cPLA ₂ α	エイコサノイド産生低下に準ずる表現型 (急性呼吸窮迫症候群, アレルギー性気管支喘息, 関節リウマチ, 骨粗鬆症, 腸管ポリープ形成, 多発性硬化症. 虚血再灌流障害などの軽減, 受精卵の子宮内膜への着床障害, 分娩異常, 血液凝固遅延, 加齢に伴う腎機能の低下など)	
iPLA ₂	VIA	iPLA ₂ β/PNPLA9	精子の運動性低下と受精能低下, インスリン分泌の低下, 加齢に伴う脳神経障害と運動異常, 加齢に伴う骨形成異常, 平滑筋細胞の遊走低下, 血管壁細胞エイコサノイド産生の低下	虚血性障害によるリゾリン脂質の蓄積亢進, 心機能障害 (心臓特異的 Tg)
	VIB	iPLA ₂ γ/PNPLA8	ミトコンドリア機能不全による心機能障害, エネルギー代謝異常, 神経変性障害, 筋力低下, 体脂肪の低減	心筋のリン脂質減少とミトコンドリア機能異常, 心機能障害 (心臓特異的 Tg)
	VIC	iPLA ₂ δ/NTE/PNPLA6	胎盤異常による胎生致死, 神経変性異常 (神経特異的 KO)	
	VIE	iPLA ₂ ζ/ATGL/PNPLA2	中性脂質蓄積症による心不全致死, マクロファージファゴサイトーシスの低下 (マクロファージ特異的 KO)	肥満に対する抵抗性 (脂肪特異的 Tg)
PAF-AH	VIIIA	PAF-AH (I) _{α2}	精子形成障害	
	VIIIB	PAF-AH (II)	酸化ストレスによる肝障害の回復遅延	
LPLA ₂	XV	lysosomal PLA ₂	肺胞マクロファージにおける肺サーファクタントの分解障害によるリン脂質蓄積	
aiPLA ₂		Prdx6	構成的肺サーファクタント分解の低下	
AdPLA	XVI	H-rev107	メタボリックシンドロームの改善	

AdPLA: adipose PLA₂, aiPLA₂: acidic Ca²⁺-independent lysosomal PLA₂, ATGL: adipose triglyceride lipase, LPLA₂: lysosomal PLA₂, NTE: neuropathy target esterase, PAF-AH: PAF acetylhydrolase, Prdx6: peroxiredoxin 6

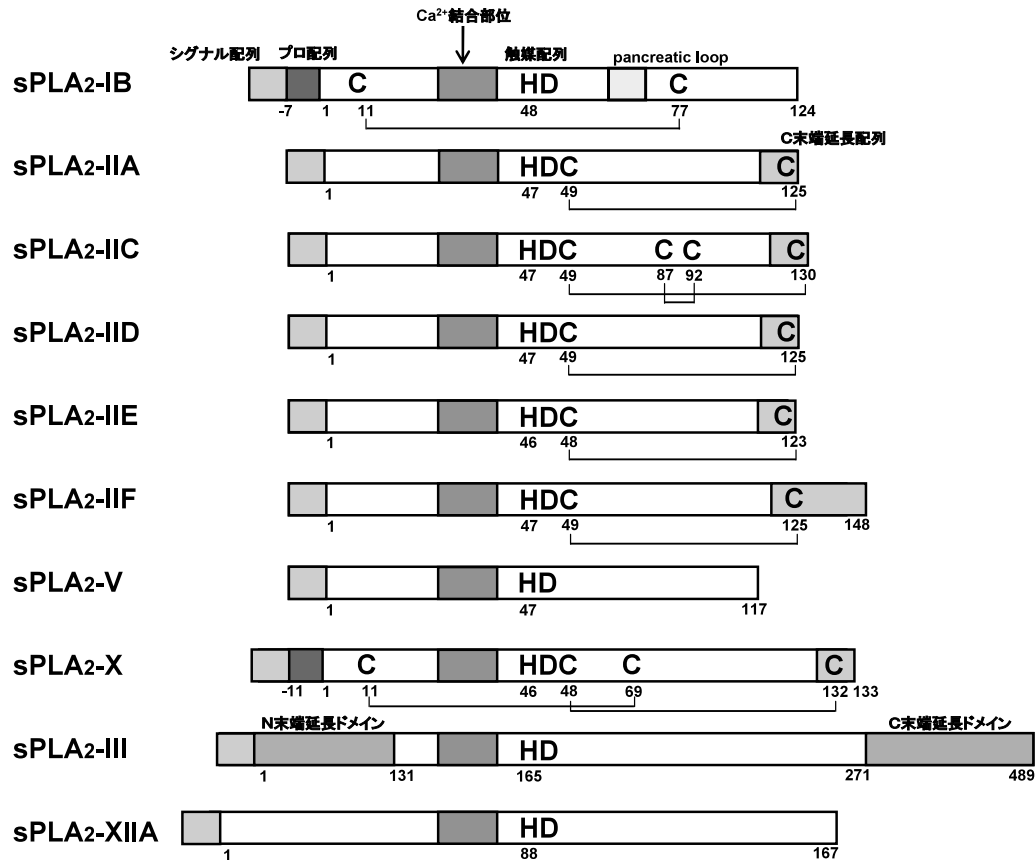


図1 sPLA₂の特徴

マウス sPLA₂ の構造を示す。分泌タンパク質に特徴的なシグナル配列を持ち、His-Asp 触媒モチーフと Ca²⁺ 結合部位が高度に保存され、分子内ジスルフィドに富んでいる。ここには、各分子に特徴的なジスルフィド結合のみを示した。分子内ジスルフィド結合を構成する Cys の数と位置関係、pancreatic loop、および C 末端の延長配列の有無が分類の指標となる。sPLA₂-IB と sPLA₂-X は、プロテアーゼによってプロペプチドが切断されて活性化される。sPLA₂-III は N 末と C 末領域に固有のドメインを持つが、分泌の過程で除かれる。sPLA₂-XIIB は酵素活性を持たないので図には含めていない。

要な分子種で、免疫系組織をはじめ小腸、肺、肝臓、腎臓など様々な組織で発現が見られ、また炎症刺激により発現が強く誘導される。例外的にマウスでは sPLA₂-IIA の発現は小腸に局限し、更に遺伝子改変マウスに通常使われる系統 (C57BL/6 や 129) では *Pla2g2a* 遺伝子座にフレームシフト変異が生じているため先天的に sPLA₂-IIA が欠損している。sPLA₂-IIC は齧歯類では精巣に発現しているが、ヒトでは偽遺伝子である。sPLA₂-IID は二次リンパ組織、sPLA₂-IIF は精巣と皮膚、sPLA₂-V は心臓、肺、およびマクロファージなどの免疫細胞に主に発現している。sPLA₂-X は主に消化管、精巣に発現が認められ、sPLA₂-IB と同様に N 末端のプロペプチドの切断によって活性化される。sPLA₂-III はハチ毒 PLA₂ と相同性を持つ唯一の分子種で、I/II/V/X 系列の sPLA₂ がそれぞれ組織固有の発現分布を示すのに対し、sPLA₂-III は全身に広範囲かつ構成的に発現しているが、特に生殖器、神経系、消化管で発現が高い。XII 系列には、酵素活性が極めて弱い酵素 (XIIB)

あるいは全くない酵素 (XIIB) が存在するが、これらの機能については不明である。各々の sPLA₂ 分子種の酵素活性を *in vitro* の測定系で比較した場合、sPLA₂ には脂肪酸側鎖の極端な選択性はないが、リン脂質の極性基にはある程度の選択性が認められる。sPLA₂-IB、-IIA、-IID などはホスファチジルエタノールアミン (PE) やホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルグリセロールのような酸性基質を好む性質があるのに対し、sPLA₂-X、-V、-III、-IIF は酸性リン脂質の他にホスファチジルコリン (PC) も加水分解する能力を持ち、特に sPLA₂-X の PC への作用は際立っている。しかしながら後述するように、*in vivo* では明らかな脂肪酸側鎖または極性基の選択性が見られる場合があるので、人為的な *in vitro* 測定系の結果と生体内で起こっている反応は必ずしも一致しない点に留意したい。

上記のようにそれぞれの sPLA₂ 分子は固有の組織分布と基質特異性を持つが、このような部分情報をもとに KO マウスを用いて sPLA₂ 各アイソザイムの *in vivo* における機

能ならびにその標的基質と酵素反応生成物を同定しようとする試みは、当初困難が予想された。そこで我々はまず、sPLA₂ 群の各アイソザイムを網羅的にマウスに過剰発現させて、表現型を精査する戦略を選択した。さらに Tg マウスの組織から脂質を抽出し、脂質質量分析の手法により各酵素の標的基質と酵素反応生成物を同定した。この Tg マウスで得られた情報を、その後に続く KO マウスの解析に演繹することにより、以下の如く各酵素に固有の新しい機能を発見するに至った。

3. PLA₂ と気道病態

我々は PC に対して比較的高い活性を持つ sPLA₂-X, sPLA₂-V, sPLA₂-III の Tg を作製した。このうち、sPLA₂-V Tg のみが肺サーファクタントの過剰分解に起因する肺障害により新生児致死となることを最初に見出した³⁾。sPLA₂-V Tg の肺は、母胎から酸素が供給される出生前は組織学的に正常であったが、自発呼吸が始まる出生後には急性呼吸不全症候群 (ARDS) 様の急激な肺拡張不全を引き起こした。このような表現型は、肺サーファクタントの合成や輸送を制御する分子の欠損マウスでしばしば観察される。実際に sPLA₂-V Tg マウスでは肺サーファクタント

の主成分であるジパルミトイル PC が分解されていたことから、これに伴う肺胞表面張力の減少が ARDS 様の症状の主因と解釈できた。sPLA₂-V は気道上皮細胞に発現しており、卵白アルブミン (OVA) 誘発喘息モデルや LPS 気道投与による ARDS モデルにおいて気道上皮細胞と肺胞マクロファージに著明な発現の誘導が認められる。sPLA₂-V KO にこれらのモデルを適用すると症状が軽減すると報告されているが^{4,5)}、肺組織中のエイコサノイドを含め脂質の解析が行われていないため、どのようなメカニズムで気道病態に関わるのかについては不明である。しかしながら sPLA₂-V KO における気道病態改善の表現型は、病態に伴って進行する肺サーファクタント分解が sPLA₂-V の欠損によって低下することが要因の一つと考えられる。一方、野生型マウスの気道にリコンビナント sPLA₂-V を投与すると酵素量依存的に病態が増悪するのに対し、sPLA₂-V 中和抗体を投与すると病態が改善する。実際に重篤な肺炎患者の気道上皮細胞では sPLA₂-V の発現が認められており、気道病態に関して sPLA₂-V が抗体医療の分子標的になり得ることを示唆している。また、sPLA₂-V KO では樹状細胞による抗原の捕捉と提示が低下しており、これも sPLA₂-V KO マウスの抗原誘発喘息モデル軽減

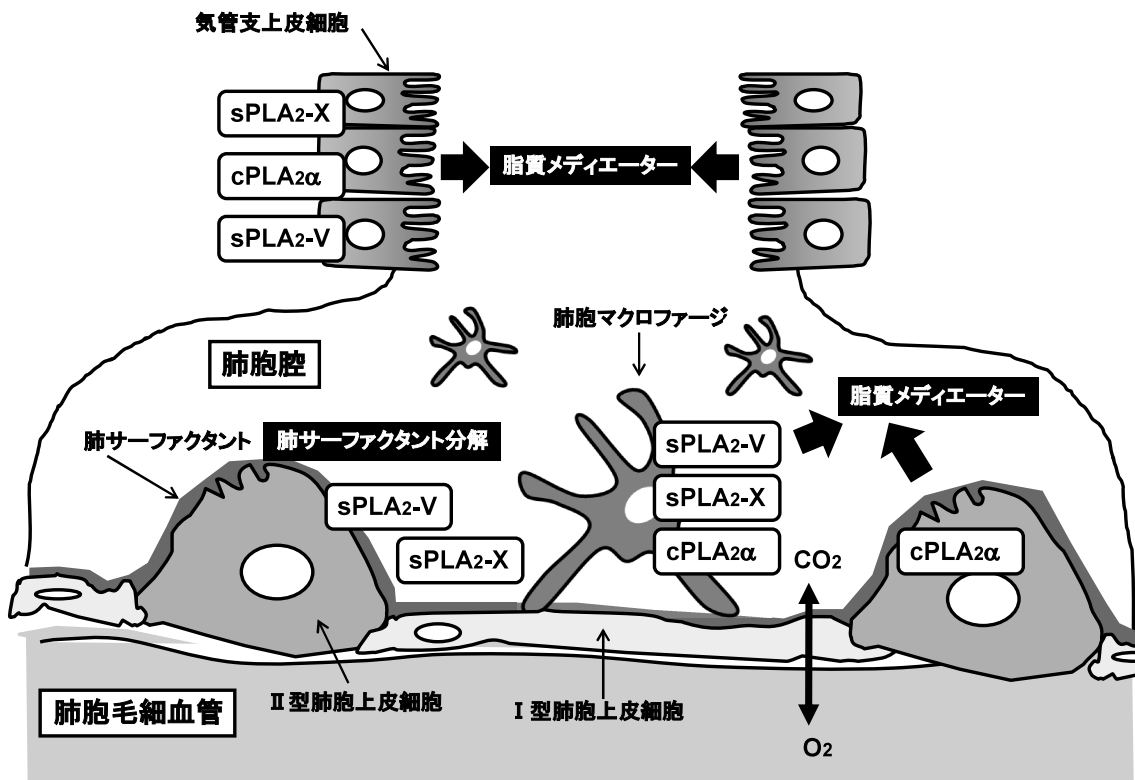


図2 気道病態における PLA₂ の作用

cPLA₂α は様々な細胞に普遍的に発現しており、エイコサノイド産生を介して気道炎症に関わる。sPLA₂-V と sPLA₂-X は気道炎症に伴い気管支上皮細胞と肺胞マクロファージにおいて発現誘導される。これらの sPLA₂ は細胞からの分泌に伴い肺サーファクタントのリン脂質を直接分解するか、または局所で脂質メディエーターを産生することにより、気道炎症病態の増悪に関与する。

の表現型に部分的に寄与することが樹状細胞再構成実験などを通じて示されている⁶⁾。

sPLA₂-X は気道上皮細胞に構成的に発現しており、OVA 誘発喘息モデルマウスでは気道上皮細胞での発現増加に加え、肺胞マクロファージにも陽性所見が認められる。sPLA₂-X KO に OVA 誘発喘息モデルを施行すると、対照と比べて炎症細胞の浸潤、気道過敏症、気道浮腫、肺細胞粘液分泌、繊維化、平滑筋増生、Th2 サイトカイン産生、エイコサノイド産生が顕著に減弱する⁷⁾。一方、我々が樹立した sPLA₂-X Tg の肺では sPLA₂-X の活性化 (N 末端ペプチドの限定分解) がごく一部でしか生じておらず、気道障害は全く認められなかったが³⁾、別グループが樹立したマクロファージ特異的 sPLA₂-X Tg は sPLA₂-V Tg と同様に ARDS 様の肺障害を起こして離乳前に死亡する⁸⁾。

従来、cPLA₂α KO に OVA 誘発モデルを適用すると気道滲出液中のエイコサノイド量ならびに気道過敏症が顕著に低下することから、cPLA₂α を介して産生される脂質メディエーターが喘息応答に関わると解釈されてきた⁹⁾。cPLA₂α と sPLA₂-X の欠損ではそれぞれが肺組織中のエイコサノイド産生量が正常レベルにまで減少するので、両者が独立して脂質メディエーター産生に寄与していることは考えにくい。おそらく構成的に発現している cPLA₂α が組織全体のエイコサノイド産生に関わるのに対し、時空間的に特定の細胞集団に発現する sPLA₂ は病態のボトルネックとなるステップを制御しており、結果的に病態の増悪に関わる可能性が考えられる。また、両酵素の機能的相互作用を示唆する結果として、好酸球の LTC₄ の産生が sPLA₂-X と cPLA₂α の相乗作用により制御されていること、すなわち sPLA₂-X により産生されたリゾホスファチジルコリン (LPC) が Ca²⁺ 流入を介して cPLA₂α の活性化を著しく促進するというメカニズムが提唱されている¹⁰⁾。あるいは sPLA₂ は主に肺サーファクタント分解に関与しており、組織障害が生じる結果として間接的に cPLA₂α によるエイコサノイド産生に影響を与えている可能性も考えられる (図 2)。

4. PLA₂ と動脈硬化

高等動物は食餌から摂取あるいは肝臓で合成した脂質を、リポタンパク質という形態で全身組織に行き渡らせる。リポタンパク質は、中性脂肪およびリン脂質、コレステロールから構成され、比重の違いから一般にキロミクロン、VLDL, LDL, HDL に分類される。リポタンパク質粒子の量的なバランスの変化や酸化変性は、動脈硬化といった循環器障害を引き起こすことが知られている。リポタンパク質粒子は、内部のトリグリセリドが PC を主とするリン脂質によって取り囲まれていることから、sPLA₂ の良い細胞外基質として位置づけられ、リポタンパク質粒子中の

リン脂質の代謝が長期的に乱れれば、全身あるいは局所の脂質状態に影響を与えることが予想される。sPLA₂-IIA Tg が高脂肪食負荷により動脈硬化を発症しやすいという報告を発端に、本酵素が LDL 中の PC を分解することにより動脈硬化促進性の変性 LDL が生じることが提唱された¹¹⁾。sPLA₂-IIA Tg より調製した骨髓細胞を LDL 受容体 (*Ldlr*) KO に移植再構成した後に、動脈硬化促進食を与えると、血漿リポタンパク質の組成変化なしに動脈硬化の進展が亢進されることから、マクロファージ由来の sPLA₂-IIA による動脈硬化の誘発は局所 (血管壁内部) でのリポタンパク質の代謝に起因することが示唆されている¹²⁾。これらの結果は sPLA₂-IIA が動脈硬化促進因子としての作用を有していることを示唆している。実際に sPLA₂-IIA はヒト動脈硬化巣に多量に発現していること¹³⁾、心血管性疾患と血中の sPLA₂-IIA の濃度は正の相関性を示すことから¹⁴⁾、本酵素が血管病変と何らかの関連を持つ可能性は高いと思われるが、反面 *in vitro* では sPLA₂-IIA の PC に対する加水分解活性は非常に弱く、リポタンパク質粒子中の PC の分解が殆ど起こらない点が疑問であった。最近、動脈硬化巣に sPLA₂-IIA 以外の sPLA₂ 分子種も存在することが、筆者らを含むいくつかのグループによって示された^{15~17)}。また、sPLA₂-III, -V, -X は sPLA₂-IIA よりも遙かに LDL 中のリン脂質を分解する活性が強く、*in vitro* でマクロファージを容易に泡沫化することから、sPLA₂-IIA よりもむしろこれらの分子種が動脈硬化に関与することが指摘されるようになった¹⁸⁾。

我々が樹立した sPLA₂-III Tg は、早齢期には外見上異常が見られなかったが、血漿中のリポタンパク質 (LDL と HDL) のリン脂質が顕著に分解された¹⁸⁾。sPLA₂-III と反応した LDL はマウス腹腔マクロファージの泡沫化を著しく亢進し、その効果は別途報告されている sPLA₂-V および sPLA₂-X (後述) に匹敵していた。さらに、sPLA₂-III Tg を *ApoE* KO (動脈硬化自然発症マウス) と交配した後に高コレステロール食を与えると、動脈硬化が促進されるとともに、血中の LPC, トロンボキサン A₂ (TXA₂) の増加が認められた。また、ヒト動脈硬化巣では内因性の sPLA₂-III の発現の著しい増加が認められた。以上の結果から、sPLA₂-III は血管壁でリポタンパク質の分解 (変性) を促進して動脈硬化に関わるものと推察された。興味深いことに、sPLA₂-III Tg を長期間飼育すると皮膚炎を自然発症する個体が高頻度で出現することから¹⁹⁾、動脈硬化を血管壁の慢性炎症とみなす最近の風潮を踏まえれば、血管壁における炎症の増悪が動脈硬化の進展の背景にあるとも考えられる。これらの結果は sPLA₂-III と動脈硬化との機能的な連関を示唆するものであるが、病態生理学的な意義は sPLA₂-III KO を使った解析を待つべきである。

sPLA₂-V もヒトおよびマウスの動脈硬化巣部位、特に平

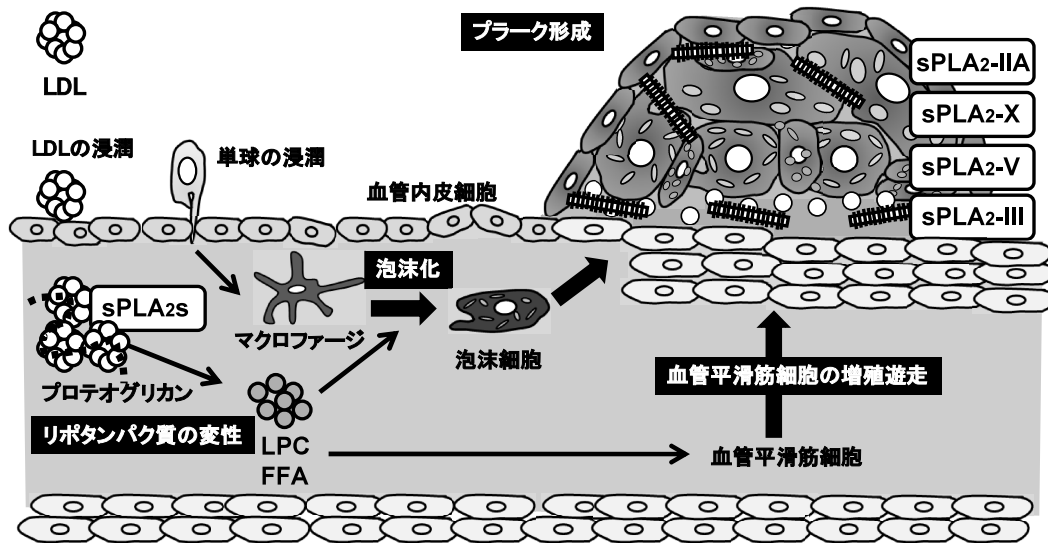


図3 sPLA₂と動脈硬化

高コレステロール血症により傷害された動脈の内皮では、コレステロールに富むLDLが内膜の細胞間隙へ浸潤する。浸潤したLDLはプロテオグリカンに捕捉されマクロファージ由来のsPLA₂の基質となる。この反応の結果、血管壁局所において変性LDLの生成ならびにリゾリン脂質（LPC等）と遊離脂肪酸（FFA）の遊離が進行する。変性LDLはマクロファージの泡沫化を促進し、LPC（またはその代謝物）とFFAは血管平滑筋細胞の増殖と遊走を促進する。この反応が過度に進行するとプラーク形成が増悪する。

滑筋細胞と泡沫化細胞の周囲に発現していること^{15,20)}、また動脈硬化を自然発症する *ApoE* KO×*Ldlr* KO の動脈硬化巣で sPLA₂-V の発現が増加することから、動脈硬化との関連が指摘されている。実際に sPLA₂-V KO より調整した骨髓細胞を移植再構成した *Ldlr* KO マウスに動脈硬化促進食を与えると、動脈硬化の進展が抑制される²⁰⁾。すなわち、炎症細胞に発現している sPLA₂-V は動脈硬化巣局所において LDL を代謝し、動脈硬化促進性の変性 LDL を生じているものと考えられる。興味深いことに、ヒトにおいて sPLA₂-V の一塩基多型 (SNP) が II 型糖尿病患者の血中 LDL 濃度と相関する²¹⁾。このことは、本酵素がメタボリックシンドロームにおいて血漿 LDL の代謝に関わることを示唆している。

sPLA₂-X もヒトおよびマウスの動脈硬化巣部位に発現していることが報告されている^{16,21)}。sPLA₂-X は、LDL や HDL の PC を加水分解し、その作用は sPLA₂-V よりも更に強い¹⁶⁾。実際、我々が樹立した sPLA₂-X Tg の血漿では、LDL と HDL が大きく減少していた²²⁾。血漿中に内因性の sPLA₂-X は検出されず²²⁾、また通常飼育下の sPLA₂-X KO においてリポタンパク質組成に変化は認められない²³⁾、sPLA₂-X KO を *ApoE* KO と交配した後にアンジオテンシン II 誘発性の大動脈瘤および動脈硬化促進モデルを適用すると、対照群と比較して血管病変の重症度が減弱し、これは血管局所の炎症誘発性メディエーターの低下を伴う²⁴⁾。さらにマクロファージに発現している sPLA₂-X は、核内受容体 LXR による ABC トランスポーターの発現を

抑制することにより、マクロファージからのコレステロール排出を負に調節する²⁵⁾。これらの結果は *in vivo* において sPLA₂-X も動脈硬化の増悪に寄与することを示唆している。

このように、複数の sPLA₂ アイソザイムがリポタンパク質の変性を経て動脈硬化の促進に寄与することは確実であると思われるが（図3）、どのアイソザイムが最も重要であるかについては結論が出ていない。C57BL/6 系統のマウスでは sPLA₂-IIA が存在しないが、ヒトの心血管系では sPLA₂-IIA が最も発現の高いアイソザイムであるため、動脈硬化における各アイソザイムの寄与については動物種差を踏まえて考える必要がある。最近の報告によれば、sPLA₂-IIA は上述のように正常の LDL にはほとんど作用しないが、酸化変性 LDL に対する活性は非常に強いという（私信）。動脈硬化巣には酸化変性 LDL が蓄積するので、Tg マウスの結果を見れば、当然 sPLA₂-IIA も動脈硬化促進性のアイソザイムの一つと考えるべきである。最近、米国企業により開発された sPLA₂ 阻害剤（IIA, V, X を阻害）が動脈硬化モデルに著効を示すことが示され²⁶⁾、動脈硬化の予防治療薬としての治験が進行中である。

5. PLA₂と皮膚疾患

皮膚の病態というと接触性皮膚炎やアトピー性皮膚炎などの炎症性疾患が思い出される。実際にエイコサノイドの受容体や合成酵素の欠損が炎症性細胞の遊走や活性化に関連して皮膚炎の改善や増悪を起こすことが報告されてい

る。老齢の sPLA₂-III Tg はアトピー性皮膚炎の病理像と類似した皮膚炎を発症し、炎症性 Th2 サイトカインの発現増加や好中球・マクロファージの浸潤、PGE₂ の産生亢進が認められる¹⁹⁾。しかしながら、このような応答は皮膚に特有なものではなく、炎症反応を皮膚で評価しているのに過ぎず、実際に皮膚炎が認められる群では肺や肝臓の炎症像や脾臓肥大も観察される。ここでは炎症ではなく、皮膚における恒常性維持と sPLA₂ の関連について概説する。

皮膚の最も外側を構成する表皮は 4 層の細胞から成り、下から上に向かって基底層、有棘層、顆粒層、角質層の順番に分化が進んでいく。最上層の角質の細胞間隙には脂質の層があり、体内からの水分の蒸発を防ぐとともに、外界からの微生物や異物の侵入を防ぐ機能を持つことから「バリア脂質」と呼ばれる。バリア脂質の主要な構成成分はセラミドであり、コレステロールと脂肪酸が残り占める。脂肪酸はバリア脂質層を弱酸性に保つ機能を持ち、セラミドやコレステロールの合成を促進するとともに、皮膚への細菌の侵入を防ぐ役割を持つ。この角質脂肪酸は表皮顆粒層細胞のラメラ小体から分泌されたリン脂質が細胞外に存在する何らかの PLA₂ により分解されて生じると考えられている。一方で、表皮の分化やバリア脂質形成のために不飽和脂肪酸の代謝物が機能すると報告されており、実際にヒト魚鱗癬患者の中には ALOX12B や ALOXE3 などのリポキシゲナーゼ遺伝子の変異が見つかっている²⁷⁾。

皮膚と sPLA₂ の概念は、最初に樹立された sPLA₂-IIA Tg が皮膚異常を認めたことから始まる²⁵⁾。このマウスは無毛であると同時に著しい表皮の肥厚が認められるが、炎症の所見は全く認められない。しかしながら、野生型マウスの皮膚では sPLA₂-IIA は全く発現が認められないことから、この Tg で観察された表現型の生理的意義は説明できない。最近、我々は sPLA₂-X Tg が sPLA₂-IIA Tg と類似の皮膚の表現型を示すことを見出した²⁹⁾。sPLA₂-X Tg では体毛の歪曲を伴う一過性の脱毛、表皮の肥厚および皮脂腺の膨張といった皮膚異常が認められた。脱毛の著しい生後 25 日の皮膚を用いたマイクロアレイと定量的 PCR の結果から、このマウスの皮膚では表皮細胞の最終分化が亢進していることが示された。しかしながら、この時期における内因性 sPLA₂-X の発現は認められなかった。同じ生後 25 日の sPLA₂-X KO の皮膚を用いてマイクロアレイ解析を行うと、sPLA₂-X Tg の遺伝子変化に対応するような正反対の変化は認められなかったが、sPLA₂-X KO の皮膚では体毛に局在するケラチン遺伝子群の選択的な低下が認められ、sPLA₂-X は体毛の機能に何らかの関連があるのではないかと推察された。体毛は成長期（胎生期-生後 16 日）、退行期（生後 16 日-19 日）、休止期（生後 19-28 日）のステージを経て、以後同様のサイクルで進行する。免疫組織化学染色および定量的 PCR の詳細な検討から、sPLA₂-X は体

毛の外根鞘に局在しており、体毛の毛周期に同調して sPLA₂-X の発現量が変化することを見出した²⁹⁾。先に述べた生後 25 日の体毛は毛周期の休止期末期、すなわち体毛が短く外根鞘がほとんど認められない時期に相当するため、この時期に内因性 sPLA₂-X の発現が認められないのも当然である。体毛の伸びが盛んな成長期中期（生後 8 日）の sPLA₂-X KO の皮膚では、体毛の数に変化は認められないものの、毛包関連遺伝子の発現低下、体毛の歪曲、外根鞘の形成不全、メラニン顆粒の増加が認められた。したがって、sPLA₂-X は皮膚組織において毛包に局限して時空間的に発現し、体毛形成の制御に関わるアイソザイムであると考えられた（図 4）。一部の PG やリゾリン脂質が体毛形成に関わることを踏まえると、sPLA₂-X は毛包ニッチにおいて育毛性脂質メディエーター生合成経路の最上流の一つとして位置づけられることが想定されるが、sPLA₂-X KO の毛包では予想に反して PGE₂ の産生が増加しており、sPLA₂-X は少なくとも PGE₂ 産生経路とは直接リンクしていないことが判明した。如何なる脂質代謝経路が毛包 sPLA₂-X の下流に位置するかについては今後の検討が必要である。

先に *in vitro* の系において、sPLA₂-X は PE のような酸性基質の他に PC も際だって加水分解する活性を持つことを述べた。しかしながら、sPLA₂-X Tg および対照マウスの皮膚の脂質成分について脂質質量分析計を用いて分析すると、sPLA₂-X は PC を標的基質とせず、高度不飽和脂肪酸を含む PE のみを基質とすることが判明した²⁹⁾。これは、*in vivo* における sPLA₂ の基質特異性が必ずしも *in vitro* の結果と一致しないことを示す一例である。このことは、リン脂質分子と sPLA₂ の機能的相互作用は組織および細胞の微少環境において固有であることを示しており、組織固有環境下での酵素と基質の存在状態を踏まえて理解する必要がある。すなわち皮膚の場合、sPLA₂-X が高度不飽和脂肪酸を含む PE と選択的に出会う「時空間的な場」が存在することが想定される。

内在性の sPLA₂-X の皮膚全体における発現は極めて低く、時期特異的に外根鞘に発現していることから、sPLA₂-X Tg において観察された皮膚異常、特に sPLA₂-X が本質的に分布していない表皮の表現型の意義に関しては謎が残る。おそらく表皮には別の内因性 sPLA₂ が発現して機能しており、人為的な sPLA₂-IIA や sPLA₂-X の過剰発現によって見られる皮膚異常は、本来の内因性 sPLA₂ によるリン脂質代謝を過剰発現した酵素が代替増幅すること起因するものと考えられる。我々はマウス皮膚における sPLA₂ ファミリーの網羅的な発現解析を行い、表皮顆粒層から角質層に高発現し、表皮肥厚の病態モデルと相関して発現が増加する主要な sPLA₂ アイソザイムを見出した（投稿準備中のため、ここでは「表皮 sPLA₂」と称する）。

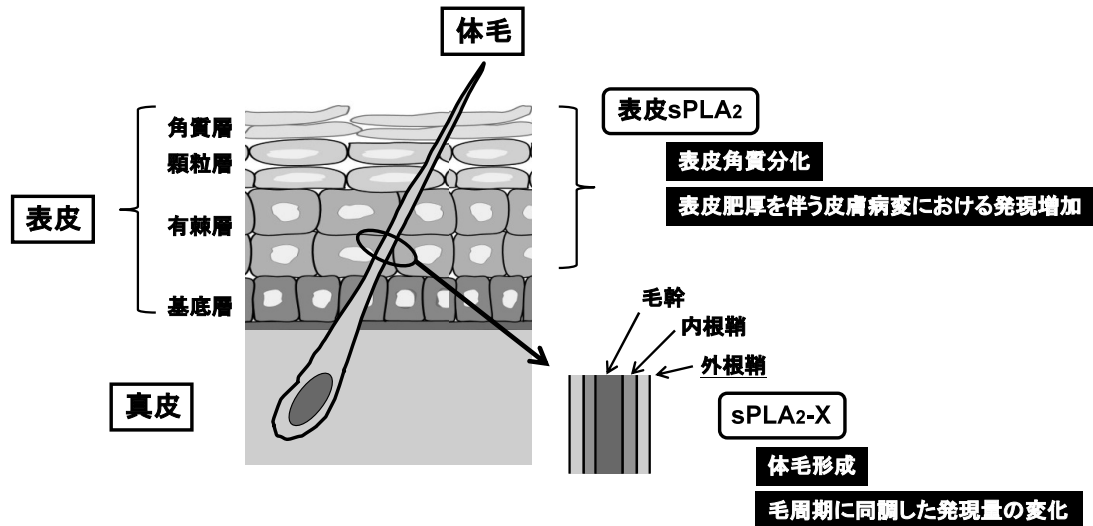


図4 sPLA₂と皮膚

皮膚の最も外側を構成する表皮は基底層、有棘層、顆粒層、角質層から成り立っている。表皮sPLA₂は角質層、顆粒層、有棘層に局在し、表皮角質分化に関与する。またこのアイソザイムは表皮肥厚を伴う皮膚病変において発現が増加する。sPLA₂-Xは体毛の外根鞘に局在しており、毛周期に応じて発現量が変化する。さらに、このアイソザイムは体毛の形成に関与する。

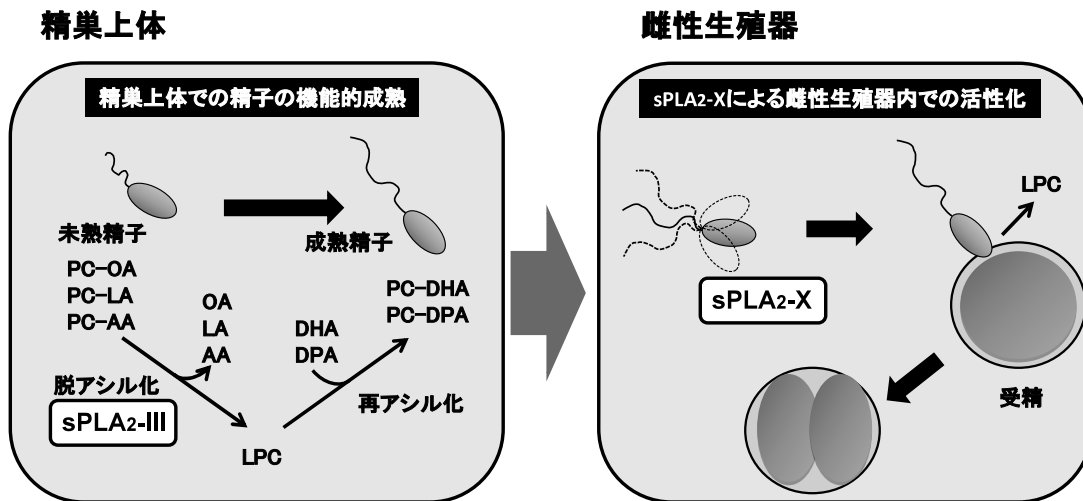
sPLA₂-X Tgの皮膚では表皮sPLA₂の著しい発現増加が認められた。表皮sPLA₂ TgはsPLA₂-X Tgと同様に、脱毛を伴う表皮の肥厚が認められた。一方、表皮sPLA₂のKOの皮膚では表皮角質層の形成異常が生じ、皮膚バリア機能が消失していた。脂質質量分析の結果、表皮sPLA₂は高度不飽和脂肪酸を含むPEを選択的に基質として、表皮作動性の脂質メディエーターを生成することがわかった。これらの結果は表皮sPLA₂が表皮の分化とバリア機能を制御するものであると強く示唆しており(図4)、先のsPLA₂-X Tgの表現型は表皮sPLA₂の本質的な機能を代替増幅した結果を見ていたものと考えている。

6. PLA₂と生殖

生命の発生は精子と卵子の受精から始まる。生殖は脂質、特に高度不飽和脂肪酸との関連が非常に深い。例えばアラキドン酸代謝物のPG類は、卵形成から排卵、受精、着床、分娩といった母体の中で起こる一連の生殖プロセスに非常に重要である。これに対し、脂質の合成や運搬、輸送に関わる分子群の欠損はしばしば雄性生殖に影響を与えることから、脂肪酸の組成が精子の形成や機能に重要であると考えられてきた。雄性生殖器の脂質組成は全身臓器の中でも特に高度不飽和脂肪酸が豊富であり、その中でも精子膜はドコサヘキサエン酸(DHA)やドコサペンタエン酸(DPA)などの超高度不飽和脂肪酸に富み、これらが精子膜の流動性を高め、精子鞭毛に活発な運動性を与えている。実際に精子膜のDHA含有率と精子運動性は正の相関性があることがヒトを含む様々な動物で示されている。

筆者らは全sPLA₂アイソザイムのKOの繁殖成績から、

sPLA₂-III KOの雄が著しい繁殖異常を示すことを見出した³⁰⁾。野生型マウスでは、sPLA₂-IIIは精巣の支持細胞(セルトリ細胞とライディッヒ細胞)と精巣上体頭部の管腔上皮細胞に発現していた。sPLA₂-III KOの精巣上体尾部より得た精子は、数は正常であったが、対照マウスの精子と比べて運動性が著しく低下していた。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判明した。また、KO精子では対照精子と比べてATP量やチロシンリン酸化が顕著に減少しており、鞭毛軸索微小管の対称リング構造が損なわれていた。そしてこれらの異常は、精巣ではなく、KO精子が精巣上体を通る間に生じていた。精巣で作られた精子細胞は機能的に未成熟であり、精巣上体を通る際に成熟して運動性を獲得する。この際に、精子の膜リン脂質に脂肪酸の劇的なリモデリングが起こり、オレイン酸、アラキドン酸などの不飽和脂肪酸からDPAやDHAなどの超高度不飽和脂肪酸に置き換わる。前述のようにヒトをはじめとしたいくつかの動物種において、DHA含量の少ない精子は運動性が悪いことが報告されている。そこで、脂質質量分析により精巣上体頭部の未成熟精子と精巣上体尾部の成熟精子の膜リン脂質組成を分析した結果、sPLA₂-III KOマウスの精巣上体では、この精子の成熟に伴う膜リン脂質の脂肪酸リモデリングが大きく損なわれており、DPA、DHAの少ない異常精子となっていることが判明した。したがって、sPLA₂-IIIは精巣上体の管腔上皮細胞から分泌されて内腔を通過する精子の膜リン脂質の脂肪酸リモデリングを制御しており、この代謝系の破綻が精子成熟不全を導くものと結論した(図5)。

図5 sPLA₂と生殖

sPLA₂-IIIは精巣上体の管腔上皮細胞から内腔に分泌され、内腔を通過する未熟な精子膜の再構成を制御することで運動性に富む精子への成熟を促進する。sPLA₂-Xは精子先体部（アクロソーム）より分泌され、雌性生殖器内での精子の活性化を促進する。

また、sPLA₂-III KOの精巣上体では、いわゆるアラキドン酸代謝物のうち12/15-リポキシゲナーゼ（12/15-LOX）の代謝物が選択的に減少しており、これはsPLA₂が特定のアラキドン酸代謝経路と選択的にカップルすることを*in vivo*で示した初めての例である。しかしながら、12/15-LOX代謝産物の減少と精子成熟異常の関連は現段階では明らかではない。さらに、sPLA₂-III KOでは精巣上体液中に存在するリン脂質の組成も変化しており、精子と精巣上体管腔上皮細胞の間のリン脂質の運搬が乱れているものと予想される。

精巣上体から射精された精子は、capacitationと呼ばれる活性化反応とそれに続くアクロソーム反応（先体放出反応）を経て、初めて卵子と受精可能になる。我々は、精子先体部（アクロソーム）にsPLA₂-Xが発現しており、アクロソーム反応（精子の脱顆粒反応）により分泌されることを見出した³¹⁾。sPLA₂-X KOの精子は、精巣での精子形成ならびに精巣上体での精子成熟は正常であったが、アクロソーム反応が低下しており、その結果卵子との体外受精率が低下することがわかった。また、野生型マウスの精子にsPLA₂-Xの阻害剤あるいは特異抗体を添加すると、卵子との受精率がsPLA₂-X KOと同程度のレベルまで低下した。この時にリコンビナントsPLA₂-Xまたはその代謝産物であるLPCを添加すると、KO精子の受精率が野生型精子のレベルまで回復した。したがって、sPLA₂-Xは精巣上体以降のステップ（生理的には子宮内）における精子の活性化を促進する機能を持つものと結論した。

sPLA₂-X KOの雌雄同士を交配すると産仔数が有意に減少するが、雄KOを野生型マウスの雌と交配しても産仔数の減少には至らない³¹⁾。このことは、雌側から供給される

sPLA₂-Xも生殖に関わることを示唆している。雌性生殖器において、sPLA₂-Xは子宮内腔上皮細胞と卵巣（卵子）に発現している。雌のsPLA₂-X KOから単離した卵子を用いて体外受精を行っても受精率には影響がなかったことから、卵子のsPLA₂-Xは生殖には関わらないものと思われる²³⁾。おそらく精子が受精の場である卵管に向かって子宮内を通過する際に子宮内腔上皮細胞から供給されるsPLA₂-Xがパラクライン的に精子の活性化を補助していることを予想しているが、受精卵の子宮壁への着床以降のステップに関与している可能性も否定できない。

以上の結果より、精巣で作られた精子は、sPLA₂-IIIによる精巣上体での機能的成熟、sPLA₂-Xによる雌性生殖器内での活性化、の2段階の制御を受け、卵子との受精が可能になるものと考えられる（図5）。この結果は、雄性生殖器内の異なるニッチに発現している2種のsPLA₂アイソザイム（精巣上体管腔細胞のsPLA₂-IIIと精子アクロソームのsPLA₂-X）により、「生殖」という生命の継続性に必須の現象が時空間的に制御を受けていることを初めて明らかにしたものである。ごく最近我々は脂質質量分析により、精子より分泌されたsPLA₂-Xが精子膜中のDHA、DPAを有するPCを分解することを見出している（未発表）。このことはすなわち、精巣上体のsPLA₂-IIIによりDHA、DPA含有PCに富む精子が産生され、引き続きsPLA₂-Xがこれらのリン脂質分子種を基質としてLPCを供給することが精子の活性化に必要なことを意味しており、生殖ニッチにおいて時空間的に異なる部位に発現している2種類のsPLA₂の機能的連携を示すものといえる。この研究成果は、生殖における脂質の重要性を裏付けるのみならず、不妊症の診断や避妊薬の開発に役立つものと期

待している。

7. PLA₂ と神経

sPLA₂-X はヒトおよびマウスの末梢神経繊維に発現しており、*in vitro* の培養系において LPC の産生を介して神経突起伸長を増強する^{23,32)}。sPLA₂-X KO および sPLA₂-X Tg を長期間飼育しても外見的に神経異常に伴う表現型は認められないが、sPLA₂-X Tg の 12.5 日胚から脊髄後根神経節 (DRG) ニューロンを摘出し、NGF 存在下 *exo vivo* で培養して神経突起伸長を調べると、野生型マウス由来の DRG ニューロンと比較して突起伸長が促進された。同様の実験系を sPLA₂-X KO に適用すると、突起伸長は逆に部分的に抑制された。神経系の恒常性維持に密接な関与が指摘されている分子群の発現量が KO で減少していたことから、sPLA₂-X が個体発生時の神経系の成熟に関わっているものと考えられる。DRG ニューロンは疼痛応答を仲介する場であることから、sPLA₂-X 遺伝子改変マウスに化学刺激による侵害受容の評価テスト (酢酸ライジング) を適用した結果、sPLA₂-X Tg では侵害受容が増悪したのに対し sPLA₂-X KO では軽減された。しかし、sPLA₂-X が痛覚増感物質である PG 類の産生を介して疼痛反応に直接関与している証拠は得られておらず、むしろ否定的である。おそらくリゾリン脂質の産生を介して微小神経ネットワークの構築に寄与している可能性を想定している。

8. その他の機能 (消化, 関節炎, 生体防御, 虚血性心障害, がん)

ここでは、主に我々以外の研究グループからこれまでに報告されている sPLA₂ 群の機能について、簡単に概説したい。

(1) 消化: 「膵臓型 sPLA₂」とも呼ばれる sPLA₂-IB は長い間消化酵素であると考えられてきた。実際、sPLA₂-IB 欠損マウスでは消化管での食餌および胆汁由来 PC の分解とそれに伴う LPC の産生が顕著に低下する³³⁾。消化管から吸収された LPC は肝臓のインスリン抵抗性の増悪因子であるが、sPLA₂-IB 欠損マウスではこれを生じない³⁴⁾。このため、sPLA₂-IB 欠損マウスに高脂肪食を負荷すると、肥満とそれに伴うインスリン抵抗性を生じにくい³⁵⁾。この知見と合致して、ヒトにおいて sPLA₂-IB 遺伝子は肥満感受性遺伝子座に存在する³⁶⁾。最近我々は、胃から大腸までの消化管全体の内腔上皮細胞に発現している sPLA₂-X もリン脂質の消化に関わることを明らかにした²³⁾。このため、通常食下で長期間飼育した sPLA₂-X KO マウスは脂肪組織への脂質沈着が低下し、「痩せ」の表現型を示す。先に動脈硬化の項で触れた sPLA₂ 阻害剤をマウスに経口投与すると高脂肪食により誘導される肥満が改善することか

ら³⁷⁾、本阻害剤は肥満予防治療薬としても有望である。

(2) 関節炎: 「炎症性 sPLA₂」としばしば称される sPLA₂-IIA は、元々リウマチ関節炎患者の滲出液から精製されたことから、炎症性関節炎の病態に関わることが当初から予想されていた。しかしながら、先述のように KO の作成に通常用いられるマウス系統は先天的に sPLA₂-IIA を欠失しているため、本酵素の機能を評価する有効な系は長い間 sPLA₂-IIA Tg しか存在しなかった。正常の *Pla2g2a* 遺伝子を持つ BALB/c と持たない C57BL/6 を比較して sPLA₂-IIA の機能を論評している論文が複数あるが、遺伝学的背景の差異を無視したこれらの報告は論理的にナンセンスである。最近、BALB/c と C57BL/6 の交配を重ねることにより、BALB/c の背景で C57BL/6 の *Pla2g2a* 遺伝子座を持つコンジュニックマウス (すなわち sPLA₂-IIA 欠損 BALB/c マウス) が作出されたことにより、関節炎における sPLA₂-IIA の役割がようやく解決された³⁸⁾。本 sPLA₂-IIA KO では炎症性関節炎が顕著に軽減し、逆に sPLA₂-IIA Tg では増悪が認められることから、本酵素が関節炎の病態に関わることが証明された。一方、同じ炎症性関節炎モデルにおいて、sPLA₂-V KO は病態が著しく増悪する³⁸⁾。これは、マクロファージの貪食作用による病原性抗原抗体複合体のクリアランスが sPLA₂-V の欠損により損なわれるためである³⁹⁾。sPLA₂-V KO に sPLA₂-V を投与すると、マクロファージによる抗原抗体複合体のクリアランスが回復し、関節炎の改善が見られる³⁸⁾。この作用には sPLA₂-V による LTC₄ 産生が関わるようである。

(3) 生体防御: sPLA₂-IIA の最も主要な生理機能は、感染微生物 (特にグラム陽性菌) に対する感染防御である。sPLA₂-IIA は極めて低濃度で細菌膜中の PE を分解し、強い殺菌活性を示す⁴⁰⁾。このため、sPLA₂-IIA Tg は黄色ブドウ球菌や大腸菌の感染に対して抵抗性を示す⁴¹⁾。一方、sPLA₂-V KO では先述のようにマクロファージの貪食能が低下するため、真菌を除去する自然免疫に低下が認められる。したがって、sPLA₂-V KO はカンジダ感染に弱く、病原菌をクリアすることができずに早期死亡する⁴²⁾。

(4) 虚血性心疾患: sPLA₂-X は好中球に発現しており、虚血心障害モデルをマウスに施行すると好中球の浸潤に伴って病変部に放出され、おそらく LTB₄ の産生を介して心筋細胞の障害に関わる。このため、sPLA₂-X KO は虚血再還流による心筋障害モデルにおいて症状が劇的に緩解する⁴³⁾。一方、sPLA₂-V は心筋細胞に発現しており、心虚血部で発現が増加する⁴⁴⁾。sPLA₂-V KO に同じ心筋障害モデルを施行すると、梗塞障害部が著減するとともに、LTB₄、TXA₂ の産生量が有意に低下する⁴⁵⁾。同心疾患モデルに

sPLA₂ 阻害剤を投与すると症状が顕著に改善することから、本阻害剤は心疾患の予防治療薬としても有望である。

(5) がん：sPLA₂-IIA の主要な発現部位の一つは小腸、特に細菌防御に関わるパネット細胞である。sPLA₂-IIA の自然変異を持つマウス系統は、本酵素を正常に発現するマウス系統と比べて大腸がんの発生リスクが高い⁴⁶⁾。sPLA₂-IIA 欠損系統のマウスを sPLA₂-IIA Tg と交配すると大腸がんが軽減するので⁴⁷⁾、マウスの遺伝学的背景とは関係なく、sPLA₂-IIA には大腸がんを抑制する機能があるようである。同様に、ヒト胃がんの重篤度と sPLA₂-IIA の胃内発現量は逆相関する⁴⁸⁾。この sPLA₂-IIA の消化器がん抑制作用のメカニズムは不明であるが、本酵素の抗細菌活性による腸内細菌環境の変化ががん発症率に影響を与えていることが予想されている。一方、sPLA₂-IIA Tg は皮膚化学発がんモデルに感受性が高く⁴⁹⁾、またヒト前立腺において本酵素の発現量と前立腺がんの悪性度の間に正の相関性があることが示されている⁵⁰⁾。したがって、sPLA₂-IIA とがんの関係は組織固有と考えるべきである。他の sPLA₂ アイソザイムとがんの関係については実験的証拠に乏しいが、ヒト大腸がんと sPLA₂-III 遺伝子の発現量ならびに SNP の間に正の相関性が見出されている^{51,52)}。実際、sPLA₂-III はヒト大腸がん組織のがん細胞と新生血管に発現しており、sPLA₂-III を過剰発現した大腸がん細胞株をヌードマウスに移植すると腫瘍サイズが増大する⁵³⁾。

9. お わ り に

本稿では、sPLA₂ 分子群の生体調節機能について、最近の我々の研究成果を中心に紹介した。細胞内に存在する cPLA₂ や iPLA₂ はアラキドン酸代謝をはじめとするシグナル伝達や細胞膜の恒常性の調節因子として注目されているが、sPLA₂ は細胞形質膜のリン脂質のみならず、リポタンパク質やサーファクタント、細菌などの細胞外リン脂質を加水分解し、多彩な生理機能を発揮していることが明らかになってきた。また、sPLA₂ はアラキドン酸以外の高度不飽和脂肪酸を含むリン脂質も基質として触媒することから、最近注目されているエイコサペンタエン酸 (EPA) や DHA などの ω -3 脂肪酸由来の抗炎症性脂質メディエーターの産生に関わることも示唆されつつある。sPLA₂ は細胞外微少環境の局所において適切な時期に発現し、そのようなニッチ特有の環境で固有のリン脂質を加水分解することで、多彩な生命現象に大きな影響を与えているのであろう。今回は誌面の都合上紹介できなかったが、我々の研究室ではメタボリックシンドロームや獲得免疫応答においても各 sPLA₂ がアイソザイム固有の機能を発揮することを見出しており、現在解析中である。

本稿では詳しく触れなかったが、細胞内 PLA₂ ファミ

リーについても世界的に活発に研究が行われている。cPLA₂ 群と iPLA₂ 群は本質的に共通の祖先遺伝子から派生し、cPLA₂ 群が進化的に脊椎動物で初めて出現するのに対し、iPLA₂ (別名：PNPLA：patatin-like phospholipase domain containing lipase) 群は、脊椎動物のみならず酵母、線虫、昆虫、粘菌など原始的な真核生物においても多数のアイソザイムが存在することから、進化的に保存された生命応答に必須の脂質代謝を制御しているものと推察される。特に、iPLA₂ 群の遺伝子変異は神経変性やメタボリックシンドロームと密接に絡んでいることが明らかとなっており、その注目度は高い⁵⁴⁻⁵⁶⁾。生体内には機能不明の PLA₂ 関連分子がまだまだ多数存在しており、未知の脂質代謝が制御する生命応答を探索することに多大な魅力を感じている。

文 献

- 1) 村上 誠, 佐藤弘泰, 平林哲也, 山本 圭, 武富芳隆 (2010) 実験医学, 28, 114-125.
- 2) Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., & Yamamoto, K. (2011) *Prog. Lipid Res.*, 50, 152-192.
- 3) Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Arata, S., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Yamamoto, K., Kudo, I., & Murakami, M. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 36420-36433.
- 4) Muñoz, N.M., Meliton, A.Y., Arm, J.P., Bonventre, J.V., & Leff, A.R. (2007) *J. Immunol.*, 179, 4800-4807.
- 5) Muñoz, N.M., Meliton, A.Y., Meliton, L.N., Dudek, S.M., & Leff, A.R. (2009) *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 296, L879-L887.
- 6) Giannattasio, G., Fujioka, D., Xing, W., Katz, H.R., Boyce, J. A., & Balestrieri, B. (2010) *J. Immunol.*, 185, 4430-4438.
- 7) Henderson, W.R. Jr., Chi, E.Y., Bollinger, J.G., Tien, Y.T., Ye, X., Castelli, L., Rubtsov, Y.P., Singer, A.G., Chiang, G.K., Nevalainen, T., Rudensky, A.Y., & Gelb, M.H. (2007) *J. Exp. Med.*, 204, 865-877.
- 8) Curfs, D.M., Ghesquiere, S.A., Vergouwe, M.N., van der Made, I., Gijbels, M.J., Greaves, D.R., Verbeek, J.S., Hofker, M.H., & de Winther, M.P. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 21640-21648.
- 9) Uozumi, N., Kume, K., Nagase, T., Nakatani, N., Ishii, S., Tashiro, F., Komagata, Y., Maki, K., Ikuta, K., Ouchi, Y., Miyazaki, J., & Shimizu, T. (1997) *Nature*, 390, 618-622.
- 10) Lai, Y., Oslund, R.C., Bollinger, J.G., Henderson, W.R. Jr, Santana, L.F., Altmeier, W.A., Gelb, M.H., & Hallstrand, T.S. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 41491-41500.
- 11) Ivandic, B., Castellani, L.W., Wang, X.P., Qiao, J.H., Mehra, M., Navab, M., Fogelman, A.M., Grass, D.S., Swanson, M.E., de Beer, M.C., de Beer, F., & Lusis A.J. (1999) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 1284-1290.
- 12) Webb, N.R., Bostrom, M.A., Szilvassy, S.J., van der Westhuyzen, D.R., Daugherty, A., & de Beer, F.C. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23, 263-268.
- 13) Romano, M., Romano, E., Bjorkerud, S., & Hurt-Camejo, E. (1998) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18, 519-525.
- 14) Kugiyama, K., Ota, Y., Takazoe, K., Moriyama, Y., Kawano,

- H., Miyao, Y., Sakamoto, T., Soejima, H., Ogawa, H., Doi, H., Sugiyama, S., & Yasue, H. (1999) *Circulation*, **100**, 1280–1284.
- 15) Rosengren, B., Peilot, H., Umaerus, M., Jönsson-Rylander, A. C., Mattsson-Hultén, L., Hallberg, C., Cronet, P., Rodriguez-Lee, M., & Hurt-Camejo, E. (2006) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**, 1579–1585.
- 16) Hanasaki, K., Yamada, K., Yamamoto, S., Ishimoto, Y., Saiga, A., Ono, T., Ikeda, M., Notoya, M., Kamitani, S., & Arita, H. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 29116–29124.
- 17) Kimura-Matsumoto, M., Ishikawa, Y., Komiyama, K., Tsuruta, T., Murakami, M., Masuda, S., Akasaka, Y., Ito, K., Ishiguro, S., Morita, H., Sato, S., & Ishii, T. (2008) *Atherosclerosis*, **196**, 81–91.
- 18) 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., & Murakami, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 33483–33497.
- 19) Sato, H., Taketomi, Y., Isogai, Y., Masuda, S., Kobayashi, T., Yamamoto, K., & Murakami, M. (2009) *Biochem. J.*, **421**, 17–27.
- 20) Bostrom, M.A., Boyanovsky, B.B., Jordan, C.T., Wadsworth, M.P., Taatjes, D.J., de Beer, F.C., & Webb, N.R. (2007) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**, 600–606.
- 21) Karabina, S.A., Brochériou, I., Le Naour, G., Agrapart, M., Durand, H., Gelb, M., Lambeau, G., & Ninio, E. (2006) *FASEB J.*, **20**, 2547–2549.
- 22) Yamamoto, K., Isogai, Y., Sato, H., Taketomi, Y., & Murakami, M. (2011) *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 1829–1842.
- 23) Sato, H., Isogai, Y., Masuda, S., Taketomi, Y., Miki, Y., Kamei, D., Hara, S., Kobayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Ishimoto, Y., Suzuki, N., Yokota, Y., Hanasaki, K., Suzuki-Yamamoto, T., Yamamoto, K., & Murakami, M. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 11632–11648.
- 24) Zack, M., Boyanovsky, B.B., Shridas, P., Bailey, W., Forrest, K., Howatt, D.A., Gelb, M.H., de Beer, F.C., Daugherty, A., & Webb, N.R. (2010) *Atherosclerosis*, **214**, 58–64.
- 25) Shridas, P., Bailey, W.M., Gizard, F., Oslund, R.C., Gelb, M. H., Brummer, D., & Webb, N.R. (2010) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **30**, 2014–2021.
- 26) Rosenson, R.S., Hislop, C., McConnell, D., Elliott, M., Stasiv, Y., Wang, N., & Waters, D.D. (2009) *Lancet*, **373**, 649–658.
- 27) Vahlquist, A., Bygum, A., Gånemo, A., Virtanen, M., Hellström-Pigg, M., Strauss, G., Brandrup, F., & Fischer, J. (2010) *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 438–443.
- 28) Grass, D.S., Felkner, R.H., Chiang, M.-Y., Wallace, R.E., Nevalainen, T.J., Bennett, C.F., & Swanson, M.E. (1996) *J. Clin. Invest.*, **97**, 2233–2241.
- 29) Yamamoto, K., Taketomi, T., Isogai, Y., Miki, Y., Sato, H., Masuda, S., Nishito, Y., Morioka, K., Ishimoto, Y., Suzuki, N., Yokoyama, Y., Hanasaki, K., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kobayashi, T., Fukami, K., Ikeda, K., Nakanishi, H., Taguchi, R., & Murakami, M. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 11616–11631.
- 30) Sato, H., Taketomi, Y., Isogai, Y., Miki, Y., Yamamoto, K., Masuda, S., Hosono, T., Arata, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kobayashi, T., Nakanishi, H., Ikeda, K., Taguchi, R., Hara, S., Kudo, I., & Murakami, M. (2010) *J. Clin. Invest.*, **120**, 1400–1414.
- 31) Escoffier, J., Jemel, I., Tanemoto, A., Taketomi, Y., Payre, C., Coatrieux, C., Sato, H., Yamamoto, K., Masuda, S., Pernet-Gallay, K., Pierre, V., Hara, S., Murakami, M., Waard, M.D., Lambeau, G., & Arnoult, C. (2010) *J. Clin. Invest.*, **120**, 1415–1428.
- 32) Masuda, S., Murakami, M., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Arioka, M., & Kudo, I. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 23203–23214.
- 33) Labonté, E.D., Kirby, R.J., Schildmeyer, N.M., Cannon, A.M., Huggins, K.W., & Hui, D.Y. (2006) *Diabetes*, **55**, 935–941.
- 34) Labonté, E.D., Pfluger, P.T., Cash, J.G., Kuhel, D.G., Roja, J. C., Magness, D.P., Jandack, R.J., Tschöp M.H., & Hui, D.Y. (2010) *FASEB J.*, **24**, 2516–2524.
- 35) Huggins, K.W., Boileau, A.C., & Hui, D.Y. (2002) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **283**, E994–E1001.
- 36) Wilson, S.G., Adam, G., Langdown, M., Reneland, R., Braun, A., Andrew, T., Surdulescu, G.L., Norberg, M., Dudbridge, F., Reed, P.W., Sambrook, P.N., Kleyn, P.W., & Spector, T.D. (2006) *Eur. J. Hum. Genet.*, **14**, 340–348.
- 37) Hui, D.Y., Cope, M.J., Labonte, E.D., Chang, H.T., Shao, J., Goka, E., Abousalham, A., Charnot, D., & Buysee, J. (2009) *Br. J. Pharmacol.*, **157**, 1263–1269.
- 38) Boilard, E., Lai, Y., Larabee, K., Balestrieri, B., Ghomashchi, F., Fujioka, D., Gobeze, R., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Thornhill, T.S., Divangahi, M., Remold, H., Lambeau, G., Gelb, M.H., Arm, J.P., & Lee, D.M. (2010) *EMBO. Mol. Med.*, **2**, 172–187.
- 39) Balestrieri, B., Hsu, V.W., Gilbert, H., Leslie, C.C., Han, W.K., Bonventre, J.V., & Arm, J.P. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 6691–6698.
- 40) Koduri, R.S., Gronroos, J.O., Laine, V.J., Le Calvez, C., Lambeau, G., Nevalainen, T.J., & Gelb, M.H. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 5849–5857.
- 41) Weinrauch, Y., Abad, C., Liang, N.S., Lowry, S.F., & Weiss, J. (1998) *J. Clin. Invest.*, **102**, 633–638.
- 42) Balestrieri, B., Maekawa, A., Xing, W., Gelb, M.H., Katz, H. R., & Arm, J.P. (2009) *J. Immunol.*, **182**, 4891–4898.
- 43) Fujioka, D., Saito, Y., Kobayashi, T., Yano, T., Tezuka, H., Ishimoto, Y., Suzuki, N., Yokota, Y., Nakamura, T., Obata, J. E., Kanazawa, M., Kawabata, K., Hanasaki, K., & Kugiyama, K. (2008) *Circulation*, **117**, 2977–2985.
- 44) Masuda, S., Murakami, M., Ishikawa, Y., Ishii, T., & Kudo, I. (2005) *Biochim Biophys Acta*, **1736**, 200–210.
- 45) Yano, T., Fujioka, D., Saito, Y., Kobayashi, T., Nakamura, T., Obata, J.E., Kawabata, K., Watanabe, K., Watanabe, Y., Mishina, H., Tamaru, S., & Kugiyama, K. (2011) *Cardiovasc. Res.*, **90**, 335–343.
- 46) MacPhee, M., Chepenik, K.P., Liddell, R.A., Nelson, K.K., Siracusa, L.D., & Buchberg, A.M. (1995) *Cell*, **81**, 957–966.
- 47) Cormier, R.T., Hong, K.H., Halberg, R.B., Hawkins, T.L., Richardson, P., Mulherkar, R., Dove, W.F., & Lander, E.S. (1997) *Nat. Genet.*, **17**, 88–91.
- 48) Leung, S.Y., Chen, X., Chu, K.M., Yuen, S.T., Mathy, J., Ji, J., Chan, A.S., Li, R., Law, S., Troyanskaya, O.G., Tu, I.P., Wong, J., So, S., Botstein, D., Brown, P.O. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16203–16208.
- 49) Mulherkar, R., Kirtane, B.M., Ramchandani, A., Mansukhani, N.P., Kannan, S., & Naresh, K.N. (2003) *Oncogene*, **22**, 1936–1944.
- 50) Mirtti, T., Laine, V.J., Hiekkänen, H., Hurme, S., Rowe, O., Nevalainen, T.J., Kallajoki, M., & Alanen, K. (2009) *APMIS*, **117**, 151–161.
- 51) Mounier, C.M., Wendum, D., Greenspan, E., Flejou, J.F., Rosenberg, D.W., & Lambeau, G. (2008) *Br. J. Cancer*, **98**, 587–595.

- 52) Hoeft, B., Linseisen, J., Beckmann, L., Müller-Decker, K., Canzian, F., Hüsing, A., Kaaks, R., Vogel, U., Jakobsen, M.U., Overvad, K., Hansen, R.D., Knüppel, S., Boeing, H., Trichopoulou, A., Koumantaki, Y., Trichopoulos, D., Berrino, F., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Bueno-de-Mesquita, H.B., van Duijnhoven, F.J., van Gils, C.H., Peeters, P.H., Dumeaux, V., Lund, E., Huerta Castaño, J.M., Muñoz, X., Rodriguez, L., Barricarte, A., Manjer, J., Jirström, K., Van Guelpen, B., Hallmans, G., Spencer, E.A., Crowe, F.L., Khaw, K.T., Wareham, N., Morois, S., Boutron-Ruault, M.C., Clavel-Chapelon, F., Chajes, V., Jenab, M., Boffetta, P., Vineis, P., Mouw, T., Norrat, T., Riboli, E., & Nieters, A. (2010) *Carcinogenesis*, **31**, 466–472.
- 53) Murakami, M., Masuda, S., Shimbara, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., & Kudo, I. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 24987–24998.
- 54) Morgan, N.V., Westaway, S.K., Morton, J.E., Gregory, A., Gissen, P., Sonek, S., Cangul, H., Coryell, J., Canham, N., Nardocci, N., Zorzi, G., Pasha, S., Rodriguez, D., Desguerre, I., Mubaidin, A., Bertini, E., Trembath, R.C., Simonati, A., Schanen, C., Johnson, C.A., Levinson, B., Woods, C.G., Wilmot, B., Kramer, P., Gitschier, J., Maher, E.R., & Hayflick, S. J. (2006) *Nat. Genet.*, **38**, 752–754.
- 55) Fischer, J., Lefevre, C., Morava, E., Mussini, J.M., Laforet, P., Negre-Salvayre, A., Lathrop, M., & Salvayre, R. (2007) *Nat. Genet.*, **39**, 28–30.
- 56) Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L.A., Boerwinkle, E., Cohen, J.C., & Hobbs, H.H. (2008) *Nat. Genet.*, **40**, 1461–1465.
-