

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05898

研究課題名(和文) 新たな機能性脂肪酸~奇数鎖脂肪酸~の抗炎症作用機序の解明

研究課題名(英文) The odd chain fatty acids (OCFAs) is a new anti-inflammatory agent

研究代表者

伴野 勸 (Tomono, Susumu)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：60554011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,400,000円

研究成果の概要(和文)：最近、大規模疫学調査により奇数鎖脂肪酸が糖尿病を含む慢性炎症疾患と逆相関する事が報告された。しかし、長鎖奇数鎖脂肪酸(ヘプタデカン酸やペンタデカン酸)の抗炎症作用メカニズムについてはわかっていない。本研究では、長鎖奇数鎖脂肪酸がマクロファージにおいてIL-6やIL-12などの炎症性サイトカインやプロスタグランジンE2産生の阻害効果があることを見出した。また、その産生阻害メカニズムの一つとしてp65タンパク質の分解を介したNFκBシグナル抑制効果があることがわかった。現在、行われている標的タンパク質の詳細な解析によってさらなる研究の発展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病や心血管疾患、神経変性疾患およびがんに代表される生活習慣病は現在、我が国において死亡者数の約6割、医療費は約3割を占めており、今後さらに進行する高齢化社会における健康寿命の延伸への最大の阻害要因であり、国民医療費負担にも大きな影響を与えている。日々摂取する食品から、機能性成分を見出し、作用機序の解明を試みることは非常に意義のあるものであると考える。本研究で、これまで報告がほとんどなかった奇数鎖脂肪酸の抗炎症作用機序について新たな知見を得たことは生活習慣病を始めとする疾病予防に非常に意義のある研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, some large-scale epidemiological studies reported an inverse association between chronic inflammatory diseases including type 2 diabetes risk and odd-chain saturated fatty acids (OCFAs). However, the molecular mechanism by which OCFAs suppress inflammation remains unclear. In this study, we demonstrated that OCFAs (C15:0 and C17:0) regulated the production of proinflammatory cytokine and lipid mediators in macrophages. Furthermore, we found that OCFAs inhibit proinflammatory NFκB signaling through p65 degradation in macrophage. It is expected that a future research through detailed analysis of the OCFAs-target protein in progress.

研究分野：生化学

キーワード：機能性脂質 抗炎症 奇数鎖脂肪酸

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂質は生物の生体膜成分やエネルギー源、シグナル分子として多彩な役割を担っている重要な生体成分である一方で、脂肪組織やそれ以外の肝臓などの組織への脂質の異常蓄積、自律神経の失調、ホルモン、様々なシグナル伝達因子などによってひとたび脂質の代謝や産生、輸送などのバランス制御が破綻すると高脂血症や動脈硬化、糖尿病など様々な病態を引き起こすと考えられている。近年、DHA や EPA に代表される  $\omega$ -3 系多価不飽和脂肪酸とアラキドン酸に代表される  $\omega$ -6 系多価不飽和脂肪酸の血中バランスが心血管疾患リスク評価因子となることが報告され、また、それぞれの脂肪酸の生理活性に関する研究が進んでいる。

最近、2 型糖尿病のヨーロッパ多国間相互コホート研究により、長鎖奇数鎖脂肪酸 (C15:0, C17:0) を構成成分に含むリン脂質やトリアシルグリセロールの血漿中濃度と肥満・糖尿病罹患患者数が逆相関を示すことが報告された (Lancet diabetes endocrinol., 2014, 2 810-818.)。また、他の疫学研究では肥満者において生体内の炎症の指標であり、2 型糖尿病の有意な予測因子であると確認されている血清 C 反応性蛋白 (CRP) 値 (JAMA, 2001, 286, 327-334.) や肥満や糖尿病で高値を示す 15-ケト-ジヒドロプロスタグランジン F2a や 8-イソ-プロスタグランジン F2a と長鎖奇数鎖脂肪酸 (C15:0, C17:0) は逆相関しているとの報告や血中長鎖奇数鎖脂肪酸濃度が高値であるほど、炎症性サイトカインで 2 型糖尿病の予測因子でもある IL-6 の値が有意に低かったとの疫学調査結果もある (Obesity, 2011, 19, 2404-2410.)。また、我々も自己免疫疾患モデルマウスや肥満・糖尿病モデルマウスの血中長鎖奇数鎖脂肪酸、それを化学構造に含むリン脂質濃度の変化が対照群と比較して顕著に変動することを確認した。

しかし、現在までに長鎖奇数鎖脂肪酸の機能性研究はまったくといって無いに等しく、詳細な抗炎症作用機序や生活習慣病との関わりについてはほとんどわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、長鎖奇数鎖脂肪酸であるヘプタデカン酸 (C17:0)、ペンタデカン酸 (C15:0) に着目し、抗炎症作用・抗生活習慣病作用機序の解明を試みた。培養細胞またはマウス骨髄由来細胞を用いて NF $\kappa$ B や MAP kinase など炎症シグナル経路における長鎖奇数鎖脂肪酸の作用点の解明と同時に奇数鎖脂肪酸のターゲットタンパク質を見つけるために高分解能質量分析計を用いて解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 長鎖奇数鎖脂肪酸の起炎症シグナルの阻害効果の検討

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 および C57BL/6 骨髄から分化誘導したマクロファージ (BMMs) を用いて、リポポリサッカライド (LPS) 刺激による下流のシグナル伝達機構に対するヘプタデカン酸 (C17:0) およびペンタデカン酸 (C15:0) の影響について MAP kinase、NF $\kappa$ B シグナルに着目してウエスタンブロットおよび NF $\kappa$ B レポーターアッセイ、ELISA、プロスタグランジン産生量により検討を行った。

#### (2) 長鎖奇数鎖脂肪酸の標的タンパク質の網羅的解析

長鎖奇数鎖脂肪酸の生体内でのターゲット遺伝子の同定をクリックケミストリーの手法を用いて試みた。クリックケミストリーはアジドとアルキンが付加環化反応によって化学的に安定なトリアゾール環を生成することを利用して生体分子の蛍光標識や化合物の生体分子への付加反応を容易に検出することができる方法である。まず、ヘプタデカン酸 (C17:0) にアジド基 (-N<sub>3</sub>) もしくはアルキン ( ) を導入した誘導体の合成を行った。ヘプタデカン酸誘導體、LPS を RAW264.7 に添加後、一定時間培養し、サイトカイン産生抑制効果で評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 長鎖奇数鎖脂肪酸の起炎症シグナルの阻害効果の検討

長鎖奇数鎖脂肪酸の抗炎症作用機序解析を RAW264.7 および BMMs を用いて行った結果、LPS や poly(I:C)、CpG、PMA 曝露による炎症刺激時において、C15:0 や C17:0 の投与を行うと IL-6 や IL-1b、COX-2 などの炎症関連遺伝子群の発現が顕著に抑制されることがわかった。また、IL-6 の ELISA 法によるタンパク質産生量、COX-2 タンパク質発現量および COX-2 によってアラキドン酸が代謝され産生されるプロスタグランジン E<sub>2</sub> の産生量の顕著に抑制されていた (図 1)。また、NF $\kappa$ B シグナルに関しては、核内移行後の p65 の発現量が奇数鎖脂肪酸投与によって低下することが確認できた。しかし、MAP kinase 経路を調べる上で p38、ERK、Jun のリン酸化を調べたがリン酸化に対する影響は確認できなかった。奇数鎖脂肪酸の抗炎症作用には NF $\kappa$ B シグナルの阻害作用を有する可能性が示唆された。そこでさらなる詳細な奇数鎖脂肪酸の抗炎症作用機序の解明を目指して、LC/MS によるタンパク質発現量の網羅的解析を行うこととした。

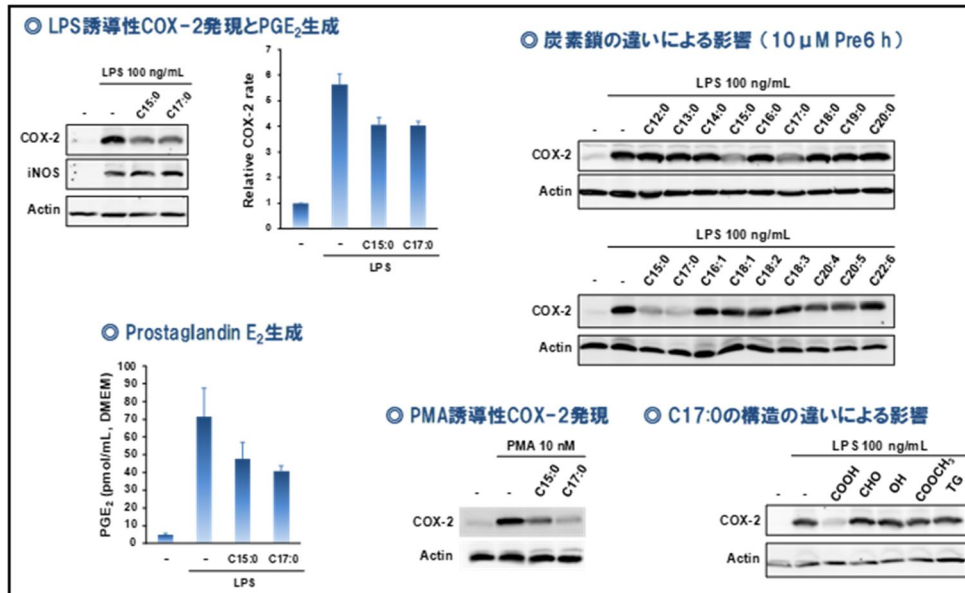


図 1. 奇数鎖脂肪酸投与が COX-2 発現および PGE<sub>2</sub> 産生に及ぼす影響

## (2) 長鎖奇数鎖脂肪酸の標的タンパク質の網羅的解析

C17:0 の抗炎症作用の化学構造の違いによる IL-6 産生および COX-2 発現量の抑制効果について調べた。脂肪酸が持つカルボキシル基 (-COOH) をアルデヒド基 (-CHO)、ヒドロキシル基 (-OH)、アセチル基 (-COCH<sub>3</sub>) に変換し、投与した後、LPS 刺激による IL-6 産生および COX-2 発現量を調べた結果、カルボキシル基のみ抑制効果を有し、その他の化学構造では、抑制効果は認められなかった (図 1)。脂肪酸のカルボキシル基はタンパク質のシステイン残基及び N 末アミノ基に対するアシル化に必要である。脂肪酸のアシル化 (パルミチン (C16:0) ミリストイル (C14:0) 化) によって修飾されたタンパク質はタンパク質の細胞内局在の変化をもたらすことによって様々なシグナル伝達に関与することが分かっている。そこで、長鎖奇数鎖脂肪酸の生体内でのターゲット遺伝子の同定をクリックケミストリーの手法を用いて試みた。クリックケミストリーで用いた脂肪酸の炭素鎖にアルキンやアジド基を導入した C17:0-誘導体は intakt の C17:0 と同様の抗炎症作用を示さず、化学構造のわずかな違いが生理活性に大きな影響を及ぼし、クリックケミストリーの手法ではターゲットタンパク質の同定は困難であることが明らかとなった。そこで、クリックケミストリーと同様にアシル化タンパク質の探索ができる Acyl biotin exchange (ABE) 法で nanoLC/TripleTOF/MS を用いて探索を行った。

その結果、600 以上の奇数鎖脂肪酸ターゲットタンパク質を同定することが出来た。奇数鎖脂肪酸のアシル化が確認できたタンパク質のうち、NF- $\kappa$ B シグナルに関与する Traf3 に着目した。Traf3 をノックダウンすると奇数鎖脂肪酸による IL-6 産生抑制効果は減弱したもののすべてをキャンセルするような関与は認められなかった。現在、その他候補タンパク質の関与について詳細に調べている。今後、さらなる詳細なメカニズムの解明を試みるとともに炭素鎖 1 の違いが機能性に及ぼす影響について調べていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kurokawa Yurie, Fujii Gen, Tomono Susumu, Miyamoto Shingo, Hamoya Takahiro, Takahashi Maiko, Narita Takumi, Komiya Masami, Kobayashi Masaki, Higami Yoshikazu, Mutoh Michihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 The Radical Scavenger NZ-419 Suppresses Intestinal Polyp Development in Apc-Mutant Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 270 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9010270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakashima Akina, Tomono Susumu, Yamazaki Tatsuya, Inui Masanori, Morita Naoko, Ichimonji Isao, Takagi Hidekazu, Nagaoka Fumiaki, Matsumoto Misako, Ito Yasuhiko, Yanagishita Takeshi, Miyake Kensuke, Watanabe Daisuke, Akashi-Takamura Sachiko	4. 巻 in press
2. 論文標題 Phospholipase A2 from bee venom increases poly(I:C)-induced activation in human keratinocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hagihara M., Kuroki Y., Ariyoshi T., Higashi S., Fukuda K., Yamashita R., Matsumoto A., Mori T., Mimura K., Yamaguchi N., Okada S., Nonogaki T., Ogawa T., Iwasaki K., Tomono S., Asai N., Koizumi Y., Oka K., Yamagishi Y., Takahashi M., Mikamo H.	4. 巻 23
2. 論文標題 Clostridium butyricum Modulates the Microbiome to Protect Intestinal Barrier Function in Mice with Antibiotic-Induced Dysbiosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100772 ~ 100772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.100772	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shimoyoshi Satomi, Takemoto Daisuke, Ono Yoshiko, Kitagawa Yoshinori, Shibata Hiroshi, Tomono Susumu, Unno Keiko, Wakabayashi Keiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Sesame Lignans Suppress Age-Related Cognitive Decline in Senescence-Accelerated Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1582 ~ 1582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu11071582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatsuya Yamazaki, Masanori Inui, Keiko Hiemori, Susumu Tomono, Makoto Itoh, Isao Ichimonji, Akina Nakashima, Hidekazu Takagi, Kumi Izawa, Jiro Kitaura, Teruko Imai, Nobuo Sugiura, Hiroaki Tateno, and Sachiko Akashi-Takamura	4. 巻 294
2. 論文標題 Receptor-destroying enzyme (RDE) from <i>Vibrio cholerae</i> modulates IgE activity and reduces the initiation of anaphylaxis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6659-6669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.006375.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伴野勤、長岡史晃、一文字功、山崎達也、乾匡範、高木秀和、伊藤誠、高村祥子
2. 発表標題 Ceramide phosphoethanolamineによるArginase-1発現誘導
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Susumu Tomono, Tatsuya Yamazaki, Masanori Inui, Sachiko Akashi-Takamura.
2. 発表標題 Ceramide phosphoethanolamine, a sphingomyelin analog prevents NO production in bone marrow-derived macrophages
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島昭奈、伴野勤、山崎達也、森田奈央子、一文字功、高木秀和、長岡史晃、松本美佐子、乾匡範、柳下武士、渡辺大輔、高村祥子
2. 発表標題 ハチ毒由来のPhospholipase A2 (PLA2) はヒト角化細胞でのPoly(I:C) 活性化を増強させる
3. 学会等名 第24回エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamazaki T, Inui M, Tomono S, Ichimonji I, Izawa K, Kitaura J, Akashi-Takamura S.
2. 発表標題 IgE glycosylation is important for the binding to mast cells and allergy induction.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakashima A, Tomono S, Yamazaki T, Morita N, Ichimonji I, Takagi H, Nagaoka H, Matsumoto M, Inui M, Yanagishita T, Watanabe D, Akashi-Takamura S.
2. 発表標題 Phospholipase A2 from Honey Bee Venom increases the Poly(I:C)-induced activation in Human Keratinocytes.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伴野勸、山地太樹、岩崎基、成島大智、加藤護、戸塚ゆ加里、三好規之、大島寛史、今井俊夫
2. 発表標題 新規発がんリスクマーカー探索のための網羅的活性カルボニル化合物解析
3. 学会等名 がん予防学術集会2016名古屋
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tomono, S., Yamaji, T., Iwasaki, M., Narushima, D., Kato, M., Totsuka, Y., Miyoshi, N., Imai, T.
2. 発表標題 Plasma level of cis-4-decenal is a possible risk marker for susceptibility to colorectal cancer
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----