

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15197

研究課題名(和文)新規ストレスメディエーター12-HETEのシグナル伝達メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the signaling mechanism of the novel stress mediator 12-HETE

研究代表者

七里 元督 (SHICHIRI, Mototada)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：20434780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス負荷によってマウス血中で12-HETEが増加し、12-HETEが逃避衝動の亢進を誘導することを見出していた。しかしながらストレス負荷後の脳組織では12-HETEが増加しておらず、血中で増加した12-HETEが脳にシグナルを伝達する経路が不明であった。本研究計画では末梢神経に発現する12-HETEレセプターを介し、脳にシグナルを伝達するという仮説を立てた。12-HETEレセプター阻害剤をマウスに前投与しストレスを負荷したところ、逃避衝動の亢進を抑制できた。また、脳内モノアミンを測定したところ、12-HETEはストレスに伴うノルアドレナリンの放出に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We had founded that 12-HETE, 12-lipoxygenase metabolite of arachidonic acid, specifically increased in mouse plasma after stress load. And, we also demonstrated that 12-HETE induces the escape behavior. However, 12-HETE did not increase in mouse brain tissue after stress load, the signal pathway by which 12-HETE increased in plasma transmits to the brain was unclear. In this study, we hypothesized that 12-HETE signal are transmitted to the brain via the 12-HETE receptor expressed in peripheral nerves. We found out that the inhibitor of 12-HETE receptor could suppress the escape behavior and 12-HETE is involved in stress-induced release of noradrenaline in brain tissue. These results suggested that 12-HETE is a novel stress pathway different from the already known pathway.

研究分野：酸化ストレス

キーワード：ストレス 脂質酸化物 脳内モノアミン

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はマウスにストレスを负荷（水浸拘束 ストレス性胃潰瘍モデル）するとマウスの血液中で脂質酸化物が増加するが、アラキドン酸酸化物（12-HETE）が他の脂質酸化物に比べ著著に増加することを見出していた。12-HETE のみが著著に増加することに着目し、12-HETE を生成する酵素である脂質酸化酵素 12-リポキシゲナーゼ（12-LOX）が欠損したマウスに同负荷を行ったところ、ストレスによる 12-HETE の増加が抑制されること、またマクロファージ内の 12-LOX の局在水浸拘束によって細胞質から膜に移行することを発見した。以上により、ストレスによる 12-HETE の増加は 12-LOX による酵素的酸化反応を介することを突き止めていた。さらに、ストレスにおける 12-HETE の生理的意義を解析するためにストレス负荷後に尾懸垂試験（ストレス環境からの逃避衝動の評価）を行った。水浸拘束後に野生型マウスでは逃避衝動が亢進していたが、12-LOX 欠損マウスでは逃避衝動が亢進していなかった。また、水浸拘束後の 12-LOX マウスに 12-HETE を尾静脈投与すると逃避衝動が亢進した。これらの結果からストレス環境からの逃避衝動に 12-HETE が関与することを示唆する。しかしながら、水浸拘束後の脳組織では 12-HETE は増加していなかった。この結果は 12-HETE が直接脳にシグナルを伝達し逃避衝動を惹起するのではなく、間接的なシグナル伝達経路（血液から脳へのストレスシグナル伝達経路）が存在する可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

本研究計画では、12-HETE が逃避衝動を惹起する機構・中枢神経へのシグナル伝達機構を解明することを目的とする。12-HETE を介したストレス応答経路は、ストレス学説で提唱される視床下部-下垂体-副腎（HPA 軸）を介する経路、自律神経を介する応答経路とは異なる新規ストレス応答経路となる。

12-HETE の脳へのシグナル伝達・逃避衝動惹起メカニズムを解析する上で、末梢感覚神経に発現する 12-HETE レセプターに着目した（J Biol Chem 279; 20283-95: 2004）。そこで「ストレスによって血中に増加した 12-HETE が、末梢感覚神経の 12-HETE レセプターを刺激することで、脳にフィードバックし、逃避衝動を惹起する」という仮説を立て、本研究計画で実証を行うこととした。

3. 研究の方法

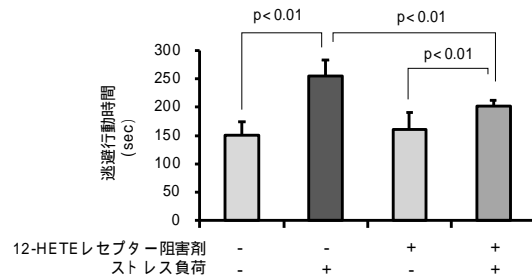
12-HETE レセプター阻害剤を前投与し、水浸拘束负荷を実施し 1) 尾懸垂試験にて逃避行動時間の測定、2) 脳内モノアミン含有量の解析を行った。

脳内モノアミンは大脳皮質、視床下部等に脳組織を細分化し、ノルアドレナリン（NA）、ノルアドレナリン代謝物（MHPG: 3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニルエチレンジグリコー

ル）、セロトニン、セロトニン代謝産物、ドーパミン、ドーパミン代謝産物を HPLC-ECD（高速液体クロマトグラフィー 電気化学検出器）を用いて測定した。

4. 研究成果

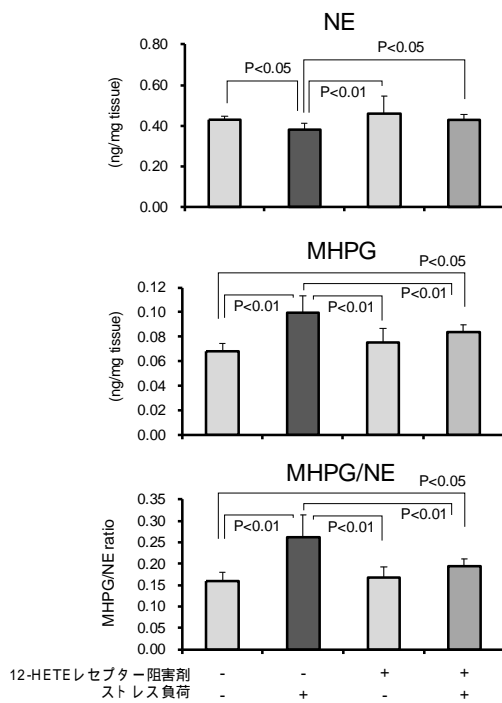
12-HETE レセプター阻害剤の前投与のタイミングや投与量の条件検討を行った後、ストレス负荷後（水浸拘束後）の尾懸垂試験での逃避行動時間を測定したところ、12-HETE レセプター阻害剤によって逃避衝動が抑制されることが明らかとなった（図 1）。



【図 1】 12-HETEレセプター阻害剤がストレス後の逃避行動に与える影響

ストレス负荷によってノルアドレナリン（NA）が神経末端から放出された後モノアミン酸化酵素によって MHPG に代謝されることが知られており、MHPG の増加は神経末端での NA 放出を示すと考えられる。野生型マウスでは水浸拘束後に MHPG/NA 比が増加し、脳内で NA 放出が増加していることを確認している。また、NA 放出は水浸拘束した 12-LOX 欠損マウスでは認められず、水浸拘束後に 12-HETE を投与すると NA 放出は増加した。この結果は、12-HETE がストレスによる脳内 NA 放出に関与することを示唆し、また、脳内 MHPG/NA 比の測定が本研究計画に有用である事を示す。

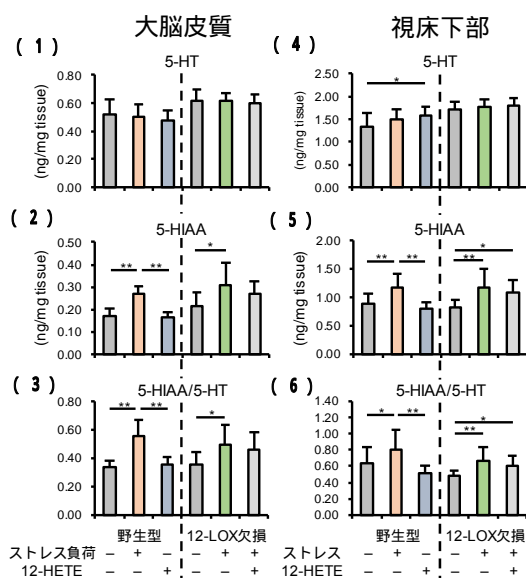
そこで、本研究計画では、上述の 12-HETE レセプター阻害剤投与後にストレス负荷を行ったマウスの脳のサンプルより大脳灰白質の NA、MHPG 含有量を測定した。結果、大脳皮質内の NA 含有量はストレス负荷によって減少すること（図 2 上）、MHPG 含有量はストレス负荷によって増加し（図 2 中）、MHPG/NE 比も増加すること（図 2 下）が確認された。さらに、ストレス负荷によって増加する大脳皮質内 MHPG 含有量増加は 12-HETE レセプター阻害剤の前投与によって抑制されることを見出した（図 2 中、下）。脳内 MHPG の増加は神経末端からの NA の放出が増加していることを意味しており、脳内 MHPG の減少は神経の活性化が抑制されていることを示す。以上の結果は、ストレスによって血中で増加するアラキドン酸酸化物 12-HETE がレセプターを介して脳内 NA の放出を誘導するという機構が存在する可能性を示唆する。



【図2】12-HETEレセプター阻害剤が大脳皮質内ノルアドレナリン (NA) ノルアドレナリン代謝産物 (MHPG) に与える影響

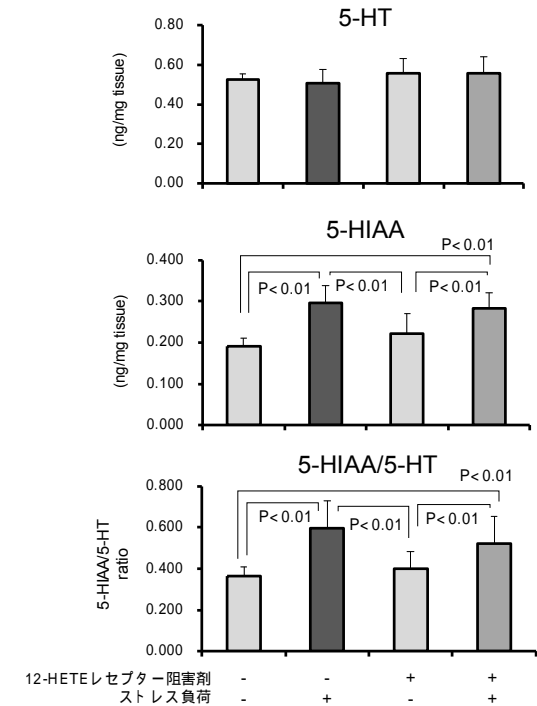
NAはストレス時に増加し、不安や恐怖を誘発するが、セロトンは不安感を緩和する作用を有することが知られている。そこで、2016年度はNAに着目して解析していたが、2017年度はストレス負荷後のマウスの大脳皮質と視床下部のセロトニン(5-HT)およびセロトニン代謝物(5-HIAA)を解析した。MHPGと同様に5-HIAAはシナプス末端からのセロトニンの放出を示す。

その結果、ストレス負荷によって大脳皮質内の5-HT含有量は変化せず(図3(1))、5-HIAA含有量はストレスによって増加し(図



【図3】ストレス負荷による大脳皮質・視床下部のセロトニン(5-HT)およびセロトニン代謝物(5-HIAA)含有量の変化と12-HETEの関連

3(2))、5-HIAA/5-HT比も増加した(図3(3))。一方、ストレス負荷でも12-HETEが生成されない12-LOX欠損マウスにおいても5-HIAAの含有量および5-HIAA/5-HT比は増加していた(図3(2)(3))。この傾向はセロトニン含有濃度の高い視床下部でも同様の傾向であった(図3(4)(5)(6))。また、12-HETEレセプター阻害剤はセロトニンの分泌に影響しないことも分かった(図4)



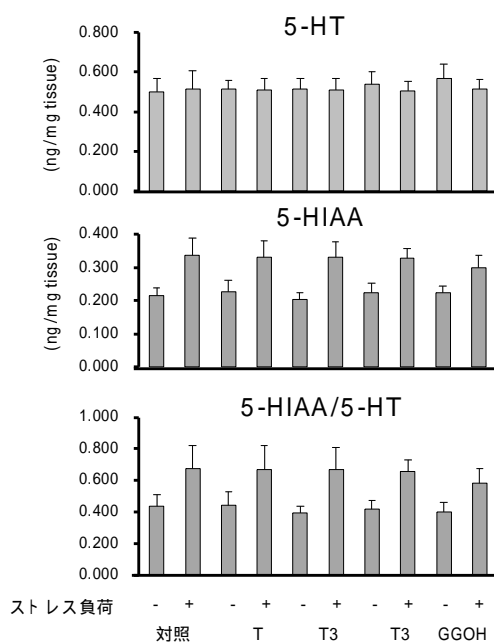
【図4】12-HETEレセプター阻害剤が大脳皮質内セロトニン(5-HT)セロトニン代謝物(5-HIAA)に与える影響

以上の結果は、確かにストレス負荷によって大脳皮質および視床下部のシナプス末端よりセロトニンが放出されていることを示すが、12-HETEはセロトニンの放出には関与していないことを示している。

また、以前の検討で、12-LOX阻害活性を持つトコトリエノール類縁化合物をマウスに前投与した後、ストレス負荷を実施すると、ストレスに伴う12-HETEの生成は抑制され、逃避衝動の亢進も抑制されることを見出していた。脳内のNA系の含有量を測定したところ、ストレス負荷に伴うMHPGの増加がトコトリエノール類縁化合物で抑制されることを確認し、特許の出願を行っている。

そこで、本計画では上述と同様にセロトニン系に関しての測定を実施した。

-トコフェロール(T)、-トコトリエノール(T3)、-トコトリエノール(T3)、ゲラニルゲラニオール(GGOH)を餌に混ぜてマウスに投与したが、いずれの化合物においてもストレスに伴うセロトニンの放出を有意に抑制していなかった(図5)



【図5】ストレス負荷による大脳皮質・視床下部のセロトニン(5-HT)およびセロトニン代謝物(5-HIAA)含有量の変化とトコトリエンール類縁化合物の効果

ストレスによって活性化された 12-リボキシゲナーゼによって生成される 12-HETE は 12-HETE レセプターを刺激することで脳にストレスシグナルを伝達し、脳組織(大脳皮質や視床下部)でノルアドレナリンの放出が亢進し、その結果としてマウスは逃避行動が増加することになったことが推察され、我々の提唱する新規ストレス伝達経路に関する重要な知見を得ることができた。

以上の結果のうち一部は、現在論文を作成済みであり、投稿を進めているが、現時点では受理に至っていない。今後も継続して投稿を進め、受理された際には報告する予定である。

本研究に関連する産業財産権

1) 名称: 脂質酸化生成物の測定によるストレス、疲労の客観的評価方法

発明者: 七里元督

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特許第 6112510 号

出願年月日: 平成 25 年 4 月 9 日

取得年月日: 平成 29 年 3 月 24 日

国内外の別: 国内

2) 名称: ストレスに起因する精神症状の予防または緩和用の食品または医薬組成物

発明者: 七里元督、青木由典、小池泰介

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所、エーザイフード・ケミカル株式会社

種類: 特許

番号: 特開 2017-131185

出願年月日: 平成 28 年 1 月 29 日

公開年月日: 平成 29 年 8 月 3 日

国内外の別: 国内

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)

〔学会発表〕(計 5 件)

(招待講演) The lipid peroxidation biomarkers for detection of diseases, 七里元督 (登壇), International Conference on Trends in Biochemical & Biomedical Research: Advances and Challenges, インド バラナシー、2018 年 2 月 14 日

ストレスによって血中で増加する脂質酸化物とその生理的意義 - ビタミン E 類の抗ストレス効果 -、七里元督 (登壇) 第 28 回ビタミン E 研究会、東京、東洋大学白山キャンパス、2017 年 1 月 21 日

ストレスによる酵素活性化によって増加する脂質酸化物と行動学的生理的意義、七里元督 (登壇) 第 69 回日本酸化ストレス学会、宮城県仙台市、2016 年 8 月 31 日

ストレスによる脂質酵素活性化を介して増加する脂質酸化物とその行動学的生理的意義、七里元督 (登壇) 日本ビタミン学会第 70 回大会、大阪、2018 年 6 月 23 日 (予定)

ストレスによる脂質酵素活性化を介して増加する脂質酸化物とその行動学的生理的意義、七里元督 (登壇) 第 359 回脂溶性ビタミン総合研究委員会、大阪、2018 年 6 月 21 日 (予定)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

七里元督 (SHICHIRI, Mototada)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号: 20434780