

令和元年6月6日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19188

研究課題名(和文)可溶性エポキシド加水分解酵素(sEH)の糖尿病における機能と発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of biological functions and transcriptional regulation of soluble epoxide hydrolase (sEH) in diabetes

研究代表者

大黒 亜美 (Oguro, Ami)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：20634497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：可溶性エポキシド加水分解酵素(sEH)の基質であるアラキドン酸やDHAのエポキシ体は、糖尿病モデルラットにおいて抗酸化因子を増加させる作用や、また新たな生理作用としてTRPV4を介した神経細胞への突起伸長促進作用などを持つことを見出した。これらのエポキシ体の作用はsEH阻害剤によって増強された。糖尿病モデルマウスではsEH発現量は転写レベルで減少しており、その機構として酸化ストレス下においてSp1の核内移行が促進され、転写を正に制御するAP2と競合してsEH遺伝子上流に結合することで転写を負に制御していること、さらにNF- κ BもsEH遺伝子発現を負に制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、サプリメントとしても販売されているアラキドン酸やDHAなどの不飽和脂肪酸は、生活習慣病の予防や脳機能増進に効果的であると期待されているが、その作用機序は十分には明らかとなっていない。本研究ではCYP2Cにより産生されるこれらのエポキシ体が様々な作用を持つことを明らかにし、sEH阻害剤がその作用を増強できることを見出した。sEH阻害剤は、現在アラキドン酸エポキシドの抗炎症作用を増大させるとして慢性閉塞肺疾患の薬として臨床試験の段階まで開発が進んでおり、特に本研究で新たに見出したエポキシ体の神経細胞への作用は今後脳機能への作用を解明することで、sEH阻害剤の有効性が広がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that substrates of soluble epoxide hydrolase (sEH), arachidonic acid- or DHA-epoxides, have physiological actions such as regulation of anti-oxidant gene expression in diabetic rat, and promotion of neurite outgrowth of rat fetal hippocampus via TRPV4 channel. These actions of epoxides were augmented by sEH inhibitor. We found that sEH transcriptional levels were suppressed in diabetes. Diabetes-induced oxidative stress promoted nuclear translocation of transcriptional factor, Sp1, and it negatively regulated sEH gene expression by binding to upstream of sEH gene via competition with the binding of AP2. NF- κ B was also involved in the suppression of sEH gene expression.

研究分野：ストレス応答 脂質代謝

キーワード：可溶性エポキシド加水分解酵素 アラキドン酸 DHA チトクロームP450

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不飽和脂肪酸は様々な生理作用が期待されており、特にアラキドン酸やドコサヘキサエン酸(DHA)は糖尿病などの生活習慣病や神経変性疾患に対する効果が期待され、サプリメントとしての販売も行われている。これら不飽和脂肪酸については直接的な効果も報告されているが、生体内における代謝産物の作用が重要ではないかと考えられている。我々はこれまで不飽和脂肪酸のチトクローム P450(P450)による代謝物の作用に着目してきた。この代謝系は、シクロオキシゲナーゼやリポキシゲナーゼによる代謝経路に次ぐ第3の経路として知られているが、その代謝産物の生理活性はまだ不明な部分が多い。アラキドン酸は、P450によって水酸化体とエポキシ体が生成されるが、特にエポキシ体であるエポキシエイコサトリエン酸(EET)は、血圧低下作用や抗炎症作用などを持ち、生活習慣病などの疾患において有効ではないかと期待されている。また ω -3 不飽和脂肪酸である DHA や EPA も P450 によってエポキシ体が産生されることが明らかとなっているが、その生理作用はまだ十分には明らかとなっていない。これらのエポキシ体は、可溶性エポキシド加水分解酵素(sEH)によって迅速に、そのジオール体へと代謝される。sEH は薬物代謝酵素として知られていたが、生体内においてこれらの不飽和脂肪酸の代謝に関わることが明らかとなり、その生理機能解析の重要性が高まっている。さらに、我々は、sEH が生体内の脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸(LPA)を脱リン酸化する活性をエポキシド加水分解活性とは独立して有することを見出している。このように sEH の活性や発現量は不飽和脂肪酸エポキシドや LPA の生理活性制御に重要であり、これまでに sEH 発現が糖尿病など酸化ストレスにより抑制されることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、sEH がアラキドン酸や DHA などのエポキシ体や LPA の作用を介して、糖尿病などの生活習慣病にどのように関わっているかを明らかにすることを目的とした。まずアラキドン酸や DHA のエポキシ体の合成に関わる P450 について、どの P450 分子種がアラキドン酸や DHA のどのエポキシ体を効率的に産生するのかについて検討した。またこれらのエポキシ体の糖尿病における作用や、新たな生理活性の探索を神経細胞を用いて行った。また sEH 発現量が酸化ストレスによりどのように調節されているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

アラキドン酸や DHA の代謝活性については、12 種類の精製ラット P450 タンパク質を用いて質量分析装置である UPLC(Waters)-NanoFrontier LD (Hitachi)により解析した。また sEH の糖尿病における機能解析においては、型糖尿病モデルラットである Goto-Kakizaki (GK)ラット 7 週齢雄において、DHA(10mg/kg/day)、または DHA と sEH の阻害剤である TPPU (0.3mg/kg/day)を共に摂取させることで検討した。

4. 研究成果

(1)P450 によるアラキドン酸及び DHA のエポキシ体の生成の検討
アラキドン酸は P450 により水酸化体及びエポキシ体へと変換される。そこでまず、どの P450 分子種によりどの水酸化体(HETE)、エポキシ体(EET)が産生されるかを明らかにするため、12 種類のラット P450 を用いてアラキドン酸の反応代謝物を LC-MS を用いて定量した。その結果、CYP1A2、2A1、2B1、2C11、2C13、2C23、2E1、4A2 及び 4F1 は効率的に HETEs 及び EETs を産生した。CYP1A2 は 5-, 9-, 11-, 12-, 15-, 16-, 18-, 19-HETE を産生したが、特に 16-HETE を多く産生した。また CYP2A1、2B1、2C13、2C23 は 5-, 8-, 9-, 11-, 12-, 15-, 16-HETE の産生に関わり、特に CYP2C13 は 16-HETE を多く産生した。また CYP2C23 及び 2E1 は効率的に ω -1 水酸化体である 19-HETE を産生した。一方で CYP4A2 及び 4F1 は脂肪酸の ω -水酸化酵素として知られているが、 ω -水酸化体である 20-HETE の産生に加えて CYP4A2 は 5- and 15- HETE、CYP4F1 もその他の HETE の産生にも関与することが示された。一方で EET の産生においては、CYP1A1、1A2、2A1、2B1、2C11、2C13、2C23、2D1 は 4 種類の EET 産生に関わり、特に CYP2C13 は 14、15-EET を、また 11、12-EET は CYP2C23 を効率的に産生することが示された。また DHA の P450 代謝物についてもアラキドン酸と同様に LC-MS を用いて同定した。

(2)sEH の糖尿病における役割の検討

ドコサヘキサエン酸(DHA)などの ω -3 不飽和脂肪酸の摂取は、肥満レベルの低下や、血圧を抑制することで糖尿病の予防に有効であるとされている。また近年では、糖尿病は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の発症リスクを増加させることが示されており、DHA がこれらの疾患の予防や症状の緩和に重要であるとの報告もある。しかしその作用機序は不明な点が多い。本研究ではこれら DHA の作用について、DHA エポキシ体の作用が重要ではないかと考え、糖尿病モデルラットを用いて sEH 阻害剤と DHA を併用して投与することでその効果を検討した。GK ラット 7 週齢雄において、DHA、または DHA と sEH の阻害剤である TPPU を共に摂取させ 13 週齢まで各週の体重及び血糖値を測定した。またグルコース負荷試験による血糖値やインスリン量の変化を定量した。その結果、DHA 投与群では DHA 投与期間が長くなるほど、非投与群に比べて、体重増加の割合が抑制された。また空腹時血糖値は、DHA 投与群で非投与群に比べて減少していた。しかしこれらの効果について、sEH 阻害剤との併用による有意な効

果は見られなかった。従って、これらの作用について DHA の関与は示唆されるが、DHA エポキシ体は関与しない可能性がある。またグルコース負荷試験においては、Wistar ラットに比べて GK ラットではグルコース負荷後の血糖値の顕著な上昇がみられたが、DHA 及び sEH 阻害剤の顕著な効果は見られなかった。一方、13 週齢における GK ラットの脳における酸化ストレス応答因子 Nrf2 の発現量は Wistar ラットに比べて減少しており、GK ラットに DHA 及び sEH 阻害剤を併用して摂取させた群においては、Nrf2 発現量は非投与群の GK ラットに比べて増加していた。また脳内の炎症性サイトカイン IL-1 の mRNA 量が、GK ラットでは Wistar ラットに比べて増加しており、この増加は DHA 及び sEH 阻害剤の摂取により抑制される傾向がみられた。Nrf2 は酸化ストレスや炎症を抑制することで神経細胞の保護作用を示し、Nrf2 活性化は神経障害疾患にも有効であるとの報告がある。DHA エポキシ体の合成に重要な CYP2C23 の発現も脳で確認できたことから、DHA エポキシ体は、脳において Nrf2 を増加させる作用が示唆され、今後そのメカニズム解明と、実際に糖尿病における脳機能への影響を検討したい。

(3) sEH の EET 代謝を介した神経細胞における機能解析

本研究ではアラキドン酸、及びその P450 代謝物の神経細胞における作用を検討するため、神経細胞のモデルとしてラット副腎髄質由来褐色細胞種である PC12 細胞を用いた。アラキドン酸はこれまで神経細胞の増殖やシナプス形成に関わることが報告されており、本研究の結果においてもアラキドン酸は神経成長因子(NGF)によって誘導される細胞の突起伸長形成を促進することが示された(図 1A)。またアラキドン酸のエポキシ体である 11,12-EET 及び 14,15-EET も突起伸長を促進し、14,15-EET は濃度 100 nM において同濃度のアラキドン酸の効果よりも強い突起伸長促進作用を持つことが示された(図 1A)。一方で EET の加水分解産物である DHET はこれらの作用を示さなかった。またアラキドン酸の水酸化体である 19-HETE 及び 20-HETE も突起伸長作用を示し、特に 20-HETE は 14,15-EET と同等の効果を示した(図 1D)。これらの飽和脂肪酸酸化体の作用は NGF 非存在下では確認されなかった。これらの結果は、神経細胞の突起伸長においてアラキドン酸よりもその酸化体の方が強い促進作用を持つことを示している。

次に PC12 細胞の突起伸長を強く促進する 14,15-EET 及び 20-HETE 産生に関与する P450 が実際に PC12 細胞に発現しているかを検討した。その結果、PC12 細胞には 14,15-EET 産生に関与する CYP2C11、2C13、及び 2C23 が発現していることが示され、一方で 20-HETE 産生に関与する CYP4A2 の発現は見られなかった(図 2A)。そこで CYP2C の活性を低濃度で阻害するケトコナゾールを PC12 細胞に添加したところ、アラキドン酸による細胞の突起伸長促進作用が抑制されることが示された(図 2B)。ケトコナゾールにより実際に CYP2C11、2C13、2C23 による 14,15-EET 産生が阻害されていることは LC-MS を用いて確認した(図 2D-F)。また EET の加水分解酵素である可溶性エポキシド加水分解酵素(sEH)の阻害剤である N,N-dicyclohexylurea (DCU)は細胞の突起伸長を促進させることが示された(図 2C)。これらの結果より、アラキドン酸による突起伸長促進作用において 14,15-EET を産生する P450 活性が重要であることが示された。

EET の特異的な受容体はまだ同定されていないが、14,15-EET は血管内皮細胞においてカチオンイオンチャンネルである TRPV1 及び TRPV4 を活性化することが報告されている。TRPV4 は、脊髄性筋萎縮症などの遺伝性神経障害患者において TRPV4 のミスセンス変異が明らかになっており、神経細胞の正常な機能に重要であることが報告されている。実際に PC12 細胞に TRPV4 が発現しており、TRPV4 の活性化は神経突起形成を促進することも報告されている。そこで、14,15-EET による突起伸長促進作用における TRP の関与を検討した。その結果、TRP の非選択的阻害剤であるルテニウム

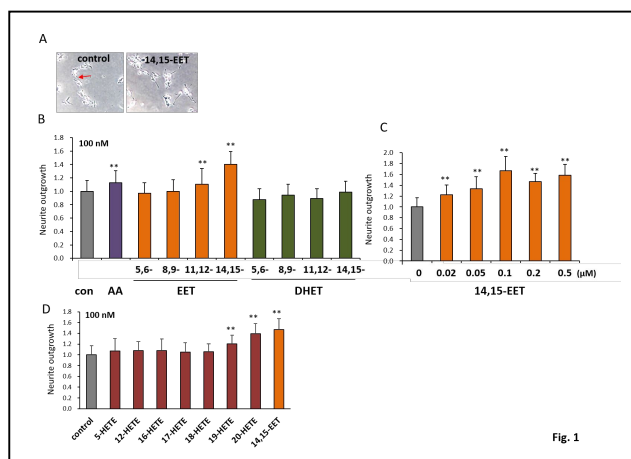


Fig. 1

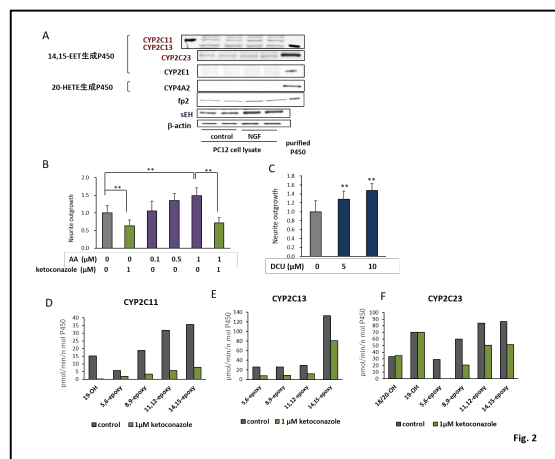


Fig. 2

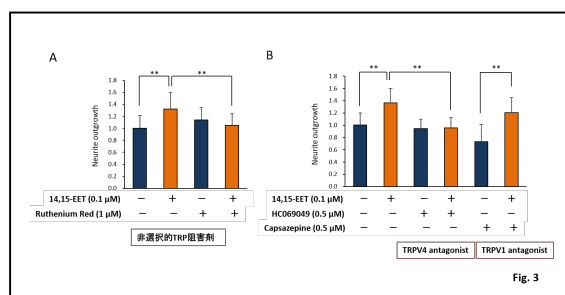
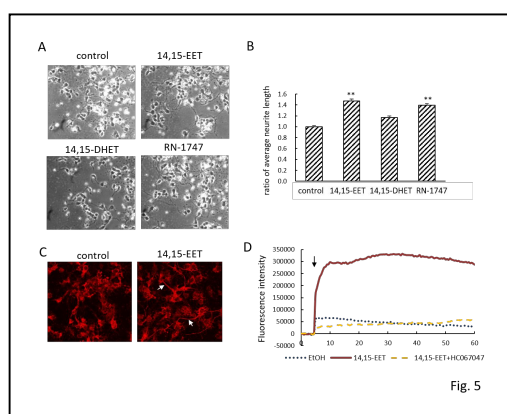
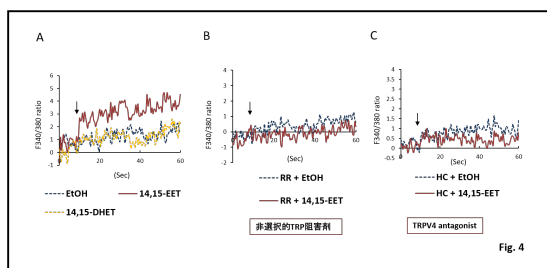


Fig. 3

レッドは、14,15-EET における突起伸長促進を抑制した (図 3A)。さらに TRPV1 の阻害剤であるカプサイシンは 14,15-EET の作用に影響を与えない一方で、TRPV4 の阻害剤 HC069049 は 14,15-EET の作用を抑制した (図 3B)。また蛍光試薬である Fura-2AM を用いて TRPV4 を介した細胞内カルシウムイオンの流入を測定した結果、14,15-EET は PC12 細胞のカルシウムイオンの流入を促進することが明らかとなり (図 4A)。これらの作用もルテニウムレッドや HC069049 によって抑制された (図 4B、C)。従って 14,15-EET は TRPV4 を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させることで PC12 細胞の突起伸長促進作用を示していることが示唆された。またこれらの作用は、ラット海馬由来の神経細胞においても同様の効果が見られ、14,15-EET により軸索伸長の促進や TRPV4 を介したカルシウムイオンの流入が見られた (図 5)。



(4)sEH の酸化ストレスによる発現抑制機構の検討

sEH の発現量は、様々な病態によって変化することが報告されているが、その発現調節機構は明らかとなっていない。我々はこれまでに糖尿病モデルマウスの血管や腎臓において sEH の発現量が減少することを見出し、この減少は高グルコースに起因する酸化ストレスによるものであることを明らかにしている。sEH の遺伝子上流には多数の Sp1 認識配列があり、通常 Sp1 は転写促進に働くが、sEH 遺伝子上流においては、Sp1 が結合することで sEH 遺伝子発現を抑制していることを、レポーターアッセイを用いて明らかにした。その機構として、Sp1 認識配列に結合し転写促進に働く AP2 の結合と競合するためであることを ChIP アッセイ及び DNA affinity precipitation アッセイにより明らかにした。さらに sEH 遺伝子上流には NF- κ B 結合配列もいくつか存在しており、NF- κ B 不活性化剤や p65 の過剰発現によりレポーターアッセイを用いて検討した結果、NF- κ B は sEH 遺伝子発現を負に制御していることを明らかにした。また様々な長さの sEH 遺伝子上流域を用いることにより NF- κ B による制御に重要な領域を決定した。これらの結果より、Sp1 は酸化ストレスにより核内移行が促進されることを明らかにしており、NF- κ B も酸化ストレスにより活性化される因子であることから、酸化ストレスによる sEH 発現低下は、これらの因子を介した制御であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Oguro A, Inoue T, Kudoh SN and Imaoka S. 14,15-epoxyeicosatrienoic acid produced by cytochrome P450s enhances neurite outgrowth of PC12 and rat hippocampal neuronal cells. *Pharmacology Research & Perspectives*, 6(5):e00428 2018 (査読有)

Nakamura M, Yamanaka H, Oguro A, and Imaoka S, Bisphenol A induces Nrf2-dependent drug-metabolizing enzymes through nitrosylation of Keap1, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 33(4):194-202. 2018 (査読有)

Kobayashi Y, Oguro A, Imaoka S, "Bisphenol A and Its Derivatives Induce Degradation of HIF-1 α via the Lysosomal Pathway in Human Hepatocarcinoma Cell Line, Hep3B" *Biol. Pharm. Bull.* 41(3):374-382. 2018 (査読有)

Siswanto FM, Oguro A, and Imaoka S, Chlorogenic acid modulates hypoxia response of Hep3B cells, *Personalized Medicine Universe*, 6, 12-16, 2017 (査読有)

[学会発表](計 20 件)

大黒亜美 井上巧 工藤卓 今岡進

アラキドン酸及び DHA のエポキシ体が神経細胞の機能に及ぼす効果の検討 第 41 回日本分子生物学会年会 2018

中村 美里, 大黒 亜美, 今岡 進 低酸素下における Nrf2 及びその制御因子の発現解析 第 45 回日本毒性学会学術年会 2018

杉谷 篤志, 大黒 亜美, 今岡 進 ビスフェノール A による Nrf2 活性化メカニズムの検討 第 45 回日本毒性学会学術年会 2018

中村 美里, 大黒 亜美, 今岡 進 低酸素下における p62 発現低下のメカニズムの検討 第

41 回日本分子生物学会年会 2018

杉谷 篤志、Ferbian Milas Siswanto、大黒 亜美、今岡 進 BPA 及び CGA による SKN-1(Nrf2 ホモログ)依存的な寿命の調節メカニズムの検討 第 41 回日本分子生物学会年会 2018

大黒亜美、今岡進「アラキドン酸エポキシド(EET)の神経細胞における生理作用解析」第 59 回 日本脂質生化学会 2017

大黒亜美、山中秀剛、小林之乃、今岡進 「環境化学物質ビスフェノール A による Nrf2 活性化機構の解析」 第 44 回日本毒性学会学術年会 2017

Devi Ayu, Lestari, Yukino Kobayashi, Ami Oguro, and Susumu Imaoka “ Bisphenol A is a villain or a hero: It suppresses VEGF expression in Hep3B cells and Erp29 binds to it ” The 23rd international Congress of Personalized Medicine 2017

大黒亜美、今岡進 「チトクローム P450 によるアラキドン酸代謝物の神経細胞における生理機能解析」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017

中村美里、小林之乃、大黒亜美、今岡進「Siah2 及び p62 による Nrf2 発現調節機構の検討」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017

Ferbian Siswanto, Ami Oguro, Susumu Imaoka “ Induction of Nrf2 by Chlorogenic acid in Hep3B cells and elongation of lifespan of Caenorhabditis elegans by induction of SKN-1(Nrf2 homolog) ” 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017

北山晃嗣、大黒亜美、今岡進「HIF-1 及び IKK に対する PHD アイソフォームの活性の違いについて」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017

大黒亜美、八木英里奈、小林之乃、今岡進 第 43 回日本毒性学会学術年会「ビスフェノール A によるニトロシル化を介した脳神経系への影響解析」2016

大黒亜美、今岡進 内外環境応答・代謝酵素研究会「アラキドン酸及びドコサヘキサエン酸代謝における P450 及びエポキシド加水分解酵素の生理機能解析」2016

大黒亜美、Endang R. Purba、今岡進「可溶性エポキシド加水分解酵素(sEH)の遺伝子多型がアラキドン酸エポキシド及び、リゾホスファチジン酸の代謝に与える影響の検討」第 2 回国際個別化医療学会 2016

Ferbian Milas Siswanto, Ami Oguro, Susumu Imaoka CHLOROGENIC ACID MODULATES HYPOXIC RESPONSE OF HEP3B CELLS AND PROLONGS THE LIFESPAN OF Caenorhabditis elegans 第 22 回 国際個別化医療学会学術集会 2016

大黒亜美、今岡進「チトクローム P450 及び可溶性エポキシド加水分解酵素によるアラキドン酸代謝産物の生理機能解析」第 39 回 日本分子生物学会年会 2016

布施江璃奈、三浦玲奈、大黒亜美、今岡進「低酸素がエクソソーム分泌に与える影響の検討」第 39 回 日本分子生物学会年会 2016

中村美里、小林之乃、大黒亜美、今岡進「低酸素状態における Nrf2 の制御」第 39 回 日本分子生物学会年会 2016

小林之乃、大黒亜美、今岡進「酸化還元による低酸素感受性因子 HIF-1α の転写活性制御機構の検討」第 39 回 日本分子生物学会年会 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：今岡 進

ローマ字氏名：Imaoka Susumu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。