

令和元年5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18364

研究課題名(和文) 3脂肪酸の機能性発現に関わる代謝経路についての網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the metabolic pathway involved in the biological function of omega-3 fatty acids

研究代表者

石原 知明 (Ishihara, Tomoaki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：90724013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：EPAなどの3脂肪酸は、酵素的に代謝されることにより抗炎症効果を発揮する。我々はこれまでに、EPA由来の代謝物である17,18-EpETEが炎症反応を抑制する事を見出しているが、この代謝物の内因性の生理学的役割は未だ不明である。そこで、この代謝物を生成する酵素を同定するために、試験管内でスクリーニングを行ったところ、110種類の脂肪酸代謝酵素のうち、5種類のシトクロムP450(Cyp)が17,18-EpETEを産生した。次に、Cyp欠損マウスを用いた解析を行い、生体内においてもCypが3脂肪酸の代謝に寄与する事、及びそこから生成する機能性代謝物が組織恒常性の維持に関与する事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症反応は癌やアルツハイマー病の病態において重要な役割を果たしていると考えられている。また、近年の医療費増加は先進国において大きな問題になっているため、医療用医薬品に頼らない方法、特に食品(特定保健用食品や機能性表示食品)による疾患予防に大きな注目が集まっている。すなわち、本研究は長い間不明であった3脂肪酸による炎症抑制機序の全体像を明らかにする技術基盤となる研究であるとともに、3脂肪酸食による疾病予防エビデンスを提供する社会的にも大変意義のある研究であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), including eicosapentaenoic acid (EPA), display a wide range of beneficial effects mediated through converting into bioactive lipid mediators by fatty acid oxygenases. It is reported that 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid (17,18-EpETE), an epoxide form of EPA, has anti-inflammatory bioactivity against various inflammatory models. However, its metabolic pathway and its endogenous function in vivo remains unknown. In this study, we conducted a comprehensive analysis of murine fatty acid oxygenases to form 17,18-EpETE and revealed that five cytochrome P450 (Cyp) isoforms converted EPA into 17,18-EpETE. Next, we analyzed Cyp-deficient mice, and suggested not only that this Cyp is involved in omega-3 fatty acid metabolism, but also that bioactive metabolites produced by this enzyme may contribute to maintain tissue homeostasis in vivo.

研究分野：生物系薬学、脂質生物学

キーワード：3脂肪酸 脂肪酸代謝酵素 活性代謝物 シトクロムP450 生体恒常性 EPA 17,18-EpETE

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

分子中に二重結合を複数含む多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) は、生体内で酵素的に酸化代謝されることにより生理活性を獲得し、脂質メディエーターとして作用する。 $\omega 6$ 系 PUFA であるアラキドン酸は炎症性の脂質メディエーターに変換され、炎症反応を惹起することが知られている。一方、様々な疫学研究や臨床研究の結果から、 $\omega 3$ 系 PUFA は様々な病態に対して抗炎症的に作用することが報告されてきたが、その作用機序は不明であった。近年の質量分析器の発展により、生体内に存在する微量な生理活性物質の検出が可能になってきた。申請者らのグループではこれまでに、高速液体クロマトグラフィー・タンデムマスマスペクトロメトリー (LC-MS/MS) を用いたメタボローム解析システムを独自に構築し、脂肪酸由来の代謝物を包括的かつ定量的に捉えることを可能にしている。この解析システムを用いることで、代表的な $\omega 3$ 系 PUFA であるエイコタペンタエン酸 (EPA) の $\omega 3$ 位のエポキシ化代謝物である 17,18-epoxyicosatetraenoic acid (17,18-EpETE) が炎症時に誘導されること、および外因性に投与した 17,18-EpETE が抗炎症活性を示すことを見出した。しかしながら、生体内におけるこの活性代謝物の産生経路は不明であったため、 $\omega 3$ 系 PUFA の抗炎症機能性発現機構におけるこの代謝物の役割は不明であった。

2. 研究の目的

内因性に産生される脂肪酸代謝物の生理学的役割を明らかにするためには、まずその産生を触媒する代謝酵素を明らかにし、その酵素の欠損マウスを用いることが有効である。そこで、本研究において研究代表者らはまず、マウスのゲノム上に含まれるすべての脂肪酸代謝酵素を包括した cDNA ライブラリーを作成し、17,18-EpETE をはじめとする $\omega 3$ 脂肪酸由来の活性代謝物産生における役割を包括的に解析した。その結果をもとに、代謝酵素遺伝子欠損マウスを用いて生体内における代謝物の役割を解析することにより、 $\omega 3$ 脂肪酸による抗炎症作用機構の全体像解明へと繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) EPA から 17,18-EpETE を産生する脂肪酸代謝酵素の同定

マウスゲノムに存在するシクロオキシゲナーゼ (Cox, 2種)、リポキシゲナーゼ (Lox, 8種)、チトクロム P450 (Cyp, 101種) を pCAGGS ベクターに組み込んだ cDNA ライブラリーを作成した。cDNA ライブラリーはヒト胎児腎細胞 (HEK293) に一過性に過剰発現させた。その後、基質である EPA を処理し、1時間後に氷冷したメタノールを添加し、上清を回収した。回収した培養上清から C18 スピнкаラムを用いて固相抽出を行い、脂肪酸代謝物を精製した。三連四重極型 LC-MS/MS を用いた多重反応モニタリングにより脂肪酸代謝物の一斉定量分析を行った。

(2) 同定した酵素の遺伝子欠損マウスを用いた解析

サイトカインや疾患マーカーなどの遺伝子発現は、特異的プライマーを用いた定量 PCR により解析した。遺伝子改変マウスの解析には、H&E 染色による組織学的解析、臓器から調製した細胞懸濁液を用いたフローサイトメトリー、LC-MS/MS による脂肪酸代謝物の測定を行った。

4. 研究成果

(1) EPA から 17,18-EpETE を産生する脂肪酸代謝酵素の同定

マウス脂肪酸代謝酵素 cDNA ライブラリーをそれぞれ HEK293 細胞に一過性に過剰発現させた後に、基質である EPA を処理し、脂肪酸代謝物を LC-MS/MS により測定した。その結果、5種類の Cyp が EPA から 17,18-EpETE を産生することを見出した。興味深いことに、それぞれの Cyp は異なる酸化位置選択性や立体選択性を持つことが明らかとなった。さらに、17,18-EpETE のみにとどまらず、脂肪酸代謝酵素を介して生成される EPA 代謝物を包括的に捉えることができたことにより、EPA 代謝マップを描くことに成功した (Isobe *et. al.*, Scientific Reports. (2018) 8: 7954)。

(2) 同定した酵素の遺伝子欠損マウスを用いた解析

同定した Cyp のマウス個体における発現臓器・細胞をデータベース (BioGPS (<http://biogps.org/#goto=welcoming>) や Immugen (<https://www.immgen.org>)) により検索したところ、4つの Cyp とは異なり B 細胞、好中球、樹状細胞などの免疫細胞やリンパ節、脾臓などのリンパ組織に特徴的に発現する Cyp に着目し、その遺伝子欠損マウスを調製した。

調製した Cyp 欠損マウスからリンパ節を採取し、C18 陰イオン交換カラムを用いてリンパ節中の脂肪酸代謝物を抽出し、LC-MS/MS を用いて脂肪酸代謝物の解析を行った。その結果、17,18-EpETE やその二次代謝物が、野生型マウスと比較して Cyp 欠損マウスで顕著に減少した。この結果から、Cyp4f18 は試験管内と同様に、生体内においても $\omega 3$ 系 PUFA の $\omega 3$ 位の二重結合をエポキシ化していることが示唆された。

興味深いことに、Cyp 欠損マウスは時間の経過に伴い皮膚炎様症状 (表皮の肥厚及び真皮へ

の炎症性細胞浸潤)を呈することが組織学的解析により明らかになった。皮膚組織の炎症反応は主に皮膚の所属リンパ節で制御されることから、腋窩・鼠径リンパ節を両マウスで比較した。その結果、皮膚炎様症状と同様に、野生型マウスに比べて Cyp 欠損マウスのリンパ節は時間依存的に徐々に肥大が認められた。皮膚組織を酵素により消化し、細胞懸濁液を調製したのちにフローサイトメトリーを用いて IL-17 発現を細胞内染色により解析した。その結果、Cyp 欠損マウスの皮膚組織においては、IL-17 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が Cyp 欠損マウスの皮膚組織で顕著に増加することがわかった。一方、IL-17 陽性 CD4⁺ T 細胞 (Th17) には変化は認められなかった。さらに、Cyp 欠損マウスのリンパ節においては、*IL-17* mRNA 発現 (定量 PCR) 及び IL-17 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞 (フローサイトメトリー) が野生型マウスに比べて顕著に上昇することがわかった。以上の結果から、Cyp 欠損マウスでは乾癬様の皮膚炎が自然発症することが示唆された。

T 細胞における IL-17 産生は、活性化した樹状細胞より放出される IL-23 により制御されることが知られている。実際に、乾癬の病態においても IL-23/IL-17 axis が役割を果たしていることが知られており、その中和抗体は臨床的な効果が認められている。そこで、骨髄由来樹状細胞を両マウスから調製し、リポポリサッカライド (LPS) 刺激後のサイトカイン発現を比較した。その結果、野生型マウスに比べて Cyp 欠損マウス由来の樹状細胞では、LPS 刺激に依存した *IL-23* mRNA 発現量の有意な増加が認められた。

以上の結果から、Cyp は生体内においても ω 3 系 PUFA の代謝に寄与すること、及びそこから産生された機能性代謝物が IL-23/IL-17 axis を制御することにより、皮膚組織の恒常性を制御する可能性が示唆された。

本研究は、脂肪酸代謝バランスの質的变化の是正により皮膚組織の恒常性が保たれることを示唆するものであり、食生活による皮膚疾病の予防や治療のエビデンスとなることが期待される。さらに、機能性代謝物の作用点は新たな創薬標的となりうることから、将来的には皮膚疾患に対する新規治療薬開発にも応用可能な研究であると考えている。

また、本研究は長い間不明であった ω 3 脂肪酸による炎症抑制機序の全体像を明らかにする技術基盤となる研究であるとともに、 ω 3 脂肪酸食による疾病予防エビデンスを提供する社会的にも大変意義のある研究であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① [Ishihara T](#), Yoshida M, Arita M. Omega-3 fatty acid-derived mediators that control inflammation and tissue homeostasis. *Int Immunol.* (査読有) 印刷中. doi: 10.1093/intimm/dxz001.
- ② [Isobe Y](#), [Kawashima Y](#), [Ishihara T](#), [Watanabe K](#), [Ohara O](#), [Arita M](#). Identification of Protein Targets of 12/15-Lipoxygenase-Derived Lipid Electrophiles in Mouse Peritoneal Macrophages Using Omega-Alkynyl Fatty Acid. *ACS Chem Biol.* (査読有) 13(4). 2018. 887-893. doi: 10.1021/acscchembio.7b01092.
- ③ 吉田美桜, 磯部洋輔, [石原 知明](#), 有田誠. ω 3 脂肪酸由来脂質メディエーターと炎症制御. *細胞.* (査読有) 50. 2018. 8-12.
- ④ [石原 知明](#), 磯部 洋輔, 有田 誠. ω 3 脂肪酸の代謝と抗炎症作用. *ビタミン.* (査読有) 91. 2017. 537-541. doi: <https://doi.org/10.4010/jln.26.27>

[学会発表] (計 4 件)

- ① [Tomoaki Ishihara](#). Protective role of omega-3 fatty acid oxygenase in skin homeostasis. Annual Meeting of Aging Project 2018 . 2018.
- ② [石原 知明](#), 吉田 美桜, 板垣 舞, 磯部 洋輔, 有田 誠. ω 3 脂肪酸オキシゲナーゼの皮膚恒常性における役割. 第 4 回新学術領域「リボクオリティ」班会議. 2018.
- ③ [石原 知明](#), 磯部 洋輔, 吉田 美桜, 板垣 舞, 有田 誠. 皮膚の組織恒常性における脂肪酸代謝系の関与. 第 42 回日本医用マスメクトル学会年会. 2017
- ④ [Tomoaki Ishihara](#). Emerging roles of fatty acid metabolism in tissue homeostasis and aging. Young researchers workshop Integrated life science research to challenge super aging society. 2017

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

分担なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：有田 誠、池田 和貴

ローマ字氏名：(Makoto Arita, Kazutaka Ikeda)

※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。