

令和元年9月9日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26750362

研究課題名(和文) 抗炎症化合物SMTP-7の脂肪肝改善作用におけるsEHとERストレスの寄与の検討

研究課題名(英文) Investigation of the role of sEH and ER stress in SMTP-7-mediated improvement of fatty liver diseases

研究代表者

鈴木 絵里子 (Suzuki, Eriko)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00468513

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)：マウスへのSMTP長期投与実験の結果、SMTPがsEHKOマウスと共通して、IL-6による制御を介した複数の遺伝子発現を上方調節することが明らかになった。我々は次に、アドレナリン受容体を介した交感神経作動による炎症制御機構に着目した。結果、アドレナリン受容体刺激はin vivoでSMTP-7による血中IL-6産生を相乗的に増加させ、 β 2アドレナリン受容体(B2AR)antagonistによってのみ、SMTPによるIL-6産生の抑制を認めた。即ち、B2ARの下流の経路が、SMTP-7/sEH阻害を介してIL-6の下流で抗炎症活性をもたらす機序に共通したものであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題において遂行した、微生物由来生理活性物質SMTPによる抗炎症活性の機序解明が、現在脳梗塞治療薬として臨床開発段階にあるSMTP同族体の薬効を説明する上で非常に重要な意義を持つことは明らかであり、今後、より詳細な分子機序に迫るための展望が見出せた。

研究成果の概要(英文)：Our DNA microarray data derived from SMTP-treated mice and sEH KO mice, there was a striking similarity regarding the gene expression pattern. Those includes Lcn2 and Saa, which are all upregulated under IL-6 signaling. We therefore focused on sympathetic nerve system leading to IL-6 signaling, determined whether AR activation enhances SMTP-mediated IL-6 secretion in vivo. As a result, SMTP-induced IL-6 secretion was synergistically enhanced by alpha and beta AR agonist. Interestingly, only beta2 AR antagonist effectively inhibited SMTP-induced IL-6 secretion, suggesting that beta2 AR downstream signaling is involved in SMTP/sEH inhibition-mediated anti-inflammatory action in vivo.

研究分野：細胞生物学

キーワード：抗炎症 IL-6 生理活性物質

1. 研究開始当初の背景

真菌 *Stachybotrys microspora* 由来の生理活性物質 SMTP は、線溶促進活性と抗炎症活性とを併せ持ち、当研究室にて保有する N 側鎖構造の異なる約 60 種類の同族体の内の一つは、現在脳梗塞を対象に臨床第二相試験が進行中である。近年我々は、SMTP の優れた抗炎症活性の主要メカニズムとして、炎症関連酵素 soluble epoxide hydrolase (sEH) 阻害を明らかにした。sEH は、C 末端に脂質エポキシドヒドロラーゼ活性 (C-EH)、N 末端に脂質リン酸ホスファターゼ活性 (NPhos) を有する 2 機能酵素であり、両者は互いにアロステリックに影響し合う。C-EH の生体内基質である epoxyeicosatrienoic acid (EET) は、sEH により不活性な diol である DHET へと代謝を受けるため、EH 活性の阻害は EET の持つ有益な生理作用の発現に繋がる。一方で、N 末端の P 活性の生体内の基質は、リゾホスファチジン酸およびファルネシルモノリン酸を含むコレステロール生合成経路の中間体である。P 活性は脂質代謝やコレステロールの生合成に寄与することが示唆されている。NASH の病態においては、しばしば局所の炎症を伴うが、このような脂肪肝に付随した炎症状態では、unfold タンパク質による細胞内ストレス、続く小胞体(ER)ストレスが炎症の悪化や肝臓の脂肪変性に密接に関与することが明らかになってきた。また、高脂肪食誘発肥満モデルマウスの肝臓および脂肪組織においては、sEH 発現の上方調節が認められている。しかしながら、SMTP による脂肪肝の抑制に、sEH の EH 活性阻害を介した抗炎症作用や P 活性阻害を介した脂質代謝制御が関与しているのか、また ER ストレスの寄与については未解明であった。

2. 研究の目的

本邦における肥満や高脂血症、脂肪肝といった所謂メタボリックシンドロームは人々の健康的な生活を脅かす深刻な問題である。非アルコール性脂肪肝(NASH)の病態では、肝臓の脂肪変性に伴う局所炎症の際、組織での ER ストレス応答や炎症関連酵素である可溶性エポキシドヒドロラーゼ(sEH)の関与が示唆されている。しかしこの詳細な機序は不明であった。我々が発見した微生物由来低分子化合物 SMTP-7 には sEH の阻害による抗炎症活性と、肥満マウスモデルでの脂肪肝改善効果が認められている。本研究課題においては、SMTP を用い、肝臓脂肪変性を含む脂質代謝異常における ER ストレス応答と sEH の寄与を明らかにし、病態改善に繋がる分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

野生型マウス(C57BL/6、)および sEH KO

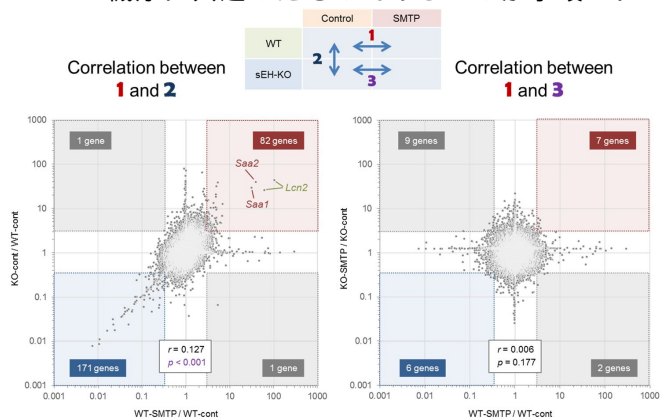
マウスに、SMTP-7(10 mg/kg) および生理食塩水を週 3 回腹腔内投与し、体温・体重測定を行った。投与開始から 180 日後にマウスを解剖、肝臓・白色脂肪組織、褐色脂肪組織を採取した。肝臓より Folch 法により脂質を抽出し、トリグリセリド等、脂質代謝関連パラメーター解析に供した。採取した血液は、血中遊離脂肪酸、血中コレステロール、トリグリセリド、グルコースの定量に用いた。肝臓より RNA を抽出し、遺伝子発現変動解析のため、DNA microarray(Agilent technology に委託、SurePring G3 Mouse GE 8x60K v2 Microarray)を行った。

4. 研究成果

本研究より、野生型マウスへの SMTP-7 の投与により血中遊離脂肪酸および肝臓中トリグリセリドといった中性脂肪の減少が見られた。これまでに、ob/ob マウスにおいて SMTP-7 投与により、血中遊離脂肪酸の減少および肝臓中の脂肪酸合成の第一ステップである acetyl-CoA carboxylase (ACC) および脂肪酸合成の大半を触媒する fatty acid synthase (FAS) の発現低下が認められており、これを支持する結果が得られたと考えられる。

また、非常に興味深いことに、マウスへの SMTP 長期投与後、肝臓における遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイにより解析したところ、SMTP 投与が sEHKO マウスと共通した機序で遺伝子発現誘導を行うことが示された(図 1)。共通して顕著な発現上昇を認めた遺伝子の非階層クラスター解析の結果、共通するメカニズムとして IL-6 の下流で制御を受けること、概日リズムに関与する遺伝子が発現上昇することが挙げられた。特に、遺伝子発現変動解析において、sEHKO マウスと SMTP 投与マウスとで共通して 100 倍以上の大きな発現増加を認めた *Lcn2*、*Saa* はいずれも IL-6 の下流で発現調節を受けることが報告されており、炎症に際して発現誘導される急性期応答遺伝子である一方で、炎症を鎮静化することに貢献することも近年報告されている。マウスへの SMTP の単回投与によっても、肝臓における *Lcn2* の発現上昇が確認された(図 2)。一方で、近年、神経系の交感神経作動が免疫細胞の動態を制御し、炎症制御を担うことが明らかになっているが、これには炎症誘導タンパク質の発現を相乗的に誘導する機構“IL-6 アンブ”が密接に関わる。そこで次に、アドレナリン受容体を介した交感神経作動による炎症制御機構に着目した。SMTP 投与による IL-6 産生に対するアドレナリン受容体(α , β AR)の各種 agonist, antagonist による影響を検討したところ、SMTP-7 投与により誘導される血中 IL-6 産生はいずれの受容体サブタイプの agonist によっても促進されたが、 β 2 AR antagonist によってものみ、SMTP による IL-6 産生の抑制を認めた。即ち、

β2 AR の下流の経路が、SMTP-7/sEH 阻害を介して IL-6 の下流で抗炎症活性をもたらす機序に共通したものであることが示唆され



On-target and off-target analyses → *Saa* and *Lcn2* can be on-target response markers

た。

図 1. SMTP 投与による遺伝子変動パターンと Wt/sEH KO の比較における遺伝子発現変動パターンとの比較

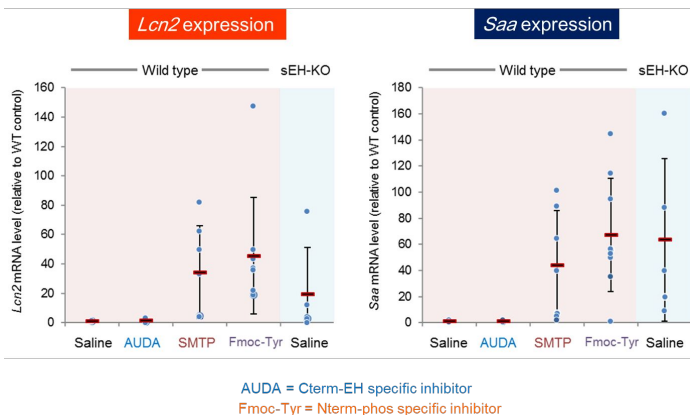


図 2. 野生型マウスへの SMTP、sEH 阻害剤の単回投与および sEH 欠損による *Lcn2*, *Saa* 発現への影響

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)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- Otake S, Ogawa N, Kitano Y, Hasumi K, Suzuki E. (corresponding author) Isoprene side-chain of SMTP is essential for soluble epoxide hydrolase inhibition and cellular localization. *Nat Prod Commun*. 2016; **11**: 223-228. (査読有)
- Matsumoto N, Suzuki E, Tsujihara K, Nishimura Y, Hasumi K. Structure-activity relationships of the plasminogen modulator SMTP with respect to the inhibition of soluble epoxide hydrolase. *J Antibiot*. 2015; **68**: 685-690. (査読有)
- Matsumoto N, Suzuki E (joint first author), Ishikawa M, Shirafuji T, Hasumi K. Soluble epoxide hydrolase as

an anti-inflammatory target of the thrombolytic stroke drug SMTP-7. *J Biol Chem*. 2014; **289**: 35826-35838. (査読有)

- Koyanagi K, Narasaki R, Yamamichi S, Suzuki E, Hasumi K. Mechanism of the action of SMTP-7, a novel small-molecule modulator of plasminogen activation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2014; **25**: 316-321. (査読有)
- Sawada H, Nishimura N, Suzuki E, Zhuang J, Hasegawa K, Takamatsu H, Honda K, Hasumi K. SMTP-7, a novel small-molecule thrombolytic for ischemic stroke: a study in rodents and primates. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014; **34**: 235-241. (査読有)

〔学会発表〕(計 16 件)

- 廣寄響、田島真梨絵、悴田正浩、阿部純己、鈴木絵里子、蓮見恵司. 可溶性エポキシドヒドロラーゼ N 末端 phosphatase の生体内基質探索および機能解析、第 90 回日本生化学会 2017/12/08
- Suzuki E. Nterm-phosphatase of soluble epoxide hydrolase (sEH) in the regulation of inflammation, International exchange meeting at Lingnan Normal University, 2017/11/24
- Suzuki E, Kunikiyo Y, Matsumoto N, Sawada H, Nishimura N, Hasegawa K, Hasumi K. Nterm-phosphatase of soluble epoxide hydrolase (sEH) in the regulation of vascular endothelial inflammation, 60th International Society of Thrombosis and Haemostasis, 2017/07/12
- Amemiya Y, Mutoh J, Suzuki E, Hasumi K. HABP2 (PHBP/FSAP) is the major plasma protease that promote extracellular histone degradation, 60th International Society of Thrombosis and Haemostasis, 2017/07/12
- 鈴木絵里子、廣寄響、田島真梨絵、悴田正浩、阿部純己、蓮見恵司. 血管内皮炎症制御における可溶性エポキシドヒドロラーゼ N 末端 phosphatase の機能の解析、日本血栓止血学会、2017/06/10
- 雨宮優子、武藤純太、鈴木絵里子、蓮見恵司、細胞外ヒストンの分解に関する血漿プロテアーゼ HABP2 の制御物質の探索、日本血栓止血学会、2017/06/10
- Suzuki E, Kunikiyo Y, Matsumoto N, Sawada H, Nishimura N, Hasegawa K, Hasumi K. Pharmacological rationale of the action of SMTP, a novel anti-inflammatory thrombolytic for ischemic stroke, 10th World Stroke Congress, 2016/10/28
- Hasumi K, Nishimura N, Hasegawa K, Sawada H, Suzuki E, Honda K, Tominaga T,

- Niizuma K, Wakabayashi Y, Moritoyo T, Yamazaki T. The first-in-human phase I study of TMS-007, a member of the anti-inflammatory small-molecule thrombolytic SMTP, 10th World Stroke Congress, 2016/10/28
9. Suzuki E, Kunikiyo Y, Matsumoto N, Sawada H, Nishimura N, Hasegawa K, Hasumi K. Evaluation of the in vivo action of SMTP-7, a novel small-molecule anti-inflammatory thrombolytic for ischemic stroke, International Congress on Fibrinolysis & Proteolysis, 2016/10
 10. Hasumi K, Nishimura N, Hasegawa K, Sawada H, Suzuki E. Nonclinical development and the first-in-human phase I study of TMS-007, a member of the anti-inflammatory small-molecule thrombolytic SMTP, International Society for Fibrinolysis & Proteolysis, 2016/10
 11. 鈴木絵里子、国清悠大、松本直欣、長谷川啓子、西村直子、蓮見恵司、サル心原性脳梗塞モデルにおける抗炎症性血栓溶解薬 SMTP-7 および t-PA の作用機序の相違、第 38 回日本血栓止血学会、2016/06
 12. Suzuki E, Kunikiyo Y, Matsumoto N, Sawada H, Nishimura N, Hasegawa K, Hasumi K. SMTP-7, a profibrinolytic and anti-inflammatory small molecule, in the treatment of embolic stroke in comparison to t-PA. 5th International Conference on Neurology & Epidemiology, 2015/11
 13. 鈴木 絵里子、Soluble epoxide hydrolase as an anti-inflammatory target of the thrombolytic stroke drug SMTP, 第 37 回日本血栓止血学会、2015/06
 14. Suzuki E, Kunikiyo Y, Matsumoto N, Sawada H, Nishimura N, Hasegawa K, Hasumi K. Evaluation of the therapeutic effect of novel stroke drug SMTP-7 on embolic stroke in monkeys. 59th International Society of Thrombosis and Haemostasis, 2015/06/16
 15. Hasumi K, Nishimura N, Hasegawa K, Sawada H, Suzuki E. Non clinical and clinical development of TMS-007, a member of the anti-inflammatory small-molecule thrombolytic, 59th International Society of Thrombosis and Haemostasis, 2015/06/16
 16. 蓮見 恵司、西村 直子、長谷川 啓子、澤田 裕伸、鈴木 絵里子、新規脳梗塞治療薬 SMTP の非臨床および臨床開発、日本農芸化学会、2015/03/27
 17. 鈴木 絵里子、松本 直欣、蓮見 恵司、新規脳梗塞治療薬 SMTP の抗炎症作用機序の解析、日本農芸化学会、2015/03/27
 18. Hasumi K, Koyanagi K, Narasaki R, Suzuki E. Mechanism of the action of SMTP-7, a novel small-molecule modulator of

plasminogen activation, that is under development as a drug for stroke treatment, 22nd International Society for Fibrinolysis & Proteolysis, 2014/07

〔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：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

東京農工大学発「脳梗塞を治療する新薬候補」の臨床第 相試験を開始
http://www.tuat.ac.jp/outline/disclosure/pressrelease/2018/20180608_01.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 絵里子 (Suzuki Eriko)
 東京農工大学・大学院農学研究院・助教
 研究者番号：00468513

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

蓮見 恵司 (Hasumi Keiji)
 東京農工大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：20208474