

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850135

研究課題名(和文)8-水酸化エイコサペンタエン酸(8-HEPE)の生理作用と代謝経路の解明

研究課題名(英文)Bioactivity of 8-hydroxyeicosapentaenoic acid (8-HEPE) and 8-HEPE metabolisms.

研究代表者

山田 秀俊(Yamada, Hidetoshi)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：70511955

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)：我々は、ツノナシオキアミから新たなPPAR活性化物質として8-ヒドロキシエイコサペンタエン酸(8-HEPE)を同定した。8-HEPEはEPAよりも高いPPAR活性化作用を有していることから、肥満やメタボリックシンドロームに対する予防・改善作用が期待される。本研究では、1)水産物中の8-HEPE含有量、2)哺乳細胞における8-HEPE代謝、3)PPAR活性化を介した8-HEPEの生理作用について検討した。

8-HEPEは甲殻類特有の成分であり、PPARの活性化することで、脂質分解促進、脂肪細胞成熟、グルコース取り込み促進、血漿および肝臓の中性脂肪抑制に働くことが示された。

研究成果の概要(英文)：We identified 8-Hydroxyeicosapentaenoic acid (8-HEPE) as new PPAR ligand using with luciferase reporter assay from pacific krill. 8-HEPE has a greater affinity for PPAR activation than EPA; it is possible that 8-HEPE might be of value in the treatment of obesity and metabolic syndrome. In this study, we examined 1) 8-HEPE content of marine products, 2) metabolism of 8-HEPE in human and mouse cells, 3) bioactivity of 8-HEPE via PPAR activation in vitro and in vivo.

Our results indicated that 8-HEPE was a characteristic compound of the crustacea. And we demonstrated that 8-HEPE induced fatty acid beta-oxidation, adipogenesis and glucose uptake in vitro. Furthermore, the mice experiences, we demonstrated that 8-HEPE has a larger positive effect on metabolic syndrome than EPA and that 8-HEPE acts by inducing PPARalpha activation in the liver.

研究分野：天然物化学

キーワード：8-HEPE オキアミ PPAR 肥満

1. 研究開始当初の背景

必須栄養素である脂質は、主要なエネルギー源や細胞膜の構成成分、ホルモン等の生理活性物質として機能する恒常性維持分子である。他方、過剰蓄積は肥満症を引き起こし、糖尿病や心血管障害、がんなど様々な疾患の原因となることから、健康維持には脂質の摂取と合成、分解のバランスが重要である。過剰に摂取された脂質は主に脂肪組織に運ばれるが、それらの分解を制御するのがPPARである。核内受容体であるPPARは、不飽和脂肪酸や脂肪酸代謝物をリガンドとして認識し、脂質代謝に関わる遺伝子群の発現を増強することで、脂質分解、アディポネクチン産生、糖の取り込みを促進させる。即ち、PPARのリガンド依存的な活性化は、肥満を代表とする脂質異常の予防・治療の鍵となっている。

これまでに、ツノナシオキアミに脂質蓄積を抑制する作用があり、本作用はPPARの活性化を介していることを明らかにした。また、先行研究として、PPARリガンド活性を指標に活性物質の単離・同定を行い、8位水酸化EPA(8-HEPE)が活性物質であることを見いだしている。8-HEPEはEPAを上回るPPARリガンド活性を示すことから8-HEPEは、より効果的な脂質異常症の予防・改善薬としての活用が期待できる。しかしながら、8-HEPEの生理作用に関する報告は非常に少なく、代謝経路に関する先行研究も殆ど存在しない。さらにツノナシオキアミ以外の水産資源における8-HEPE含有量も現状不明である。

2. 研究の目的

- 1) 水産資源中の8-HEPE含有量
 - 2) 哺乳動物における8-HEPE代謝
 - 3) 8-HEPEの生理活性
- を明らかにすることを目的に研究に取り組んだ

3. 研究の方法

8-HEPEの抽出

試料に10倍量(w/v)のMeOHを添加し、室温で2時間抽出した。抽出の際には内部標準として1 μ Mリシノール酸を添加した。マウス血清サンプルは抽出後MonoSpinC18(GLサイエンス)を用いて濃縮した。

8-HEPEの分析

8-HEPEの分析は質量分析装置LC/Q-TOFMS(アジレントテクノロジー)で行った。カラムはInertSustainC18カラム(GLサイエンス)を用い、移動層A液には純水+0.1%ギ酸溶液を、移動層Bにはアセトニトリル+0.1%ギ酸溶液を使用した。8-HEPEの分離は開始時の移動層A:Bの割合55:45で開始し、A:B(5:95)までグラジエント25分でB液の割合を増加させることで分離した。質量装置はネガティブイオンモードで検出を行った。

細胞培養

マウス脂肪前駆細胞株(3T3-F442A)、マウス線維芽細胞株(NIH-3T3)、マウス筋芽細胞株(C2C12)、ラット肝臓細胞株(FaO)、ヒト肝臓ガン細胞株(HepG2)は10%牛胎児血清(FCS)およびペニシリン・ストレプトマイシンを添加したDMEM培地で培養した。

動物試験

試験にはC57BL/6J系統のオスマウス(日本チャールズリバー)を用いた。1匹ずつ個別のケージに入れ、室温23 $^{\circ}$ C、12時間の明暗サイクルで飼育した。動物試験は岩手生物工学研究センター・動物倫理委員会の承認を受け(ARC-2014-01)適正に行った。高脂肪食はチャールズリバーのHFD-60(タンパク質18.2%カロリー、脂質62.2%カロリー、炭水化物19.6%カロリー)(合計506kcal/kg)を用いた。試験マウス27匹をHFDで7週間飼育したのちに、HFD摂取群、HFD with EPA(10mg/kg)摂取群、HFD with 8-HEPE(10mg/kg)

の3群（各群9匹）に分け、餌は自由摂取で4週間飼育した。トリグリセリドはトリグリセリドEテストワコー（Wako）を、コレステロールはコレステロールEテストワコー（Wako）、グルコースはグルコースC2ワコー（Wako）を、トランスアミラーゼはトランスアミラーゼC2ワコー（Wako）を用いて測定した。

4. 研究成果

1) 水産資源中の 8-HEPE 含有量

水産物中の 8-HEPE を定量した。定量結果は表1の通り。8-HEPE はツノナシオキアミ、南極オキアミ、アカエビ、クルマエビ、ミネフジツボに含有される化合物であり、甲殻類に特有の化合物であることがわかった。

生物種	8-HEPE (mg/100g)
イワシ	検出されず
サンマ	検出されず
アジ	検出されず
サバ	検出されず
チカ	検出されず
マガレイ	検出されず
ツノナシオキアミ	21.8
南極オキアミ	11.4
アカエビ	2.3
クルマエビ	0.7
ミネフジツボ	0.3
ミナミヌマエビ	検出されず
アルテミア	検出されず

表1. 水産物中の 8-HEPE 含有量

2) 哺乳動物における 8-HEPE 代謝

HepG2 細胞の培地に 10 μ M の 8-HEPE もしくは EPA を添加し、細胞への取り込みについて検討した（図1）。EPA は培地に添加後速やかに細胞に取り込まれたが、24 時間後には5分の1以下に低下していた。一方、8-HEPE は24 時間経っても細胞内に安定に存在していた。また、8-HEPE 添加後 24 時間

の細胞において、顕著に蓄積する2次代謝物は観察されなかった。

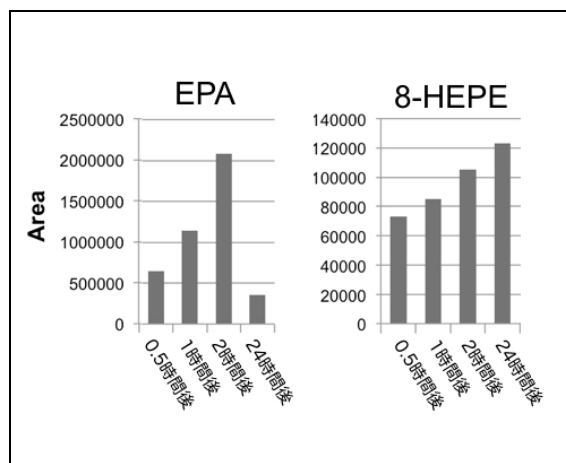


図1、EPA および 8-HEPE の細胞への取り込み。10 μ M の EPA および 8-HEPE を添加後 0.5, 1, 2, 24 時間後に細胞を回収し EPA および 8-HEPE を定量。1 \times 10⁶ 個の細胞あたりの値。

哺乳細胞における EPA を基質とした 8-HEPE 代謝について検討するため、マウス Alox8 発現ベクターを作製し、293T 細胞にて安定発現株を樹立し、EPA 添加時の細胞内における 8-HEPE 濃度を定量した。EPA 添加によって細胞内の HEPE 量は増加したが、8-HEPE よりも 18-HEPE の増加がみられ、8-HEPE の選択的な代謝は観察されなかった。

8-HEPE 経口摂取による生体内の 8-HEPE 量増加について検討するため、8-HEPE 混餌を1ヶ月間継続摂取したマウス血漿における 8-HEPE 濃度を定量した。8-HEPE 摂取マウス血漿中には 3.7 \pm 1.9nM の濃度で 8-HEPE が検出された。一方で、EPA 摂取マウスにおいて、8-HEPE は検出されなかった。このことから、経口摂取した 8-HEPE は生体内に取り込まれ、血流に乗って循環していると考えられた。

3) 8-HEPE の生理活性

ルシフェラーゼを用いたレポーター解析から、8-HEPE には高い PPAR 活性化作用があると考えられた。そこで、PPAR

を介した 8-HEPE の生理作用について培養細胞および動物試験にて検討した。

① PPAR α 活性化作用

8-HEPE による PPAR α 活性化について FaO 細胞株を用いて検討した(図 2)。Fabp1, Ehhadh, Cyp4a1 といった PPAR α によって転写活性化が報告されている遺伝子の発現が 8-HEPE 添加で優位に増加した。8-HEPE による遺伝子発現誘導は、EPA よりも優位に高く、PPAR α アンタゴニスト (GW7647) 添加によって抑制された。上記の結果から、8-HEPE による PPAR α が示された。

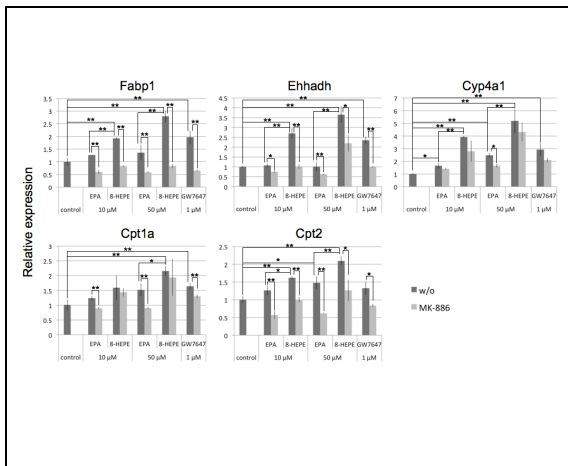


図 2. 8-HEPE による PPAR α 活性化作用. FaO 細胞に 8-HEPE, EPA, GW7647 を添加し、6 時間後の遺伝子発現を real-timePCR にて定量した. 遺伝子発現は *Actb* 遺伝子の発現量で補正した. *P<0.05, **P<0.01, w/o: without.

② PPAR γ 活性化作用

8-HEPE による PPAR γ 活性化作用について、3T3-F442A 細胞を用いて検討した(図 3)。8-HEPE 添加によって *Fabp4* 遺伝子発現が増加し、脂肪細胞分化およびトリグリセリドの蓄積が促進した。これらの結果から、8-HEPE が PPAR γ を活性化し、脂肪細胞の分化と成熟を促進することが明らかとなった。

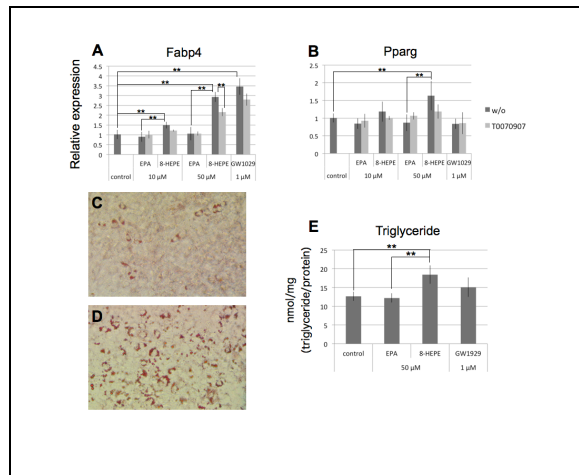


図 3. 8-HEPE による PPAR γ 活性化作用. 8-HEPE, EPA, PPAR γ アンタゴニスト : GW1929 添加 24 時間後の細胞における *Fabp4* (A)、*Pparg* (B) の遺伝子発現を real-timePCR にて定量した. 遺伝子発現は *Rplp0* 遺伝子発現で補正した. C-E : 50 μ M EPA、8-HEPE、1 μ M GW1929 を添加し 3T3-F442A 細胞を 7 日間培養した. EPA(C) もしくは 8-HEPE 添加で培養後 7 日目の細胞を OilRedO で染色した. E : 細胞中のトリアシルグリセロール量の定量結果. **P<0.01. w/o: without.

③ PPAR δ 活性化作用

8-HEPE による PPAR δ 活性化作用について C2C12 細胞を用いて検討した(図 4)。8-HEPE 添加によって *Angptl4* 発現は促進され、PPAR δ アンタゴニスト GW501516 によって発現増加は抑制された。また、8-HEPE 添加によって C2C12 細胞におけるグルコースの取り込みが促進された。上記の結果から、8-HEPE が筋細胞における PPAR δ 活性化とグルコース取り込み促進に働くことが示された。

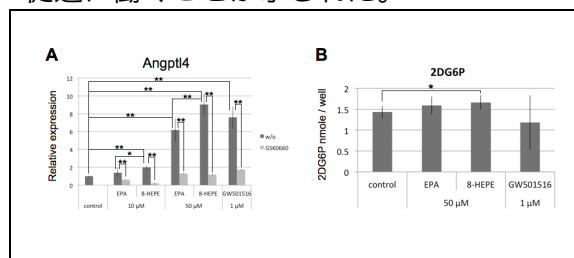


図 4. 8-HEPE による PPAR δ 活性化作用. A : EPA、8-HEPE、GW501516 を添加

し6時間後の細胞における *Angptl4* 遺伝子発現を real-timePCR にて定量した. 遺伝子発現量は *Actb* 遺伝子発現量で補正した. B: 筋細胞分化を誘導した C2C12 細胞を EPA、8-HEPE、GW501516 で6時間処理し、2-デオキシグルコースの取り込みを測定した。
*P<0.05, **P<0.01. w/o: without.

④肥満モデルマウスにおける作用

DIO モデルマウスにおける 8-HEPE の作用を検討した. 8-HEPE 摂取マウスにおいて血漿および肝臓中のトリグリセロール低下が観察された (表2)。一方で、血漿中のグルコース、コレステロールに変化はなかった。また、肝臓において *Cpt1a*, *Ehhadh*, *Cyp4a10* の遺伝子発現増加、遊離型パルミチン酸の低下が観察された (図5)。これら結果は、8-HEPE による肝臓 PPAR α の活性化と脂肪分解促進による中性脂肪値の低下作用を示唆している。

	Plasma TG (mg/dL)	Hepatic TG (mg/g)
HFD	91.3 \pm 22.1	50.1 \pm 10.8
HFD with EPA	82.1 \pm 23.5	44.3 \pm 13.7
HFD with 8-HEPE	78.1 \pm 18.4	40.5 \pm 7.6

表 2. 8-HEPE 摂取マウスにおける中性脂肪 (TG) 値

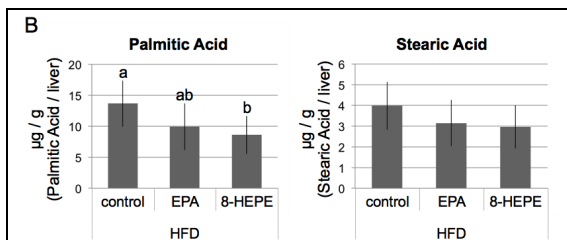


図 5. 8-HEPE 摂取マウス肝臓におけるパルミチン酸、ステアリン酸量

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 1 件)

Yamada H*, Kikuchi S, Hakozaki M, Motodate K, Nagahora N, Hirose M. 8-Hydroxyeicosapentaenoic Acid Decreases Plasma and Hepatic Triglycerides via Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Journal of Lipids*, 2016: 7498508, 2016.
*Corresponding author

(学会発表) (計 4 件)

発表者: Yamada H, Oshiro E, Kikuchi S, Hakozaki M, Takahashi H, Kimura KI.

題名: Hydroxylation of eicosapentaenic acid at the C-8 or C-9 position increases ligand activity for PPARs.

学会名: International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids

Abstract Number: M1.01.

場所: Stockholm, Sweden .

日時: June 28 – July 3, 2014

(ポスター発表、査読有り)

発表者: 山田秀俊、菊地明香、箱崎真由佳、高橋秀行、木村賢一

題名: エイコサペンタエン酸 8 位および 9 位炭素への水酸基導入はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体に対するリガンド活性を増強する

学会名: 2014年日本農芸化学会

発表番号: 2B05a16

場所: 明治大学生田キャンパス

日時: 2014年3月28-30日

(口頭発表、査読有り)

発表者: 山田秀俊、菊地明香、箱崎真由佳、高橋秀行、木村賢一

題名：オキアミ由来の 8-ヒドロキシエイ
コサペンタエン酸 (8-HEPE) による脂質
代謝制御

学会名：2014 年マリンバイオテクノロジー
学会大会

発表番号：1-E-2

場所：三重大学

日時：2014 年 5 月 31 日 - 6 月 1 日

(口頭発表、査読有り)

発表者：○山田秀俊、山崎裕也、小池誠
治、箱崎真友佳、岩間裕文、長洞希、矢
野明

題名：ツノナシオキアミの特徴と生理作
用

学会名：日本甲殻類学会第 53 回大会

発表番号：1-E-2

場所：東京海洋大学品川キャンパス

日時：2015 年 10 月 10 日 - 10 月 11 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田秀俊 (Hidetoshi Yamada)

(公財) 岩手生物工学研究センター店

生物資源研究部・主任研究員

研究者番号：70511955

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：