

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860586

研究課題名(和文) 心血管疾患における脂肪酸バランス制御の意義と機能の解明

研究課題名(英文) An investigation of the impacts of tissue fatty acid balance control in cardiovascular diseases

研究代表者

遠藤 仁 (Endo, Jin)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50398608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、細胞・組織個々の脂肪酸組成には異なる意義があり、骨髄由来細胞の脂肪酸組成が3脂肪酸の心血管保護効果にとって鍵となることを明らかにした。また、LC-MS/MSを用いたリポドミクス解析により、3脂肪酸が豊富な環境においてEPA代謝物18-HEPEが選択的に増えており、この脂肪酸代謝物がin vivoおよびin vitroにおいて抗炎症性、抗線維化活性を有することを明らかにした。18-HEPEの受容体探索を開始し最適な細胞株および刺激分子を選出しており、現在も探索を継続している。病的心臓組織のMS-imagingを行い、条件検討が済み、脂質(リン脂質、脂肪酸)の画像評価を行っている。

研究成果の概要(英文)：We revealed that the fatty acid composition in each organ and tissue impacted their functional activities and the enrichment of omega-3 fatty acids in bone marrow-derived cells played a key role in the cardioprotective effects of omega-3 fatty acids under pressure overload. LC-MS/MS-based lipidomic analysis of lipid mediator identified 18-HEPE as a major EPA metabolite released by the cardiac macrophages in omega-3 enriched heart. 18-HEPE, which exhibited anti-fibrotic and anti-inflammatory properties in vitro, prevented the pressure overload-induced cardiac remodeling in vivo. These research findings were published in a scientific journal (Endo J et al. J Exp Med. 211(8), 1673-87, 2014). To identify an 18-HEPE specific receptor, we are now searching the cell lines and the stimulants optimized for the receptor screening. Using MS-imaging technique, we are examining the significance of lipid distribution in the pathological heart tissue.

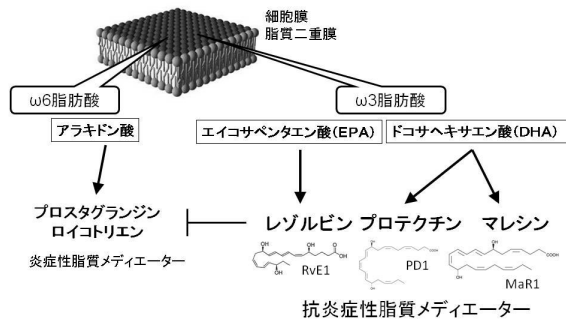
研究分野：心臓代謝学

キーワード：脂肪酸 心臓リモデリング 骨髄由来細胞 リポドミクス

1. 研究開始当初の背景

多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid; PUFA) は生体膜リン脂質の構成成分であり、その酸化物の多くは脂質メディエーターとして循環器系や免疫系などの恒常性維持に重要な役割を果たしている。例えばアラキドン酸に由来するプロスタグランジン・ロイコトリエンといったプロスタノイドは、生体防御反応の一環として起炎反応に深く関わることがよく知られている。また近年、レゾルビン、プロテクチンといった 3 系多価不飽和脂肪酸 (3PUFA) 由来の脂質メディエーターが炎症反応の収束過程においても積極的な役割を果たしていることが知られるようになった。このように炎症をはじめとする生体反応の多くは、PUFA 由来の脂質メディエーターによる正と負の制御を受けている。また、古くから多くの疫学調査や介入試験がおこなわれ、エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) に代表される 3PUFA が心血管保護作用を有し、症候性慢性心不全、心筋梗塞後の症例において予後を改善することが確認されている。しかし、その機構については依然不明な点が多い。

ω3脂肪酸から抗炎症性脂質メディエーターが産生される



私は、3PUFA が有する心血管保護効果の分子機構を解明するため研究を行ない、3PUFA の代謝物の中に心保護作用をもつ生理活性酸化物が存在することを見出した。哺乳類は 3PUFA を体内で合成できないが、全身に線虫から単離した 3PUFA 変換酵素 fat-1 を発現させた fat-1 マウスでは、遺伝学的に 3PUFA が体内に豊富に存在するよう制御されている。fat-1 マウスに大動脈縮窄による心肥大・心不全モデルを作成したところ、fat-1 マウスは野生型に比し、間質の線維化および炎症細胞 (主にマクロファージ) 浸潤の減少、心機能低下の抑制といった心臓リモデリングに対する抵抗性がみられた。また、骨髄移植実験を行なうことで、3PUFA による心臓リモデリング抑制効果の責任細胞は、意外なことに心筋細胞のような心臓を構成する実質細胞ではなく、肥大心に浸潤している骨髄由来炎症細胞であることがわかった。さらに、高速液体クロマトグラフィー、タンデムマススペクトロメトリー (LC-MS/MS)

を用いた選択的反応モニタリング (MRM) 解析により fat-1 マウスのマクロファージの EPA 酸化物を網羅的に定量したところ、いくつかの EPA 代謝物が顕著に増加していることが明らかになり、3PUFA の心血管保護効果を有する抗炎症性メディエーターの候補分子と考えられた。その中で、EPA の一次酸化物である 18-HEPE は、in vitro および in vivo で、抗炎症、抗線維化の生理活性を示し、3PUFA が持つ心臓リモデリング抑制効果を同様に示した。

2. 研究の目的

3PUFA 代謝物の中には生理活性を示す酸化物が存在し、EPA 由来の 18-HEPE が抗炎症・抗線維化の生理活性を有することがわかった。しかし、18-HEPE がどのような酵素で積極的に産生され、どのような分子機構で作用するかについては全くわかっていない。これらを解明するため、本研究では 18-HEPE の合成酵素およびその受容体の探索を行なう。

また、3PUFA による心保護効果は、実質細胞ではない骨髄由来細胞が責任細胞であり、このことから組織、細胞単位での脂肪酸バランス制御が重要であることが分かった。そこで本研究では、脂肪酸とその代謝物の生体内での分布、局在を、質量分析器を用いたイメージング技術を利用することで詳細に解析し、正常組織における特徴や病態における変化を明らかにするとともに、その意義と制御機構に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

18-HEPE が酵素的に合成されるか検証するため、キラルカラムを用いた LC-MS 解析を行なった。受容体探索については、初代培養細胞以外のスクリーニングに適した培養細胞株を選定し、オーファンを含めた GPCR スクリーニングシステムへの導入を試みた。

質量分析器を用いたイメージング技術 (MS イメージング) を用い、リン脂質、脂肪酸、脂肪酸酸化物の生体内での分布、局在を解析した。検出感度を上げるため、条件検討を行ない、マイクロウェーブ法を用いた。心血管の病態モデルとしてモノクロータリン誘導性肺高血圧・右心不全モデルを用い、また高脂肪食負荷で栄養学的介入を加えたマウスモデルも並行して準備し、病態形成に重要な組織の脂質バランスの特徴の解明をこころみだ。飽和脂肪酸の毒性を評価するため、ラット胎児心筋細胞の初代培養の実験系を樹立しパルミチン酸負荷を行なった。脂肪毒性の解除に有用な条件・分子の同定を行なった。

4. 研究成果

18-HEPE は、マクロファージの培養上清により活性化した心臓線維芽細胞に対し抗炎症活性を示した。この実験系において、18-HEPE 以外に構造の近似した脂肪酸代謝物や 18-HEPE から産生される抗炎症性脂質

メディエーターであるレゾルピンなども添加したが、18-HEPEを上回る生理活性は見られなかった。18-HEPEは μM 濃度の低濃度で生理活性を示し、濃度依存性に心臓線維芽細胞のIL-6産生を抑制したため、高親和性の受容体の存在が疑われ、GPCRを標的とした受容体探索を開始した。

今までの実験系は、心臓線維芽細胞を初代培養という形で単離・培養し研究に用いてきたが、受容体スクリーニングにはより適正化した細胞が望ましく、できれば均一な細胞集団である細胞株を用いたい。また、刺激に関しても今までマウスから採取したマクロファージの培養上清を用いていたが、より特異性の高い刺激分子を用いる必要がある。そこで現在18-HEPEの受容体探索に最適な細胞株および刺激分子を選出している。現在も18-HEPEの作用点の同定には至っていないが探索を継続している。

また、我々は、ヒトの血清サンプルのキラルカラムを用いた18-HEPEの測定において、EPAを内服した群では、2つのキラル体の一つ(R体と思われる)が特異的に増えていることを確認しており、18-HEPEの合成機序に関して、COX、LOX、CYPといった酵素などにより積極的に作られていることが示唆された。

また、我々は細胞、組織における脂肪酸バランスの制御機構の解明を目的に研究を展開している。心臓に蓄積した脂質は、膜脂質の飽和化やn-3脂肪酸比の低下といった細胞・組織の脂質バランスの破綻を招くことで、心筋細胞の機能低下や細胞死、または線維芽細胞の活性化、炎症細胞浸潤といった心臓組織の機能的・組織的傷害を誘導すると考えられている。これまでの研究から、脂肪毒性には、脂質代謝物中の生体保護的な脂質が減少することも重要と考えており、このような脂質代謝物のプロファイルの修正も脂肪毒性の治療に有用ではないかと考えている。現在、遺伝学的に心筋細胞内に脂質を異常蓄積し、それぞれ溜まる脂質の形態が異なる3種類のユニークな遺伝子改変マウスを用意しており、脂質解析を始めている。組織分布を解析するMS-imagingについては、本大学医化学教室の杉浦悠毅講師の協力のもと、心臓組織での条件検討を行い、糖代謝の中間代謝物やATPなどのエネルギー産生に関わる分子の画像化は可能になっており、リン脂質の組織画像評価を現在行っている。培養細胞でも胎児ラットの初代心筋培養を用いて、飽和脂肪酸の毒性を評価しているが、この脂肪毒性は不飽和脂肪酸でレスキューできることを確認している。今後も研究を進め、脂質の心血管系疾患に及ぼす影響を分子学的に解明し、新たな治療戦略の創出につなげたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計7件)

1. Yamamoto T, Tamaki K, Shirakawa K, Ito K, Yan X, Katsumata Y, Anzai A, Matsuhashi T, **Endo J**, Inaba T, Tsubota K, Sano M, Fukuda K, Shinmura K. Cardiac Sirt1 Mediates the Cardioprotective Effect of Caloric Restriction by Suppressing Local Complement System Activation after Ischemia/Reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.:ajpheart.00676.2015. doi: 10.1152/ajpheart. 00676.2015. [Epub ahead of print] 査読有り
2. **Endo J**, Arita M. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. Review, *J Cardiol*. 67(1):22-7(2016). 査読有り
3. Hayashiji N, Yuasa S, Miyagoe-Suzuki Y, Hara M, Ito N, Hashimoto H, Kusumoto D, Seki T, Tohyama S, Kodaira M, Kunitomi A, Kashimura S, Takei M, Saito Y, Okata S, Egashira T, **Endo J**, Sasaoka T, Takeda S, Fukuda K. G-CSF supports long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy. *Nat Commun*. 6:6745. doi: 10.1038/ncomms7745 (2015). 査読有り
4. Matsuhashi T, Hishiki T, Zhou H, Ono T, Kaneda R, Iso T, Yamaguchi A, **Endo J**, Katsumata Y, Atsushi A, Yamamoto T, Shirakawa K, Yan X, Shinmura K, Suematsu M, Fukuda K, Sano M. Activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate has the potential to induce epigenetic remodeling in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 82:116-124 (2015). 査読有り
5. Anzai A, Shimoda M, **Endo J**, Kohno T, Katsumata Y, Matsuhashi T, Yamamoto T, Ito K, Yan X, Shirakawa K, Shimizu-Hirota R, Yamada Y, Ueha S, Shinmura K, Okada Y, Fukuda K, Sano M. Adventitial CXCL1/G-CSF Expression in Response to Acute Aortic Dissection Triggers Local Neutrophil Recruitment and Activation Leading to Aortic Rupture. *Circ Res*. 116(4):612-23 (2015). 査読有り
6. **Endo J**, Sano M, Isobe Y, Fukuda K, Kang JX, Arai H, Arita M. 18-HEPE, an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages, prevents pressure overload-induced maladaptive cardiac remodeling. *J Exp Med*. 211(8), 1673-87 (2014). 査読有り
7. Yan X, Hegab AE, **Endo J**, Anzai A, Matsuhashi T, Katsumata Y, Ito K, Yamamoto T, Betsuyaku T, Shinmura K, Shen W, Vivier E, Fukuda K, Sano M.

Lung natural killer cells play a major counter-regulatory role in pulmonary vascular hyperpermeability after myocardial infarction. *Circ Res.* 114(4):637-49(2014). 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 遠藤 仁 AHA-JCS Joint Symposium Functional Importance of Immune Cells in the Heart 「Omega-3 Fatty Acid Metabolism in Cardiac Macrophages」第 80 回日本循環器学会学術集会、仙台国際センター(宮城県仙台市) 2016 年 3 月 19 日
2. Endo J, Sano M, Isobe Y, Fukuda K, Arita M Cardiac macrophage-derived 18-HEPE, an EPA metabolite, prevents the progression of cardiac remodeling under pressure overload in mice. PLM2015, 京王プラザホテル(東京都新宿区) . (2015.2.11)
3. Endo J, Sano M, Isobe Y, Arai H, Fukuda K, Arita M 18-HEPE, an EPA metabolite released by macrophages, prevents against pressure overload-induced cardiac remodeling. BCVS 2014, Las Vegas, Nevada, USA. (2014.7.14-17)

〔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〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

遠藤 仁 (Endo Jin)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50398608

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし