

令和元年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07368

研究課題名(和文)好酸球の中心代謝と12/15-リポキシゲナーゼを介した炎症収束メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the resolution mechanism of inflammation via central carbon metabolism and 12/15-lipoxygenase in eosinophil

研究代表者

岡橋 伸幸 (Okahashi, Nobuyuki)

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・客員研究員

研究者番号：30802748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球における多価不飽和脂肪酸の酸化酵素12/15-リポキシゲナーゼ(LOX)の活性が、抗炎症性脂質メディエーターの産生や炎症収束と関連していることが示唆されているが、12/15-LOXの活性制御機構は明らかとなっていない。申請者は、12/15-LOXの高活性維持には、還元力を使って反応過程で生じる脂質過酸化物を迅速に代謝することが重要であると考え、好酸球におけるレドックスバランスに注目した。本研究では、脂質メディエーターの定量解析や還元力供給を担う中心炭素代謝経路の¹³Cトレーシングを通して、炎症時の好酸球の代謝が持つ役割の解明を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、脂質代謝が基質量や酵素量だけでなく、還元力という側面からも制御されることを示唆した点である。この結果は、アレルギー、癌やアルツハイマー病など炎症反応が病態に關与する多くの疾患に対して、還元力が新たな治療法開発の糸口となる可能性を示している。また、還元力に注目して生体内の抗炎症脂質メディエーターの産生量を高めることができれば、3脂肪酸の特定保健用食品の効果を最大化し、医療用医薬品に頼らない疾患予防の発展にもつながる点が本研究の社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：Previous studies demonstrated that the activity of 12/15 lipoxygenase (LOX), an oxidation enzyme of polyunsaturated fatty acids, expressed in eosinophil is related to the production of anti-inflammatory lipid mediators and resolution of inflammation. However, the regulation mechanism of 12/15-LOX activity is not well understood. We hypothesized that the rapid neutralization of the lipid peroxide produced via 12/15-LOX by reducing cofactors could be essential to keep higher enzymatic activity of 12/15-LOX. In this project, the role of metabolism in eosinophil was explored by the quantitative measurement of lipid mediators and metabolites in central carbon metabolism using mass spectrometry.

研究分野：脂質生化学

キーワード：12/15-リポキシゲナーゼ リピッドメディエーター 好酸球 レドックスバランス 中心炭素代謝

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

1. 研究開始当初の背景

好酸球は顆粒を有する白血球の一種で、アレルギーや喘息、アトピーなど種々の炎症性疾患で好酸球の顕著な増加が見られる。好酸球の顆粒が細胞傷害性を有することから、好酸球は炎症患部に集積し、病態を増悪させる役割があるものと考えられてきた。一方で、近年、好酸球が炎症の収束に関与し、生体の恒常性維持に寄与していることが示唆されている (Wu et al., Science, 2011, Chu et al., Immunity, 2014)。我々のグループも急性腹膜炎モデルにおいて、好酸球で特異的に発現が見られる代謝酵素 12/15-リポキシゲナーゼ (LOX) が、多価不飽和脂肪酸から抗炎症作用を有する脂質メディエーターを産生することを報告した (Yamada et al., FASEB, 2011)。また、重症喘息患者の血液中の好酸球では 12/15-LOX による抗炎症性脂質メディエーターの産生能力が著しく低下していることも見出している (Miyata et al., J. Allergy Clin. Immunol., 2013)。このような背景から、好酸球による抗炎症性メディエーターの産生能力の違いが炎症の収束可能性を左右する重要な要素であることが示唆された。しかし、重症喘息患者と健常者の好酸球の 12/15-LOX の遺伝子発現を調べたところ、有意な変化は認められず、12/15-LOX の活性制御機構は依然として不明のままである。申請者は、12/15-LOX が抗炎症性脂質メディエーターを産生する際に、細胞に有害な過酸化物の生成を経ることに着目した。通常、生体内で生じる過酸化物は還元力運搬補酵素 NADPH によって還元されたグルタチオンによって代謝される。これらの背景を総合し、申請者は中心代謝経路における NADPH 再生能力の高い好酸球のみが脂質メディエーター産生時に発生する過酸化中間体を迅速に代謝し、炎症を収束できるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、高精度質量分析装置を用いた網羅的脂質メディエーター量の計測や、¹³C 代謝フラックス解析法による中心炭素代謝経路でのフラックスを指標とし、炎症モデルマウスにおける好酸球の炎症緩和と還元力、中心炭素代謝の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

12/15-LOX と還元力の関係を評価するために、本研究では *in vitro* 酵素アッセイ、*ex vivo* 好酸球の代謝解析、*in vivo* 炎症評価を軸に研究を進めた。

(1) 酵素アッセイ

マウスのリコンビナント 12/15-LOX、10 μ M 多価不飽和脂肪酸、ビタミン E を PBS 中でインキュベートし、産生される 12/15-LOX 代謝物量のタイムコースを液体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて計測した。

(2) *ex vivo* 好酸球の代謝解析

IL-5 トランスジェニック (IL-5Tg) マウスの脾臓細胞から CD45⁺、CD11b⁺、CCR3⁺ の集団を好酸球として FACS でソーティングし、96 well プレート中で 10 μ M 多価不飽和脂肪酸を含む RPMI1640 培地中でインキュベートした。産生された 12/15-LOX 代謝物は同様に LC-MS/MS を使って分析した。中心炭素代謝の定量的には、¹³C 代謝フラックス解析を用いた。[1-¹³C]グルコースを含む RPMI1640 培地で好酸球を培養し、細胞内代謝物をメタノールで回収した。ガスクロマトグラフィー質量分析装置で中心炭素代謝中間体に蓄積した ¹³C 標識割合を計測し、解糖系とペントースリン酸 (PP) 経路の分岐比を算出した。

(3) *in vivo* での炎症評価

還元力供給が強化された Keap1 ノックダウン (KD) マウス、還元力供給が減弱された Nrf2 ノックアウト (KO) マウスに IL-33 誘導性喘息モデルを適用した。100ng の IL-33 を 3 日間点鼻し、肺への好酸球集積が極大を迎える 3 日後の気管支肺泡洗浄液中の総細胞数をカウントした。この時の肺をコラゲナーゼ処理後、好酸球を FACS でソーティングし、(2) に示した方法で 12/15-LOX 代謝物の産生量を評価した。また 12/15-LOX の有無で好酸球の中心炭素代謝が異なるかを評価するために、IL-5Tg および IL-5Tg かつ 12/15-LOX KO マウスの腹腔に 1mg のザイモサンを投与した。1 日後の腹腔滲出細胞を上記と同様に総細胞数に基づく炎症評価、および *ex vivo* 代謝実験を実施した。

4. 研究成果

まず、12/15-LOX 代謝物量と還元力の関係を *in vitro* 酵素アッセイで評価した。リコンビナント 12/15-LOX と多価不飽和脂肪酸をインキュベートし、LC-MS/MS を用いて産生された 12/15-LOX 代謝物量を調べた。その結果、ビタミン E を含まない群では 6 時間程度で 12-HETE や 15-HETE といった 12/15-LOX 代謝物の産生が停止するのに対し、ビタミン E 添加群では 24 時間以上継続したことから、12/15-LOX の活性維持に脂質ラジカルの除去が重要であることが確認された。

続いて、IL-5Tg の脾臓からソーティングした好酸球の *ex vivo* 培養系にて 12/15-LOX 代謝物の産生量と中心炭素代謝および還元力の関係を調べた。その結果、グルコースを含まない培地で培養した好酸球では 12/15-LOX で産生される脂質メディエーターのリポキシンやレゾルビン量が減少したことから、12/15-LOX の活性維持に中心炭素代謝が関与していることが示唆された。さらにグルタチオンの前駆体である *N*-acetyl-cysteine を培地に添加して還元力供給を強化したところ、同代謝物の産生

量が増加したことから、グルタチオンによる脂質ラジカルの除去によって好酸球の 12/15-LOX 活性が維持されていると考えられた。

さらに、これまでに得た知見を *in vivo* でも検証するために、炎症モデルを用いて還元力供給を増強もしくは減弱させた場合の炎症度合いと 12/15-LOX 活性の評価を行った。還元力供給が強化された Keap1 KD マウス、還元力供給が減弱された Nrf2 KO マウスに、IL-33 誘導性喘息モデルを適用し、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数を指標として炎症を評価したところ、野生型マウスに比べて Keap1 KD マウスでは炎症は軽減し、Nrf2 KO マウスは増悪するという予想通りの結果を得た。そこで、肺の好酸球をソーティングし、*ex vivo* でのメディエーター産生量評価実験を行ったが、野生型マウスとの間に差は見られなかった。これは、12/15-LOX の活性が、好酸球を単離するためのコラゲナーゼ処理やソーティング過程で失活してしまったことが原因であると考えられた。

そこで、好酸球における 12/15-LOX の有無で中心炭素代謝の還元力再生反応の活性に差異があるのかをより詳細に解析する方針に変更した。まず、中心炭素代謝における主要な還元力再生経路のペントースリン酸 (PP) 経路の活性を反応速度で評価するために、¹³C 標識グルコースを使って代謝をトレースする ¹³C 代謝フラックス解析法を立ち上げ、PP 経路の糖リン酸を計測することで、フラックスの解析精度を飛躍的に向上させた。続いて、IL-5Tg 及び IL-5Tg かつ 12/15-LOX KO マウスにザイモサン誘導性腹膜炎モデルを適用した。腹腔滲出細胞数を評価したところ、IL-5Tg マウスに比べて、IL-5Tg かつ 12/15-LOX KO マウスで好酸球の顕著な集積が認められ、炎症の収束が遅延していることが分かった。そこで、腹腔滲出細胞から迅速に好酸球をソーティングし、*ex vivo* メディエーター産生量評価実験を行ったところ、12/15-LOX KO マウスでは 12/15-LOX 代謝物量の著しい減少が見られた。続いて、これらの好酸球の中心炭素代謝の活性を評価するために、*ex vivo* で [1-¹³C] 標識グルコースおよび多価不飽和脂肪酸を添加培養し、解糖系と PP 経路の分岐比を調べた。その結果、12/15-LOX KO マウス由来の好酸球では、取り込まれたグルコースの 41% が解糖系、59% が PP 経路で代謝されていた。一方、12/15-LOX を有する好酸球では 30% が解糖系、70% が PP 経路と、PP 経路へのフラックスの割合が増加していることが明らかとなった。これは、12/15-LOX 代謝物が産生される過程で生じる過酸化物を代謝するために、好酸球が PP 経路を活性化させ、NADPH の再生を増加させたためであると考えられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 2 件)

1. 岡橋伸幸, 松田史生. 糖リン酸の精密計測が明らかにする中心代謝フラックス, (2019) バイオサイエンスとインダストリー, Vol.77, NO.2, 116-118. 査読無.
2. Nobuyuki Okahashi, Kousuke Maeda, Shuichi Kawana, Junko Iida, Hiroshi Shimizu, Fumio Matsuda. Sugar phosphate analysis with baseline separation and soft ionization by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry improves flux estimation of bidirectional reactions in cancer cells, *Metabolic Engineering*, Vol.51, 43-49, 2018. 査読有.

(学会発表) (計 1 件)

1. 岡橋伸幸, 前田昂亮, 川名修一, 飯田順子, 清水浩, 松田史生. ガスクロマトグラフィー負化学イオン化質量分析法を用いた糖リン酸新規分析法の構築と ¹³C 代謝フラックス解析への応用, 2018 年 9 月, 第 70 回日本生物工学会大会.

(図書) (計 1 件)

1. 岡橋伸幸, 松田史生, 清水浩. 第 25 章 動物培養細胞の ¹³C 代謝フラックス解析, 代謝センシング -健康、食、美容、薬、そして脳の代謝を知る-, 2018 年 10 月, シーエムシー出版. 218-227.

(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：
ローマ字氏名：

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。