

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20570

研究課題名（和文）脂質酸化酵素のクロストークにより産生される新規生理活性脂質の探索

研究課題名（英文）Formation of novel eicosanoids in the biosynthetic convergence of the 5-LOX and COX-2 pathways

研究代表者

中島 史恵（Nakashima, Fumie）

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：60961612

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：5-リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ-2、トロンボキサン合成酵素の3種類の脂質酸化酵素の協調的な作用により産生されるアラキドン酸由来の新規生理活性脂質の探索を行った。In vitro モデルとして成熟顆粒球である分化HL-60を用い、質量分析装置により生理活性脂質の生成を評価した。その結果、分化HL-60はLPSおよびカルシウムイオノフォアの刺激に依存して、thromboxane B2の5位の炭素に水酸基を有する新規生理活性脂質である5-OH-thromboxane B2を産生する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アラキドン酸由来の生理活性脂質は、炎症や組織の恒常性維持に重要な役割を果たすが、既知の生理活性脂質だけで全ての生体応答を説明することができない。生体には未だ同定されていない生理活性脂質が存在すると予想し、本研究を行った結果、成熟顆粒球において3つの脂質酸化酵素の協調的作用により新規生理活性脂質である5-OH-thromboxane B2が生合成されることを明らかにした。今後、5-OH-thromboxane B2の生理活性解明を行うことは、生体の恒常性維持機構の理解を深める学術的意義があり、さらにこれらを通して得られた知見は疾病の予防や治療法の開発等、社会へ還元されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the formation of novel eicosanoid biosynthesized in the convergence of three enzymes, 5-lipoxygenase, cyclooxygenase-2, and thromboxane synthase. Using differentiated HL-60 as an in vitro model of mature granulocyte, biosynthesis of novel eicosanoid was evaluated using mass spectrometry. A novel eicosanoid 5-OH-thromboxane B2, the 5-hydroxy analog of arachidonic acid derived thromboxane B2, was formed by the stimulation of LPS and calcium ionophore.

研究分野：脂質生化学

キーワード：5-リポキシゲナーゼ シクロオキシゲナーゼ-2 トロンボキサン合成酵素 生理活性脂質 エイコサノイド

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

脂質メディエーターは、生物活性を有する脂質の総称である。アラキドン酸は、5-リポキシゲナーゼやシクロオキシゲナーゼ-2などの脂質酸化酵素により酸素付加を受けて、ロイコトリエンやプロスタグランジンと呼ばれる脂質メディエーターへ変換され、炎症反応の初期過程における血管透過性の亢進や好中球の浸潤、活性化において中心的な役割を果たすことが知られている。これまで脂質メディエーターに関する研究が精力的に行われてきたが、これらはアラキドン酸が脂質酸化酵素である5-リポキシゲナーゼもしくはシクロオキシゲナーゼ-2による触媒作用を受ける“古典的経路”により生成されるエイコサノイドに焦点が当てられてきた。しかし、生体は刺激を受けると時間依存的な生体応答により制御されていることから（図1, Serhan, Nature 2014より改変）、生体においては基質が複数酵素による多段階の代謝（複数酵素のクロストーク）を受ける可能性が予想される。また、近年のリピドミクス解析で既知の生理活性脂質には該当しない未知の脂質分子が多数検出されていることという事実からも、生体には基質と酵素が一对一の関係にある古典的経路だけでは説明できない未知の生理活性脂質の存在が示唆される。そこで研究代表者は、「複数酵素のクロストークが脂質メディエーターの生合成に多様性を与え、これが厳密かつ多彩な生体応答制御を可能としているのではないか？」という学術的問いを立てた。

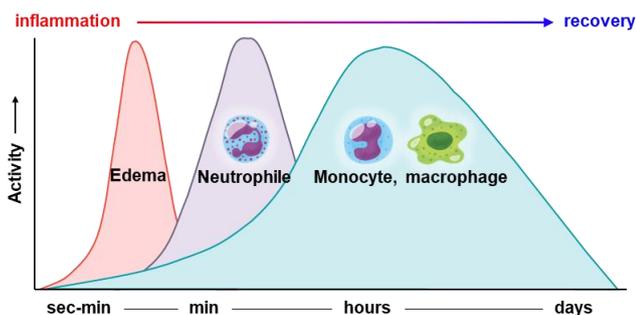


図1 炎症傷害時の生体応答

2. 研究の目的

アラキドン酸由来の脂質メディエーターは、種々の炎症応答に関わることが知られているが、5-リポキシゲナーゼもしくはシクロオキシゲナーゼ-2が単独で作用する古典的経路で生合成されるエイコサノイドだけでは多彩な生体応答を説明することができず、アラキドン酸代謝経路の全容解明が求められている。実際の生体においては、複数の酵素が同じ環境に存在する可能性が十分に考えられることから、基質が複数酵素の触媒作用を受けることで生成される脂質メディエーターの存在を予想した。アラキドン酸代謝に関して、これまで脂質酸化酵素の多段階かつ協調的な触媒作用に関する研究は皆無である。そこで本研究では5-リポキシゲナーゼおよびシクロオキシゲナーゼ-2に加えてトロンボキサン合成酵素に着目し、脂質酸化酵素の協調的な触媒作用により産生されるアラキドン酸由来の新規脂質メディエーターの探索・同定を目的とした（図2）。

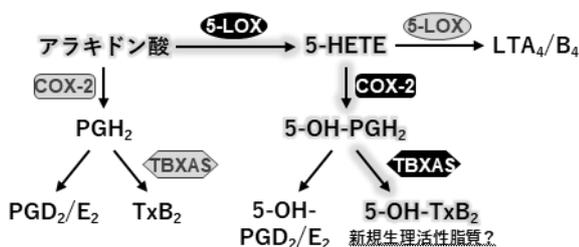


図2 本研究の概要

3. 研究の方法

5-リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ-2 およびトロンボキサン合成酵素の協調的な触媒作用により産生されるアラキドン酸由来の新規脂質メディエーターを探索した。具体的には以下に示す2つの方法を用いて検討を行った。

(1) 一重項酸素付加反応を用いた標品 5-hydroxy-thromboxane B₂ の作製

5-リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ-2 およびトロンボキサン合成酵素の協調的な触媒作用により産生されるアラキドン酸由来の新規脂質メディエーターとして、トロンボキサン B₂ の5位の炭素に水酸基を有する 5-hydroxy-thromboxane B₂ の産生を予想した。そこで、thromboxane B₂ を光増感剤であるメチレンブルーと反応させ、化学的に 5-hydroxy-thromboxane B₂ を合成し、これを質量分析装置による解析での標品として使用した。

(2) 培養細胞における新規脂質メディエーターの生成評価

培養細胞に刺激を行い、5-リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ-2、トロンボキサン合成酵素の3つの酵素を同時に発現させた。刺激した細胞の培養上清を回収し、固相抽出カラムを用いて培養上清中に含まれる脂質メディエーターを精製した後、質量分析装置を用いて脂質メディエーターを解析した。質量分析装置を用いた高感度な検出を可能とするため、カルボキシ基との反応性を有する *N*-(4-aminomethylphenyl)pyridinium により脂質分子の誘導体化を行った。

4. 研究成果

(1) 標品 5-hydroxy-thromboxane B₂ の作製

質量分析装置を用いた解析に用いる標品 5-hydroxy-thromboxane B₂ の作製を行った。作製には一重項酸素付加反応を用い、thromboxane B₂ と光増感剤であるメチレンブルーを 4℃ で一晩反応させた (図 3)。固相抽出によりサンプル中からメチレンブルーを除去した後、高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、メチレンブルーとの反応により thromboxane B₂ よりも極性の高い新規のピークが検出された。質量分析装置を用いた解析の結果、thromboxane B₂ よりも質量電荷比が 16 多い化合物の生成が認められた。この結果から、thromboxane B₂ をメチレンブルーにより酸化させることで 5-hydroxy-thromboxane B₂ を化学的に調製できることが明らかとなった。得られたサンプルは、今後の検討における標品として使用することとした。

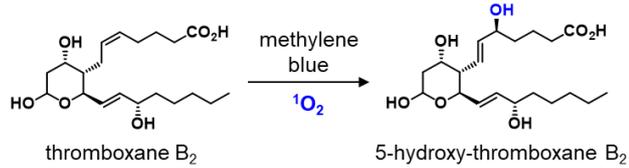


図 3 標品 5-hydroxy-thromboxane B₂ の作製

(2) 質量分析装置を用いた高感度な脂質メディエーターの検出手法の確立

培養細胞が産生する脂質メディエーターの解析を行う為、質量分析装置を用いた高感度かつ特異的な検出手法の確立を行った。まず、5-リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ-2 およびトロンボキサン合成酵素が産生する既知のエイコサノイドである leukotriene B₄、prostaglandin E₂、prostaglandin D₂、および thromboxane B₂ の標品を *N*-(4-aminomethylphenyl)pyridinium (AMPP) と反応させ、AMPP Amide へと誘導体化した (図 4)。質量分析装置のポジティブイオンモードにおける検出の最適化を行い、MRM モードでの特異的および高感度な検出手法を確立した。研究成果 (1) において作製した標品 5-hydroxy-thromboxane B₂ についても同様に AMPP により誘導体化を行った後、検出手法の最適化を行い、質量分析装置のポジティブイオンモードにおける MRM モードでの特異的および高感度な検出手法を確立した。

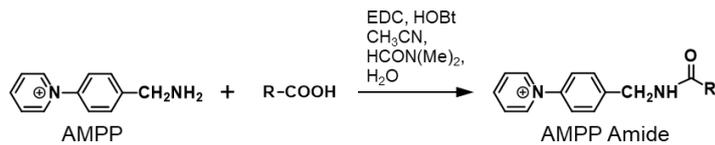


図 4 AMPP 誘導体化

(3) 培養細胞の選定

培養細胞における 5-hydroxy-thromboxane B₂ の産生を評価するため、5-リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ-2 およびトロンボキサン合成酵素を発現する *in vitro* の系の確立を行った。データベースを用いた検索の結果、5-hydroxy-thromboxane B₂ の産生に必要な酵素である 5-リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ-2、トロンボキサン合成酵素の 3 つの酵素はヒト血液由来細胞である HL-60 細胞を分化誘導後、刺激を行うことで発現する可能性が示唆された。TGF-β およびジメチルスルホキシドを HL-60 細胞に 4 日間処理することで成熟顆粒球へと分化させたのち、LPS 刺激により炎症応答を誘導した。その結果、分化 HL-60 細胞は LPS 刺激依存的にシクロオキシゲナーゼ-2 の発現が上昇することがウエスタンブロッティングおよびリアルタイム PCR を用いた解析により明らかになった (図 5)。一方で、5-リポキシゲナーゼとトロンボキサン合成酵素は、分化誘導および炎症誘導刺激の有無に関わらず、HL-60 細胞において恒常的に発現することが確認された。

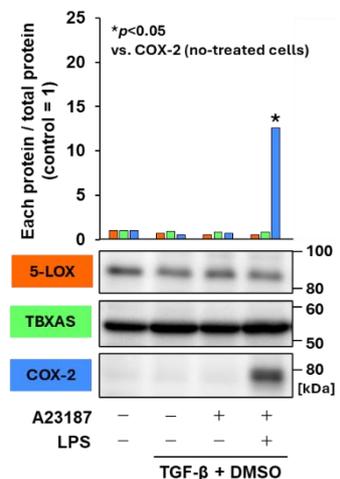


図 5 脂質酸化酵素の発現評価

(4) 分化 HL-60 細胞における 5-hydroxy-thromboxane B₂ 産生評価

TGF-β およびジメチルスルホキシドを 4 日間処理して成熟顆粒球へと分化させた分化 HL-60 細胞に LPS 刺激を行い、シクロオキシゲナーゼ-2 の発現を誘導した。さらに、カルシウムイオノフォアの処理により細胞膜からのアラキドン酸の切り出しと 5-リポキシゲナーゼの活性化を誘導した。回収したサンプルを固相抽出カラムを用いて精製した後、AMPP により脂質分子の誘導体化し、研究成果 (2) で確立した方法を用いて脂質メディエーターを検出した。その結果、LPS およびカルシウムイオノフォアの刺激依存的にアラキドン酸由来のシクロオキシゲナーゼ-2 代謝物である prostaglandin E₂、prostaglandin D₂ の産生、5-リポキシゲナーゼにより生成される leukotriene B₄、およびトロンボキサン合成酵素により生成される thromboxane B₂ の産生が認められた。このことから、刺激に反応して確かに分化 HL-60 は 5-リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ-2 およびトロンボキサン合成酵素の 3 つの酵素が活性化していることが明らかになった。5-hydroxy-thromboxane B₂ の産生を評価した結果、LPS 刺激およびカルシウムイオ

ノフォア処理を行った分化 HL-60 細胞において標品 5-hydroxy-thromboxane B₂ と一致するピークの生成が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakashima Fumie, Gimenez-Bastida Juan A., Luis Paula B., Presley Sai H., Boer Robert E., Chiusa Manuel, Shibata Takahiro, Sulikowski Gary A., Pozzi Ambra, Schneider Claus	4. 巻 299
2. 論文標題 The 5-lipoxygenase/cyclooxygenase-2 cross-over metabolite, hemiketal E2, enhances VEGFR2 activation and promotes angiogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 103050 ~ 103050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.103050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島 史恵, Luis Paula, Presley SaiHan, 柴田 貴広, Pozzi Ambra, Schneider Claus
2. 発表標題 Cyclooxygenase-2および5-Lipoxygenaseのクロストークにより産生される新規プロスタグランジンの同定
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------