

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22116006

研究課題名（和文） 3系脂肪酸の代謝と生理的機能についての包括的メタボローム解析

研究課題名（英文）Metabolomic analyses of omega-3 fatty acid metabolism and their physiological functions

研究代表者

有田 誠（ARITA, Makoto）

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：80292952

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 85,100,000円

研究成果の概要（和文）：EPAやDHAを含む約500種類の脂肪酸代謝物を同時多项目的に検出、定量するメタボローム解析系を構築した。EPAのメタボローム解析から 3系脂肪酸に固有の代謝経路を見出し、その中から強い抗炎症活性を有する新規代謝物（17,18-diHEPE、12-OH-17,18-EpETE）を見いだした。3脂肪酸合成酵素（fat-1）のトランスジェニックマウスを用いた解析から、心臓のマクロファージが生成するEPA代謝物18-HEPEに心不全抑制作用があることを見出した。また、ヒト重症喘息のメタボローム解析から、プロテクチンD1など 3系メディエーターの代謝異常を見出し、病態の進展に関わる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：We established LC-MS/MS-based lipidomics system to monitor more than 500 of fatty acid metabolites simultaneously. From EPA-lipidomics, we identified potent anti-inflammatory metabolites, namely 17,18-diHEPE and 12-OH-17,18-EpETE, that belong to unique omega-3 PUFA metabolic pathway. By using omega-3 desaturase (fat-1) transgenic mouse, we identified cardioprotective function of macrophage-derived EPA metabolite 18-HEPE. Also we found dysregulated synthesis of omega-3 PUFA-derived anti-inflammatory mediator protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma.

研究分野：生物系薬学

キーワード：生理活性脂質 脂肪酸代謝 抗炎症作用 メタボロミクス

## 1. 研究開始当初の背景

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 3 系多価不飽和脂肪酸には、抗炎症作用や心血管保護作用をはじめとする健康増進効果に優れていることが知られている。しかしながらこれらの脂肪酸がなぜ体によいのか、分子レベルの解明は遅れていた。

## 2. 研究の目的

EPA や DHA など 3 系脂肪酸の代謝および生理機能を、代謝物の網羅的解析 (メタボロミクス) を中心とした研究により、分子レベルで解明することを目指す。具体的には、3 系脂肪酸の代謝フローを総合的に解析して固有の代謝マップを構築し、3 系脂肪酸の抗炎症性と相関性を示す代謝経路および新規メディエーターの同定を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 脂肪酸メタボローム解析系の確立

生体内に微量かつ一過性にしか存在しない脂肪酸代謝物を高感度かつ網羅的に測定するために、LC-MS/MS を用いたメタボローム解析システムの質の向上を目指す。具体的には、LC と三連四重極型質量分析計を連結した multiple reaction monitoring (MRM) 解析システムを用い、多種類の脂肪酸代謝物をピコグラムレベルで一斉定量分析する系を確立する。とくに 3 系脂肪酸由来の代謝物を網羅する独自の MRM プログラムを開発する。

### (2) 病態と関連性を示す脂肪酸代謝系についての解析

3 系脂肪酸合成酵素 (*fat-1*) トランスジェニックマウスをはじめ、脂肪酸代謝酵素の遺伝子改変動物とメタボローム解析とを組み合わせることによって、病態と相関性を示す脂肪酸代謝系および活性代謝物を見いだす。また、3 系脂肪酸由来の代謝物が組織や細胞からどれだけ生成するのかを定量的に分析し、3 系脂肪酸の生理機能におけるこれら代謝物の寄与について解析する。

### (3) 3 系脂肪酸由来の活性代謝物の同定と作用機構の解析

代謝物の仮想 MRM を用いた新規代謝物の探索を行う。候補に上がった新規代謝物については、産生細胞および生合成経路を明らかにし、またそこで得られた情報に基づき酵素反応を用いた合成あるいは有機化学的な合成を行い、構造決定と活性評価を行う。さらに、得られた活性代謝物の作用機構を解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 脂肪酸メタボローム解析系の確立

研究開始当時は、高分離 UPLC と三連四重極型質量分析計 4000QTRAP を連結した MRM 解析システムで、約 100 種類の脂肪酸代謝物を

ピコグラムレベルで一斉定量分析が可能であったが、さらにパフォーマンスが大幅に向上した三連四重極型質量分析計 QTRAP5500 を UPLC と連結し、従来の 5 倍のスキャンスピードで約 500 種類の脂肪酸代謝物の一斉定量分析を行なうことが可能になった。また、化合物の同定および定量分析において必須である標準化合物についても、200 種類から 300 種類にまで拡充した。

### (2) 病態と関連性を示す脂肪酸代謝系についての解析

ステロイド抵抗性の重症喘息患者において、末梢血好酸球の 12/15-リポキシゲナーゼ (12/15-LOX) 活性、およびプロテクチン D1 (PD1) の生成量が健常人に比べて大幅に低下していることを見いだした。なお、PD1 は 3 系脂肪酸 DHA に由来する抗炎症性代謝物であり、12/15-LOX 活性の高い好酸球がその主要な産生細胞である。重症喘息患者の好酸球でなぜ 12/15-LOX 活性が低下しているのか、また喘息病態の形成において脂肪酸代謝異常が関与する可能性など、新たな問題提起がなされた。

インフルエンザウイルス感染症において 12/15-リポキシゲナーゼ代謝系および DHA 由来のプロテクチン D1 が内因性の制御因子であることを見いだした。プロテクチン D1 には従来抗炎症作用が示されていたが、今回インフルエンザウイルス感染に対する有効性が認められた。さらにその作用機構として、ウイルス RNA が核内から細胞質へ移行する過程を阻害するという、従来の治療薬にはない新規的作用点であることが明らかになった。

*fat-1* トランスジェニックマウスを用いた解析、および栄養因子として リノレン酸を多く含む亜麻仁油と、リノール酸を多く含む大豆油、それぞれを含む飼料で飼育したマウスを用いた解析を行った。*fat-1* トランスジェニックマウスは心不全モデルに対して抵抗性を示し、LC-MS/MS を用いたメタボローム解析から、心臓保護作用を有する EPA 代謝物 18-HEPE を新たに同定した。一方、亜麻仁油を摂取したマウスは食物アレルギーに対して抵抗性を示し、亜麻仁油を摂取した際に腸内で生成する脂肪酸代謝物のメタボローム解析から、抗アレルギー作用を有する EPA 代謝物 17,18-EpETE を見出した。

### (3) 3 系脂肪酸由来の活性代謝物の同定と作用機構の解析

EPA に由来する新規代謝物を複数見だし、その中から急性腹膜炎における初期の好中球の浸潤を抑制する活性を有する代謝物として 17,18-diHEPE を新規に同定し、レゾルビン E3 (RvE3) と命名した。RvE3 は好中球の遊走をわずかなナノモルレベルの濃度で抑制し、炎症初期の好中球浸潤を強く抑制する活性を有していた。RvE3 は、EPA の 17 位と 18 位が水酸化された代謝物であり、理論上は

4 種類の異性体 (17*S*,18*R*-、17*S*,18*S*-、17*R*,18*S*-、17*R*,18*R*-diHEPE) が存在する。これら 4 種類の異性体をすべて有機合成し、実際に生体内で生成する内因性の RvE3 の立体配置が 17*R*,18*S*/*R*-diHEPE であることを明らかにした。さらに、有機合成化合物を用いて構造活性相関を調べたところ、内因性の RvE3 においてのみ好中球の遊走を抑制する活性が認められた。この結果から、内因性に生成する RvE3 の構造を特異的に認識する受容体が好中球に存在する可能性が示唆された。

また、メタボローム解析の成果として、EPA の 3 位の二重結合がエポキシ化された化合物 (17,18-EpETE) を起点とする新規の代謝経路を見出すことに成功した。そのうち、12-hydroxy-17,18-EpETE は急性腹膜炎モデルにおける好中球の浸潤を低用量で抑制し、さらにロイコトリエン B4 に対する好中球の遊走および細胞極性の形成をナノモルレベルの濃度で抑制することを明らかにした。推定された平面構造から理論上可能な立体異性体をすべて有機合成し、分光学的手法と LC-MS/MS を用いた微量分析法を活用して、実際に生体内で生成する内因性の化合物は 12*S* 体のみであることを明らかにした。さらに、12*S* 体のみ好中球抑制作用が認められることから、内因性に生成する代謝物の立体構造を識別する受容体の存在が示唆された。

#### 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 10 件)

Kunisawa J, Arita M (15 名中 2 番): Dietary ω3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut.

*Sci. Rep.* in press 査読有

DOI:

Endo J, Arita M (7 名中 7 番): 18-HEPE, an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages, prevents pressure overload-induced maladaptive cardiac remodeling.

*J. Exp. Med.* 211: 1673-1687. (2014) 査読有

DOI: 10.1084/jem.20132011.

Kubota T, Arita M (9 名中 2 番): Eicosapentaenoic acid is converted via omega-3 epoxygenation to anti-inflammatory metabolite 12-hydroxy-17,18-epoxyeicosatetraenoic acid.

*FASEB J.* 28: 586-593. (2014) 査読有

DOI: 10.1096/fj.13-236224.

Yokokura Y, Arita M (10 名中 10 番): Identification of 14,20-dihydroxy-docosahexaenoic acid as a novel anti-inflammatory metabolite.

*J. Biochem.* 156, 315-321 (2014) 査読有

DOI: 10.1093/jb/mvu044.

Yamashita A, Arita M (19 名中 17 番): Increased tissue level of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents pathological preterm birth.

*Sci. Rep.* 3: 3113. (2013) 査読有

DOI: 10.1038/srep03113.

Isobe Y, Arita M (8 名中 2 番): Stereochemical assignment and anti-inflammatory properties of the omega-3 lipid mediator resolvin E3.

*J. Biochem.* 153: 355-360. (2013) 査読有

DOI: 10.1093/jb/mvs151.

Miyata J, Arita M (15 名中 14 番): Dysregulated synthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma.

*J. Allergy Clin. Immunol.* 131: 353-360 (2013) 査読有

DOI: 10.1016/j.jaci.2012.07.048.

Morita M, Arita M (22 名中 21 番): The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza.

*Cell.* 153: 112-125. (2013) 査読有

DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.027.

Isobe Y, Arita M (12 名中 2 番): Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid.

*J. Biol. Chem.* 287: 10525-10534 (2012) 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M112.340612.

Arita M: Mediator lipidomics in acute inflammation and resolution. (invited review)

*J. Biochem.* 152: 313-319. (2012) 査読有

DOI: 10.1093/jb/mvs092.

[学会発表](計 5 件)

Arita M: Genetic and lipidomic approach for anti-inflammatory functions of omega-3 polyunsaturated fatty acids: PLM2015: 2015/02/10 (京王プラザホテル、東京都新宿区)

Arita M: Genetic and lipidomic approach to uncover cardioprotective mechanisms by omega-3 polyunsaturated fatty acids: 5<sup>th</sup> European Workshop on Lipid Mediators : 2014/10/23 (Istanbul, Turkey)

Arita M: Genetic and lipidomic approach for the anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acid: 55<sup>th</sup> International Conference on the Bioscience of Lipids: 2014/06/24 (Aberdeen, Scotland)

Arita M: Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in controlling inflammation and resolution: 13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases: 2013/11/14 (San Juan, Puerto Rico)

Arita M: Mediator lipidomics in inflammation research: The 1st International Symposium in Lipid Mediators: 2012/06/06 (九州大学医学部百年講堂、福岡県福岡市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計5件)

名称：アレルギー性疾患の予防または治療のための医薬組成物

発明者：國澤純、清野宏、有田誠

権利者：東京大学

種類：

番号：特願 2013-081548

出願年月日：2013年4月9日

国内外の別：国内

名称：Therapeutic Agent against Influenza

発明者：今井由美子、久場敬司、有田誠、

Joseph Penninger

権利者：秋田大学

種類：

番号：特願 2013-044813

出願年月日：2013年3月6日

国内外の別：国内

名称：光学活性な新規抗炎症性代謝物

発明者：有田誠、井上将行、占部大介、増田

功嗣、新井洋由

権利者：東京大学

種類：

番号：特願 2010-188939

出願年月日：2010年8月25日

国内外の別：国内

名称：オメガ3脂肪酸由来の新規抗炎症性代謝物

発明者：有田誠、井上将行、占部大介、増田

功嗣、新井洋由

権利者：東京大学

種類：

番号：特願 2010-184473

出願年月日：2010年8月19日

国内外の別：国内

名称：新規抗炎症性化合物

発明者：有田誠、新井洋由、田口良、磯部洋

輔

権利者：東京大学

種類：

番号：PCT/JP2010/052509

出願年月日：2010年2月19日

国内外の別：海外

取得状況(計1件)

名称：新規抗炎症性化合物

発明者：有田誠、新井洋由、田口良、磯部洋

輔

権利者：東京大学

種類：

番号：特許第 5523439 号

出願年月日：2010年2月19日

取得年月日：2014年4月18日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.ims.riken.jp/labo/53/index\\_j.html](http://www.ims.riken.jp/labo/53/index_j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有田 誠 (ARITA, Makoto)

理化学研究所・統合生命医科学研究センタ

ー・チームリーダー

研究者番号：80292952

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：