

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02201

研究課題名(和文)新規創薬標的としてのEPHX2 phosphatase：生理的基質と阻害剤の探索

研究課題名(英文) EPHX2 phosphatase as a novel target of drug discovery: searches for a physiologically relevant substrate and a specific inhibitor

研究代表者

蓮見 恵司 (Hasumi, Keiji)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20208474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：可溶性エポキシドヒドロラーゼ(EPHX2)は、N末端領域にホスファターゼ活性(N-phos)を、C末端領域にエポキシドヒドロラーゼ活性(C-EH)を有する2機能酵素であり、sEH欠損マウスは多様な炎症抵抗性を示す。従来、この形質はC-EH機能に依存すると考えられてきたが、独自に見出した選択的阻害剤を用いた解析により、N-phos機能が血管内皮活性化や脂肪肝の抑制に決定的な役割を果たすことを明らかにした。さらに、新規開発した同位体標識タグとLC-MS/MSを利用した網羅的解析により、sn-2位に多価不飽和長鎖脂肪酸を有するホスファチジン酸をN-phos基質として同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症は組織傷害などの治癒に必須の過程であり、生体機能の維持に必須である一方で、慢性炎症は脳梗塞、心筋梗塞、肥満・糖尿病、腎臓病などの多くの重篤な病態の基礎疾患となる。それゆえその制御は健康な生活の維持に極めて重要である。従来の炎症制御に関する膨大な試みの結果多くの医薬品が開発されてきたが、それでもなお多くの重篤かつ難治性の炎症性疾患が残されており、その治療法の開発が待望されている。本研究の成果はその開発に資する新たな化合物と標的分子を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Soluble epoxide hydrolase is a bifunctional enzyme that has an N-terminal phosphatase and C-terminal epoxide hydrolase. Although many of the anti-inflammatory phenotypes have been believed to be derived from C-EH regulation, we found a definitive role of N-phos in the regulation of vascular inflammation and hepatic steatosis. Moreover, we identified phosphatidic acids with a long-chain polyunsaturated fatty acid at the sn-2 position as a substrate for N-phos, utilizing a newly developed LC-MS/MS method combined with an isotope-labeled tagging.

研究分野：生理活性生化学

キーワード：炎症 可溶性エポキシドヒドロラーゼ 生理活性脂質 阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

*Ephx2* によりコードされる二機能性酵素 EPHX2 (soluble epoxide hydrolase; sEH) は、N 末端領域に脂質リン酸エステルホスファターゼ (N-phos)、C 末端領域に脂質エポキシドヒドロラーゼ (C-EH) 活性を有する二機能酵素であり、内因性のシグナル分子の生成や分解に関わる<sup>1</sup> (Figure 1)。例えば、アラキドン酸から P450 epoxygenase 反応で生成するシグナル分子 epoxyicosatrienoic acid (EET) を不活性な dihydroxyicosatrienoic acid (DHET) に変換する。EET の作用には、血管拡張、抗炎症、組織保護などが含まれる<sup>2</sup>。それゆえ、sEH の C-EH を阻害することにより有用な薬理作用が期待でき、多くの創薬アプローチが展開されているが<sup>3</sup>、医薬としての有用性はいまだに検証されておらず、sEH ノックアウトマウスでの表現型 (炎症や組織障害に対する耐性)<sup>4</sup> が C-EH 阻害により得られるのか、現段階では定かではない。

一方、N-phos については 2003 年になってようやく酵素活性が確認された<sup>5,6</sup>。その基質として lysophosphatidic acid や sphingosine-1-phosphate などが報告がされているが<sup>7,8</sup>、生理的な意義は検証されていない (共同研究者 UC Davis Prof Hammock らの内部データでは、生理的基質とは考えられない)。それゆえ、N-phos の生理機能の多くは未解明である<sup>9</sup>。選択的阻害剤が無いこともその一因となっている。

我々は、真菌 *Stachybotrys microspora* が生産する生理活性物質 SMTP の研究を通じて、SMTP が sEH のアロステリック阻害により優れた抗炎症作用を示すことを明らかにした<sup>10</sup>。すなわち、SMTP の持つ血栓溶解促進活性<sup>11</sup> に加えて sEH 阻害が優れた脳梗塞改善作用<sup>12,13,14,15</sup> に重要な役割を果たす (これらの発見に基づき SMTP の臨床開発が進行中)

(<https://mainichi.jp/articles/20180608/pls/00m/020/260000c>)。sEH の C-tern-EH と N-phos の間にはアロステリックな相互作用があり、一方の領域のリガンドが他の領域の活性に影響する。SMTP は sEH の C-EH 活性を拮抗的に、N-phos を非拮抗的に阻害する<sup>10,16</sup>。

## 2. 研究の目的

sEH N-phos 活性の研究の歴史は浅く、2003 年にその同定がなされて以来、30 編程度の論文が発表されたに過ぎない。研究が進まない理由は生理的な基質が不明であり、かつ有用な阻害剤が無いためである。本研究は、我々が独自に発見した SMTP と N 修飾アミノ酸を用いて、血管炎症における N-phos の重要性を見出したことを発端としている。sEH 欠損が炎症抑制や組織保護に有用であることは知られていたが、多くは C-EH 阻害でもたらされると信じられている。一方、C-EH 阻害剤の医薬開発は難航しており、かつ、我々の結果からは、むしろ N-phos が重要な役割を果たすことが示唆されている。N-phos の生理的基質と選択的阻害剤が同定されれば、sEH を介した炎症制御、組織保護の全容解明に近づくものと考えられ、さらには、N-phos 阻害剤を基礎とする医薬開発の進展にも貢献すると期待される。本研究は、N-phos の生理的基質および阻害剤の同定を通じて N-phos による炎症制御の仕組みを解明するとともに、阻害剤の薬理作用を検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) N-phos の生理的基質の探索

マウスの肝臓から酸性脂質を陰イオン交換体で濃縮し、sEH の存在・非存在下でインキュベートし、それぞれ生ずる産物を DNS-Cl-*d*<sub>6</sub>あるいは DNS-Cl を用いて誘導体化した後に LC-MS/MS による一斉分析し、同じ保持時間で質量数が 6 異なるイオンピークを検出した。

### (2) N-phos 選択的阻害剤の探索・同定

合計 109 種の N 修飾アミノ酸の活性を評価し、N-phos 選択性と活性の強さを基準として、更なる評価対象を 4 種化合物に絞り込み、速度論解析から阻害様式の解析を行った。

### (3) 阻害剤の薬理作用の解析

ヒト微小血管内皮細胞を用いて、LPS 刺激後の蛍光標識単球 (U937 細胞) の接着、ICAM-1、VCAM-1、E-selectin に対する阻害剤の作用を評価した。また、正常マウスへの SMTP 投与と sEH 欠損マウスでは、*Lcn2*、*Saal* 等の肝遺伝子発現のパターンが共通して変化する。その機序への N-phos の関与を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) N-phos の生理的基質の探索

基質候補分子を sEH の存在・非存在下で極性脂質画分をインキュベートし、それぞれのインキュベーションで生ずる産物を重水素標識 DNS-Cl- $d_6$  あるいは normoisotopic DNS-Cl を用いて誘導体化した後に LC-MS/MS による一斉分析するという、本研究で新たに開発した方法により、高感度に再現性良く基質候補分子を網羅的に探索することに成功した。

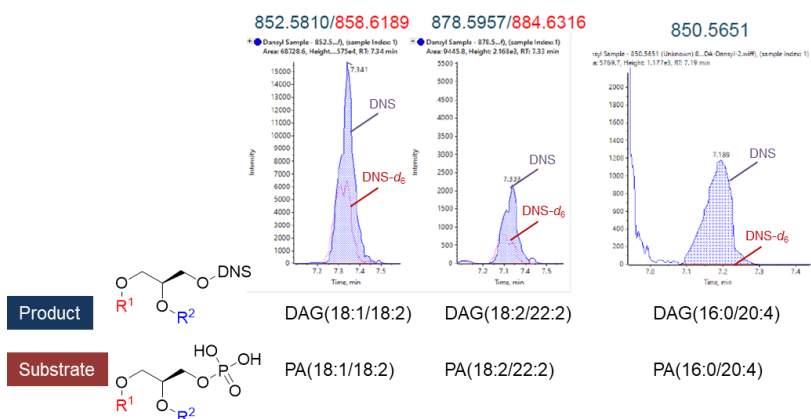


Figure 1. Identification of diacylglycerol (DAG) as a product of N-phos, indicating the corresponding phosphatidic acid (PA) as an N-phos substrate.

これらの中には、従来から N-phos の基質となる lysophosphatidic acid (LPA) や sphingosine-1-phosphate (S1P) から生ずる産物が含まれていたが、今回の解析で始めて、*sn*-1 位にパルミチン酸、*sn*-2 位に多価不飽和長鎖脂肪酸を有する phosphatidic acid (PA) の産物である diacylglycerol (DAG) を同定した (Figure 1)。その中で、特に *sn*-2 位に docosahexaenoic acid を有する PA(16:0-22:6) は極めて選択的な基質であることが示唆された (対照インキュベーションで生ずる DNS- $d_6$  標識物がほとんど確認できないにもかかわらず、sEH インキュベーションにより始めて生ずる : Figure 1, right)。

## (2) N-phos 選択的阻害剤の探索・同定

約 1000 株の微生物培養液からの探索の結果、構造決定に至らなかったもののアミノ酸誘導体が N-phos を阻害することが示唆された。これを受けて合計 109 種の N 修飾アミノ酸の活性を評価し、N-phos 選択性と活性の強さを基準として、更なる評価対象を 4 種化合物に絞り込み、速度論解析から阻害様式決定した (Figure 2)。この解析の際に、阻害の強さと N-phos 選択性の両者がマウス sEH とヒト sEH で大きく異なることを見出し、sEH の立体構造の観点から更なる検討を行った結果、特徴的な相違を明らかにした。本項目に関しては既に論文発表した<sup>17</sup>。

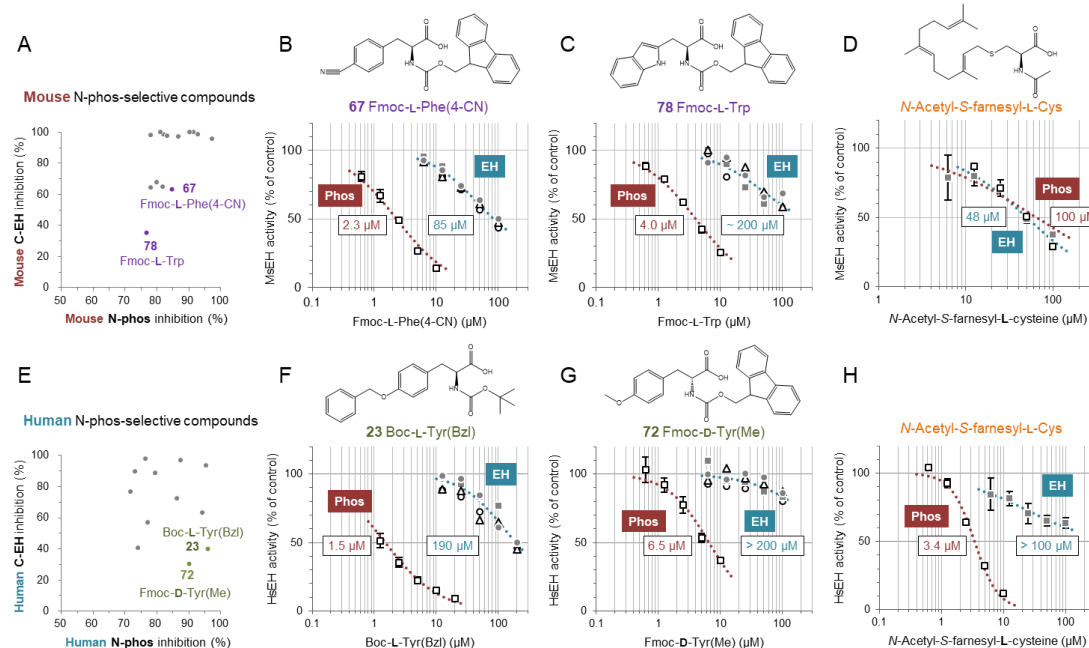


Figure 2. Identification of N-phos-selective inhibitors potent for mouse or human sEH.

## (3) Nterm-phos 選択的阻害剤の薬効評価

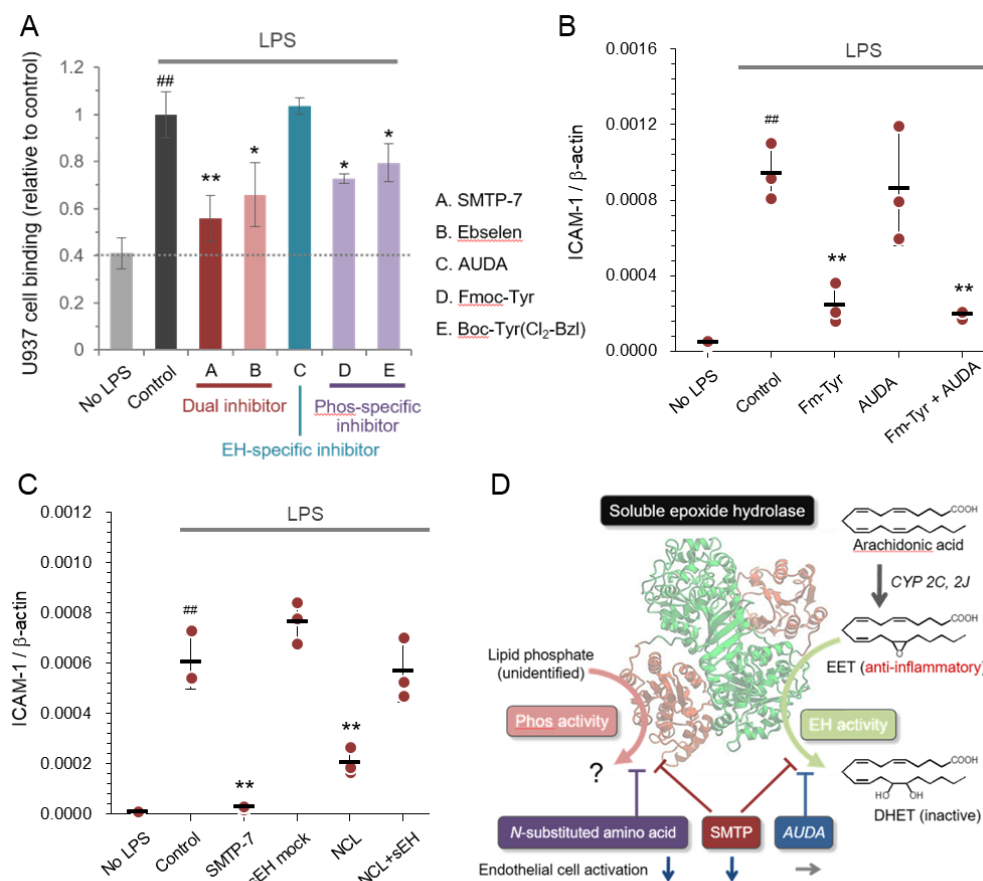
血管内皮細胞の接着分子発現は血管炎症の初期のレスポンスとして重要であり、その制御不全は動脈硬化など多様な疾患に關与する。ヒト微小血管内皮細胞の LPS 刺激後の単球接着は sEH の dual inhibitor である SMTP により阻害され (Figure 3A)、ICAM-1 および E-selectin の発現抑制と一致した (Figure 3B)。単球接着と ICAM-1 発現の抑制は SMTP-7 と同様に N-phos 阻害剤によってもたらされるが、C-EH 阻害剤 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)dodecanoic acid (AUDA)

は無効であった (Figure 3A, 3B)。N-phos 阻害剤の代わりに基質候補分子組成物 (negatively charged lipids; NCL) を処理することでも ICAM-1 が阻害され、基質候補分子の sEH 処理によりその活性が消失した (Figure 3C)。すなわち、N-phos がその基質を介して血管内皮活性化の制御に関わることが強く示唆された (Figure 3D)。

sEH 欠損マウスや sEH 阻害剤投与マウスは炎症抵抗性を示す。その機序を詳細に解析した結果、正常マウスへの SMTP 投与と sEH 欠損マウスでは、肝遺伝子発現のパターンが共通して変化する (発現上昇する) ことを明らかにした (Figure 4A)。これらの多くは *Lcn2*, *Saal* 等の急性期レスポンス遺伝子群であり、N-phos 阻害剤はその発現を誘導するが、C-EH 阻害剤は無効であった (Figure 4B)。すなわち、炎症抵抗性を示す sEH 欠損マウスの特徴的な遺伝子発現変化は N-phos の阻害によって再現されることが示された。

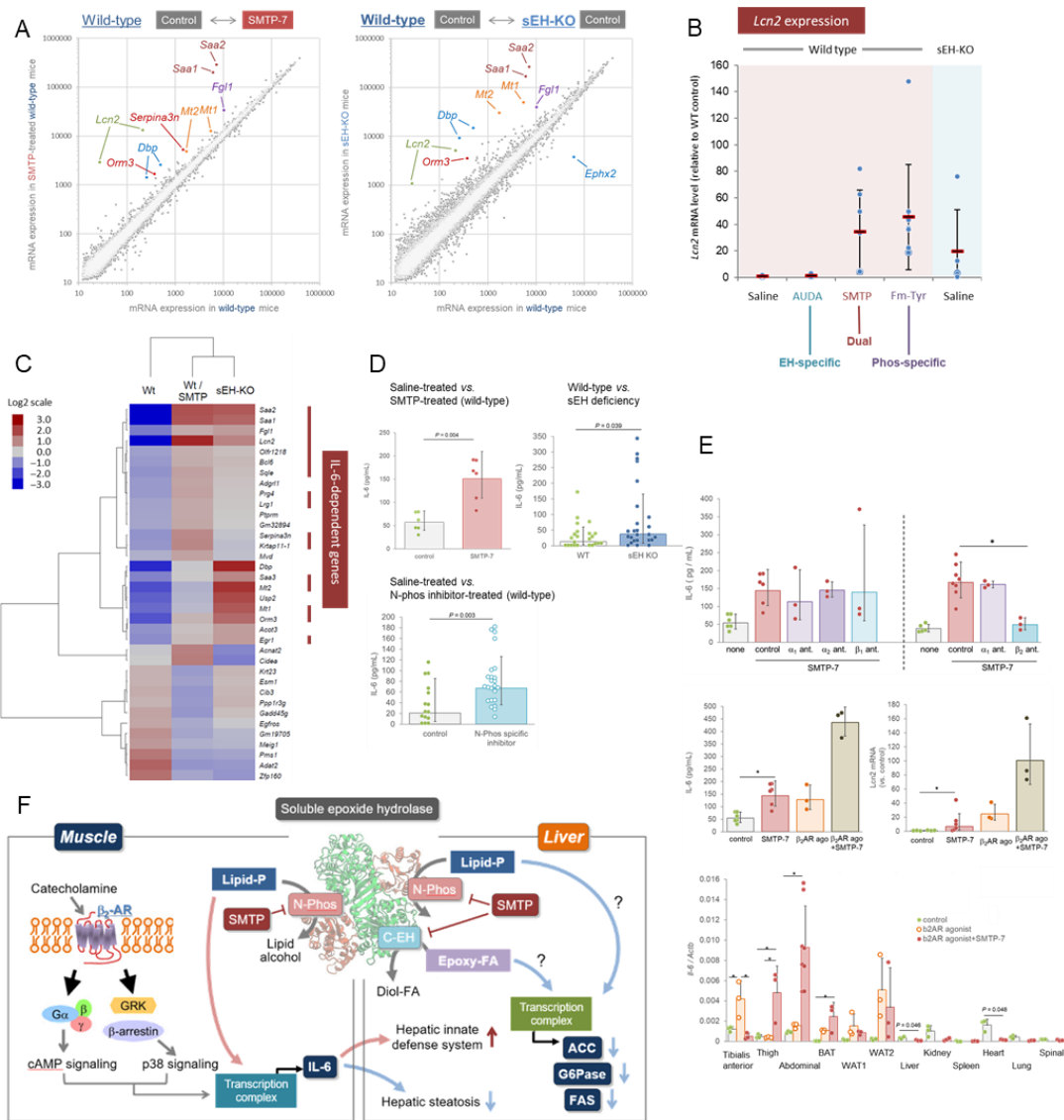
急性期レスポンス遺伝子群は IL-6 制御され、これと一致して sEH 欠損マウスや SMTP 投与マウスで血漿 IL-6 の上昇が確認された (Figure 4C)。IL-6 レベル増加は  $\beta 2$  アドレナリン受容体経路に依存し、主に筋組織におけるレスポンスであった (Figure 4D)。IL-6 誘導は N-phos 阻害によっても起こることから (Figure 4E)、血管内皮活性化と同様に、肝臓における防御システムも N-phos によって制御されることが強く示唆される。

本研究の成果を総合すると、N-phos は生理活性 PA の代謝をコントロールすることにより、血管内皮細胞においては接着分子発現の制御に、筋組織においては  $\beta 2$  アドレナリン受容体経路での IL-6 産生の制御に関わることが示唆される (Figure 4F)。



**Figure 3. N-phos inhibition suppresses vascular endothelial cells activation.**

(A) Inhibition of U937 cell adhesion to vascular endothelial cells by various inhibitors of sEH. (B) N-phos inhibitor and N-phos substrate suppress LPS-induced expression of ICAM-1. The N-phos-selective inhibitor Fmoc-tyr (*Fm-Tyr*) but not the C-EH-selective inhibitor AUDA suppresses ICAM-1 expression. (C) Negatively charged lipids (NCL) derived from mouse liver suppresses ICAM-1 expression, but it loses activity following sEH treatment, demonstrating that the NCL fraction contains a candidate for bioactive N-phos substrate. Each value represents the mean  $\pm$  SD from triplicate determinations. ##,  $P < 0.01$  compared to no LPS; \*,  $P < 0.05$  and \*\*,  $P < 0.01$  compared to LPS by Tukey test. (D) Schematic summary of the results.



**Figure 4. sEH N-phos regulates the liver defense system via a control of IL-6 production.**

(A) The consequence of the inhibition and deletion of sEH: induction of acute phase response genes in common in the liver. (B) Induction of *Lcn2* in the liver by an N-phos-selective inhibitor but not by a C-EH-selective inhibitor. (C and D) Acute phase response gene upregulation associates with the induction of IL-6 in both SMTP-treated wild-type mice and sEH-deficient mice. (E) The IL-6 induction in mice is mediated by the  $\beta_2$ -adrenergic pathway in the muscle and brown adipose. (E) Schematic summary of the results in this study.

<引用文献>

1. Imig, J. D. *Physiol. Rev.* **92**, 101–130 (2012).
2. Node, K. *et al. Science (80-. )*. **285**, 1276–1279 (1999).
3. Fang, X., Singh, P. & Smith, R. G. *Drugs Future* **34**, 579–585 (2009).
4. Harris, T. R. & Hammock, B. D. *Gene* **526**, 61–74 (2013).
5. Newman, J. W., Morisseau, C., Harris, T. R. & Hammock, B. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1558–1563 (2003).
6. Cronin, A. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1552–1557 (2003).
7. Oguro, A. & Imaoka, S. *J. Lipid Res.* **53**, 505–512 (2012).
8. Morisseau, C. *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419**, 796–800 (2012).
9. Morisseau, C. & Hammock, B. D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**, 37–58 (2013).
10. Matsumoto, N., Suzuki, E., Ishikawa, M., Shirafuji, T. & Hasumi, K. *J. Biol. Chem.* **289**, (2014).
11. Hasumi, K., Yamamichi, S. & Harada, T. *FEBS J.* **277**, (2010).
12. Miyazaki, T. *et al. Stroke* **42**, (2011).
13. Akamatsu, Y. *et al. Neurosci. Lett.* **503**, (2011).
14. Ito, A. *et al. Brain Res.* **1578**, (2014).
15. Sawada, H. *et al. J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**, (2014).
16. Matsumoto, N., Suzuki, E., Tsujihara, K., Nishimura, Y. & Hasumi, K. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **68**, (2015).
17. Matsumoto, N. *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **515**, (2019).

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 0件）

1. 著者名 Naoki Matsumoto, Masaki Kataoka, Hibiki Hirosaki, Christophe Morisseau, Bruce D. Hammock, Eriko Suzuki, and Keiji Hasumi	4. 巻 未定
2. 論文標題 N-Substituted amino acid inhibitors of the phosphatase domain of the soluble epoxide hydrolase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 廣寄響、田島真梨絵、悴田正浩、阿部純己、中野真衣、松本直欣、鈴木絵里子、蓮見恵司
2. 発表標題 可溶性エポキシドヒドロラーゼN末端phosphataseの生体内基質探索および機能解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 E. Suzuki, H. Hirosaki, M. Tajima, M. Nakano, H. Kinoshita, J. Abe, K. Hasumi
2. 発表標題 Regulation of vascular inflammation and liver defense system by a lipid substrate of N-terminal phosphatase of soluble epoxide hydrolase
3. 学会等名 27th Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木絵里子、田島真梨絵、中野真衣、廣寄響、木下春奈、蓮見恵司
2. 発表標題 生理活性物質SMTPによる血管炎症制御：beta-2アドレナリン受容体 IL-6シグナル経路の関与
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	鈴木 絵里子  (Suzkui Eriko)  (00468513)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師    (12605)	