

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03380

研究課題名（和文）アレルギー反応を制御するエポキシ化オメガ3脂肪酸の産生機構・作用標的の解明

研究課題名（英文）Elucidation of production mechanism and target proteins of omega-3 fatty acid epoxies that control allergic reactions

研究代表者

河野 望（Kono, Nozomu）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・准教授

研究者番号：50451852

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：Cyp4a12a、Cyp4a12b二重欠損マウスのマスト細胞では、IgE/抗原刺激による活性化が顕著に減弱し、その減弱はエポキシ化オメガ3脂肪酸により回復した。TR4はSrcin1のプロモーター活性を顕著に上昇させること、骨髄由来培養マスト細胞においてSrcin1の発現上昇に関わることを明らかにした。これらのことから、マスト細胞において、TR4はマスト細胞におけるSrcin1の発現に必要であり、Cyp4a12a/b-PAF-AH2によって産生されるエポキシ化オメガ3脂肪酸はTR4の機能を抑制することで、Srcin1の発現を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果によりマスト細胞の活性を制御するエポキシ化オメガ3脂肪酸の産生酵素と作用機構の一端が明らかとなり、生理活性脂肪酸の新たな産生、作用機構を提示できたとともに、アレルギー疾患に対する新たな治療標的を提供できた。

研究成果の概要（英文）：In mast cells from mice deficient in both Cyp4a12a and Cyp4a12b, IgE/antigen-stimulated activation was markedly attenuated. This attenuation was restored by epoxidized omega-3 fatty acids. TR4 markedly increased Srcin1 promoter activity, and is involved in Srcin1 expression in bone marrow-derived mast cells. These findings indicate that TR4 is essential for Srcin1 expression in mast cells and that epoxy omega-3 fatty acids produced by the Cyp4a12a/b-PAF-AH2 axis regulate Srcin1 expression by suppressing TR4 function.

研究分野：脂質生物学

キーワード：エポキシ化オメガ3脂肪酸 PAF-AH2 マスト細胞 シトクロムP450

## 1. 研究開始当初の背景

リン脂質は生体膜の主要な構成成分であると同時に、脂質メディエーターの前駆体としての役割を果たしている。生体膜リン脂質中のアラキドン酸はホスホリパーゼ A<sub>2</sub> により切り出され、酵素的に酸化されることにより、プロスタグランジンやロイコトリエンなどのエイコサノイドへと変換される。エイコサノイドは、G タンパク質共役型受容体を介して多彩な生理活性を発揮する。一方、生体膜中のアラキドン酸やエイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA) などの高度不飽和脂肪酸鎖は活性酸素やリポキシゲナーゼなどにより非酵素的・酵素的に酸化され、酸化リン脂質を生じる。特に最近、15-HETE や PGE<sub>2</sub> など生理活性を有する酸化脂肪酸が結合した酸化リン脂質が生体膜中に存在することが見いだされ、新たな生理活性脂質として注目を集めている (*Sci Signal* 2019, 574: eaau2293)。しかしながら、それらの酸化リン脂質が生理的にどのような意義をもつのか、その詳細は十分に解明されていない。

研究代表者の河野は、最近、PAF-AH2 という酸化リン脂質に選択的なホスホリパーゼ A<sub>2</sub> を介した新たな生理活性脂質の産生系とその重要性を見出した。すなわち、EPA や DHA といった、いわゆるオメガ 3 脂肪酸がエポキシ化された「エポキシ化オメガ 3 脂肪酸 (17,18-EpETE、19,20-EpDPE)」を、PAF-AH2 が生体膜中の酸化リン脂質から切り出して産生すること、エポキシ化オメガ 3 脂肪酸がアレルギー反応を司るマスト細胞の活性化に重要であることを明らかにした (*Nat Med* 2017, 23:1287)。

エポキシ化オメガ 3 脂肪酸は、抗炎症、抗がん、血圧低下作用などの生理活性が最近報告されており (*PNAS* 2014, 112:536; *PNAS* 2013, 110: 6530)、非常に注目されている生理活性脂肪酸である。しかしながら、その産生機構についてはシトクロム P450 の関与が示唆されているものの、責任酵素の同定には至っておらず、産生系の全体像は不明である。また作用標的に関して、BK チャネル、PPAR $\gamma$ 、GPR40 などの活性化が報告されているが、作用機構が不明瞭、もしくは親和性が  $\mu$ M オーダーと低いなど、エポキシ化オメガ 3 脂肪酸の受容体は未だ不明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の点を明らかにすることを目的とした。

### (1) エポキシ化オメガ3脂肪酸の産生経路の解明

マスト細胞に高発現しているシトクロム P450 である Cyp4a12 について、その欠損マスト細胞が、エポキシ化オメガ 3 脂肪酸の産生低下、マスト細胞の活性化不全を起こすことを、ごく最近見出している。そこで、本酵素の欠損マウスの表現型を解析するとともに、本酵素が PAF-AH2 の基質となるエポキシ化オメガ 3 脂肪酸を含む酸化リン脂質をどのように産生しているかを明らかにする。

### (2) エポキシ化オメガ 3 脂肪酸の作用標的の同定

マスト細胞におけるエポキシ化オメガ 3 脂肪酸の作用が核内受容体を介するという予備的知見を得ている。そこで、核内受容体ファミリーに着目した解析によりエポキシ化オメガ 3 脂肪酸の作用標的を同定する。

### 3. 研究の方法

Cyp4a12a, Cyp4a12b 二重欠損マウス、TR4 欠損マウスは C57BL/6 の受精卵に Cas9/crRNA/tracrRNA 複合体をインジェクションすることにより作成した。TR4 欠損 HEK293 細胞は CRISPR/Cas9 法により作成した。骨髄由来培養マスト細胞は骨髄細胞を IL-3 存在下で約一ヶ月培養することで作成した。マスト細胞の活性化は DNP に対する IgE で感作後に DNP-HAS で刺激することにより生じる脱顆粒を放出された  $\beta$  ヘキソサミニダーゼ活性を指標に評価した。マウス受動皮膚アナフィラキシー反応はマウスの耳介に DNP に対する IgE を皮内投与し、翌日に DNP-HAS とエバンスブルーを含む溶液を尾静脈注射することで誘導し、耳介におけるエバンスブルー色素の漏出と耳介の肥厚により反応の程度を評価した。Srcin1 プロモーター活性は HEK293 に Srcin1-NanoLuc と各種マウス核内受容体をコトランスフェクションすることにより行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) エポキシ化オメガ3脂肪酸の産生経路の解明

Cyp4a12a, Cyp4a12b二重欠損マウスから骨髄由来マスト細胞を調製したところ、二重欠損マウスのマスト細胞は細胞表面上のFcεRIやc-Kitの発現やプロテアーゼなどのマスト細胞マーカーのmRNA発現は野生型と変わらなかったが、IgE/抗原刺激による活性化は野生型に比べて顕著に減弱し、PAF-AH2欠損マスト細胞と同様の表現型を示した。マスト細胞のIgE/抗原刺激による活性化にはSrc family kinaseであるLynやFynの活性化が必須であるが、PAF-AH2欠損マスト細胞では、Srcin1 (Src kinase signaling inhibitor 1) が発現上昇しており、LynやFynの活性化が抑制されていることを明らかにしている。そこで、Cyp4a12a, Cyp4a12b二重欠損マスト細胞においてSrcin1の発現を調べた結果、二重欠損マウスにおいてもSrcin1の顕著な発現上昇がみられ、エポキシ化オメガ3脂肪酸の添加によりその発現上昇は抑制された。さらに、Cyp4a12a, Cyp4a12b二重欠損により即時型アレルギー反応が減弱するか、DKOマウスに受動皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応を起こしたところ、DKOマウスではPCA反応が顕著に減弱しており、その減弱はエポキシ化オメガ3脂肪酸の投与により回復した。これらの結果から、Cyp4a12a, Cyp4a12bはマスト細胞において、エポキシ化オメガ3脂肪酸の産生をすることによりマスト細胞の活性化に重要な働きをしていることが示唆された。

#### (2) エポキシ化オメガ3脂肪酸の作用標的の同定

マスト細胞におけるエポキシ化オメガ3脂肪酸の作用として、Srcin1の発現制御を見出している。Srcin1のプロモーター領域の下流にNanoLucを結合したコンストラクトを用いたレポーターアッセイにおいて、レポーター活性に影響を与える核内受容体をスクリーニングした結果、TR4がSrcin1-NanoLucを顕著に上昇させることを見出した。そこでTR4欠損 HEK293細胞を作成し、内在性TR4によるレポーター活性を排除した条件において、TR4によるSrcin1プロモーター活性上昇に必要なSrcin1プロモーター領域を精査したところ、-500~-1000 bpの領域にある3つのシスエレメントを同定した。これらは既知のTR4の結合配列と相同性の高い配列であった。次に、TR4によるSrcin1プロモーター活性上昇に対するエポキシ化オメガ3脂肪酸の効果を調べたところ、エポキシ化オメガ3脂肪酸の影響はみられず、なんらかの補因子が必要であることが示唆された。マスト細胞におけるTR4の機能を調べるために、CRISPR/Cas9法でTR4の欠損マウスを作成したが、欠損マウスは胎生致死

となり、解析に十分なマスト細胞を得ることができなかった。そこで骨髄由来培養マスト細胞においてレトロウイルスによりTR4をノックダウンしたところ、PAF-AH2欠損によるSrcin1の発現上昇がキャンセルされ、エポキシ化オメガ3脂肪酸による発現抑制も見られなくなった。これらの結果から、TR4はマスト細胞におけるSrcin1の発現に必要であり、エポキシ化オメガ3脂肪酸はTR4の機能を抑制することで、Srcin1の発現を制御していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Arai H, Kono N.	4. 巻 176
2. 論文標題 -Tocopherol transfer protein ( -TTP).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med.	6. 最初と最後の頁 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.021.	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
1. 著者名 Tavaglione F, Kono N, Romeo S.	4. 巻 62
2. 論文標題 Understanding the underlying molecular pathways by which Mboat7/Lpiat1 depletion induces hepatic steatosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Lipid Res.	6. 最初と最後の頁 100047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jlir.2021.100047.	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
1. 著者名 Kano K, Matsumoto H, Kono N, Kurano M, Yatomi Y, Aoki J.	4. 巻 62
2. 論文標題 Suppressing postcollection lysophosphatidic acid metabolism improves the precision of plasma LPA quantification.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Lipid Res.	6. 最初と最後の頁 100029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jlir.2021.100029.	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
1. 著者名 Arii J, Fukui A, Shimanaka Y, Kono N, Arai H, Maruzuru Y, Koyanagi N, Kato A, Mori Y, Kawaguchi Y	4. 巻 94
2. 論文標題 Role of Phosphatidylethanolamine Biosynthesis in Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells in Progeny Virus Morphogenesis in the Cytoplasm and in Viral Pathogenicity In Vivo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e01572-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01572-20	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

1. 著者名 Tanaka Y, Shimanaka Y, Caddeo A, Kubo T, Mao Y, Kubota T, Kubota N, Yamauchi T, Mancina RM, Baselli G, Luukkonen P, Pihlajam_ki J, Yki-J_rvinen H, Valenti L, Arai H, Romeo S, Kono N.	4. 巻 70
2. 論文標題 LPIAT1/MBOAT7 depletion increases triglyceride synthesis fueled by high phosphatidylinositol turnover.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 180-193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2020-320646	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

1. 著者名 Yamamoto T, Endo J, Kataoka M, Matsuhashi T, Katsumata Y, Shirakawa K, Isobe S, Moriyama H, Goto S, Shimanaka Y, Kono N, Arai H, Shinmura K, Fukuda K, Sano M.	4. 巻 526
2. 論文標題 Palmitate induces cardiomyocyte death via inositol requiring enzyme-1 (IRE1)-mediated signaling independent of X-box binding protein 1 (XBP1).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 122-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.027	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 河野 望
2. 発表標題 The role of non-mitochondrial cardiolipin in spermatogenesis
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野 望
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール脂肪酸鎖異常による脂肪肝発症機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 望月 大、 赤木 聡介、 嶋中 雄太、 饗場 篤、 佐藤 卓也、 小川 毅彦、 新井 洋由、 河野 望、 青木 淳賢
2. 発表標題 非ミトコンドリア型カルジオリピンTPCLの精子形成における作用機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大木 悠佑、 河野 望、 川名 裕己、 新井 洋由、 進藤 英雄、 清水 孝雄、 青木 淳賢
2. 発表標題 マクロファージにおけるDPPC産生機構の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 笑満里、 赤木 聡介、 河野 望、 青木 淳賢
2. 発表標題 精巢特異的リン脂質 tetrapalmitoyl cardiolipin (TPCL) 合成経路の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 笑満里、 赤木 聡介、 河野 望、 青木 淳賢
2. 発表標題 精巢特異的リン脂質 tetrapalmitoyl cardiolipin (TPCL) 合成経路の解析
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ni Shunwei、葛西 俊輔、赤木 聡介、新井 洋由、河野 望、青木 淳賢
2. 発表標題 オートファジー関連遺伝子による飽和脂肪酸誘導性のIRE1活性化機構の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倪 申ウェイ、向井 康治朗、鈴木 健裕、堂前 直、新井 洋由、田口 友彦、河野 望、青木 淳賢
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール-4-リン酸近傍タンパク質の探索
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野 望
2. 発表標題 非ミトコンドリア型カルジオリピンの精子形成における機能
3. 学会等名 第20回 日本ミトコンドリア学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野 望
2. 発表標題 非ミトコンドリア型カルジオリピンの精子形成における役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nozomu Kono
2. 発表標題 The role of phosphatidylinositol acyl chains in nonalcoholic fatty liver disease
3. 学会等名 The19th International Symposium on Atherosclerosis
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石野 雄己、河野 望、桑山 尚大、川口 大地、岸 雄介、後藤 由季子、新井 洋由、青木 淳賢
2. 発表標題 胎児期大脳皮質形成過程におけるアラキドン酸含有ホスファチジルイノシトールの役割
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021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
---------	---------