

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860034

研究課題名(和文) 3脂肪酸に固有の代謝経路に着目した 3脂肪酸の抗炎症作用機構の解明

研究課題名(英文) Functional elucidation of anti-inflammatory effect of omega-3 PUFAs focusing on the omega-3 PUFA specific metabolic pathway

研究代表者

磯部 洋輔 (ISOBE, Yosuke)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：80724335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：エイコサペンタエン酸(EPA)をはじめとしたオメガ3脂肪酸には、古くから抗炎症作用等の健康増進効果が知られている。我々は、EPAのオメガ3位が酸化されることがEPAの機能性の発揮に重要である可能性を見出しており、その反応を担う代謝酵素、及び代謝物の標的分子の同定を行った。代謝酵素については、細胞に一過性に発現させてその代謝活性を網羅的に評価する系の構築を行い、シトクロムP450(CYP)の一部にオメガ3位の酸化活性を見出した。さらに、代謝物の標的分子としてGタンパク質共役型受容体(GPCR)に着目したスクリーニングを行うことで、代謝物の投与により活性化するGPCRを見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as eicosapentaenoic acid (EPA) are well known to have anti-inflammatory effects. Previous studies have suggested that oxidation of double bond in the omega-3 position of EPA might be important for omega-3 PUFAs' anti-inflammatory actions. Here, we tried to identify enzyme(s) which is involved in the oxidation reaction of EPA, and to identify target molecule(s) of EPA-derived bioactive metabolites. For enzyme identification, we have developed an assay system which can comprehensively evaluate oxidation activity of PUFA-metabolizing enzymes using transient gene expression in mammalian cells. By using this system, we identified several cytochrome P450s (CYPs) as candidates which oxidize double bond in the omega-3 position of EPA. In addition, we found that several G-protein coupled receptors (GPCRs) were activated by treatment of EPA-derived bioactive metabolites.

研究分野：脂質生化学

キーワード：オメガ3脂肪酸 抗炎症作用 シトクロムP450

1. 研究開始当初の背景

多価不飽和脂肪酸は、メチル末端から数えた二重結合の位置によりそれぞれ ω 3 脂肪酸と ω 6 脂肪酸とに分類される。そのうち、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 ω 3 脂肪酸には、古くから抗炎症作用等の健康増進効果が知られている。その作用機序としては、 ω 6 脂肪酸であるアラキドン酸から生成する炎症性の脂質メディエーター (プロスタグランジンやロイコトリエン等) に対する拮抗作用が考えられていたが、近年 ω 3 脂肪酸が積極的に活性代謝物に変換されて機能する可能性が指摘されている。これまでに我々は、高速液体クロマトグラフィー-タンデムマスペクトロメトリー (LC-MS/MS) を用いた脂肪酸代謝物のメタボローム解析から、EPA 由来の新規抗炎症性代謝物としてレゾルビン E3 (RvE3) や 12-OH-17, 18-EpETE を見出してきた。これらの代謝物は EPA の ω 3 位に水酸基が付加した 18-HEPE や、 ω 3 位の二重結合にエポキシ基が導入された 17, 18-EpETE から生成するが、これらはいずれも ω 3 位に二重結合を有する ω 3 脂肪酸に固有の代謝経路であり、抗炎症作用など ω 3 脂肪酸に固有の機能の発揮に重要である可能性が考えられた (図1)。一方で、生体内においてこの代謝経路を担う酵素については明らかとなっていない。また、RvE3 等の EPA 由来の抗炎症性代謝物の生体内における標的分子についても不明である。

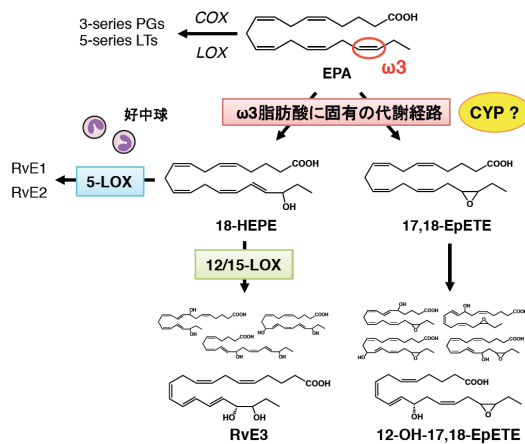


図1 ω 3脂肪酸に固有の代謝経路
EPAは ω 6脂肪酸であるアラキドン酸と同様にシクロオキシゲナーゼ (COX) やリポキシゲナーゼ (LOX) の基質となり、プロスタグランジン (PG) やロイコトリエン (LT) といった代謝物に変換される。一方で、EPAはアラキドン酸とは異なり ω 3位の二重結合が酸化され、18-HEPEや17,18-EpETEを生成する。その下流にはレゾルビン等の抗炎症性代謝物が見出されており、 ω 3脂肪酸に固有の機能の発揮に重要な代謝経路である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

ω 3 脂肪酸に固有の代謝経路に着目し、 ω 3 脂肪酸の抗炎症作用の分子機構を明らかにする。とくに、EPA の ω 3 位の酸化反応を担う脂肪酸代謝酵素、及び EPA から生成する抗炎症性代謝物の標的細胞・標的分子の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) EPA の ω 3 位の酸化を担う酵素の同定
脂肪酸の酸化酵素としてシトクロム P450 (CYP) に着目し、まず遺伝子のクローニングを行った。CYP はマウスに 102 種類、ヒトに 57 種類存在するが、それらをゲノムワイドに評価すべく、現時点で 8 割以上のクローニングを達成している。得られた CYP 遺伝子は HEK293 細胞に一過性に発現させ、基質として脂肪酸を $10 \mu\text{M}$ で添加して 1 時間後の培養上清及び細胞から脂肪酸代謝物を精製した。脂肪酸代謝物の精製は C18 カラムを用いた固相抽出により行った。我々はこれまでに、三連四重極型 LC-MS/MS を用いた Multiple Reaction Monitoring により、数百種類の酸化脂肪酸を一斉定量分析するシステムを確立している。固相抽出により得られたサンプルはこのシステムにて分析を行い、酵素の脂肪酸代謝能を評価した。17, 18-EpETE のエポキシ基の立体選択性については、バクテリアの CYP である BM3 が EPA から 17(S), 18(R)-EpETE を選択的に生成することが知られていることから、BM3 と EPA とを *in vitro* で反応させ、17(S), 18(R)-EpETE の標準化合物を得た。ラセミ体の 17, 18-EpETE は市販されているので、LC-MS/MS にキラルカラムを接続して、これらの標準化合物を分析した際の保持時間と、各 CYP が生成する 17, 18-EpETE の保持時間を比較することで、エポキシ基の向きの選択性を評価した。

(2) EPA から生成する抗炎症性代謝物の標的細胞、及び標的分子の同定

繊維芽細胞の活性化による IL-6 産生は、ELISA にて定量した。G-タンパク質共役型受容体 (GPCR) の活性化は、近年開発された GPCR の trans activation によるトランスフォーミング増殖因子 α (TGF- α) の細胞外への切り出しを指標にしたアッセイ系 (TGF- α shedding assay) を用いた。このシステムは、従来の GPCR の評価系よりも幅広い G α タンパク質の活性化を検出することができる。

4. 研究成果

(1) EPA の ω 3 位の酸化を担う酵素の同定
クローニングした CYP を HEK293 細胞に一過性に発現させ、EPA の代謝能を検討したところ、いくつかの CYP を発現させた際に EPA の ω 3 位の酸化物である 18-HEPE や 17, 18-EpETE の産生増加が認められた (図2)。さらに、これらの CYP について、基質として ω 6 脂肪酸であるアラキドン酸や、EPA 以外の ω 3 脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) を用いて代謝能を比較したところ、それぞれの CYP について基質に選択性があることが明らかになった。さらに、17, 18-EpETE について、エポキシ基の導入される向き (17(S), 18(R)-EpETE もしくは 17(R), 18(S)-EpETE) について、キラルカラムを用いて検討したところ、CYP によって

17, 18-EpETE のエポキシ基の向きに選択性があることが明らかになった。実際に生体内の 17, 18-EpETE のエポキシ基の向きも臓器・組織によってバランスが異なっており、それぞれの臓器における CYP の発現パターンの違いによりそのバランスが規定されているものと考えられた。

このように、CYP の活性をゲノムワイドに評価する系を構築したことで、 ω 3 脂肪酸に固有の代謝経路を担う酵素について、いくつかの候補を見出すことに成功した。また、このシステムは他の脂肪酸をはじめとして様々な基質に対応することが可能であり、 ω 3 脂肪酸の代謝の解析にとどまらず、CYP による低分子化合物の代謝能を網羅的に評価できるシステムとして汎用されることが大いに期待される。

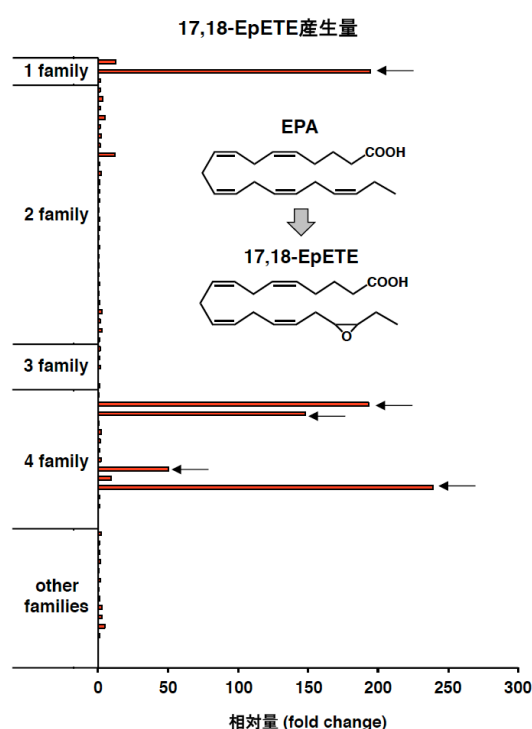


図2 マウスCYPによる17,18-EpETEの産生
 ω 3脂肪酸に固有の代謝経路を担う酵素を探索した結果の一部として、マウスのCYPによる17,18-EpETEの産生能を示す。矢印の酵素に顕著な17,18-EpETE産生能が認められた。

(2) EPA から生成する抗炎症性代謝物の標的細胞、及び標的分子の同定

標的細胞については、繊維芽細胞に着目した解析から、18-HEPE がナノモルレベルの低用量で繊維芽細胞の活性化に伴う炎症性サイトカイン (IL-6) の産生を抑制することを見出した。この作用は、18-HEPE の下流で生成する RvE3 等のレゾルビン類を等量投与した際には認められず、当初 RvE3 をはじめとしたレゾルビン類の前駆体という位置づけであった 18-HEPE そのものも生理活性を有する可能性が考えられた。18-HEPE は in vivo マウス心不全モデルにおいても、圧付加依存的な心臓の線維化が抑制され、それに伴って心機能の低下も抑制されることが明らかになった。

18-HEPE の作用点についての示唆を得るため、18-HEPE を細胞に添加した際の動態を詳細に解析したところ、18-HEPE が生体膜リン脂質中に取り込まれることが明らかとなり、18-HEPE の作用点として膜リン脂質の関与が新たに示唆された。

また、代謝物の標的分子について GPCR に着目し、その活性化を指標としたスクリーニングを行った。その結果、18-HEPE や RvE3 の投与により活性化する GPCR を複数見出すことに成功した。

(3) DHA から生成する ω 3 脂肪酸に固有の代謝経路

18-HEPE や 17, 18-EpETE は EPA の ω 3 位の二重結合が酸化された代謝物であるが、同様の代謝経路は DHA にも存在し得る。DHA の ω 3 位が酸化された代謝物に着目して LC-MS/MS を用いた探索を行った結果、DHA の ω 3 位に水酸基が付加した 20-hydroxy DHA (20-HDHA) から生成する代謝物を複数見出した。また、それらのうち 20-HDHA の 14 位にさらに水酸基が付加した 14, 20-diHDHA に、急性腹膜炎モデルにおいて炎症初期の好中球浸潤を抑制する活性を見出し、 ω 3 脂肪酸に固有の代謝経路は EPA だけでなく DHA にも存在する可能性が考えられた。また、急性腹膜炎モデルの炎症浸出液中に認められた 14, 20-diHDHA は、脂肪酸代謝酵素の一つである 12/15-リポキシゲナーゼ (12/15-LOX) の欠損マウスによって消失したことから、14, 20-diHDHA は生体内において 12/15-LOX によって生成する可能性が示唆された。

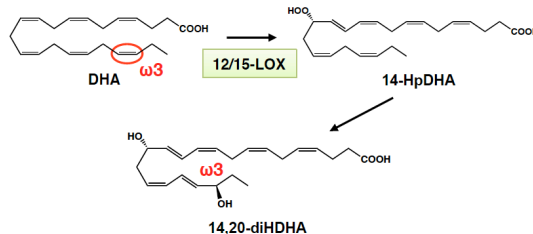


図3 DHAから生成する ω 3脂肪酸に固有の代謝経路
12/15-LOXにはDHAの14位を酸化して14-Hydroperoxy DHA (14-HpDHA)を産生することが知られている。従って、14-HpDHAの20位に水酸基を導入する酵素が存在し、ヒドロペルオキシ体が還元されて14,20-diHDHAが生成するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Tomomi Goto, Daisuke Urabe, Yosuke Isobe, Makoto Arita, Masayuki Inoue. Total synthesis of four stereoisomers of (5Z, 8Z, 10E, 14Z)-12-hydroxy-17, 18-epoxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid and their anti-inflammatory activities. Tetrahedron. 査読有、71, 2015, 8320-8332
DOI: 10.1016/j.tet.2015.08.047
- ② Tomomi Goto, Daisuke Urabe, Koji

Masuda, Yosuke Isobe, Makoto Arita, Masayuki Inoue. Total synthesis of four stereoisomers of (4Z, 7Z, 10Z, 12E, 16Z, 18E)-14, 20-dihydroxy-4, 7, 10, 12, 16, 18-docosahexaenoic acid and their anti-inflammatory activities. J. Org. Chem. 査読有、80, 2015, 7713-7726

DOI: 10.1021/acs.joc.5b01461

- ③ Yoshiyuki Yokokura, Yosuke Isobe, Shinnosuke Matsueda, Ryo Iwamoto, Tomomi Goto, Takeshi Yoshioka, Daisuke Urabe, Masayuki Inoue, Hiroyuki Arai, Makoto Arita. Identification of 14, 20-dihydroxy-docosahexaenoic acid as a novel anti-inflammatory metabolite. J. Biochem. 査読有、156, 2014, 315-321

DOI: 10.1093/jb/mvu044

- ④ Jin Endo, Motoaki Sano, Yosuke Isobe, Keiichi Fukuda, Jing X. Kang, Hiroyuki Arai, Makoto Arita. 18-HEPE, an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages, prevents pressure overload-induced maladaptive cardiac remodeling. J. Exp. Med. 査読有、211, 2014, 1673-1687

DOI: 10.1084/jem.20132011

[学会発表] (計3件)

- ① 磯部 洋輔、有田 誠 オメガ3脂肪酸の抗炎症作用についての包括的メタボローム解析 日本薬学会第135年会 2015年3月26日 神戸学院大学(兵庫県・神戸市)
- ② Yosuke Isobe, Tadafumi Kubota, Hiroyuki Arai, Daisuke Urabe, Masayuki Inoue, Makoto Arita. Identification of novel omega-3 EPA-derived anti-inflammatory mediators using a targeted lipidomics approach. PLM2015, 2015/2/11 京王プラザホテル(東京都・新宿区)
- ③ Yosuke Isobe, Makoto Arita. Identification of EPA-derived anti-inflammatory metabolites using a targeted lipidomics approach. 5th European Workshop on Lipid Mediator, 2014/10/24 イスタンブール(トルコ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 洋輔 (ISOBE, Yosuke)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・基礎科学特別研究員
研究者番号：80724335