

論文の内容の要旨

論文題目 Identification of resolvin E3 as a novel EPA-derived anti-inflammatory lipid mediator

(エイコサペンタエン酸由来の新規抗炎症性代謝物
レゾルビン E3 の同定)

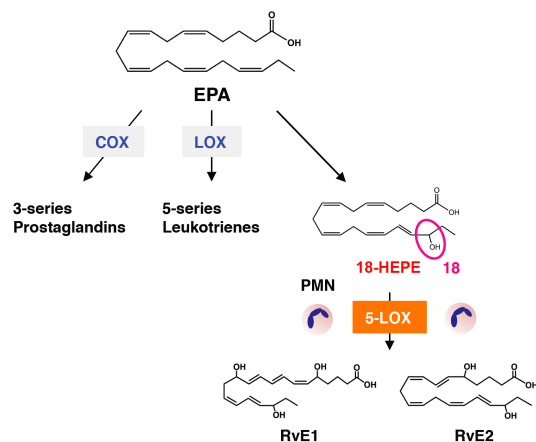
氏名 磯部 洋輔

【序】

エイコサペンタエン酸 (EPA) などの ω 3 系脂肪酸には、古くから抗炎症作用が知られており、その作用機構として ω 3 系脂肪酸が抗炎症性代謝物に変換されて機能する可能性が示されている。これまでに EPA 由来の抗炎症性代謝物として、レゾルビン E1 (RvE1) や RvE2 が同定されているが、これらは共に、EPA の 18 位 (ω 3 位) に水酸基が付加した代謝物である

18-hydroxyeicosapentaenoic acid (18-HEPE) を共通の前駆体とし、好中球の 5-リポキシゲナーゼ (5-LOX) 活性により生成することが知られている (図 1)。このようにレゾルビン生合成系

は 18-HEPE を起点とする ω 3 系脂肪酸に特徴的な代謝経路であり、 ω 3 系脂肪酸に固有の抗炎症機能に関わっている可能性が考えられている。そこで私は、18-HEPE から生成する代謝物について、特に RvE1, E2 以外の活性代謝物の網羅的探索を目指し、高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置 (LC/MS/MS) を用いた包括的メタボローム解析を行った。



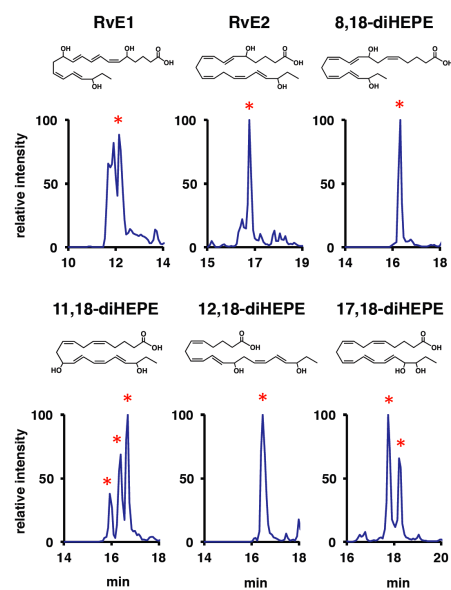
【図1】 EPAの代謝経路
EPAはシクロオキシゲナーゼ (COX) やリポキシゲナーゼ (LOX) によって代謝される他、 ω 3 位に水酸基が付加した 18-HEPE へと代謝される。さらに、18-HEPE は活性化好中球の 5-LOX 活性により、抗炎症性代謝物である RvE1 や RvE2 へと変換される。

1. 18-HEPE 由来の新規代謝物の同定

一般的に脂肪酸由来のメディエーターは非常に微量かつ不安定であり、それらを検出するためには出来る限り夾雑物を除き、バックグラウンドを下げる工夫が必要である。そこでまず、C18 カラムを用いた固相抽出によって、生体サンプルから脂肪酸代謝物を選択的に精製した。また、脂肪酸代謝物は多くの構造異性体を含んでいるため、高解像度の逆相 HPLC の系を組むことでそれらを分離した。さらに、分離した代謝物は三連四重極型 LC/MS/MS を用いた multiple reaction monitoring (MRM) によって検出した。MRM は、特定の分子量イオン及びフラグメントイオンの組み合わせを指定して構造特異的に検出を行う手法である。本研究では特に、EPA の様々なジヒドロキシ体を想定し、それらの構造から予測されるフラグメントイオンの MS 値を用いて仮想 MRM として分析を行うことで、未知代謝物の網羅的な検出を試みた。これまでに、カルシウムイオノフォアによって活性化された好中球が 18-HEPE から RvE1 や RvE2 を産生することが報告されており、私はその他の白血球を用いることで、それ以外の活性代謝物が生成するのではないかと考えた。特に最近の私達の研究から、炎症の収束を促進する細胞として好酸球を見出しており、本研究では好酸球に特に着目して解析を行った。ヒト末梢血から調整した好酸球を、18-HEPE 存在下カルシウムイオノフォア A23187 で刺激し、生成した代謝物を MRM により分析した。その結果、既知の 18-HEPE 代謝物である

RvE1 や RvE2 に加え、8, 18-dihydroxyeicosapentaenoic acid (8, 18-diHEPE)、11, 18-diHEPE、12, 18-diHEPE、17, 18-diHEPE といった新規の代謝物が生成することを見出した (図 2)。一方、ヒト好中球を 18-HEPE と培養した際には、これまでの報告通り RvE1 や RvE2 の生成が認められたものの、新規代謝物の生成はほとんど認められなかった。好酸球は好中球とは異なり、脂肪酸代謝酵素として 12/15-LOX を発現していることが知られている。そこで、好酸球から見出された新規代謝物が 18-HEPE から 12/15-LOX により生成している可能性を考え、12/15-LOX 欠損マウスから好酸球を調整し、検討を行った。

まず野生型マウスの好酸球を 18-HEPE 存在下 A23187 で刺激した結果、ヒト好酸球と同様に RvE1、RvE2 に加え、同定した新規代謝物を生成することが明らかになった。一方、12/15-LOX 欠損マウスの好酸球では、RvE1、RvE2 の産生量は野生型とほぼ同程度であったのに対し、新規代謝物の産生量はいずれも 1/10 以下に減少しており、見出した新規代謝物はいずれも、18-HEPE から 12/15-LOX 依存的に生成することが明らかになった。さらに、HEK293 細胞にマウス



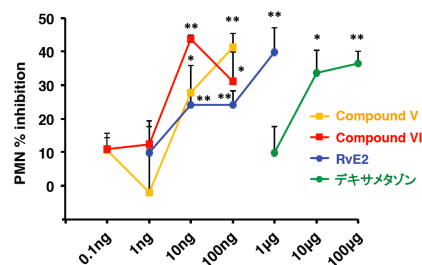
【図2】好酸球から生成する18-HEPE代謝物代謝物のピークを*で示す。ヒト好酸球は18-HEPEからRvE1やRvE2以外に、複数の新規代謝物を生成した。

12/15-LOX やヒト相同分子である 15-LOX を一過性に発現させ、18-HEPE 存在下 A23187 で刺激した際にも新規代謝物の生成が 10~500 倍程度上昇し、これらの代謝物が 18-HEPE から 12/15-LOX (マウス) や 15-LOX (ヒト) により生成する可能性が示唆された。

2. 新規代謝物の合成と活性評価

次に、これら新規代謝物の活性を評価するために、酵素反応による代謝物の合成を行った。15-LOX 活性を有する soybean LOX (sLOX) を用い、18-HEPE と反応させた。生成した代謝物を HPLC により精製し、MS/MS スペクトル及び吸光スペクトルにて構造を解析した結果、見出した新規代謝物のうち 11, 18-diHEPE と 17, 18-diHEPE を 10~30 μ g 程度合成することに成功した。11, 18-diHEPE は 4 種類 (Compound I~IV)、17, 18-diHEPE は 2 種類 (Compound V, VI) の異性体が生成した。

そこでそれらを用いて、ザイモサン誘導マウス腹膜炎モデルによる抗炎症活性の評価を行った。その結果、特に 17, 18-diHEPE である Compound V と VI に、わずか 10 ng の尾静脈投与という低用量で炎症初期の好中球の浸潤を約 40%抑制する活性が認められた (図 3)。また、この活性は 1ng から 100ng にかけて用量依存的であり、RvE2 やステロイド系抗炎症薬であるデキサメタゾンと比べてもかなりの低用量での抗炎症作用が認められた (図 3)。



【図3】 17,18-diHEPEの好中球浸潤抑制作用 (ザイモサン腹膜炎)
17,18-diHEPEであるCompound VとVIは、10-100 ngの投与量で用量依存的に好中球の浸潤抑制作用を示す。mean \pm S.E. n = 3-12, *P < 0.05, **P < 0.01

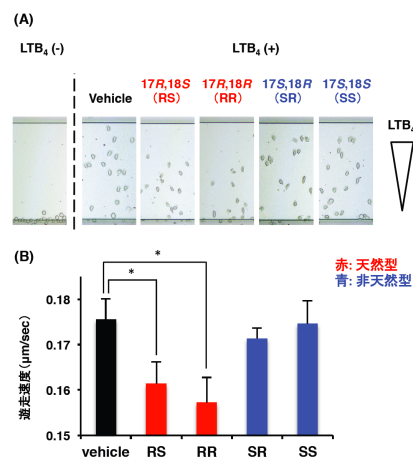
さらに、17, 18-diHEPE の好中球に対する直接作用について検討を行った。化合物の存在下、好中球の遊走因子であるロイコトリエン B₄ (LTB₄) に対する細胞遊走を評価した。その結果、17, 18-diHEPE は 10 nM で好中球の LTB₄ に対する遊走速度を有意に低下させる作用を示した。

3. RvE3 の構造決定及び構造活性相関

次に、17, 18-diHEPE の立体構造の決定を試みた。酵素により合成した 17, 18-diHEPE について ¹H NMR の測定を行ったところ、17, 18-diHEPE に存在するオレフィンの geometry について、Compound V, VI 共に 5Z, 8Z, 11Z, 13E, 15E であることが明らかになった。また、Compound V 及び VI はラセミ体である 18R/S-HEPE と sLOX により生成したので、有機合成によって得られた 18S-HEPE 及び 18R-HEPE を基質として sLOX との反応を行った。その結果、18S-HEPE からは Compound V が、18R-HEPE からは Compound VI が選択的に生成した。以上より、Compound V は 17, 18S-diHEPE、Compound VI は 17, 18R-diHEPE であることが明らかになり、それぞれ 18S-レゾルビン E3 (18S-RvE3)、18R-RvE3 と命名した。さらに、有機合成により 17 位と 18 位の不斉炭素の立体配置について全ての組み合わせ (17S, 18S-, 17R, 18S-, 17S, 18R-, 17R, 18R-diHEPE)

の RvE3 異性体を合成し、酵素的に生成する RvE3 と LC の保持時間を比較することで、RvE3 の構造を 17*R*, 18*S*-diHEPE (18*S*-RvE3) 及び 17*R*, 18*R*-diHEPE

(18*R*-RvE3) として決定した。また、酵素的に生成した 18*S*-, 及び 18*R*-RvE3 は共に、マウスの炎症浸出液を MRM により分析することで見出されたピークと保持時間が完全に一致した。そこで次に、有機合成により得られた天然型 (17*R*, 18*S*-diHEPE と 17*R*, 18*R*-diHEPE) 及び非天然型 (17*S*, 18*R*-diHEPE と 17*S*, 18*S*-diHEPE) の RvE3 異性体を用いて、好中球の遊走抑制作用を指標に構造活性相関の解析を行った。その結果、天然型の RvE3 にのみ好中球の遊走速度を有意に抑制する作用が認められた (図 4)。

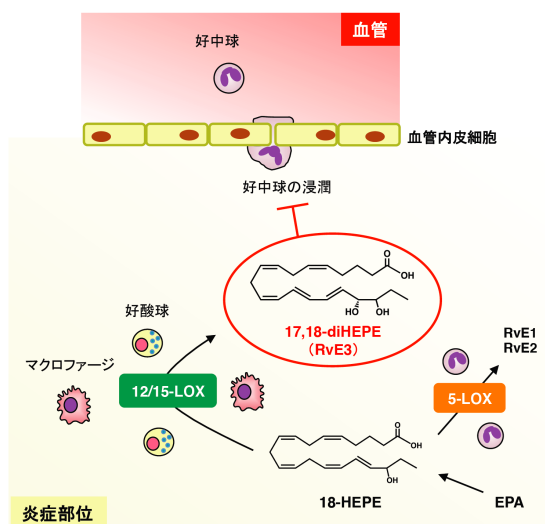


【図4】 RvE3異性体の構造活性相関
ロイコトリエン₄(LTB₄)のグラジエントに対する好中球の遊走30分後の写真(A)、及び、この時の好中球の遊走速度(B)。
mean ± S.E. n = 15, *P < 0.05

【まとめ】

以上、EPA 由来の抗炎症性代謝物として RvE3 を新規に同定した (図 3)。RvE3 は in vivo 急性炎症モデルにおいて ng レベルの低用量で好中球の浸潤を抑制し、in vitro においても nM レベルで好中球の遊走を抑制した。好中球の過剰な集積は、炎症を基盤とする多くの病態の形成と関連すると考えられており、RvE3 はそうした好中球性の組織障害や病態に対し有効である可能性が考えられる。

18-HEPE から 5-LOX 活性によって生成する RvE1 や RvE2 と異なり、RvE3 は 12/15-LOX (マウス) や 15-LOX (ヒト) という新たな代謝経路により生成する可能性が考えられた。また、RvE3 における 17 位の炭素の立体配置は *R* であることが明らかになった。12/15-LOX や 15-LOX が 18-HEPE の 13 位の炭素から位置選択的かつ立体選択的に水素の引き抜き、及び酸素分子の付加を行うことで、17*R* 型の RvE3 が選択的に生成するものと考えられた。さらに、好中球の遊走抑制作用は天然型 (17*R* 型)



【図5】 本研究のまとめ
RvE3は炎症部位において、18-HEPEから好酸球やマクロファージなどに発現する12/15-LOXにより生成し、好中球の浸潤を抑制することで積極的に抗炎症作用を発揮している可能性が考えられる。

の RvE3 にのみ認められ、好中球には天然型 RvE3 の構造を特異的に認識する機構が存在する可能性が示唆された。本研究において見出した RvE3 を含め、レゾルビン は EPA の 18 位 (ω 3 位) に水酸基が付加した 18-HEPE を前駆体としており、 ω 3 位の酸化を起点とした代謝が ω 3 系脂肪酸の抗炎症作用の発揮に重要である可能性が考えられた。