

論文の内容の要旨

論文題目

Functional analysis of docosahexaenoic acid metabolism in skeletal muscle injury and regeneration

(骨格筋の損傷・再生過程における
ドコサヘキサエン酸代謝経路の機能解析)

氏名 松枝 進之介

【序】

骨格筋は優れた再生能を持つ組織であり、傷害を受けた後に速やかに回復する。近年、骨格筋の損傷に伴って生じる炎症応答が筋再生を促進することが報告され、筋再生の制御因子として炎症関連分子の関与が示唆されている。一般に局所での炎症反応の調節には各種サイトカインやケモカインに加え、プロスタグランジンやロイコトリエンに代表される脂質メディエーターが中心的な役割を果たしているが、骨格筋の損傷・再生過程でどのような脂質メディエーターが産生され、機能するかについての包括的な理解は不十分であった。興味深いことに骨格筋はリン脂質中にドコサヘキサエン酸 (DHA) が豊富に含まれる組織であり、筋組織には特有の脂肪酸代謝系が存在する可能性が考えられた。そこで私は、高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー (LC-MS/MS) 技術を用いた脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析を行い、マウス筋損傷モデルにおいて産生される脂肪酸代謝系の全体像を俯瞰し、その機能的役割を明らかにしようと試みた。

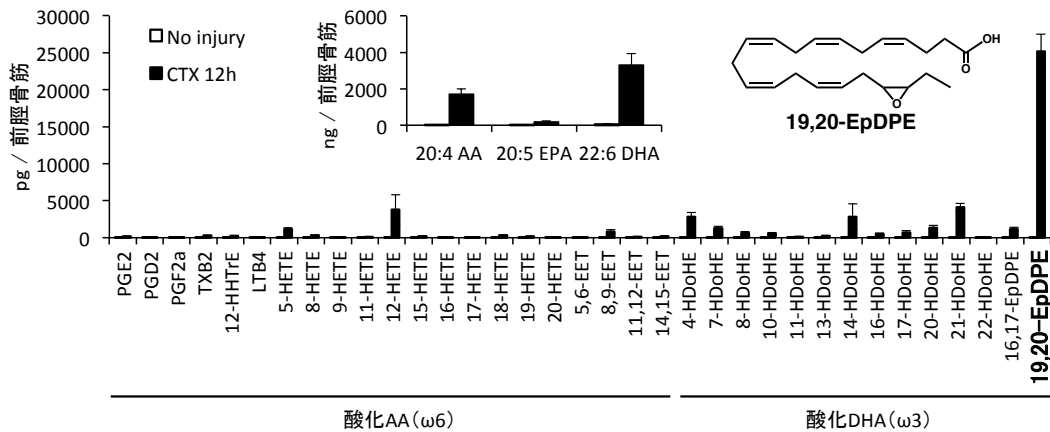
【方法と結果】

1. 損傷初期の筋組織に DHA 由来代謝物 19,20-EpDPE が豊富に産生される

筋損傷を誘発する薬剤カルジオトキシン (CTX) をマウス前脛骨筋に投与した後、経時的に損傷筋を採取して損傷・再生の進行に伴って産生される脂肪酸代謝物を LC-MS/MS で測定した。

その結果、損傷初期の CTX 投与 12 時間後をピークとして ω 3 系の DHA や ω 6 系のアラキドン酸 (AA) などの遊離脂肪酸量が顕著に増加しており、それらの代謝物に着目すると DHA の ω 3 二重結合がエポキシ化された代謝物 19,20-Epoxyeicosapentaenoic acid (19,20-EpDPE) が豊富に産生されることが明らかになった (図 1)。19,20-EpDPE については、血管新生に対する抑制作用など生理活性が報告されているが、筋損傷・再生過程における役割は明らかになっていない。そこで私は骨格筋における本代

謝経路の産生細胞・生合成経路を明らかにし、内因性に産生される 19,20-EpDPE の機能的役割の解明を目指した。



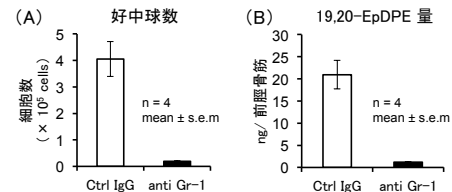
【図 1】
CTX 投与 12 時間後の損傷筋に含まれる脂肪酸、及び代謝物の量。初期の損傷筋では DHA 代謝物である 19,20-EpDPE が豊富に産生される。
(n=4, mean±sem)

2. 損傷筋に浸潤する好中球は 19,20-EpDPE を産生する

19,20-EpDPE の産生は好中球浸潤が認められる炎症初期に顕著であったことから、産生細胞の候補として好中球が考えられた。そこで好中球に発現する表面抗原 Gr-1 に対する抗体を投与し、筋組織に浸潤する好中球を除去することで 19,20-EpDPE の産生に対する好中球の関与を調べた。

その結果、抗 Gr-1 抗体の投与によって基質である DHA の量に変化はない一方で 19,20-EpDPE の産生量は顕著に減少した (図 2A, B)。

また、マウス骨髄から単離した好中球に DHA を加え、incubation した細胞懸濁液から脂肪酸代謝物を抽出して解析したところ、19,20-EpDPE の選択的な産生が認められた (図 3B)。



【図 2】
(A) 抗 Gr-1 抗体投与による損傷筋に浸潤する好中球の除去
(B) 抗 Gr-1 抗体の投与により損傷筋中の 19,20-EpDPE 量は減少する

以上から、骨格筋の損傷時に組織へ浸潤する好中球が、筋組織から遊離した DHA を基質として局所で 19,20-EpDPE を産生することが示唆された。

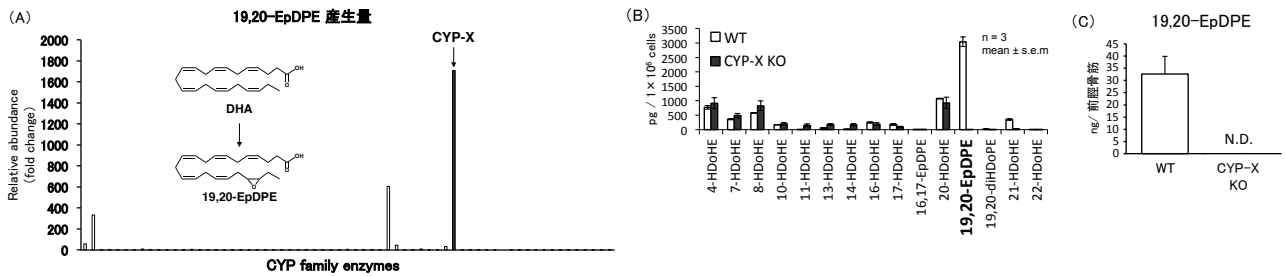
3. 好中球に発現する CYP が 19,20-EpDPE の産生酵素である

アラキドン酸や DHA などの多価不飽和脂肪酸に含まれる二重結合をエポキシ化する酵素としてシトクロム P450 (CYP) ファミリーの酵素が知られている。マウスのゲノムには CYP をコードする遺伝子が 102 種存在するが、DHA から 19,20-EpDPE を産生する活性を持つ酵素の全容は不明であった。

当研究室では CYP の簡便な活性評価系として、特定の CYP を過剰発現させた HEK293 細胞に対して基質を加え、incubation 後の上清に含まれる代謝物の量を LC-MS/MS で定量することで酵素活性を評価する系を構築している。現在まで約 70 種の CYP の活性を評価した結果、DHA から 19,20-EpDPE を産生する活性を持つ酵素 CYP-X を同定した (図 3A)。CYP-X は好中球などの骨髄系細胞に高発現しており、骨格筋損傷時の 19,20-EpDPE 産生に関与している可能性が示唆された。

そこで CYP-X KO マウスを用いた解析を行ったところ、CYP-X KO マウス由来の好中球では DHA を添加した際の 19,20-EpDPE 産生が完全に消失しており (図 3B)、さらに CYP-X KO マウスでは CTX 投与 12 時間後の損傷筋に含まれる 19,20-EpDPE 量が顕著に減少していた (図 3C)。以上の結果から、骨格

筋の損傷時において好中球の CYP-X が、DHA から 19,20-EpDPE を局所で産生する主要な酵素であることが明らかになった。



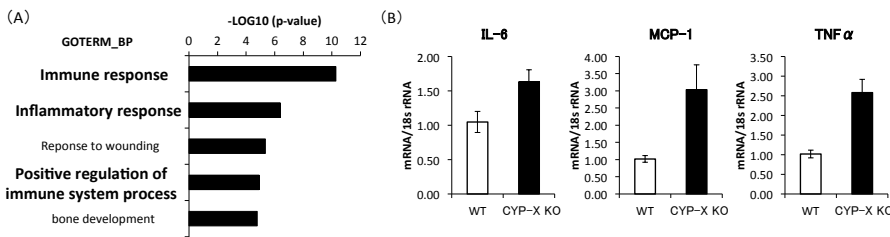
【図 3】

(A) CYP-X を過剰発現した HEK293 細胞では 19,20-EpDPE 産生活性が顕著に上昇する
 (B) WT 及び CYP-X KO マウス骨髄由来好中球が産生する DHA 代謝物
 (C) CTX 12h 後の WT 及び CYP-X KO マウス損傷筋に含まれる 19,20-EpDPE 量 (n=3, mean±sem)

4. CYP-X KO マウスの損傷筋では炎症関連遺伝子の発現が上昇する

CYP-X 欠損マウスでは筋損傷に伴う 19,20-EpDPE の産生が大きく減弱していたことから、私は本代謝経路の生理的意義を明らかにするべく CYP-X KO マウスを用いた筋損傷モデルの解析を行った。

WT 及び CYP-X 欠損マウスに CTX を投与して損傷を惹起した後、経時的に採取した筋組織から RNA を抽出し、次世代シーケンズにより両マウスの遺伝子発現変動を網羅的に解析した。CTX 投与後 Day1 において CYP-X KO マウスで WT マウスに比べて発現上昇していた遺伝子群の生物学的機能を Gene Ontology (GO) 解析によって調べたところ、免疫応答や炎症応答に関連する遺伝子の変動が顕著であることが明らかになった (図 4A)。そこで、炎症関連遺伝子の mRNA 発現量を RT-PCR 法により調べたところ、CYP-X KO マウスでは炎症性サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現量の上昇が観察された (図 4B)。一方で好中球やマクロファージ (MΦ) など損傷後、筋組織に浸潤する炎症細胞の数には WT マウスと CYP-X KO マウスの間に変化は認められなかったことから、CYP-X KO マウスではこれら炎症細胞におけるサイトカイン、ケモカインの遺伝子発現が上昇している可能性が考えられた。



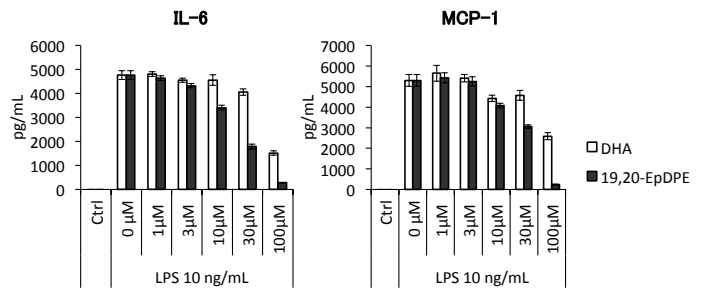
【図 4】

(A) CTX Day1 の CYP-X KO マウスで発現上昇する遺伝子群の GO 解析結果
 (B) 炎症性サイトカイン、ケモカインの遺伝子発現が CYP-X KO マウスでは上昇する。(n = 5, mean±sem)

5. 19,20-EpDPE は MΦ に対する抗炎症活性を有する

CYP-X KO マウスの損傷筋では炎症関連遺伝子の発現が上昇していたことから、CYP-X の代謝産物である 19,20-EpDPE が炎症反応を負に制御している可能性が示唆された。そこで損傷初期の筋組織に存在する主要な炎症性細胞の一つである MΦ に着目して、MΦ の炎症応答に対する 19,20-EpDPE の作用を検討した。

thioglycolate 投与によって誘導した MΦ をマウス腹腔から回収して 19,20-EpDPE を処理し、LPS



【図 5】

Thioglycolate で誘導した腹腔 MΦ の LPS 刺激依存的な IL-6, MCP-1 産生に対する 19,20-EpDPE と DHA の抗炎症活性

による炎症性刺激を与えた後の上清中の炎症性サイトカイン量を ELISA 法によって評価したところ、19,20-EpDPE の処理によって濃度依存的に細胞上清中の IL-6, MCP-1 量が減少していた。また、19,20-EpDPE の前駆体である DHA に同様の抗炎症活性が報告されていたことから両者の作用を比較すると、19,20-EpDPE は DHA より低濃度で強い抗炎症活性を持つことが明らかになった (図 5)。

以上の結果より、損傷初期の筋組織では CYP-X を介した 19,20-EpDPE 産生が DHA の抗炎症活性を増強することで MΦ の炎症応答を負に制御する可能性が示唆された。

【まとめと考察】

本研究において私は、骨格筋の損傷に伴って組織に浸潤する好中球が CYP-X を介して DHA から 19,20-EpDPE を産生し、筋損傷初期の炎症応答を負に制御していることを明らかにした。

損傷を受けた筋組織に浸潤する炎症細胞は壊死組織をクリアランスするとともに、筋線維の前駆細胞である筋衛星細胞の増殖・分化を促進する種々の因子を産生することが知られている。一方で、過剰な炎症応答は組織の傷害を引き起こすことから、損傷初期の炎症応答が適切にコントロールされることは、その後の骨格筋の再生において重要な過程であると考えられる。今回新たに見出された CYP-X を介する DHA 代謝系は、骨格筋の損傷時に組織の恒常性を維持する重要なメカニズムである可能性が考えられる。