

皮膚アレルギーを制御する ω 3由来脂肪酸メディエーターの 産生・作用機構の解明

東京大学大学院薬学系研究科

河野 望

Allergic diseases such as atopic dermatitis and asthma are becoming very common in developed countries. Allergy is associated with increased serum IgE levels and mast cell activation. Association of an antigen with IgE on the mast cell surface causes cross-linking of the high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI), leading to exocytosis of granule-associated mediators and proteases (degranulation) as well as new synthesis of cytokines and lipid mediators. Therefore, uncovering molecular mechanisms that regulate mast cell activation could provide crucial insights into the pathophysiology of mast cell-associated diseases. We recently found that omega-3 fatty acid epoxides are produced in mast cells dependently of PAF-AH (II), an oxidized phospholipid-selective phospholipase A2 and are critical for proper IgE-mediated mast cell activation. In this study, we demonstrated that PAF-AH (II) preferentially hydrolyzed omega-3 epoxide-containing phospholipids in mast cell membrane to liberate omega-3 epoxides. We also identified Cyp4a12a and Cyp4a12b as enzymes involved in the epoxidation of omega-3 fatty acids in mast cells. We further revealed that the omega-3 epoxides promoted IgE-mediated activation of mast cells by downregulating Srcin1, a Src-inhibitory protein that counteracts Fc ϵ RI signaling. Thus, the Cyp4a12-PAF-AH (II)-omega-3 epoxide-Srcin1 axis presents new potential drug targets for allergic diseases.

1. 緒言

アトピー性皮膚炎に代表されるアレルギー疾患は、先進諸国において罹患率が過去20年間で2-3倍に急増しており、大きな社会問題となっている。マスト細胞はアレルギー反応において中心的な役割を担う免疫細胞であり、免疫グロブリンE (IgE)によって感作されたマスト細胞が抗原刺激を受けると、脱顆粒を引き起こし、ヒスタミン、脂質メディエーター、サイトカインなどの炎症性物質を放出する。これまでに、抗原刺激を受けたマスト細胞が脱顆粒に至るまでの細胞内シグナル伝達経路は非常によく研究されているものの、このマスト細胞活性化シグナルを調節する因子については、未解明の部分が多い。

私は、これまでに生体膜リン脂質の酸化防御に関する研究に従事してきた¹⁻⁴⁾。その中で、酸化リン脂質に選択的なホスホリパーゼであるPAF-AH(II)のノックアウト(KO)マウスを樹立し、PAF-AH(II)が酸化リン脂質を分解することにより、過度な酸化ストレスによる組織障害に対する防御機構として機能することを示してきた。最近、このKOマウスでは、皮膚アレルギー反応が減弱していることを見だし、さらにPAF-AH(II)はマスト細胞においてEPAやDHAといった ω 3脂肪酸がエポキシ化された酸化脂肪酸を選択的に産生し、マスト細胞活性化を正に制御し

ているという、まったく予想外な現象を捉えた。すなわち、PAF-AH(II)が単なる酸化リン脂質の消去酵素ではなく、新規の生理活性酸化脂肪酸の産生酵素であることが示唆された。

本研究では、マスト細胞機能を制御するエポキシ ω 3脂肪酸の産生機構、エポキシ ω 3脂肪酸の作用機構を解明することを目的とした。

2. 方法

骨髄由来マスト細胞は、マウス骨髄細胞をIL3存在下で培養することにより得た。骨髄由来マスト細胞の活性化はIgEと抗原(ジニトロフェニル化ヒト血清アルブミン)により刺激後、 β ヘキソサミニダーゼの放出を常法に従い検出した。骨髄由来マスト細胞におけるSrcin1のRNAiはSrcin1に対するshRNAを発現するレトロウイルスを感染させることによりおこなった。エポキシ ω 3脂肪酸およびエポキシ脂肪酸を持つリン脂質の測定にはUHPLC-QTRAP4500を用いた。エポキシ ω 3脂肪酸含有リン脂質の分解アッセイは、エポキシ ω 3脂肪酸含有リン脂質を含む培養マスト細胞膜画分にリコンビナントPAF-AH(II)を作用させることによりおこなった。Cyp4a12a/b二重欠損マウスはCyp4a12a/bに対するsgRNAとCas9 mRNAを受精卵にインジェクションすることにより得た。

3. 結果

3.1 エポキシ ω 3脂肪酸含有リン脂質の測定系の確立

エポキシ脂肪酸を持つリン脂質の高感度な検出・定量系をUHPLC-MS/MSを用いて構築した。その結果、マスト細胞からエポキシ ω 3脂肪酸を含有するリン脂質分子種を複数検出することに成功した(図1)。またマスト細胞のり



The mechanisms of production and action of omega-3-derived fatty acid mediators regulating skin allergy

Nozomu Kono

Graduate School of Pharmaceutical Science, the University of Tokyo

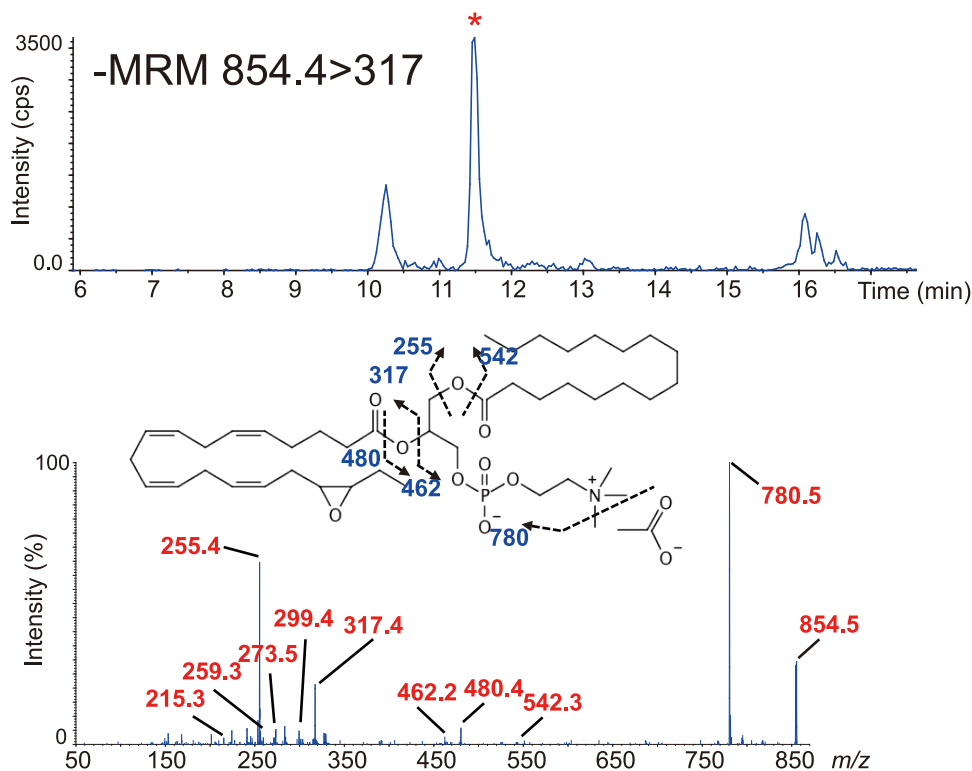


図1 マスト細胞におけるエポキシ ω 3 脂肪酸含有リン脂質の検出
 (上) エポキシ ω 3 脂肪酸含有リン脂質(1-palmitoyl-2-17, 18-EpETE PC)を検出するMRMチャネルのイオンクロマトグラム。
 (下) *でしめしたピークのMS/MSスペクトル。

ン脂質画分中のエポキシ ω 3 脂肪酸を定量したところ、リン脂質中に含まれる全 ω 3 脂肪酸の1%程度がエポキシ ω 3 脂肪酸であることが明らかとなった。

3.2. PAF-AH (II) によるエポキシ ω 3 脂肪酸含有リン脂質の分解

培養マスト細胞にエポキシ ω 3 脂肪酸を添加すると、すみやかに膜画分に取り込まれ、エポキシ ω 3 脂肪酸を含有するリン脂質が産生される。このようなエポキシ ω 3 脂肪酸を含有するリン脂質に富む脂質膜にリコンビナントPAF-AH (II) を *in vitro* で作用させたところ、エポキシ ω 3 脂肪酸を含有するリン脂質が減少し、遊離エポキシ ω 3 脂肪酸の増加がみられた。一方、酵素活性を失ったPAF-AH (II)^{S234C} 変異リコンビナントではそのような活性はみられなかった(図2)。

3.3. エポキシ ω 3 脂肪酸を持つリン脂質の産生酵素の同定

ω 3 脂肪酸のエポキシ化には複数のシトクロームP450 (CYP) が関わるということが知られており、CYP2とCYP4ファミリーの中には脂肪酸を基質とするものが多く存在する⁵⁾。実際、培養マスト細胞にCYP阻害剤を添加したところ、CYP4 選択的阻害剤HET0016を添加したときに、エポキシ ω 3 脂肪酸を持つリン脂質が顕著に減少した。そこで、

培養マスト細胞のマイクロアレイデータから、マスト細胞に発現しており ω 3 脂肪酸のエポキシ化に関わる可能性のあるCYPを探索したところ、PAF-AH (II)の組織分布と非常に良く似た分布を示すCyp4a12a、Cyp4a12bを見出した。Cyp4a12aおよびCyp4a12bをそれぞれ培養細胞に発現させたところ、添加した ω 3 脂肪酸からエポキシ ω 3 脂肪酸への変換が顕著に増加した。Cyp4a12a、Cyp4a12bはアミノ酸レベルで98%以上の相同性を示し、ゲノム上で100 kb以内に近接して存在している。そこで、CRISPR/Cas9法によりCyp4a12a/bの二重欠損マウスを作成したところ、二重欠損マウス由来の培養マスト細胞ではエポキシ ω 3 脂肪酸の産生の顕著な減少がみられた。

3.4. エポキシ ω 3 脂肪酸によるマスト細胞活性化促進の作用メカニズムの解明

PAF-AH (II) KOマウス由来の培養マスト細胞にエポキシ ω 3 脂肪酸を添加すると、IgE/抗原刺激時の脱顆粒能が回復する。この作用はIgE/抗原刺激の直前の添加ではみられず、添加から24時間以上の時間が必要である。このことから、エポキシ ω 3 脂肪酸は遺伝子発現を介してマスト細胞機能を制御していることが示唆された。そこで、脂肪酸をリガンドとする核内受容体であるペロキシソーム増殖因子活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated

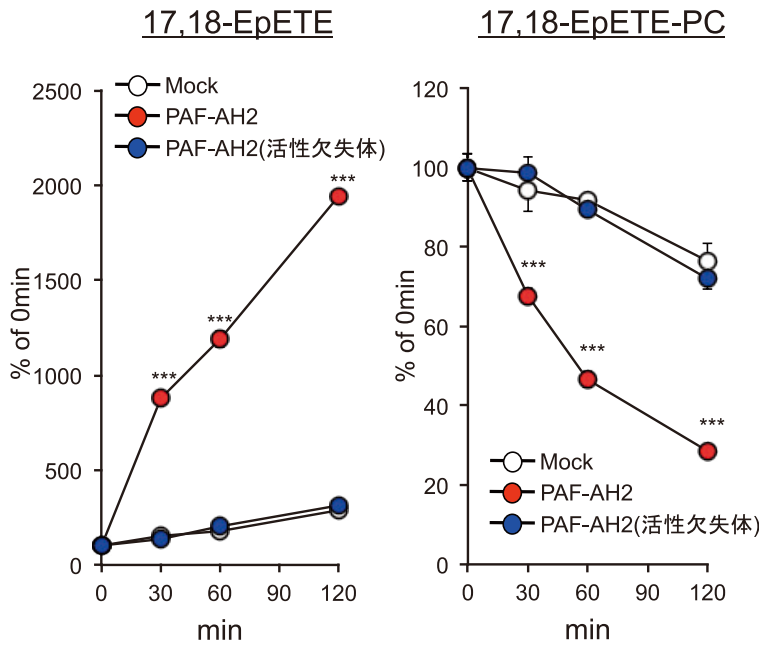


図2 PAF-AH(II)によるエポキシ ω 3脂肪酸含有リン脂質の分解
 (左) PAF-AH(II)による17,18-EpETEの産生。
 (右) *PAF-AH(II)によるエポキシ ω 3脂肪酸含有リン脂質の分解。
 *** $p < 0.001$ 。

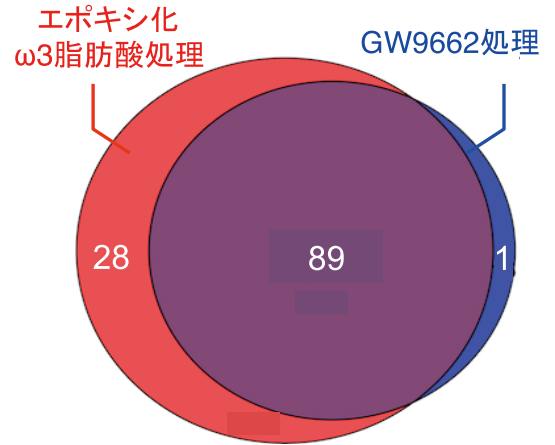


図3 エポキシ ω 3脂肪酸とPPAR γ アンタゴニストGW9662で共通の遺伝子が発現減少する。

receptor, PPAR)に着目し、PPARの各種アゴニスト、アンタゴニストの添加実験をおこなったところ、PAF-AH(II) KOマウス由来のマスト細胞にPPAR γ のアンタゴニスト(GW9662)を添加したときに、脱顆粒能が野生型マウスと同程度まで回復した。次にエポキシ ω 3脂肪酸およびGW9662をそれぞれ処理したPAF-AH(II) KOマスト細胞の遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイにより比較したところ、GW9662で1/4以下に発現が低下した遺伝子群のほとんどがエポキシ ω 3脂肪酸によっても1/4以下に発現低下していることがわかった(図3)。発現低下した遺伝子の内、Srcin1 (Src kinase signaling inhibitor 1)に着目した。Srcin1はSrcとCsk (carboxy-terminal src kinase)に結合する足場タンパク質であり、CskはSrcin1を介してSrcと結合することにより、SrcのC末端のチロシンをリン酸化し、Srcを不活化する⁶⁾。SrcファミリーキナーゼであるLynやFynはマスト細胞のIgE/抗原刺激時の活性化に必須であること、Srcin1はPAF-AH(II) KOマスト細胞で発現上昇しており、エポキシ ω 3脂肪酸によってそれが抑えられたことから、Srcin1がエポキシ ω 3脂肪酸の作用に関与する可能性が考えられた。そこでPAF-AH(II) KOマスト細胞においてSrcin1を発現抑制したところ、KOマスト細胞の活性化不全がWTレベルまで回復した(図4)。

4. 考察

エポキシ ω 3脂肪酸の産生において、PAF-AH(II)とCyp4a12a/bの重要性が明らかとなった。マスト細胞にお

いて、まずCyp4a12a/bにより ω 3脂肪酸からエポキシ ω 3脂肪酸が生成し、一旦膜リン脂質に取り込まれた後、PAF-AH(II)により切り出され、生理活性を発揮していると考えられる。エポキシ ω 3脂肪酸がなぜ一旦膜リン脂質に取り込まれるのかは不明であるが、エポキシ ω 3脂肪酸の安定性向上や代謝回転の重要性が関係しているかもしれない。リポキシゲナーゼの中には遊離脂肪酸のみならず、リン脂質に結合した脂肪酸も基質にするものも存在することから⁷⁾、Cyp4a12a/bがリン脂質中の ω 3脂肪酸を直接エポキシ化している可能性もある。

またエポキシ ω 3脂肪酸は、Srcin1の遺伝子発現抑制を介してマスト細胞の活性化を促進しているという、エポキシ ω 3脂肪酸の作用機構の1つが明らかとなった。PPAR γ のアンタゴニストGW9662はエポキシ ω 3脂肪酸と同様の効果を示したが、エポキシ ω 3脂肪酸はPPAR γ レポーターアッセイにおいて、PPAR γ の活性化を抑制できなかった。したがって、エポキシ ω 3脂肪酸はPPAR γ の直接のアンタゴニストとして働いているのではなく、別の標的分子があることが示唆された。核内受容体のなかには未だリガンドが不明なものが数多く存在しており⁸⁾、それらの中にエポキシ ω 3脂肪酸をリガンドとするものがあるのかもしれない。

5. 総括

本研究から、エポキシ ω 3脂肪酸の産生におけるPAF-AH2の重要性が明らかとなり、エポキシ ω 3脂肪酸が酸化

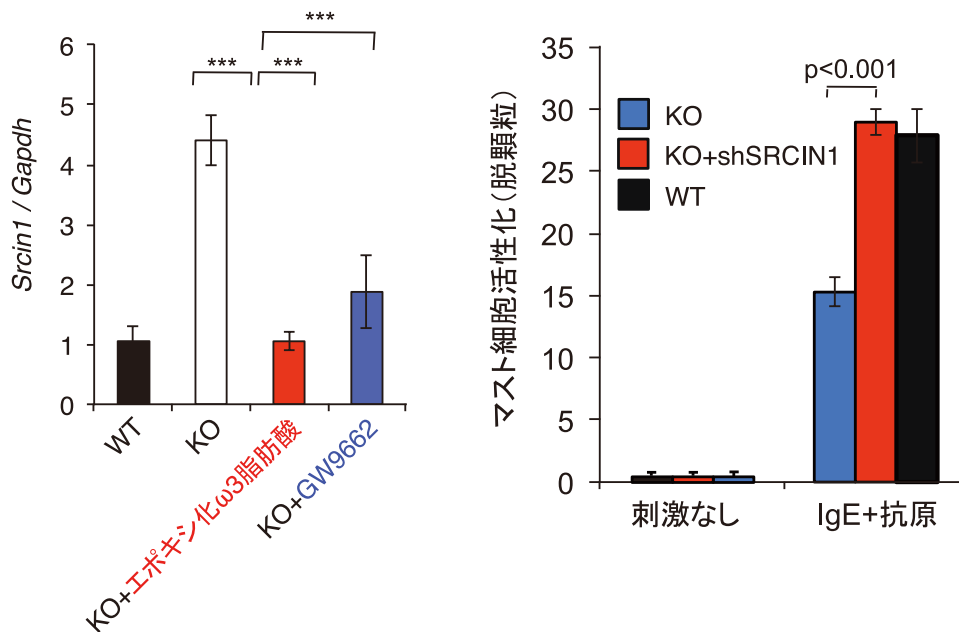


図4 Srcin1 はエポキシ ω 3 脂肪酸のエフェクターである。
 (右) Srcin1 の定量PCR。(左) Srcin1 発現抑制によるPAF-AH (II) KO マスト細胞活性化不全の回復。*** $p < 0.001$

リン脂質を介して産生されるという、従来のアラキドン酸カスケードとは異なる脂肪酸メディエーターの産生経路の存在が示唆された⁹⁾。本経路はマスト細胞を賦活化しており、本研究の成果は、皮膚アレルギーを制御する新たな方法論の開発等へ貢献できると期待される。

(引用文献)

- 1) Kono N, Arai H. Intracellular Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase, Type II: A Unique Cellular Phospholipase A2 That Hydrolyzes Oxidatively Modified Phospholipids. *Enzymes*. 38:43-54, 2015.
- 2) Kono N, Arai H. Intracellular transport of fat-soluble vitamins A and E. *Traffic*. 16(1):19-34, 2015.
- 3) Kono N, Ohto U, Hiramatsu T, Urabe M, Uchida Y, Satow Y, Arai H. Impaired α -TTP-PIPs interaction underlies familial vitamin E deficiency. *Science*. 340(6136):1106-10, 2013.
- 4) Kono N, Inoue T, Yoshida Y, Sato H, Matsusue T, Itabe H, Niki E, Aoki J, Arai H. Protection against oxidative stress-induced hepatic injury by intracellular type II platelet-activating factor acetylhydrolase by metabolism of oxidized phospholipids in vivo. *J Biol*

- Chem. 283(3):1628-36, 2008.
- 5) Arnold C, Konkel A, Fischer R, Schunck WH. Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Rep*. 62(3):536-47, 2010.
- 6) Cabodi S, del Pilar Camacho-Leal M, Di Stefano P, Defilippi P. Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer*. 10(12):858-70, 2010.
- 7) Ivanov I, Kuhn H, Heydeck D. Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). *Gene*. 573(1):1-32, 2015.
- 8) Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci*. 116(Pt 4):585-6, 2003.
- 9) Shimanaka Y, Kono N, Taketomi Y, Arita M, Okayama Y, Tanaka Y, Nishito Y, Mochizuki T, Kusuhara H, Adibekian A, Cravatt BF, Murakami M, Arai H. Omega-3 fatty acid epoxides are autocrine mediators that control the magnitude of IgE-mediated mast cell activation. *Nat Med*. 23(11):1287-1297, 2017.