

申請者	学科名	栄養学科	職名	教授	氏名	高橋 吉孝
調査研究課題	リポキシゲナーゼ経路を標的とした慢性炎症性疾患の新規治療法の開発を目指す基礎研究					
調査研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	高橋 吉孝	教授	病態生化学	研究総括・酵素活性測定	
	分担者	川上 祐生 森 香子 大河内脩史	助教 博士後期課程保健福祉科学専攻・1年生 博士前期課程栄養学専攻・修士1年生	脂質生化学 栄養学 基礎栄養学	機能性成分有効性評価 免疫染色、細胞培養実験 動物実験 変異型単鎖抗体作成、酵素免疫測定	
調査研究実績の概要	<p>リポキシゲナーゼは、アラキドン酸に酸素分子を添加して過酸化脂質を生成する酵素で、酸素添加部位の異なる複数の 5-, 8-, 12-, 15-リポキシゲナーゼが知られている。5-リポキシゲナーゼは強力な炎症性メディエーターであるロイコトリエンの生成に関わる酵素である。生成したロイコトリエンは特異的受容体と結合して、気管支喘息のような急性炎症性疾患のみならず、肺線維症のような慢性炎症性疾患の病態形成にも重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。また、動脈硬化の発症に関わることが明らかにされてきた 12-リポキシゲナーゼは、近年の国内外の研究で、慢性炎症性疾患である非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の病態形成に関わることがノックアウトマウスなどの実験で示唆されている。</p> <p>我々は、これまでの研究で、ロイコトリエンの作用を特異的に中和する抗ロイコトリエン抗体の気管支喘息への有効性を証明してきた (Kawakami Y et al. Biochim. Biophys. Acta 2014)。また、12-リポキシゲナーゼ阻害成分を含むグアバ茶が動脈硬化の予防に有効であることを示し、有効成分の構造決定を行った (Takahashi Y et al. Food Chem 2015)。リポキシゲナーゼならびにその生成物の慢性炎症性疾患における役割のさらなる解明を目指し、これらを標的とする新規治療法を開発することを最終目的とし、本年は NASH の病態形成に関わる 12-リポキシゲナーゼの同定と、肺線維症に有効な抗ロイコトリエン単鎖抗体の開発のための基礎的治験として、部位特異的変異法を用いた抗原結合部位の構造解明を進めた。さらに、ゴボウ葉の抗炎症効果に関する論文に基づいて、ゴボウ葉抽出物中に抗炎症成分が含まれることを見出し、その単離と構造決定を行った。</p> <p>1. NASH の病態形成に関わる 12-リポキシゲナーゼアイソザイムの同定</p> <p>マウスを一週間、普通固形飼料で予備飼育を行った後、メチオニン・コリン欠損 (MCD) 食を自由に摂取させて NASH モデルマウスを作成し、継時的に肝の組織切片を作成して、脂肪蓄積、炎症細胞の浸潤、線維化の観察を行うとともに、肝から RNA を調整し、炎症マーカーとして TNF-α mRNA の発現量をリアルタイム PCR で測定した。TNF-α mRNA は MCD 食摂取開始後 4~6 週で上昇していたが、肝の線維化は 6~8 週後に起こっていた。一方 12-リポキシゲナーゼ活性は経時的に上昇したが、6 週以降での上昇が有意であったことから、本酵素は炎症そのものの増悪よりも線維化に関わることが示唆されていた。この時期に有意に上昇していた 12-リポキシゲナーゼ mRNA のアイソザイムは白血球型であったが、2~3 倍の上昇に留まっており、活性の上昇の程度を考えると、必ずしも一致していなかった。そこで、この 12-リポキシゲナーゼによるアラキドン酸代謝物の還元後のプロファイルを詳細に分析したところ、12-ヒドロキシ酸と不明のヒドロキシ酸と思われる化合物のみで、白血球型 12-リポキシゲナーゼの代謝物で認められる 15-ヒドロキシ酸が観察されないことに気づいた。酵素活性はサイトゾルに存在し、生成する 12-ヒドロキシ酸はすべて S 体であった。現在、この 12-リポキシゲナーゼアイソザイムの同定を進めている。</p>					

<p>調査研究実績の概要</p>	<p>2. ロイコトリエンE₄への親和性が高い抗ロイコトリエンC₄単鎖抗体の部位特異的変異体の作成</p> <p>ロイコトリエンC₄(LTC₄)は分子内にグルタチオンを有し、ここから順次グルタミン酸、グリシンが外れてLTD₄、LTE₄となる。これまでの研究で、抗LTC₄モノクローナル抗体のリガンド認識機構解明に向け、X線結晶解析に基づき抗LTC₄単鎖抗体変異体を網羅的に作成した。この中でV_L上の54番目のチロシン(Y)をトリプトファン(W)に変異させた変異体Y54(L)WIにおいて、LTE₄への親和性が上昇することを見出し、トリプトファン(W)とLTE₄との間に、新たな水素結合が形成された可能性を示唆した。その後さらに、V_L上の35番目のアスパラギン(N)をグルタミン(Q)あるいはチロシン(Y)に置換した変異体N35(L)Q、N35(L)Yにおいても、LTE₄への結合親和性が上昇していることも明らかにした。そこで、Y54(L)WIに、先に作成した2つの35番目のアスパラギン変異体のうちの一つを加えたダブルミュータントN35(L)Q/Y54(L)WのLTへの親和性と結合特異性をEIAを用いて検討した。このダブルミュータントN35(L)Q/Y54(L)WはLTC₄との親和性はあまり変化していなかったが、LTE₄への親和性は、LTD₄への親和性を大きく上回った。このことから、LTE₄の分子内で35番目のアスパラギン(N)が置き換えられたグルタミン(Q)が新たに形成する水素結合は、Y54(L)WIにおいて新たに形成された水素結合とはLTE₄上の異なる原子との間で形成されていることが示唆された。</p> <p>3. 慢性炎症性疾患の新規治療法を目指したゴボウ葉抽出物からの機能性成分の単離と構造決定</p> <p>ごぼうは世界中で民間療法に用いられており、現在その機能性が注目を浴び様々な研究が行われているが、ごぼうの葉についても低極性の抽出物において抗炎症効果を示すことが報告されている。そこでごぼう葉抽出物に含まれる慢性炎症性疾患の治療に結びつく機能性成分を明らかにすることを目的として、ごぼう葉抽出物を逆相HPLCで分画したところ、低極性画分に12-リポキシゲナーゼならびにシクロオキシゲナーゼを阻害する成分が含まれていた。この成分を均一に精製して構造を決定したところ、n-3系不飽和脂肪酸であるα-リノレン酸であることが判明した。α-リノレン酸はアラキドン酸を基質とした白血球型12-リポキシゲナーゼ反応ならびにシクロオキシゲナーゼ反応のほか、血小板型12-リポキシゲナーゼ反応も強力に阻害した。</p>
<p>成果資料目録</p>	<p>1. <u>Takahashi Y, Otsuki A, Mori Y, Kawakami Y, Ito H.</u> 2015 Inhibition of leukocyte-type 12-lipoxygenase by guava tea leaves prevents development of atherosclerosis. <i>Food Chem.</i> 186:2-5.</p> <p>2. <u>Sasabe S, Fukushima M, Xin X, Taniguchi A, Nakai Y, Mitsui R, Takahashi Y, Tsuji H, Yabe D, Yasuda K, Kurose T, Inagaki N, Seino Y.</u> 2016 Insulin secretory defect and insulin resistance in isolated impaired fasting glucose and isolated impaired glucose tolerance. <i>J Diabetes Res.</i> in press</p>