

包括的酸化脂質解析手法の開発および非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスへの応用

齋藤, 耕太

<https://hdl.handle.net/2324/6787554>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

【序論】

生体内には様々な脂質分子が存在し、それらは膜の構成成分やエネルギー源として生体恒常性維持の役割を果たしている。一方で、脂質は非常に酸化されやすく、生体内の活性酸素種 (ROS)と反応することで、脂質過酸化反応 (LPO)が惹起される。本反応は、その進行にともない、多様な酸化修飾をうけた酸化脂質を生成・蓄積させる。近年、これら酸化脂質が炎症亢進や細胞死誘導に寄与するとともに^{1,2}、疾患への関与も報告されていることから、酸化脂質分子種の解析は疾患の発症・進展機序解明に大きく貢献することが期待される。

ここで、生体内で生じる酸化脂質は、LPOの複雑な反応機序に加え、生体脂質の多様性から、その数は膨大となることが予想される。さらに酸化脂質は、それぞれの酸化修飾構造や脂質クラスによって、異なる生理活性を有することが報告されていることから、病態形成に対して、種々の酸化脂質が複合的に寄与していると考えられる。一方、従来の酸化脂質解析では、特定の分子種に着目した限定的な解析が行われてきたため、疾患発症時に、どのような酸化脂質がいつ、どこで、如何にして生じるかについて、詳細なメカニズムは不明であった。これまでの限定的な解析の原因のひとつとして、酸化脂質構造情報の不足が挙げられる。このような課題に対し、当研究室では近年、酸化脂質の網羅的構造解析技術を確立することで、3種のホスファチジルコリン (PC)から生じる計155種の酸化脂質の構造同定に成功した³。そこで、先行研究で得られた構造情報をもとに構造推定を行い、多種多様な酸化脂質の構造情報を網羅的に獲得、さらに、それらを活用した解析手法を確立できれば、疾患時に生じる酸化脂質の包括的解析が可能になるのではないかと考えた。

そこで本研究では、生体内酸化脂質の包括的解析手法の開発ならびに疾患モデル動物への応用を目的とし、①酸化脂質推定構造情報を用いた生体試料中酸化脂質の包括的解析手法の確立、ならびに②疾患発症・進展に関与する酸化脂質種の探索ならびにその生成機序解明を行った。また、疾患モデル動物として、その病態形成にLPOの関与が報告されている非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)モデルマウスを選択し解析した。

【方法】

①包括的酸化脂質解析手法の開発 測定には高速液体クロマトグラフ三連四重極型質量分析計(LC/MS/MS)を用い、高感度分析が可能でありかつ定量性にすぐれたターゲット分析法をより広範囲に拡大したワイドターゲット分析を実施した。まず、既知の酸化脂質構造情報をもとに構造推定を行うことで、グリセロリン脂質(PC、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルイノシトール (PI))あるいはトリグリセリド (TG)に属した計3255種の酸化脂質の構造情報(組成式、分子量、*m/z*、フラグメントイオンパターン)を獲得、それらをまとめた推定構造ライブラリーを構築した。次に、標的試料の脂質組成解析を行い、高い存在比を示す脂質分子を選定した。さらに、各

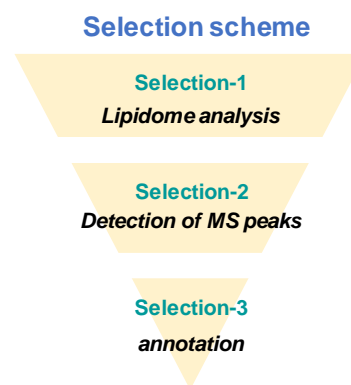


Figure 1. Selection scheme for comprehensive annotation of oxidized lipid structures *in vivo*.

種脂質分子から生じる酸化脂質の構造情報をライブラリーから抽出し、MS ピーク探索ならびに構造同定を行った (Figure 1)。

②NASH モデルマウスにおける病態関連酸化脂質の探索ならびにその生成機序解明 5 週齢雄の C57BL/6J マウスに通常食 (SD)もしくはコリン欠乏メチオニン添加高脂肪食 (CDAHFD)を 1、3、6 週間 給餌し、NASH 病態の形成ならびに酸化脂質の生成を経時的に評価した。さらに、vitamin E (100 mg/kg bw/day)経口投与時の病態抑制効果および酸化脂質生成量の変動を観察した。評価項目は、脂肪肝、炎症、肝線維化、肝障害、LPO の進行とした。次に、細胞オルガネラの分取およびマウス初代肝細胞の蛍光イメージングにより酸化脂質産生部位を調査した。最後に、酸化脂質生成機序評価のため、ミトコンドリアに着目し、ミトコンドリア標的型抗酸化物質 Mito-TEMPO (1 mg/kg bw/day)ならびに β 酸化阻害剤 Etomoxir (5 mg/kg bw/day)を投与し、酸化脂質生成への影響を評価した。

【結果】

①包括的酸化脂質解析手法の開発

NASH モデルマウス肝臓中にて生成する酸化脂質の包括的解析を実施した。まず、マウス肝臓において、脂質クラス毎に存在量の多い脂質分子を調査し、選定した 13 種の脂質分子から生じる計 778 種の酸化脂質を標的とした。次に、NASH モデルマウス肝臓中の酸化脂質に対し、生成評価ならびに構造解析を行った結果、計 132 種の酸化脂質が構造同定可能であった (Figure 2)。構造同定された酸化脂質は、複数の脂質クラスに由来しており、その中にはこれまでに報告のない分子種も含まれていた。さらに、本評価にて同定可能であった酸化脂質種に対して LC/MS/MS 分析条件の最適化を行った。

②NASH モデルマウスにおける病態関連酸化脂質の探索ならびにその生成機序解明

CDAHFD を 1、3、6 週間給餌した NASH モデルマウスにおいて、経時的な病態形成を評価した。結果、給餌 1 週間で脂肪蓄積、肝障害、炎症、線維化等の NASH 病態パラメータが上昇し始め、さらなる給餌でそれらが顕著に上昇した (Figure 3)。また、LPO 産物である 4-hydroxy nonenal (4-HNE)の修飾タンパク質が給餌 3 週以降に肝臓に蓄積することが観察された。続いて、本モデルに対して、包括

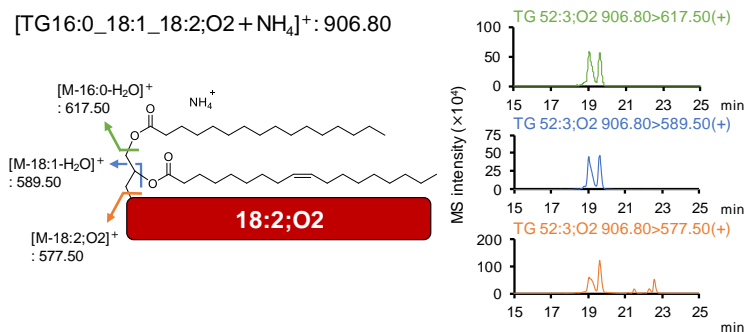


Figure 2. Structure annotation of TG16:0_18:1_18:2;O2 using LC/MS/MS. The structure and chromatograph of MRM analysis are shown.

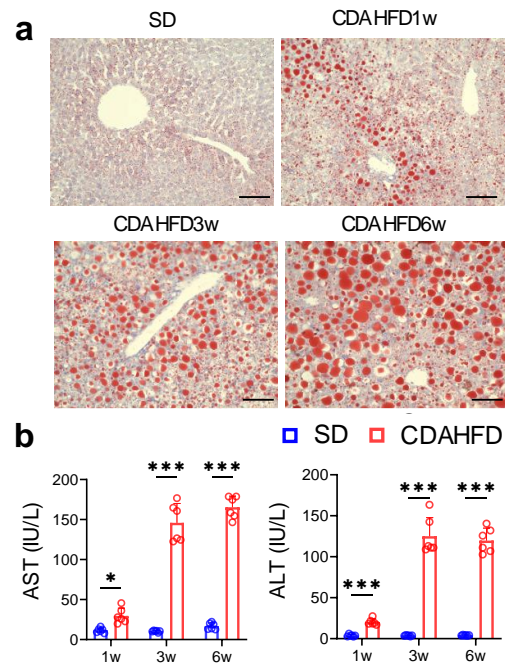


Figure 3. Evaluation of NASH pathological progression. a. Histological observation of lipid accumulation in the liver (Oil red O staining). Original magnification: $\times 200$. Scale bars: 100 μm . b. Plasma AST and ALT levels.

的酸化脂質解析を実施したところ、中性脂質である TG の酸化物 (oxTG)が、給餌1週時点の NASH 病態早期段階で顕著に増加することがわかった (Figure 4)。またこの時、酸化リン脂質の増加は観測されず、それらは給餌6週間後に有意な増加を示した。さらに、LPO 抑制剤である

vitamin E の投与は、NASH 病態の改善に加え、酸化脂質の生成を顕著に抑制した (Figure 5)。以上の結果から、NASH 肝臓では、病態進行度に応じた複数の機序の LPO が進行していることが示唆された。

脂肪滴はトリグリセリドを貯蔵するオルガネラであり、NASH 病態での蓄積が報告されているため、oxTG 生成機構として脂肪滴における LPO の発生が想定された。そこで、脂肪滴と膜成分を分離し、各画分の酸化脂質生成を評価したところ、脂肪滴で優先的な oxTG の蓄積が観察された。さらにモデルマウス肝臓由来の初代肝細胞において LPO 検出プローブを用いたイメージングを行った結果、CDAHFD 群において、LPO に由来する蛍光発光が観測され、それらは脂肪滴と共局在することが明らかとなった (Figure 6)。以上より、本 NASH モデルでは、病態形成初期に脂肪滴局所的な LPO が発生しており、それが oxTG 蓄積に寄与していることが示唆された。

続いて、脂肪滴における LPO 発生機序解明を試みた。脂肪肝などの脂肪酸負荷条件下では、ミトコンドリアにおける脂肪酸 β 酸化が活性化し ROS 産生が亢進する。そこで、CDAHFD 給餌1週間モデルマウスに対して、ミトコンドリア標的抗酸化物質である Mito-TEMPO を投与した結果、oxTG 形成が抑制された (Figure 7)。さらに、ミトコンドリア β 酸化の阻害剤 Etomoxir の投与も同様に oxTG 産生を抑制した。以上のことから、NASH 病態早期にみられた脂肪滴における酸化脂質形成には、ミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化活性化に起因した ROS 産生が寄与していることが示唆された。

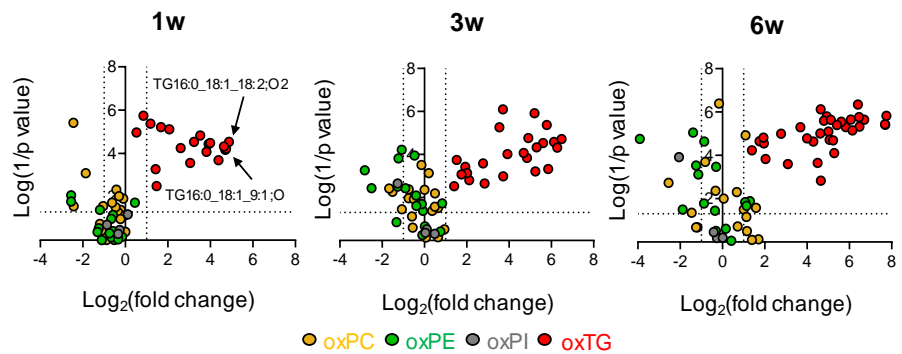


Figure 4. Comparative analysis of the profiles of oxidized lipids (oxPC, oxPE, oxPI and oxTG) produced in the liver of SD- or CDAHFD-fed mice for 1, 3, and 6 weeks by LC/MS/MS, presented as volcano plots.

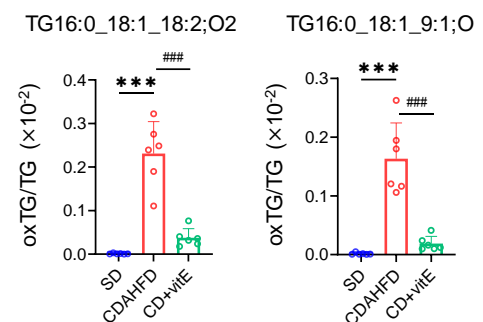


Figure 5. Change of oxidized lipids production. VitaminE (vitE) or vehicle was orally administered to CDAHFD-fed mice for 6 weeks.

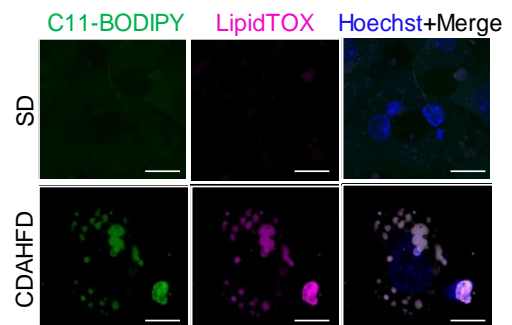


Figure 6. Confocal fluorescence image of primary hepatocytes isolated from the livers of SD- or CDAHFD-fed mice for 1 week. Green: C11-BODIPY; lipid ROS, magenta: LipidTOX; lipid droplets, blue: Hoechst; nucleus. Scale bars: 20 μ m.

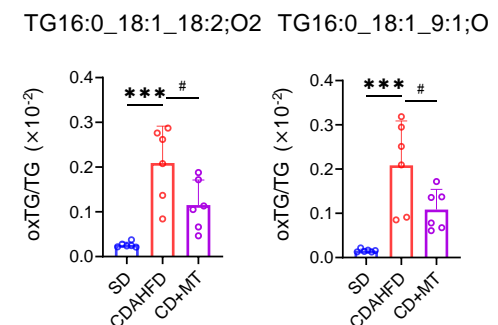


Figure 7. Change of oxidized lipids generation. Mito-TEMPO (MT) or vehicle was administered intraperitoneally to CDAHFD-fed mice for 1 weeks.

【考察】

これまで、多くの研究者が LPO と疾患の関与を提唱してきたが、実際にどのような酸化脂質が生成し、どう変動したかについて包括的な解析はなされていない。これは、生体内に存在する酸化脂質が構造未知かつ多様であるために、それらの構造情報が不足していることが原因であった。

本研究にて開発された酸化脂質解析手法では、網羅的解析技術によって得られた酸化脂質の酸化修飾様式をもとに構造推定を行うことで、生体内酸化脂質へのアプローチを可能とした。本手法を NASH モデルマウス肝臓試料に応用した結果、計 132 種の酸化脂質が構造同定可能であった。これらは、脂質クラスおよび酸化修飾様式の違いから多岐にわたっており、これまでに報告のない分子も含まれていたことから、本手法によって、生体内にて生じる多種多様な酸化脂質の構造情報を網羅的に提示することが可能であることが示された。

また、本解析手法は、標的とする動物種や臓器の違いにも対応しており、応用範囲も広い。加えて、三連四重極質量分析計を用いたターゲット分析を採用することで、生体中の微量な酸化脂質に対して高感度分析を可能とするだけでなく、測定およびデータ解析も容易である。つまり、本研究は、酸化脂質をより容易に解析できる方法論を提示しており、各種疾患モデルへの応用を通じて、疾患機序解明に大きく貢献することが期待される。

本技術の応用として、NASH 病態進行にともなう酸化脂質形成を包括的かつ経時的に評価した結果、NASH 発症初期のマウス肝臓では、脂肪滴において LPO が惹起され、TG 酸化物が生成・蓄積することが明らかとなった。これは、従来の限定的な解析では明らかにできなかった LPO 進行機序であり、本技術を用いた生体内酸化脂質の包括的評価が、疾患の発症・進展機構の解明に貢献することが示された。

CDAHFD 給餌 1 週間モデルマウスにおいて、特に高い増加を示した酸化脂質は TG16:0_18:1_18:2;O2 および TG16:0_18:1_9:1;O であった。TG16:0_18:1_18:2;O2 は、分子内開裂を経て、TG16:0_18:1_9:1;O ならびに遊離アルデヒドを形成するが、このアルデヒド体はさらなる構造変換を経て 4-HNE へと変換される。4-HNE は NASH 病態形成への寄与が報告されており⁴、本モデルにおいても 4-HNE の蓄積が観察されたことから、脂肪滴 LPO は 4-HNE 形成を介して病態に寄与することが示唆された。

また、vitamin E 投与は oxTG 形成に対して高い抑制効果を示した。高脂溶性の vitamin E は、脂肪滴に蓄積することが報告されており⁵、その特性から脂肪滴 LPO を効率的に抑制可能であったと考えられる。さらに、vitamin E が NASH 治療薬として高いエビデンスを有することを考慮すると、脂肪滴 LPO が NASH 治療におけるターゲットになり得ることが示唆された。

以上より、疾患発症時に生じる酸化脂質を包括的に解析した結果、病態形成にともなった LPO 進行メカニズムを明らかにすることができた。今後、本知見が LPO を標的とした NASH 治療薬開発に貢献することが期待される。

【引用文献】

1. Gioia DM. *et al. Nat. Immunol.* **2020**, 21, 42-53
2. Kagan VE. *et al. Nat. Chem. Biol.* **2016**, 13, 81-90
3. Matsuoka Y. *et al. Nat. Commun.* **2021**, 12, 6339
4. Spickett CM. *et al. Redox Biol.* **2013**, 1, 145-152
5. Violet PC. *et al. JCI. Insight,* **2020**, 5, e133309

【発表論文】

1. Saito K. *et al. Free Radic. Res.* **2020**, 54, 301-310,
2. Saito K. *et al. Redox Exp. Med.* **2023**. *in press*