

ローヤルゼリー特有成分デセン酸の標的分子および 効能発揮の分子機構の解明

東北大学 大学院薬学研究科

平田 祐介

1. 研究の目的と背景

ローヤルゼリーは、ミツバチの働き蜂が合成・分泌し、女王蜂となる幼虫に供される、多種類の成分が混合した栄養価の高い食物であり、近年栄養補助食品として着目されている。その成分の約5%を占めるのが、ローヤルゼリー特有のトランス脂肪酸であるデセン酸 (10-hydroxy-2-decanoic acid : 10-HDA) で、抗炎症、抗インスリン抵抗性、抗腫瘍作用など、様々な有益な作用が報告されている。ローヤルゼリーの主要な効能成分である¹。ところが、デセン酸の実際の疾患予防・治療への応用は全く進んでおらず、その大きな要因が、デセン酸の具体的な作用点や作用機構については全く未解明な点である。

トランス脂肪酸とは、炭素-炭素間2重結合を有する脂肪酸 (不飽和脂肪酸) のなかでも、トランス型2重結合を1つ以上有する脂肪酸のことである。生体内で酵素的に産生される不飽和化脂肪酸の二重結合はシス型のみであるため (以下、シス脂肪酸と呼ぶ)、トランス脂肪酸は、生体内では産生されず、含有食品の摂取を通して生体内に取り込まれ、蓄積する。トランス脂肪酸はその由来から2種類のタイプに分類され、植物油などの油脂の部分水素添加 (固形化) など、食品製造過程でシス脂肪酸が異性化することで副産物として産生される「人工型」と、反芻動物の胃の中の微生物を介して、シス脂肪酸の酵素反応による異性化によって産生される「天然型」が存在し、加工油脂を使用したマーガリン、ショートニング、スナック菓子に代表される加工食品中にはエライジン酸に代表される人工型トランス脂肪酸が、バター、牛乳、牛肉などの反芻動物由来の食品中にはバクセン酸をはじめとした天然型トランス脂肪酸が多く含有される²。また、デセン酸も広義の「天然型」トランス脂肪酸に分類することができる。過去の疫学的な知見などから、特に人工型のトランス脂肪酸摂取が、循環器系疾患、アレルギー性疾患、生活習慣病 (肥満・糖尿病など) などの諸疾患発症・増悪に寄与することが示唆されてきた²。

我々はこれまで、エライジン酸などの人工型トランス脂肪酸による毒性発現の分子機構を、詳細に明らかにしてきた^{3,4}。一連の解析の中で、天然型トランス脂肪酸であるデセン酸には他のトランス脂肪酸同様の毒性作用がないこ

とや、脂肪酸がリガンドとして作用する既知の7回膜貫通型Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) には作用しないことを見出してきた。そこで本研究では、デセン酸の作用点となるGPCRを網羅的に探索・同定し、その詳細な作用機構の分子レベルでの解明を目指した。

2. 方法

2-1. 試料

デセン酸 (10-HDA)、エラスチン、TAK-875はCaymanより、エライジン酸、Imject alum adjuvant (Alum)、ドキシソルピシン、RSL3はSigmaより、シスプラチン、セフォタキシム、H₂O₂はWakoより、N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)は東京化成より、Phorbol myristate acetate (PMA)はSanta Cruzより購入した。

2-2. 細胞培養

本研究で使用した細胞は5%CO₂-95%空気を気相として37℃のCO₂インキュベーター内で培養した。HT1080細胞、HEK293A細胞は、10% FBSおよび1% penicillin-streptomycin solution (Nacalai Tesque) を含むDulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Nacalai Tesque) で維持、継代して使用した。THP-1細胞は、10% FBSおよび1% penicillin-streptomycin solution (Nacalai Tesque) を含むRPMI1640メディアウム (Nacalai Tesque) で維持、継代して使用した。

2-3. 脂肪酸の調製

デセン酸、エライジン酸、リノール酸 (Fig. 1) を、それぞれ0.1 N NaOHに70℃で溶解し、100 mMに調製した。2-4では、このストック溶液を希釈して目的濃度で細胞に処置した。それ以外の実験では、細胞内への取り込みを容易にするため、fatty acid-free BSA (Sigma, pH7.4) を55℃、10分間反応させることにより抱合し、5 mM脂肪酸ストック溶液 (10% BSA) とした。このストック溶液を、BSAの終濃度が1%となるように希釈し、細胞への処置に用いた。

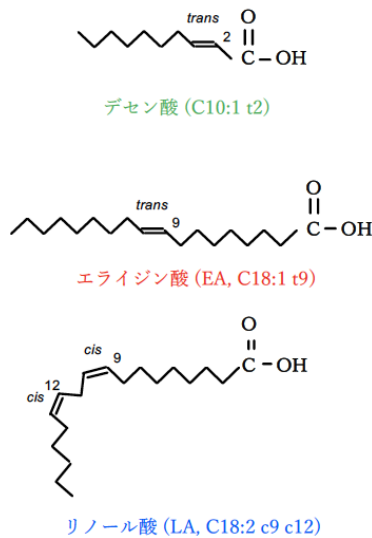


Figure. 1 本研究で使用した脂肪酸

脂肪酸名に続くカッコ内は、順に炭素数、二重結合のカルボキシル基末端からの位置 (t: trans, c: cis) を記載。

2-4. TGF- α shedding assay

本手法5を開発した、本学同学部・分子細胞性化学分野の井上飛鳥教授との共同研究により、約300種類のGPCR (大半がクラスA、一部クラスBに属する) を発現する独自のプラスミドライブラリーを利用し、以下の要領でスクリーニングを実施した。6-wellプレートに細胞を播種し、アルカリホスファターゼを融合したTGF- α (AP-TGF α)、共役G α タンパク質8種類とGPCRをトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収した。回収した細胞をHEPESで2回Washした後に、96-wellプレートに再播種した。再播種から30分後に100 μ Mの脂肪酸をリガンドとして処置し、1時間37°Cで反応させた。その後、2,500 rpm, 25°C, 3分で遠心し、上層を別の96-wellプレートに移した。下層と上層の両プレートに対して、APの基質であるp-ニトロフェニルリン酸 (ナカライテスク) を添加し、添加直後と1.5時間後に405 nmの吸光度を測定した。データは、添加後1.5時間の吸光度から添加直後の吸光度を引いた値に対して、上層の吸光度 / (上層の吸光度 + 下層の吸光度) の値を求めることで、上層の吸光度の割合を産出し、この割合をGPCRの活性とした。

2-5. 細胞生存率の測定

96-wellプレートに播種した細胞を刺激した後、PMS/MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-

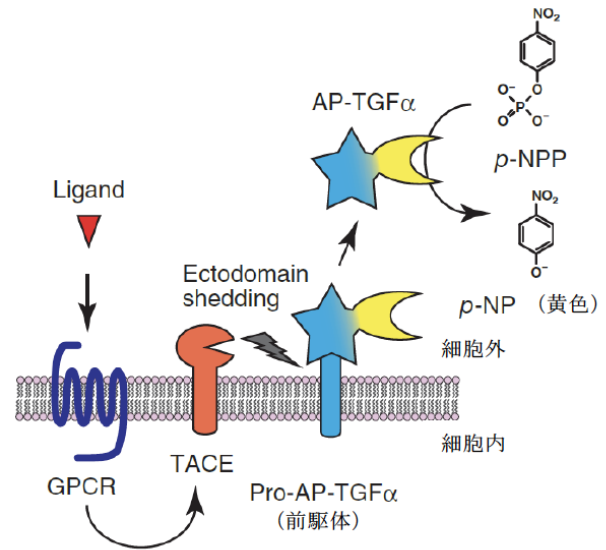


Figure. 2 TGF- α shedding assay の概要

GPCRにリガンドが結合すると、TACEが活性化し、細胞膜上のPro-AP-TGF α の細胞外ドメインを切断し、AP-TGF α が細胞外に放出される。放出されたAP-TGF α は、APの基質p-NPPをp-NPに変換するため、産生されたp-NP品を吸光度計で測定することで、GPCRの活性化を評価できる。

tetrazolium, inner salt/phenazine methosulfate) assay (Cell Titer 96 Cell Proliferation Assay, Promega) 混合液 (20:1) を加え37°Cでインキュベートし、マイクロプレートリーダー (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation) で492 nmの吸光度を測定することにより細胞生存率を算出した。

2-6. IL-1 β 放出量の測定

THP-1細胞100 nM PMAで一晩処置して分化誘導したのちに、200 μ M デセン酸を一晩処置後、Alum 100 μ g/mlで3時間刺激した。刺激後の培養上清中に産生・放出されたIL-1 β の量を、Human IL-1 β ELISA kit (eBioscience) を用いて、メーカー推奨のプロトコルで測定した。

3. 結果

3-1. デセン酸がリガンドとして作用するGPCRの探索

トランス脂肪酸がリガンドとして作用する新規GPCRの探索・同定のための手法として、TGF α -shedding assay⁵を導入した。TGF α -shedding assayは、東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野の井上飛鳥教授が開発した手法で、共役するG α タンパク質の種類を問わず、全GPCRの活性化を網羅的に高感度かつ高精度に検出できる手法である。本手法のスキームはFig. 2の通りで、細胞にAP-TGF α 、Gタンパク質と目的のGPCRを

トランスフェクションして過剰発現させたのちに、リガンドを処置してGPCRが応答すると、GPCRの下流で内在の切断酵素TACEが活性化し、AP(アルカリフォスファターゼ)-TGF α を切断する。切断されたAPは細胞上清に放出されるため、基質としてp-NPPを加えることで発光強度を測定できる。細胞上清中に放出されたAPの割合を算出することで、GPCRの活性を評価できる(Fig. 2)。実際にこの手法を用いて、既知の中鎖鎖脂肪酸受容体であるGPR40に関するエライジン酸のリガンド活性を評価したところ、シス脂肪酸の1つであるリノール酸とほぼ同程度のリガンド活性を有することが観察され、実験系に問題はないことが確認できた(Fig. 3)。そこで、デセン酸の新規受容体同定を目指し、未知のデセン酸受容体である可能性が高いと想定される、約300分子のGPCR発現プ

ラスミドを包含するライブラリーを用いて、100 μ M デセン酸を処置した際のGPCR活性化の有無を網羅的に探索した。またその際、比較対象として、代表的なトランス脂肪酸であるエライジン酸もリガンドとして用いた。スクリーニングの結果、エライジン酸はGPR40, GPR120といった既知の脂肪酸受容体に対して強いリガンド活性が認められた一方、デセン酸には両受容体に対する有意なリガンド活性は認められなかった(Fig. 4)。また、その他のGPCRについても、デセン酸に有意なリガンド活性は認められなかった(Fig. 4)。以上の結果から、デセン酸は、既知の脂肪酸受容体に対してリガンドとして作用しないこと、また、少なくとも本ライブラリーに収められている約300種類のGPCRの中にはデセン酸がリガンド活性を示すものは存在しないことが明らかとなった。

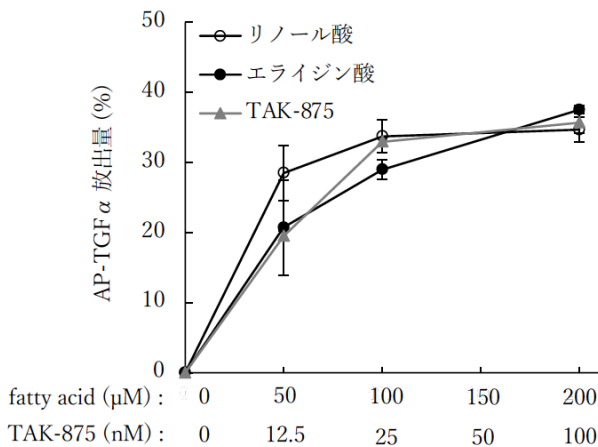


Figure. 3 エライジン酸・リノール酸はGPR40を活性化する

HEK293A細胞にGPR40, Gタンパク質及びAP-TGF α をトランスフェクションし、24時間後に細胞を再播種し、図に示した濃度の脂肪酸, TAK-875(GPR40の合成リガンド)を1時間処置した後に基質を加え、吸光度を測定し、AP-TGF α の放出量を評価した。データは、最大放出量を100%とした時の放出割合をパーセンテージで表し、平均値 \pm 標準偏差(n=3)を示している。

3-2. デセン酸が影響を与える細胞応答の探索 (表現型スクリーニング)

当初の予定では、3-1のGPCRの探索によって同定されたGPCRに対するデセン酸の作用について詳細な解析を行う予定だったが、残念ながら候補となる受容体が同定できなかったため、方針を転換し、デセン酸が影響を与える細胞応答の探索・同定を目指した。

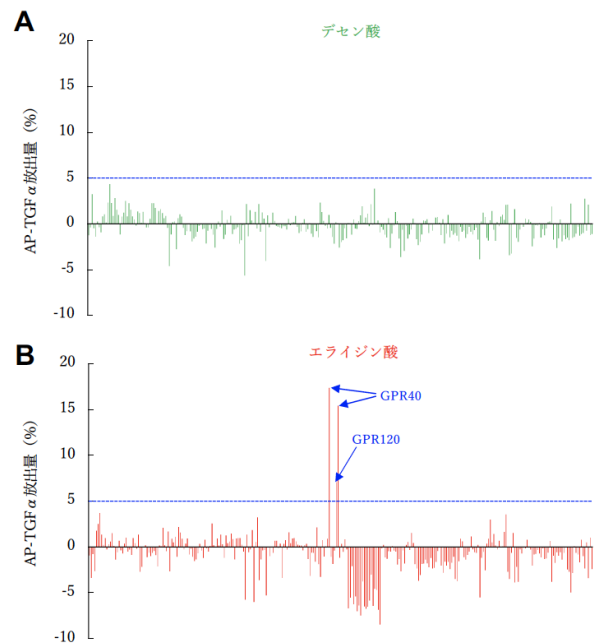


Figure. 4 ; GPCR スクリーニングの結果

約300種類のGPCRを対象とし、100 μ Mのデセン酸(A), エライジン酸(B)を処置した際のリガンド活性の有無を評価した。データは、各GPCRを利用した際のAP-TGF α 放出量(%), 横軸方向にライブラリーのNo. 1から順番に並べて表しており(平均値, n=3), 本指標が5%を超えた場合にリガンド活性ポジティブと評価した。

まず、HT1080細胞に対してデセン酸を100-500 μ Mの濃度で24時間単独処置した際の細胞生存率を解析したところ、細胞生存率の有意な低下は認められなかったことから、細胞の生存・増殖にデセン酸自体は影響を及ぼさないことが明らかになった(Fig. 4)。そこで、デセン酸を12時間前処置した上で、さまざまな細胞死・炎症誘導刺激を加えた際の、細胞死・炎症応答への影響を評価するこ

とで、デセン酸が何らかの影響を及ぼす細胞応答の探索(表現型スクリーニング)を行った。酸化ストレス (H_2O_2)、DNA 損傷 (ドキシソルビシン, シスプラチン) などの、主にアポトーシスと呼ばれる典型的プログラム細胞死を誘導する刺激、非典型的プログラム細胞死であるパータナトスの誘導刺激 (MNNG)、あるいは脂質酸化依存的な新規プログラム細胞死フェロトーシスの誘導刺激 (エラスチン, RSL3) など、様々な細胞死について検討を行ったが、200 μM デセン酸の有無で、細胞生存率に有意な差は認められなかった。また、代表的な炎症誘導刺激として、NLRP3 インフラソームの活性化への影響について検討するため、THP-1 細胞の IL-1 β 産生量を調べたが、IL-1 β の産生量についても、200 μM デセン酸の有無で有意な差が認められなかった (Table. 1)。

Table 1 表現型スクリーニングの結果

ストレスの種類	刺激	細胞応答	デセン酸の影響
酸化ストレス	H_2O_2	アポトーシス	-
	ドキシソルビシン	アポトーシス	-
DNA損傷	シスプラチン	アポトーシス	-
	MNNG	パータナトス	-
脂質酸化	エラスチン	フェロトーシス	-
	RSL3	フェロトーシス	-
炎症	NLRP3インフラマソーム活性化	炎症性サイトカイン (IL-1 β) 産生	-

これまでに行った表現型スクリーニングの結果をまとめた表。さまざまな細胞死・炎症誘導刺激に対するデセン酸の影響を評価したが、デセン酸による著明な影響は認められなかった。

4. 考察および今後の課題

当初の計画では、デセン酸の直接的なターゲットとなる GPCR の同定を目指していたものの、今回残念ながらその同定には至らなかった。エライジン酸やリノール酸のような通常の脂肪酸が GPR40, GPR120 のリガンド活性を有していたのに対し、デセン酸にはそのような作用が認められなかったことから、デセン酸は、カルボキシル末端と逆側にヒドロキシル基を有することで、他の脂肪酸と物性や生物活性が大きく異なっているものと予想される。本研究に利用した GPCR ライブラリーは、デセン酸の受容体候補である可能性が高い大半のクラス A 分子を網羅していたものの、実際のターゲットとなる GPCR の発現プラスミドがこの中に存在していなかった可能性もあることから、その他の GPCR 分子をクローニングして検討する余地が残されている。

また、GPCR スクリーニングの次に行った表現型の評価において、デセン酸の細胞死・炎症との関連を調べたが、過去に報告されている、デセン酸単独処置によるがん細胞の細胞死誘導や、炎症抑制作用などの再現性は取れなかった。その理由として、細胞種の違い、あるいは、デセン酸の使用濃度の違いが挙げられる。特に、過去の文献では mM オーダーのデセン酸を細胞に処置して応答を調べている文献が散見されるが、今回は 100-500 μM の濃度域 (主な実験は 100-200 μM) で実験を行っており、今回

チン, RSL3) など、様々な細胞死について検討を行ったが、200 μM デセン酸の有無で、細胞生存率に有意な差は認められなかった。また、代表的な炎症誘導刺激として、NLRP3 インフラソームの活性化への影響について検討するため、THP-1 細胞の IL-1 β 産生量を調べたが、IL-1 β の産生量についても、200 μM デセン酸の有無で有意な差が認められなかった (Table. 1)。

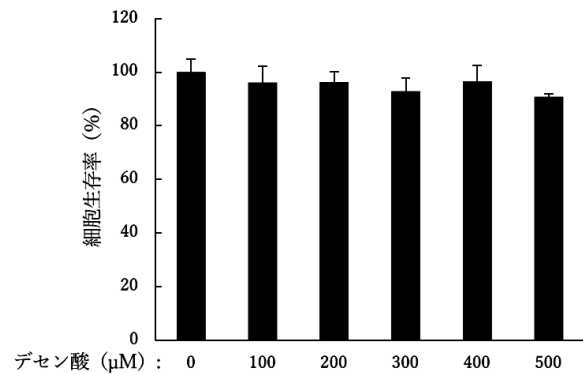


Figure. 5 ; デセン酸は細胞の生存・増殖に影響を与えない

HT1080 細胞にデセン酸を 24 時間処置後に、細胞生存率の測定を行った。データは、平均値±標準偏差 (n=3) を示している。

はより低濃度で実験を行っていることも、その主要な要因と考えられる。本研究では、デセン酸単独処置での作用が認められなかったことから、細胞死・炎症を誘導する様々な刺激との共処置を行い、デセン酸の細胞応答への影響を調べたが、主要な細胞死・炎症刺激に対する影響は認められなかった。本研究の助成期間終了後も、引き続き、表現型スクリーニングを実施中であり、ごく最近、デセン酸が、がん細胞の遊走能を著明に抑制するという予備的な結果が得られており、現在その再現性および効果の確認を行なっている。今後、このようなスクリーニング、検証を続けることで、当初の目的であるデセン酸の効能およびその作用機構の解明に、引き続き迫っていきたいと考えている。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたって、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所、ならびに関係者の方々に、厚く御礼を申し上げます。

6. 参考文献

- Cornara, Laura; Biagi, Marco; Xiao, Jianbo *et al.* Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Produces. *Front. Pharmacol.*, 2017, **8**:412, doi: 10.3389/fphar.2017.00412

- 2 内閣府食品安全委員会「食品に含まれるトランス脂肪酸の食品健康影響評価」, 2012.
- 3 Hirata, Yusuke; Takahashi, Miki; Kudoh, Yuki *et al.* trans-Fatty acids promote proinflammatory signaling and cell death by stimulating the apoptosis-signal regulating kinase (ASK1)-p38 pathway. *J. Biol. Chem.*, 2017, **292**(20), p. 8174-8185. doi: 10.1074/jbc.M116.771519
- 4 Hirata, Yusuke; Inoue, Aya; Suzuki, Saki *et al.* trans-Fatty acids facilitate DNA damage-induced apoptosis through the mitochondrial JNK-Sab-ROS positive feedback loop. *Sci. Rep.*, 2020, **10**(1):2743. doi: 10.1038/s41598-020-59636-6
- 5 Inoue, Asuka; Ishiguro, Jun; Kitamura, Hajime *et al.* TGF α shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat. Methods*, 2012, **9**, p. 1021-1029. doi: 10.1038/nmeth.2172