

# 論 文 要 旨

ドコサヘキサエン酸の CYP 代謝物による  
心臓由来 H9c2 細胞死誘導メカニズムに関する研究

平成 30 年度

北海道医療大学大学院薬学研究科

遠藤 朋子

【緒言】 n-3 系多価不飽和脂肪酸の 1 つであるドコサヘキサエン酸 (DHA) は、魚油に豊富に含まれることが知られており、循環器疾患による死亡リスクの減少、視力低下抑制、乳幼児の脳や神経の発達、認知症予防、抗がん作用などの様々な生理作用が報告されている。近年、DHA の 6 つの二重結合のうち 1 つがシトクロム P450 (CYP) によりエポキシ化されたエポキシドコサペンタエン酸 (EDPs) の生理活性が注目されている。実際、DHA の生理作用の本体の一部は、生体内において CYP 代謝物の EDPs が引き起こしているとの報告もある。DHA は、細胞の種類によって細胞生存率に異なる影響を与える。ラット新生児心臓細胞では、DHA による細胞生存率の変化はみられない。一方で、ラット心臓由来細胞である H9c2 細胞では、DHA 及び EDP が共にペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\delta$  依存的な細胞死を引き起こすことが報告されているが、この詳細なメカニズムは不明である。本研究の目的は、DHA 及びその CYP 代謝物の一つである 19, 20-EDP による H9c2 細胞死誘導メカニズムの解明を行うことにある。

【方法】H9c2 細胞を 25 mM 及び 5.5 mM グルコース濃度のダルベッコ変法イーグル培地に、10% 牛胎児血清と 1% ペニシリン、ストレプトマイシン、ファンギゾンを追加した培地で培養した。コンフルエント直前に試薬を追加し、24 時間さらに培養した。DHA 100  $\mu$ M, 19, 20-EDP 1  $\mu$ M, CYP エポキシゲナーゼ阻害薬 MSPPOH 50  $\mu$ M, セラミド *de novo* 合成阻害薬ミリオシン 1  $\mu$ M, プロテアソーム阻害薬 MG-132 1  $\mu$ M を試薬として使用した。トロポニン T 蛋白質発現はウェスタンブロット法、酸素消費速度は Extracellular O<sub>2</sub> Consumption Assay (アブカム)、乳酸値は L-Lactate Assay Kit (Cayman Chemical)、ATP/ADP 比は ADP/ATP Ratio Assay Kit (Sigma Aldrich)、NAD/NADH 比は NAD/NADH-Glo<sup>TM</sup> Assay、細胞生存率は RealTime-Glo<sup>MT</sup> Cell Viability Assay (ブ

ロメガ), 20S プロテアソーム活性は AMC を用いた蛍光法を用いて測定した。セラミド量は, ホモジネートした細胞より細胞分画法によって細胞膜・核及びリソソーム/ミトコンドリアの 2 画分を分離・調製し, その後有機溶媒によって脂質抽出を行い LC/MS にて測定した。ミトコンドリア障害は MTT Assay (Thermo Fisher Scientific), ATP 産生量は ATP Assay Kit (シグマ及びアブカム) を用いて測定した。クエン酸合成酵素 (CS) 及びシトクロム *c* オキシダーゼ (COX) 蛋白質発現はウェスタンブロット法, 酵素活性は基質を添加した産生物に特異的な波長を分光光度計にて測定した。核, ミトコンドリア, リソソームを特異的蛍光色素で染色して観察した。

【結果・考察】 25 mM グルコース (normal glucose: NG) 含有培地で培養した細胞のものと比較して, 5.5 mM グルコース (low glucose: LG) 含有培地で培養した H9c2 細胞において酸素消費量が高値を示し, 乳酸産生量, ADP/ATP 比, NAD/NADH 比が低値を示したことから, 正常グルコース (NG) 条件及び低グルコース (LG) 条件では, それぞれ解糖系及び酸化的リン酸化経路が優勢なエネルギー代謝系であることが示唆された。NG 含有培地で培養した細胞において DHA 及び 19,20-EDP はともに細胞生存率を有意に低下させ, その作用は MSPPOH を併用することで消失した。また, 同様に DHA 及び 19,20-EDP による細胞生存率低下は, ミリオシンの併用で回復した。NG 含有培地で培養した細胞において DHA 及び 19,20-EDP は, 特にリソソーム/ミトコンドリア画分においてセラミド量を著明に増加させ, この増加作用はミリオシンで抑制された。NG 含有培地で培養した細胞において DHA 及び 19,20-EDP は, CS 及び COX の蛋白質発現には影響を与えず酵素活性を抑制した。また, DHA 及び 19,20-EDP は, ATP 産生量を減少させ, ミトコンドリア障害を引き起こした。NG 含有培地で培養した細胞において DHA 及び 19,20-EDP は, リソソーム活性を上昇させたが, この上昇はミリオシン及び MG-132 で抑制された。LG 含有培地で培養した細胞においては, DHA 及び 19,20-EDP は, 細胞生存率, セラミド含量, ミトコンドリア機能及びリソソーム活性などに影響を及ぼさなかった。以上の結果から, DHA 及び 19,20-EDP は, 解糖系優位な条件下の細胞において細胞死を誘導することが明らかとなった。さらにこのメカニズムには, DHA 及び 19,20-EDP によるセラミドの *de novo* 合成とミトコンドリアへの蓄積がミトコンドリア機能障害を誘導し, リソソーム活性を上昇させる作用が関係していることが明らかとなった。

【結語】本研究により DHA 及び 19,20-EDP は解糖系優位な条件というエネルギー代謝依存的に細胞死を誘導することが明らかとなった。この機序には, ミトコンドリアへのセラミド蓄積によるミトコンドリア機能障害, リソソームの活性化が関与していることが明らかとなった。本研究により, DHA 及び EDPs の新たな生理作用が見出され, このことが DHA 及び EDPs を応用した創薬開発の基礎的知見になり得ると期待される。