

論文の内容の要旨

論文題目

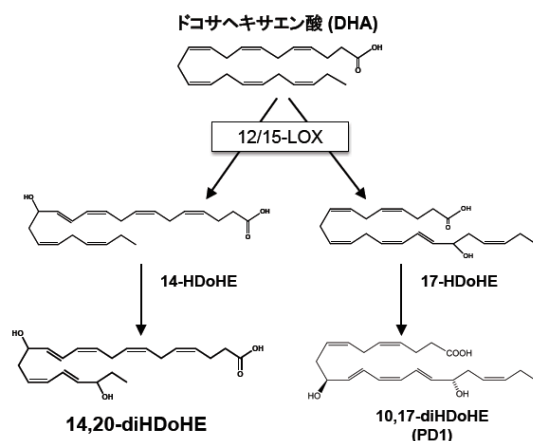
Identification of a novel anti-inflammatory mediator derived from docosahexaenoic acid and its application to the allergic airway inflammation model

(ドコサヘキサエン酸由来の新規抗炎症性代謝物の同定及び
アレルギー性気道炎症モデルへの適用)

氏名 横倉良行

【序】

魚油に多く含まれるドコサヘキサエン酸 (DHA) は ω 3 系列に分類される多価不飽和脂肪酸であり、抗炎症作用をはじめとする健康増進効果が知られている。その作用機構としては、炎症性のアラキドン酸カスケードに対する拮抗作用に加え、DHA がプロテクチン D1 (PD1)などの抗炎症性の代謝物に変換されて機能する可能性が指摘されている。私は修士課程において、DHA をはじめとする脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析を行い、炎症部位で 12/15-リポキシゲナーゼ (12/15-LOX) 依存的に産生され、急性腹膜炎において好中球の浸潤を強力に抑制する活性をもつ DHA 由来の新規代謝物 14,20-dihydroxy DHA (14,20-diHDoHE)を見出した (図 1)。既知の抗炎症性代謝物 PD1 は 12/15-LOX 依存的に 17-hydroxy DHA (17-HDoHE)を介して産生されるのに対して、14,20-diHDoHE は 12/15-LOX 依存的に 14-HDoHE を介して産生される新規の活性代謝物である。



【図 1】 12/15-LOX を介して産生される DHA 代謝物

博士課程において私は、炎症部位で 14,20-diHDoHE の産生細胞を同定し、さらに、病態時における 14,20-diHDoHE の代謝変動、および 14,20-diHDoHE

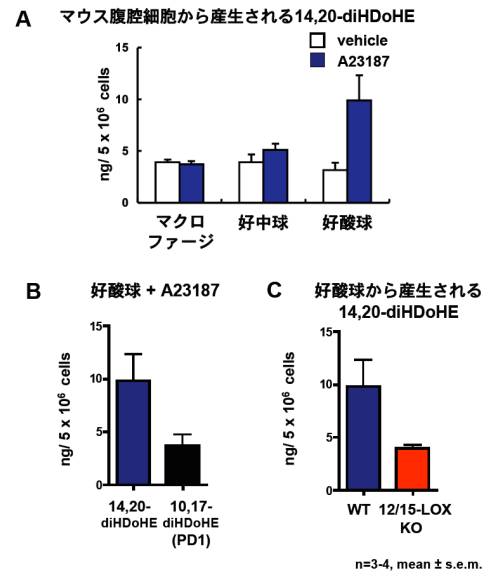
の薬理作用を初めて明らかにした。

【方法と結果】

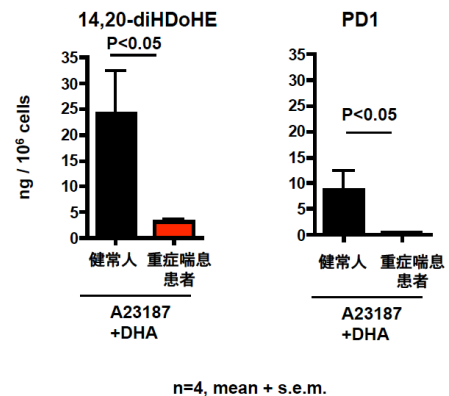
1. 14,20-diHDoHE を産生する細胞の同定

まず、14,20-diHDoHE の有機合成標品（本学部有機反応化学教室との共同研究）を用いた LC-MS/MS 定量分析系を確立した。次に、炎症部位で DHA から 14,20-diHDoHE を刺激依存的に産生する細胞を同定するために、マウスより各種血球系細胞を単離し、それぞれ DHA の存在下、カルシウムイオノフォア A23187 で刺激した上清中の脂肪酸代謝物について、LC-MS/MS を用いたメタボローム解析を行った。その結果、マクロファージ、好中球、好酸球の中で好酸球が刺激依存的に 14,20-diHDoHE を産生する細胞であることが明らかとなった(図 2 A)。この時、好酸球から刺激により産生される 14,20-diHDoHE の量は同じく好酸球から産生される抗炎症性メディエーターである 10,17-diHDoHE (PD1)と比較しても多い傾向が認められた(図 2B)。さらに、14,20-diHDoHE の産生量は 12/15-LOX KO マウス由来の好酸球では大きく減弱していた(図 2 C)。すなわち、好酸球は 12/15-LOX 依存的に 14,20-diHDoHE を産生する細胞であることが明らかとなった。

最近ヒトの臨床検体を用いた解析から、ステロイド抵抗性の重症喘息患者において末梢血好酸球の 12/15-LOX 系の代謝物である 15-HETE の生成量が健康人に比べて大幅に低下していることが明らかになった(Miyata, J. et al., *J Allergy Clin Immunol*, 2012)。そこで、14,20-diHDoHE の生成量についても定量分析を行ったところ、マウスと同様にヒトの好酸球からも刺激依存的な 14,20-diHDoHE の産生が強く認められ、その産生量は PD1 と比較しても多いことが明らかとなった。一方で重症喘息患者の好酸球ではこれらの代謝物の産生量が著しく低下していることが明らかとなった(図 3)。起炎性のメディエーターであるロイコトリエン生成に関わる 5-LOX 活性には変化がなく、12/15-LOX 活性および 14,20-diHDoHE や PD1 のような抗炎症性代謝物の産生能の低下が、重症喘息の病態の遷延化、難治化の要因となっている可能性が考えられた。そこで、12/15-LOX 活性の低下が喘息の重症化の原因となり得るのかを検証するために、次に 12/15-LOX KO マウスを用いた喘息モデルの検討を行った。



【図2】マウス腹腔細胞から産生される 14,20-diHDoHE



【図3】ヒト好酸球から産生される 12/15-LOX 代謝物

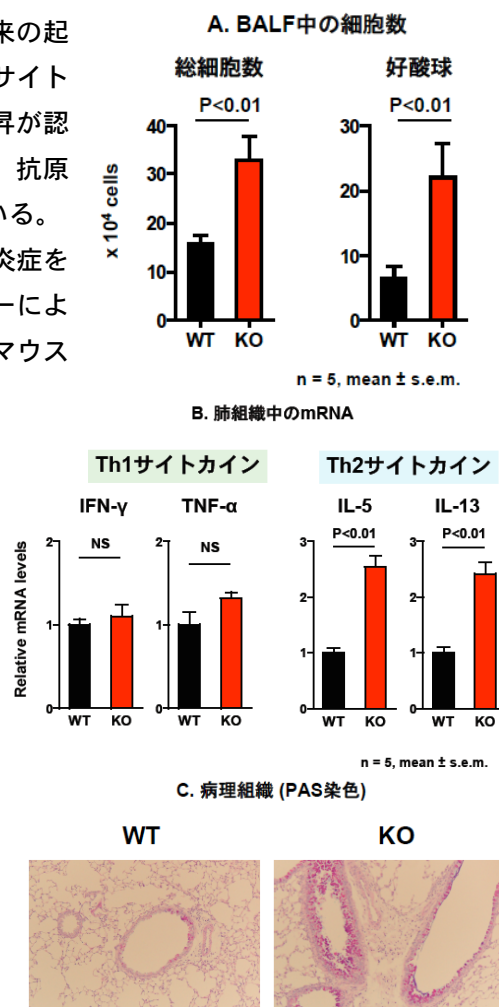
そこで、12/15-LOX 活性の低下が喘息の重症化の原因となり得るのかを検証するために、次に 12/15-LOX KO マウスを用いた喘息モデルの検討を行った。

2. 喘息モデルにおける 12/15-LOX の機能解析

マウスにおいて喘息を誘導するために、気道上皮細胞由来の起炎性サイトカインである IL-25 と IL-33 を用いた。これらのサイトカインはいずれも、重症喘息患者の気道において発現の上昇が認められており、また、マウスに気管内投与することにより、抗原非存在下で好酸球性の気道炎症を誘発することが知られている。

まず、IL-25 を点鼻により気管内に投与することで気道炎症を惹起し、肺胞洗浄液(BALF)中の細胞をフローサイトメーターにより解析したところ、野生型マウスに比べて 12/15-LOX KO マウスでは、総細胞数、好酸球数の大幅な増加が認められた(図 4 A)。また、肺組織から mRNA を抽出し、定量 PCR による解析を行ったところ、12/15-LOX KO マウスの肺組織において、好酸球の分化、成熟、活性化を誘導する IL-5 や、杯細胞分化や粘液産生を誘導する IL-13 等の Th2 サイトカインの発現の上昇が認められた(図 4 B)。一方、IFN- γ や TNF- α 等の Th1 サイトカインの発現に変化は認められなかった。また、粘液の主成分である糖タンパク質を染色する PAS 染色により病理組織を観察したところ、12/15-LOX KO マウスの肺組織において、野生型マウスと比べて PAS 染色陽性の細胞が多く認められ、粘液産生の亢進が認められた(図 4 C)。以上より 12/15-LOX KO マウスでは、野生型マウスに比べて IL-25 により誘導される Th2 応答および好酸球性の気道炎症の増悪化が認められた。

IL-33 についても同様の評価を行ったところ、12/15-LOX KO マウスにおいて BALF 中の好酸球、肺組織中の Th2 応答の亢進が認められた。従って、IL-25、IL-33 という 2 つの異なるサイトカインにより誘発される喘息モデルにおいて、12/15-LOX KO マウスでは野生型マウスに比べて明らかな喘息症状の重症化が認められた。

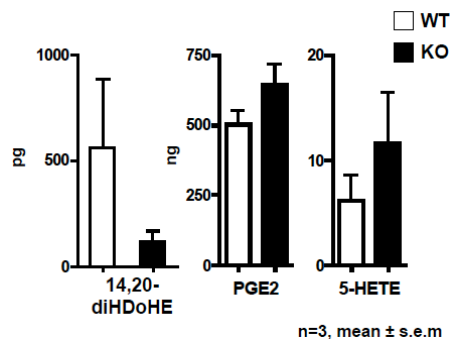


【図 4】 12/15-LOX KO マウスでは IL-25 により誘導される気道炎症が増悪する

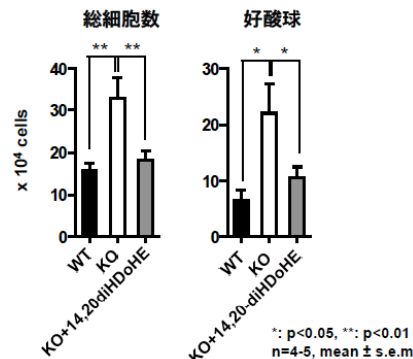
3. 喘息モデルにおける 14,20-diHDoHE の寄与の解析

次に IL-25 により気道炎症を誘導した肺組織より脂質を抽出し、LC-MS/MS を用いた脂肪酸代謝物のメタボローム解析を行った。その結果、14,20-diHDoHE は気道炎症時の肺組織で内因性の産生が認められ、その産生量は 12/15-LOX KO マウスにおいて著しく減少していた(図 5)。一方、シクロオキシゲナーゼ代謝物である PGE₂ や 5-LOX 代謝物である 5-HETE にはそれほど大きな変化は認められなかった。IL-33 により誘導した気道炎症においても、同様の傾向が認められ、14,20-diHDoHE をはじめとする 12/15-LOX 代謝物の産生量の低下が気道炎症の悪化の原因となっている可能性が示唆された。

この可能性を検証するために、12/15-LOX KO マウスに対して、IL-25 と同時に 10ng の 14,20-diHDoHE を点鼻により気管内に投与し、好酸球性気道炎症が改善されるか検討を行った。その結果、14,20-diHDoHE を局所投与することにより 12/15-LOX KO マウスにおける BALF 中の総細胞数および好酸球数が、野生型と同程度のレベルまで減少することが明らかとなった(図 6)。



【図 5】 IL-25 誘導喘息モデルにおいて肺組織で産生される脂肪酸代謝物



【図 6】 14,20-diHDoHE 投与により 12/15-LOX KO マウスにおける好酸球数の増加が改善される

【まとめと考察】

本研究において私は、好酸球が 12/15-LOX 依存的に DHA 由来の抗炎症性代謝物 14,20-diHDoHE を産生する細胞であることを明らかにした。さらに、ヒトの臨床検体を用いた解析から、重症喘息患者の好酸球では 14,20-diHDoHE の産生能が著しく低下していることを見出した。また、IL-25、IL-33 という 2 つの異なるサイトカインにより誘発される喘息モデルにおいて、14,20-diHDoHE が肺組織で内因性に生成していることを確認し、一方で 12/15-LOX KO マウスにおいては肺組織の 14,20-diHDoHE 生成量の大幅な低下および喘息症状の重症化が認められることを明らかにした。さらに、ごく低用量の 14,20-diHDoHE を局所投与することにより、12/15-LOX KO マウスにおける好酸球性の気道炎症が野生型のレベルにまで改善することが明らかとなった。以上のことから、14,20-diHDoHE は、喘息病態において好酸球から産生され、好酸球性気道炎症の悪化を抑制する自己制御因子として機能している可能性が示唆された。さらに、好酸球中の 12/15-LOX 活性および 14,20-diHDoHE 産生の低下が喘息の重症化の原因であることも示唆された。今後は、14,20-diHDoHE が抗炎症作用を発揮するための作用機序をさらに細胞レベル・分子レベルで解明するとともに、重症喘息等の病態時においてどのような機構で好酸球中の 12/15-LOX 活性が低下するのかを解明することが重要である。