

審査の結果の要旨

氏名 横倉 良行

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。DHA 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、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。横倉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、その結果、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) を見出していた。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った。博士後期課程において横倉は、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。以下にその概要を示す。

1. 14, 20-diHDoHE を産生する細胞の同定

まず横倉は、本学部有機反応化学教室との共同研究により調整した 14, 20-diHDoHE の有機合成標品 (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、好酸球から刺激依存的に 14, 20-diHDoHE が産生することを見出した。好酸球は同じく DHA 由来の活性代謝物 PD1 を刺激依存的に生成することが知られているが、14, 20-diHDoHE の生成量は PD1 よりむしろ多いことが判明した。一方、好中球やマクロファージからは 14, 20-diHDoHE の産生はほとんど認められなかった。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 A)。以上の結果から横倉は、好酸球が 12/15-LOX 依存的に DHA を 14-HDoHE に変換し、さらに抗炎症性代謝物 14, 20-diHDoHE を産生することを明らかにした。

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 活性および抗炎症性代謝物である PD1 やリポキシシン A4 の生成量が健常人に比べて大幅に低下していることが報告されている。そこで横倉は、14, 20-diHDoHE の生成量についても定量分析を行い、マウスと同様にヒトの好酸球からも刺激依存的に 14, 20-diHDoHE が産生されることを認め、さらに、重症喘息患者の好酸球ではその産生量が著しく低下していることを明らかにした。一方、起炎性の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を示した。

2. 喘息モデルにおける 12/15-LOX の機能解析

そこで、横倉は 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、12/15-LOX 遺伝子欠損マウスを用いた喘息モデルの検討を行った。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。

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、好酸球数が大幅に増加しており、CD4 陽性の Th2 細胞についても増加傾向を認めた。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、Th2 細胞を誘導するケモカインである CCL17 や CCL22、IL-25 の受容体である IL-17RB の発現がいずれも有意に上昇していることを見出した。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、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、粘液産生が亢進していることを明らかにした。以上より、横倉は 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が増悪化することを見出した。さらに、IL-33 についても同様の評価を行い、12/15-LOX KO マウスにおいて BALF 中の好酸球、Th2 細胞の増加、肺組織中の Th2 応答の亢進を認めた。従って、IL-25、IL-33 と 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が重症化することを見出した。

3. 喘息モデルにおける 14, 20-diHDoHE の寄与の解析

次に横倉は、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を認め、その生成量は 12/15-LOX KO マウスにおいて著しく減少していることを見出した。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を示唆した。さらに、12/15-LOX KO マウスに対して、IL-25 と同時に 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し、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を明らかにした。

以上、本研究において横倉は、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 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が重症化することを見出した。さらに、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を明らかにした。以上のことから横倉は、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、その代謝異常すなわち 12/15-LOX 活性の低下が喘息の重症化の要因となり得ることを示唆した。従って、本研究は喘息など炎症を基盤病態とする様々な難治性疾患に対する新しい治療戦略につながることで期待される極めて重要な研究であり、博士（薬学）に充分値するものと判断した。