

「炎症収束性脂質メディエーター：産生・作用機構とヒト血中プロファイルの解明」

神戸大学大学院 医学研究科

医学教育学分野・質量分析総合センター

篠原 正和

1 研究の背景と目的

生体に外的傷害が加わった際、防御反応として炎症が惹起される。炎症反応は本来、外的傷害に対する生体の防御反応であるが、炎症状態が持続すると慢性炎症を生じ、組織線維化等の不可逆的な組織障害を引き起こすため、適切なタイミングで炎症収束プロセスが開始されることが重要である。

生体に侵襲が加わると、急性期に浮腫が生じ、好中球の浸潤が見られる。続いて単球/マクロファージの浸潤が観察され、この時相が炎症収束期である。この単球/マクロファージは、M2 マクロファージと呼ばれ、組織デブリスやアポトーシスに陥った好中球を貪食し（エフェロサイトーシス）、炎症局所から取り除く役割を担っている。このようなプロセスで、生体は炎症を能動的に収束させ、恒常性を保つ。

従来、炎症収束は、炎症性メディエーターの経時的な産生低下・希釈に伴って「受動的に」進行すると考えられてきた。申請者は、これまでに炎症収束プロセスは「炎症収束性脂質メディエーター」によって「能動的に」制御されるプロセスであることを報告してきた【図1】。

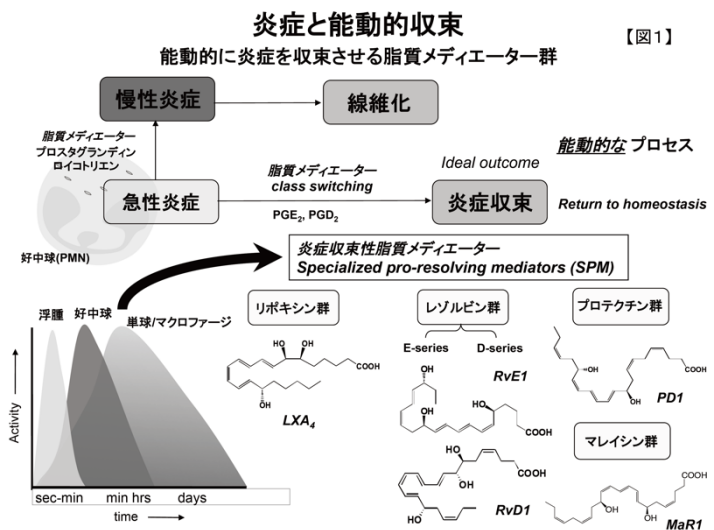
これら炎症収束性脂質メディエーターはリポキシン群・レゾルビン群・プロテクチン群・マレイシン群の4つのファミリーからなり、炎症局所において多価不飽和脂肪酸を基質として産生され、能動的な炎症収束作用を発揮することが明らかとなりつつある。本申請においては、これらの炎症収束性脂質メディエーターが（1）どのような機序ならびに環境でその産生が制御されているのか（2）どのような分子生物学的機序で能動的な炎症収束作用を発揮しているのか（3）ヒト血中においてどのようなメディエータープロファイルを示し、炎症性疾患とどのような関連を示すのか、解き明かすことを目標とする。

2 研究方法・研究内容

(1) どのような機序ならびに環境でその産生が制御されているのか

これまでの研究により、上皮細胞・内皮細胞さらに炎症局所に出現する好中球・単球/マクロファージ・血小板等が持つサイクロオキシゲナーゼ（COX）リポキシゲナーゼ（LO）シトクロム P450（CYP）酵素活性が炎症収束性脂質メディエーター産生に重要な働きを担っていることが明らかとなってきた。しかしこれら酵素発現・酵素活性が炎症局所の環境でどのように制御されているか、十分には明らかとされていない。したがって、メディエーター産生メカニズムの解明のため、以下の研究項目を立案する。

- ・pH、酸素分圧の影響の検討：培養系の上皮細胞・内皮細胞、ならびにヒト末梢血より分離



した好中球・単球/マクロファージ・血小板を用い、炎症局所で想定される pH-アシデミア・低酸素環境での培養を行い、メディエーター産生に関わる酵素発現をリアルタイム PCR 法ならびにウェスタンブロット法にて定量的に検討する。また液体クロマトグラフ質量分析を用いた脂質メディエータープロファイル手法によって、脂質メディエーター産生・分解経路を定量的に評価する。

・炎症で産生される低分子代謝物の影響の検討：炎症では嫌気性解糖系が著しく亢進し、さらに傷害組織から遊出するなどして局所において乳酸・ケトン体・アデノシン等の特定の低分子代謝物濃度が上昇する。近年、低分子代謝物が直接的に蛋白機能を制御していることが報告されるようになっており、本申請では炎症局所で蓄積する低分子代謝物により上述した酵素発現・酵素活性が制御されていないか検討する。

## (2) どのような分子生物学的機序で能動的な炎症収束作用を発揮しているのか

作用メカニズムとして、これまでにいくつかの G タンパク結合型受容体が候補受容体として報告されてきたが、炎症収束プロセスにおいて、どの細胞群にどのような発現を示しているか、いまだ明らかでない。したがって培養系の上皮細胞・内皮細胞、ならびにヒト末梢血より分離した好中球・単球/マクロファージ・血小板を用い、受容体の発現をフローサイトメトリーにて評価する。またアシデミア・低酸素環境、炎症で産生される低分子代謝物による発現誘導が見られるか検討し、GPCR 下流のシグナル伝達についても分子生物学的に検討する計画である。

また脂質メディエーターならびにその代謝物による直接的な転写因子・蛋白質の制御が予測されたため、脂質代謝物に結合する蛋白の探索を計画した。

## (3) ヒト血中においてどのようなメディエータープロファイルを示し、炎症性疾患とどのような関連を示すのか

今回の研究では、ヒト疾患として糖尿病に注目した。厚生労働省が発表する国民健康・栄養調査では、国内の糖尿病症例は現在約 2,210 万人と推定されている。近年新しい糖尿病治療薬が開発・実用化されているにもかかわらず、糖尿病症例は増加の一途にある。糖尿病の最大の合併症は血管合併症であり、脳梗塞・心筋梗塞・腎不全など生命予後を決定づける重篤な疾患の直接的な原因となっている。

ヒトの血管機能は血管内腔を覆っている血管内皮細胞によって主に制御され、糖尿病・高脂血症・高血圧などの動脈硬化リスク因子が高まると血中に増加する種々の生理活性物質が血管傷害を引き起こす。血管傷害が生じると、まず急性炎症として浮腫が生じ、好中球・血小板が集積する。その後、リスク因子が軽微であれば炎症収束相となり、傷害部位に単球・マクロファージが集まり、組織の修復が起こって恒常性の維持に働く。これまで生理活性物質は蛋白質ならびにペプチドから研究されてきたが、脂質由来の生理活性低分子代謝物、脂質メディエーターが炎症・炎症収束プロセスに重要な役割を担っていることが明らかになりつつあり、さらにヒト血液においても生理作用を持つ濃度で脂質メディエーターが同定されている。そこで、糖尿病の進行にともなって、本来ならば恒常性の維持に役立つ脂質メディエーターバランスに異常をきたすのではないかと予想し、血液を用いたプロファイリングによって糖尿病に特徴的な脂質メディエーターを解き明かすことを目標とする。

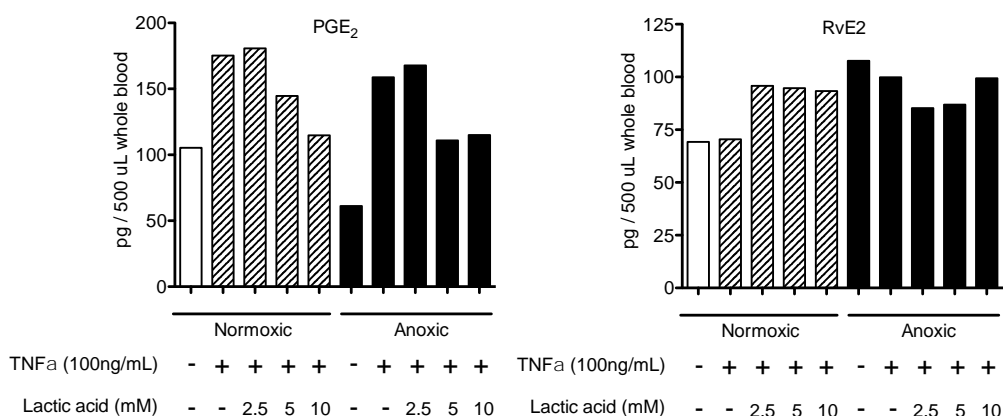
## 3 研究成果

### (1) どのような機序ならびに環境でその産生が制御されているのか

本研究では、炎症局所で予想される環境として低酸素環境、高 TNF  $\alpha$  環境、高乳酸環境を設定し、ヒト全血から産生される脂質メディエーターの解析を行った。へパリン化ヒト全血 500 $\mu$ l を 12 ウェルプレートに分注し、100ng/mL の TNF  $\alpha$  刺激、さらに 2.5mM-10mM の乳酸刺激を添加した後に、通常のインキュベーターもしくは無酸素インキュベーターに入れて 6 時間培養し、全血 500 $\mu$ l に含まれる脂質メディエーターを液体クロマトグラフ質量分析にてプロファイルした。炎症性メディエーターであるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) と、炎症収束性メディエーターであるレゾルビン E2 (RvE2) にて興味深い結果が得られ、下図に示す。

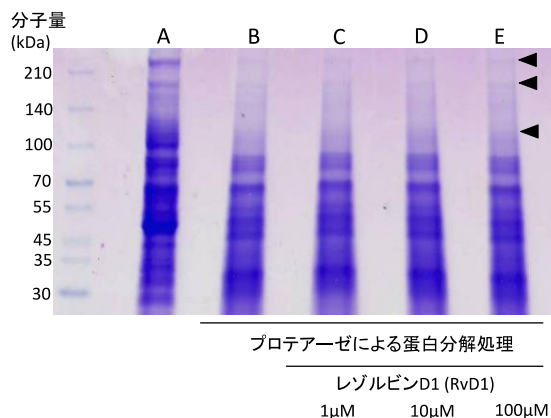
- ・低酸素環境は PGE<sub>2</sub> を低下させ、RvE2 を増加させる。全血においては、全体として抗炎症にシフトしている可能性が示される。
- ・TNF  $\alpha$  刺激によって PGE<sub>2</sub> は増加するが、乳酸が加わることによって PGE<sub>2</sub> の増加は抑制され、抗炎症作用を示している可能性が示唆される。また乳酸刺激は RvE2 を増加させる方向に働く。

これらの結果より、炎症局所環境である低酸素、高乳酸が全血の脂質メディエータープロファイルを変動させている可能性が示唆され、血中のどの細胞成分がこの現象に寄与しているのか、今後詳細な検討が必要である。



## (2) どのような分子生物学的機序で能動的な炎症収束作用を発揮しているのか

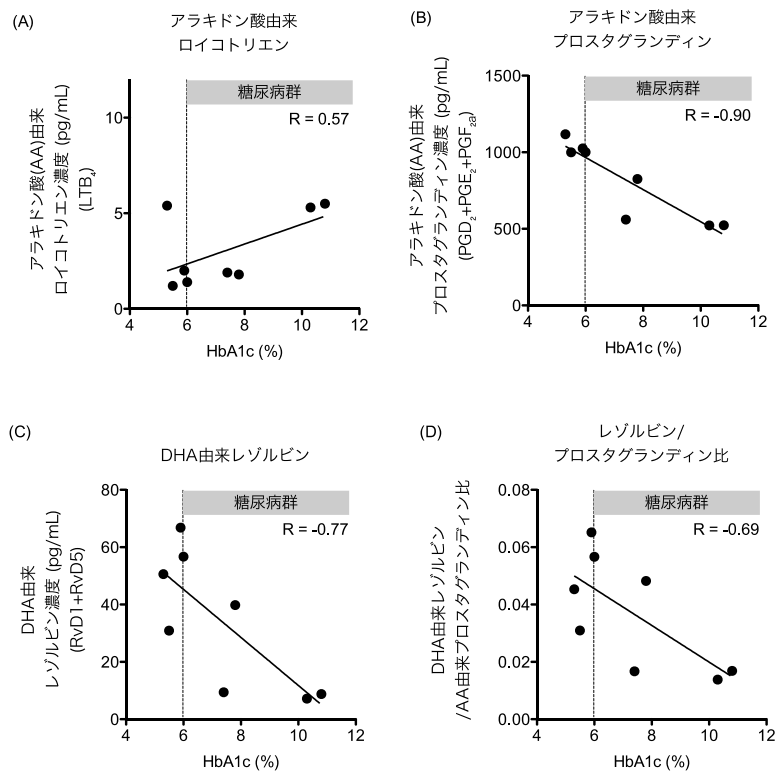
脂質由来の低分子代謝物は、水溶性代謝物と異なり比較的容易に細胞膜を通過するため、細胞内のさまざまな蛋白と相互作用を生じる可能性がある。このため、マクロファージから抽出した蛋白質を用いて、炎症収束性脂質メディエーターとして知られているレゾルビン D1 に結合する可能性のある蛋白探索に取り組んだ。本申請では DARTS (Drug Affinity Responsive Target Stability) 法によって低分子と結合する蛋白質の探索を試みた。本手法は、低分子代謝物と結合した蛋白質が蛋白分解酵素による分解から保護される現象を応用し、特定の低分子代謝物に結合する候補蛋白質を同定する手法である。右図はマウスマクロファージ細胞株 (Raw 細胞) を用いた検討であるが、細胞より抽出された蛋白(A)がプロテアーゼによる処理で(B)のように分解



される。プロテアーゼによる蛋白分解処理の前に蛋白質とレゾルビン D1 をインキュベートしておくこと(E)のようにいくつかの蛋白分解が抑制されている。(E)の矢印に示す蛋白を、質量分析による同定に供したが、発現量が少ないためか有意な同定を得ることができず、今後実験条件を検討しながらの再検が必要である。

### (3) ヒト血中においてどのようなメディエータープロファイルを示し、炎症性疾患とどのような関連を示すのか

本研究では、健常群ならびに糖尿病群から取得した末梢血液サンプルを用いて、血清中脂質メディエーター解析を実施した。右図では、X 軸に糖尿病の重症度である HbA1c 値を示した。一般的にこの値が 6.5% を超えると糖尿病と診断される。糖尿病の重症度と、血清中のアラキドン酸由来のロイコトリエン濃度(A)、プロスタグランジン濃度(B)、ならびに DHA 由来レゾルビン濃度(C)との相関を検討した。一般的にアラキドン酸由来のロイコトリエンは炎症惹起性の脂質メディエーターと理解されており、(A)に示す通り、糖尿病の悪化に伴って増加する傾向を示す。アラキドン酸由来のプロスタグランジン類は、炎症急性期で増加する傾向にある脂質メディエーターで、炎症惹起/炎症収束いずれの作用も併せ持ち、生体恒常性の維持に重要な役割を果たしているが、糖尿病の悪化に伴って減少する傾向を示す(B)。興味深いことに炎症収束プロセスに重要と考えられる DHA 由来のレゾルビンは糖尿病の悪化に伴って減少する(C)。糖尿病による影響の大きいメディエーターを理解するためレゾルビン/プロスタグランジン比を算出すると(D)、糖尿病の進行と共にレゾルビン濃度が選択的に低下していた。



この結果から糖尿病の進行とともに血中の炎症惹起性脂質メディエーターは増加し、さらに炎症収束作用を持つ脂質メディエーターの産生障害もしくは分解亢進が生じている可能性が考えらる。今後、年齢・性別・投薬状況等の患者背景因子をマッチさせた健常群、糖尿病群比較の症例数を増やし、糖尿病の増悪や合併症の出現に伴って変動する脂質メディエーターを明らかにしていくことが必要である。

この結果から糖尿病の進行とともに血中の炎症惹起性脂質メディエーターは増加し、さらに炎症収束作用を持つ脂質メディエーターの産生障害もしくは分解亢進が生じている可能性が考えらる。今後、年齢・性別・投薬状況等の患者背景因子をマッチさせた健常群、糖尿病群比較の症例数を増やし、糖尿病の増悪や合併症の出現に伴って変動する脂質メディエーターを明らかにしていくことが必要である。

## 4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究を発展させることで、血中脂質メディエータープロファイルを糖尿病血管合併症の予防・治療における管理目標として用いること、脂質メディエーターを創薬のシーズとして用いることなどの波及効果が期待できると考える。