

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19577

研究課題名(和文) 膠原病様モデルマウスを用いたT細胞活性化をもたらす新規脂質メディエータの同定

研究課題名(英文) Identification of new lipid mediators associated with inflammation in model mice for collagen vascular diseases

研究代表者

尾崎 貴士(Ozaki, Takashi)

大分大学・医学部・病院特任助教

研究者番号：70749374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膠原病モデルマウスを用いて、炎症病態形成に関連し得る新たな脂質メディエータの同定を目的とした。SLEモデルマウスをLC-MSを用いて解析した結果、同マウスではパルミトイルエタノールアミド(PEA)やオレオイルエタノールアミド(OEA)の血中及び脾臓内の濃度が野生型マウスに比べて低値であることが判明した。また、PEAやOEAは、SLEの病態形成に重要なTLR9刺激による樹状細胞やB細胞からの炎症性サイトカインの産生を抑制した。さらに、同抑制作用はマウスを用いた個体レベルでも認められた。今後、PEAやOEAの病態形成への関与やSLEに対する治療効果の検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to identify novel lipid mediators which might be associated with inflammation in model mice for collagen vascular diseases. We measured lipid mediators in MRL/lpr mice (lupus model mice) and MRL/MpJ mice (wild type mice) using LC-MS and revealed that PEA and OEA levels were decreased in serum and spleen in MRL/lpr mice compared to MRL/MpJ mice. PEA and OEA inhibited TLR9-mediated production of pro-inflammatory cytokines in bone marrow-derived dendritic cells and B cells in vitro. Moreover, PEA and OEA reduced IL-6 production in mice injected with CpG and D-galactosamine. Further researches are needed to clarify whether PEA and OEA could be potential therapeutic candidates to modulate inflammation in SLE.

研究分野：膠原病

キーワード：脂質メディエーター SLE パルミトイルエタノールアミド オレオイルエタノールアミド 炎症性サイトカイン Toll様受容体9

1. 研究開始当初の背景

近年、体内に微量に存在する脂質メディエーターと炎症との関連が注目されており、脂質メディエーターの新たな機能を解明することにより、膠原病をはじめとする炎症性疾患の治療への応用が期待されている。

我々の研究室では、Toll 様受容体(TLR)のシグナル伝達に重要な TRAF6 が T 細胞で特異的に欠損したマウス (TRAF6⁻ T マウス) の解析から、同マウスでは T 細胞は自然に活性化し、膠原病様の全身性慢性炎症を引き起こすことを明らかにしてきた。しかし、これまで TRAF6 を欠損した T 細胞が自然に活性化する分子機序は不明であった。そこで、本研究において、T 細胞の活性化を生じる機序に、脂質メディエーターが関与しているか検討することとした。

さらに、他の膠原病モデルマウスにおける病態形成に関しても、脂質メディエーターが関与している可能性について、液体クロマトグラフ・質量分析計(LC-MS)などを用いて解析することを目的とし、本研究を遂行することとした。

2. 研究の目的

膠原病モデルマウスを用いて、炎症病態の発生に寄与する新たな脂質メディエーターの機能を解明し、膠原病に対する新たな治療標的分子としての可能性を探る

3. 研究の方法

【1】 TRAF6⁻ T マウスを用いた、T 細胞活性化や全身性炎症性疾患に関与する脂質メディエーターの機能解析

TRAF6 欠損 T 細胞の自然活性化において、スフィンゴシン 1 リン酸(S1P)シグナルが関与しているか検討する

TRAF6 欠損 T 細胞の活性化及び TRAF6⁻ T マウスにおける全身性慢性炎症に関連する脂質メディエーターの候補として、本研究ではリンパ球遊走の制御に関与するなど多彩な機能を有するスフィンゴ脂質由来のスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) を挙げた。

S1P は T 細胞の PI3K-Akt 経路を活性化することで制御性 T 細胞の活性化と分化を抑制していることや、S1P1 受容体を T 細胞で過剰に発現したトランスジェニックマウスにおいて Th2 応答が亢進するといった過去の報告があり、これらの S1P に関する作用は TRAF6 欠損 T 細胞でみられる特徴と類似していたことから、本研究では S1P に着目した。

我々のウエスタンブロット法を用いた予備検討では、S1P 刺激を受けた TRAF6 欠損 T

細胞ではリン酸化 Akt は増強していた。そこで、TRAF6⁻ T マウスに対して、S1P 受容体の機能的アンタゴニストである FTY720(フィンゴリモド)を全身投与し、全身性炎症性疾患の改善がみられるか検討した。

TRAF6⁻ T マウスの炎症に関与する S1P 以外の分子を同定する

S1P 以外に TRAF6⁻ T マウスの炎症に関与する分子を同定するため、同マウスと野生型マウスの血中代謝産物をキャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) を用いて網羅的に解析した (HMT 社に外部委託)。その結果着目された分子について、炎症との関連性を免疫担当細胞を用いた実験を行い検討した。

【2】全身性エリテマトーデス (SLE) モデルマウス (MRL/lpr マウス) の病態形成に寄与する脂質メディエーターを同定する

SLE モデルマウスの体内において、野生型マウスと比較して有意に高値、あるいは低値となっている脂質メディエーターを同定する

膠原病のひとつである全身性エリテマトーデス (SLE) の代表的モデルマウスである MRL/lpr マウスでは、Fas 遺伝子異常を有し、腎炎やリンパ節腫大といった SLE に類似した炎症を自然発症する。

本研究では、同マウス及び野生型マウス (MRL/MpJ マウス) の血液や各臓器に含まれる脂質メディエーター関連代謝物を、液体クロマトグラフ・質量分析計(LC-MS)にて測定し、炎症に寄与する脂質メディエーターの候補分子を絞ることを目指した。

測定に際しては、脂質メディエーター関連物質計 158 成分を同時に測定できるメソッドプログラム (LC/MS/MS メソッドパッケージ脂質メディエーター ver. 2 島津製作所) を用いて網羅的に一斉解析を行った。

LC-MS の解析結果から着目した脂質メディエーター関連物質について、病態形成に及ぼす影響に関して免疫担当細胞を用いて検討する

SLE モデルマウスの体内において、野生型マウスと比べて有意に高値、あるいは低値を示した脂質メディエーター関連物質が、SLE の病態形成に関与しているかどうか、マウス由来の免疫担当細胞を用いて実験を行った。

また、炎症モデルマウスを用いて、同脂質メディエーター関連物質の生体内における作用を検討した。

4. 研究成果

【1】TRAF6- Tマウスを用いた、T細胞活性化や全身性炎症性疾患に關与する脂質メディエーターの機能解析

TRAF6- Tマウスに対して、S1P1受容体の機能的アンタゴニストであるFTY720を連日、計5か月間にわたり自由飲水にて投与した。その後、脾臓におけるT細胞活性化をFACSにて解析した結果、T細胞の自然活性化は抑制されなかった。また、FTY720投与によるマウスの全身性炎症性病態の治療効果も認めなかった。

以上より、TRAF6欠損T細胞の自然活性化やTRAF6- Tマウスでみられる全身性炎症性疾患に対するS1Pの關連性を証明することはできなかった。

次に、TRAF6- Tマウスと野生型マウスの血清をCE-MSを用いてメタボローム解析を行ったところ、長鎖アシルカルニチン濃度がTRAF6- Tマウスにおいて高値である可能性が示唆された。しかし、当大学が所有しているLC-MSを用いてTRAF6- Tマウスの血中長鎖アシルカルニチン濃度の測定を行った結果、ミリストイルカルニチンやパルミトイルカルニチンといった長鎖アシルカルニチンの血中濃度は、野生型マウスとTRAF6- Tマウスで有意な差はみられず、CE-MS解析の結果の再現性を確認することはできなかった。

また、脾臓由来 naïve T細胞のヘルパーT細胞分化における長鎖アシルカルニチンの影響を検討したが、T細胞分化への明らかな影響はみられなかった。

以上から、TRAF6- Tマウスの炎症病態と、長鎖アシルカルニチンとの關連性は証明できなかった。

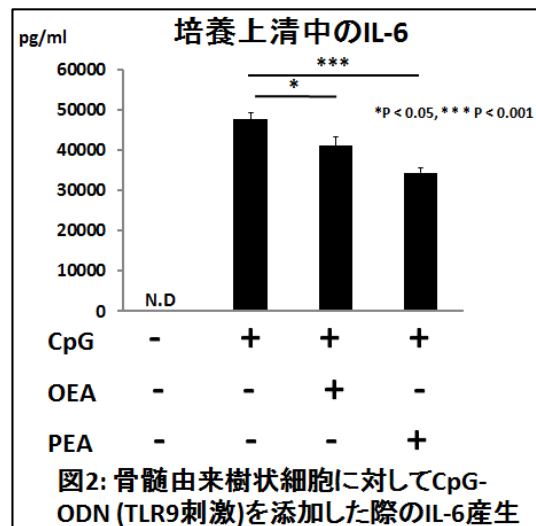
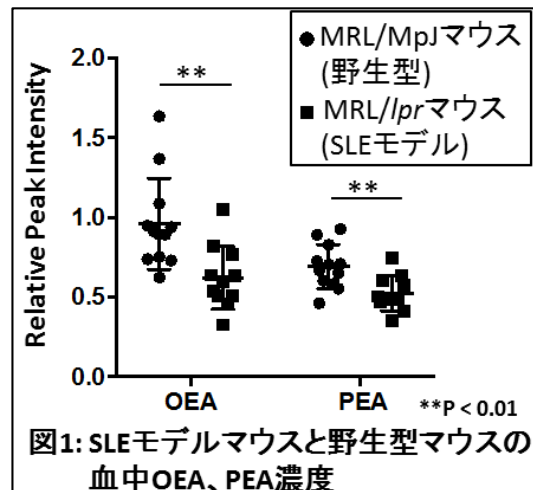
【2】全身性エリテマトーデス (SLE) モデルマウス (MRL/ *lpr* マウス) の病態形成に寄与する脂質メディエーターを同定する

生後約半年が経過したMRL/ *lpr* マウス及び野生型マウス (MRL/MpJ マウス) の脾臓や血清中に含まれる脂質メディエーター關連代謝物を、LC-MSを用いて測定した結果、MRL/ *lpr* マウスの血中及び脾臓では、脂質代謝物であるパルミトイルエタノールアミド (PEA) とオレオイルエタノールアミド (OEA) の濃度が、野生型マウスに比べて有意に低下していることを見出した (図1)

そこで、OEA及びPEAと、SLEとの關連性を探るため、SLEの病態形成に重要な役割を担うとされるTLR9刺激 (CpG-ODN) に対する作用を検討した。

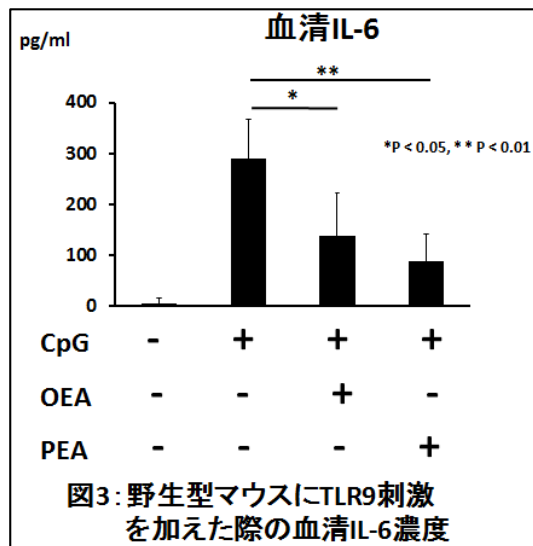
マウス由来のマクロファージ細胞株であるRaw 264.7細胞、マウス骨髄由来樹状細胞、及びB細胞に対して、CpG-ODNを添加した際に産生されるIL-6濃度を測定した。その結

果、PEAやOEAを添加することによって、其々の細胞が産生するIL-6濃度は有意に低下することを見出した (図2)。また、マウス骨髄由来樹状細胞においては、TLR9刺激した際のIL-12、IL-23の産生もPEA、OEAは有意に抑制した。



さらに、マウス骨髄由来樹状細胞において、TLR9刺激を加えた際の補助刺激シグナル分子CD86発現レベルは、PEA、OEA添加により有意に低下がみられた。

次に、これらのTLR9刺激に対するPEA、OEAの抑制効果がin vivoにおいてもみられるか、マウスを用いて検討した。TLR9刺激であるCpGと、D-ガラクトサミンを野生型マウス (BALB/c) に腹腔内注射し、その後上昇する血中IL-6濃度をELISA法にて測定した。その結果、OEAやPEAを事前にマウスに投与することによって、CpGとD-ガラクトサミンを投与した後の血中IL-6濃度は有意に低下することを見出した (図3)



以上より、本研究において SLE モデルマウスの血中および脾臓内においては、野生型マウスに比べて PEA や OEA 濃度が有意に低値であることに加え、両物質は TLR9 刺激に対して細胞レベル及びマウス個体レベルのいずれにおいても炎症抑制作用を示すことを見出した。今後、これらの物質の病態形成への関与や、SLE に対する治療応用に関する研究の発展が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Kamiyama Naganori, Soma Ryusuke, Hidano Shinya, Watanabe Kei, Umekita Hiroshi, Fukuda Chiaki, Noguchi Kaori, Gendo Yoshiko, Ozaki Takashi, Sonoda Akira, Sachi Nozomi, Runtuwene Lucky Ronald, Miura Yumako, Matsubara Etsuro, Tajima Shigeru, Takasaki Tomohiko, Eshita Yuki, Kobayashi Takashi. Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice. Antiviral Res. 2017 Oct;146:1-11. (査読有)

[学会発表](計2件)

尾崎貴土, 園田光, 玄同淑子, 野口香緒里, 佐知望美, 神山長慶, 飛弾野真也, 石井宏治, 柴田洋孝, 小林隆志. Inhibition of TLR9-induced dendritic cell activation and pro-inflammatory cytokine production by Oleylethanolamide, whose level is reduced in MRL/lpr mice. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会

尾崎貴土, 後藤亮, 園田光, 広瀬晴奈, 玄同淑子, 野口香緒里, 神山長慶, 飛弾野真也, 石井宏治, 柴田洋孝, 小林隆志. 新規脂質メディエーターの OEA 及び PEA は、Toll 様受容体 9(TLR9)刺激による樹状細胞と B 細胞の活性化を抑制する. 第 8 回 癌・炎症と抗酸化研究会(CIA 研究会) 2017 年

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 貴土 (Ozaki, Takashi)
大分大学・医学部・病院特任助教
研究者番号: 70749374

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()