

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16155

研究課題名(和文) SLEに対する抗炎症性脂質メディエーターOEA、PEAの機能解明と有用性の検討

研究課題名(英文) Identification of palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide with inhibitory effect on SLE-related inflammation

研究代表者

尾崎 貴士(Ozaki, Takashi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70749374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、PEAは骨髄由来樹状細胞、脾臓B細胞、Raw 264.7細胞においてTLR9刺激を介した炎症性サイトカイン産生をmRNAレベルおよび蛋白レベルで抑制することを見出した。さらに、TLR9刺激による細胞表面マーカーの発現や、細胞増殖、抗体産生をPEAは抑制することも明らかにした。また、TLR9刺激によるseptic shock modelマウスに対して、PEAを投与することで生命予後が改善した。PEAは他のTLR刺激(TLR2, 3, 4, 7)による炎症性サイトカイン産生も抑制することから、TLRが関与するSLEを含めた炎症性疾患の治療においてPEAが応用される可能性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、抗炎症性の脂質メディエーターが注目される中において、本研究を通じてパルミトイルエタノールアミド(PEA)が各種免疫担当細胞におけるTLR9刺激を介した炎症性サイトカイン産生や細胞表面マーカー発現、細胞増殖や抗体産生に対していずれも抑制的に作用することが明らかとなった。また、PEAの抗炎症作用はSeptic shockモデルマウスの生体内においても発揮されることも見出した。将来的にSLEをはじめとするTLRが関連した炎症性疾患の治療薬として、PEAが創薬のターゲットとなり得る可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Palmitoylethanolamide (PEA), an endogenous N-acylethanolamide, can suppress inflammation induced by Toll-like receptor (TLR) signaling both in vitro and in vivo. PEA suppressed pro-inflammatory cytokine production in a mouse macrophage cell line (RAW 264.7) in response to TLR ligands such as lipopolysaccharide, peptidoglycan, poly(I:C), imiquimod and CpG-ODN. PEA inhibited both mRNA and protein levels of IL-6 in bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) and B cells stimulated with CpG-ODN. In addition, co-stimulatory molecules such as CD80 and CD40 on BMDCs and B cells, together with IgM production and cell proliferation of B cells, were attenuated by PEA. Moreover, PEA significantly reduced mortality and serum IL-6 levels in mice injected with CpG-ODN plus D-galactosamine. Taken together, these results suggest that PEA ameliorates inflammation by inhibiting TLR signaling, which could be a novel therapeutic target for inflammatory disorders.

研究分野：膠原病

キーワード：パルミトイルエタノールアミド Toll様受容体 脂質メディエーター オレオイルエタノールアミド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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による抗炎症作用が注目されており、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、SLE モデルマウス (MRL/lpr マウス) と野生型マウス (MRL/MpJ マウス) の血中および脾臓に含まれる脂質メディエーターを、液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて網羅的に解析した。その結果、SLE モデルマウスでは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。さらに、PEA 及び OEA は、SLE の病態形成機序に関わっている Toll 様受容体 9 (TLR9) 刺激による炎症性サイトカイン産生を、免疫担当細胞を用いた *in vitro* において蛋白レベルで抑制することを明らかにし、CpG-ODN と D-ガラクトサミンを用いた septic shock model マウスを用いた *in vivo* においても同様に炎症性サイトカイン産生を抑制することを見出した。

2. 研究の目的

Toll 様受容体を介した炎症に対する PEA、OEA の抑制作用を遺伝子転写レベルで解析し、さらに炎症性疾患に対する PEA、OEA の作用について動物モデルを用いてさらなる検証を行うことで、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) TLR シグナルを介する炎症性サイトカイン産生に対する PEA や OEA の抑制作用機序の解明

これまでの研究により、我々はマウス骨髄由来樹状細胞、脾臓 B 細胞、Raw 264.7 細胞において、PEA と OEA は TLR9 刺激による炎症性サイトカイン産生をタンパクレベルで抑制することを見出した。本研究では、PEA と OEA の抑制作用点を明らかにするため、同細胞における炎症性サイトカインの mRNA 産生レベルを Real-time PCR 法を用いて解析した。

また、TLR9 以外の TLR 受容体 (TLR2, 3, 4, 7) 刺激による炎症性サイトカイン産生 (IL-6, TNF-) に対する PEA の作用について、Raw 264.7 細胞を用いて検討した。

(2) TLR9 シグナルを介した細胞表面マーカー発現に対する PEA の抑制作用の検討

これまでの研究により、骨髄由来樹状細胞における TLR9 刺激を介する CD86 発現を PEA と OEA は抑制することを明らかにした。今回はさらに骨髄由来樹状細胞の他の表面マーカー (CD40 や MHC Class II) の発現や、マウス脾臓 B 細胞における表面マーカーの発現に対する PEA の影響について、フローサイトメトリーを用いて解析した。

(3) TLR9 シグナルを介した B 細胞増殖や抗体産生に対する PEA の抑制作用の検討

TLR9 シグナルを介したマウス脾臓 B 細胞の増殖を PEA が抑制するか、フローサイトメトリーを用いて検討した。また、抗体産生に対する抑制作用についても ELISA 法を用いて検討した。

(4) TLR9 刺激による Septic shock モデルマウスに対する PEA の治療効果の検討

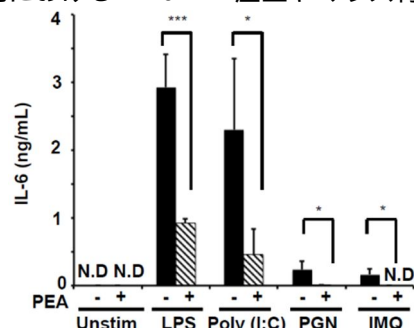
PEA (40mg/kg) を 3 日連続投与した野生型マウスに対して、TLR9 刺激薬の CpG-ODN (1.5mg/kg) と、D-ガラクトサミン (250mg/kg) を投与した septic shock model を用いて、生命予後に影響するか検討した。

4. 研究成果

(1) TLR シグナルを介する炎症性サイトカイン産生に対する PEA の抑制作用機序の解明

マウス骨髄由来樹状細胞、脾臓 B 細胞、Raw 264.7 細胞において、PEA は TLR9 刺激による IL-6 mRNA 発現を抑制していることを見出した。さらに、骨髄由来樹状細胞では、PEA は IL-12 と IL-23 の mRNA 発現も抑制された。また、OEA も Raw 264.7 細胞における IL-6 mRNA 産生やマウス骨髄由来樹状細胞における IL-6 と IL-23 の mRNA 産生を抑制した。この結果より、PEA や OEA は、炎症性サイトカイン産生の過程の中で転写あるいは細胞内シグナル伝達の段階において作用している可能性が示唆された。

また、TLR9 以外の TLR 受容体 (TLR2, 3, 4, 7) 刺激による IL-6 や TNF- α 産生に対して、PEA はタンパクレベルで抑制することを見出した (右図)。この結果から、様々な TLR 受容体が関わる炎症性病態に対して PEA が抑制作用を示す可能性が期待される。



(2) TLR9 シグナルを介した細胞表面マーカー発現に対する PEA の抑制作用の検討

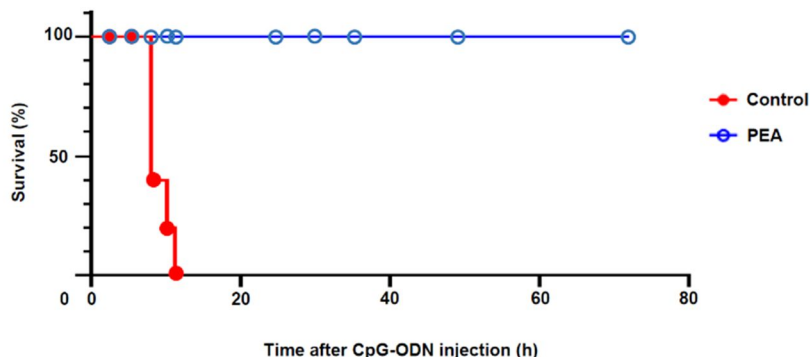
マウス骨髄由来樹状細胞では、TLR9 刺激を介する CD86 発現に加えて、CD40 と MHC Class II の発現に対しても PEA は抑制作用を有することを見出した。また、マウス脾臓 B 細胞においても、PEA は TLR9 を介した CD86 と CD40 の発現に対して抑制作用を有することも明らかにした。

(3) TLR9 シグナルを介した B 細胞の増殖や抗体産生に対する PEA の抑制作用の検討

TLR9 刺激による B 細胞増殖は、PEA を投与することによって有意に抑制された。また、B 細胞に TLR9 刺激を行った際に産生される IgM 抗体量は、PEA を投与することで有意に減少した。この結果から、PEA は TLR9 シグナルを介した B 細胞の増殖及び抗体産生に対して抑制作用を有することが明らかとなった。

(4) TLR9 刺激による Septic shock モデルマウスに対する PEA の予防効果の検討

野生型マウスに CpG-ODN と D-ガラクトサミン投与した Septic shock モデルマウスにおいて、PEA を投与することによって生命予後が劇的に改善することを見出した (下図)。



我々の本研究の一連の結果から、PEA は抗炎症性脂質メディエーターとして SLE などの TLR9 が関与する疾患や、他の TLR が関与する炎症性疾患において、治療応用される可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hidano Shinya, Mizukami Kazuhiro, Yahiro Takaaki, Shirakami Kohei, Ito Hideyuki, Ozaka Sotaro, Ariki Shimpei, Saechue Benjawan, Dewayani Astri, Chalalai Thanyakorn, Soga Yasuhiro, Goto Mizuki, Sonoda Akira, Ozaki Takashi, Sachi Nozomi, Kamiyama Naganori, Nishizono Akira, Murakami Kazunari, Kobayashi Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Analysis of the prevalence and species of Anisakis nematode in Sekisaba, Scomber japonicus caught in coastal waters off Saganoseki, Oita in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2020.859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Torigoe Masataka, Maeshima Keisuke, Ozaki Takashi, Omura Yuichi, Gotoh Koro, Tanaka Yoshiya, Ishii Koji, Shibata Hiroataka	4. 巻 29
2. 論文標題 l-Leucine influx through Slc7a5 regulates inflammatory responses of human B cells via mammalian target of rapamycin complex 1 signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 885 ~ 891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1510822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Yuichi, Gotoh Koro, Masaki Takayuki, Ozeki Yoshinori, Tokoro Masanori, Kudo Akiko, Ozaki Takashi, Okamoto Mitsuhiro, Chiba Seiichi, Watanabe Kiminori, Ohta Masayuki, Inomata Masafumi, Shibata Hiroataka	4. 巻 27
2. 論文標題 Effects of Sleeve Gastrectomy on Blood Pressure and the Renal Renin?Angiotensin System in Rats with Diet Induced Obesity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Obesity	6. 最初と最後の頁 785-792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/oby.22443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sonoda A, Kamiyama N, Ozaka S, Gendo Y, Ozaki T, Hirose H, Noguchi K, Saechue B, Sachi N, Sakai K, Mizukami K, Hidano S, Murakami K, Kobayashi T	4. 巻 23
2. 論文標題 Oral administration of antibiotics results in fecal occult bleeding due to metabolic disorders and defective proliferation of the gut epithelial cell in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 1043-1055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noguchi K, Kamiyama N, Hidano S, Gendo Y, Sonoda A, Ozaki T, Hirose H, Sachi N, Saechue B, Ozaka S, Eshita Y, Mizukami K, Kawano K, Kobayashi T	4. 巻 504
2. 論文標題 Autoimmune sialadenitis is associated with the upregulation of chemokine/chemokine receptor pairs in T cell-specific TRAF6-deficient mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 245-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.08.162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gendo Y, Matsumoto T, Kamiyama N, Saechue B, Fukuda C, Dewayani A, Hidano S, Noguchi K, Sonoda A, Ozaki T, Sachi N, Hirose H, Ozaka S, Eshita Y, Mizukami K, Okimoto T, Kodama M, Yoshimatsu T, Nishida H, Daa T, Yamaoka Y, Murakami K, Kobayashi T	4. 巻 3
2. 論文標題 Dysbiosis of the Gut Microbiota on the Inflammatory Background due to Lack of Suppressor of Cytokine Signalling-1 in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflamm Intest Dis	6. 最初と最後の頁 145-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000495462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 尾崎貴士, 首藤航太, 新貝祐太, 児玉尚吾, 梅木達仁, 大村雄一, 今田千晴, 堀田美鈴, 安倍いとみ, 森山かおり, 前島圭佑, 石井宏治, 柴田洋孝
2. 発表標題 急速進行性の間質性肺炎と多彩な神経精神症状を呈した抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎の一例
3. 学会等名 第61回九州リウマチ学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今田千晴, 児玉尚吾, 清永恭弘, 立川裕史, 尾崎貴士, 石井宏治, 柴田洋孝
2. 発表標題 再燃を繰り返す多発性筋炎に生物学的製剤多剤抵抗性の関節リウマチを合併し、治療に苦慮した一例
3. 学会等名 第61回九州リウマチ学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Ozaki, Keisuke Maeshima, Koji Ishii, Hirotaka Shibata, Takashi Kobayashi
2. 発表標題 A comprehensive LC-MS/MS lipid mediator analysis of lupus-prone mice revealed inhibitory effects of palmitoylethanolamide on Toll-like receptor 9-mediated inflammation
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児玉尚吾、梅木達仁、大村雄一、鳥越雅隆、尾崎貴士、今田千晴、前島圭佑、石井宏治、柴田洋孝
2. 発表標題 難治性急速進行性間質性肺炎に対しリツキシマブが奏功した抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎の一例
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新貝 祐太、梅木 達仁、安部 佑、児玉 尚吾、尾崎 貴士、安部 いとみ、前島 圭佑、石井 宏治、柴田 洋孝
2. 発表標題 リツキシマブとミコフェノール酸モフェチルとタクロリムスの併用療法により寛解導入し得たステロイド抵抗性好酸球性多発血管炎性肉芽腫症の一例
3. 学会等名 第58回九州リウマチ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Benjawan Saechue, Naganori Kamiyama, Shinya Hidano, Kaori Noguchi, Yoshiko Gendo, Takashi Ozaki, Akira Sonoda, Haruna Hirise, Nozomi Sachi, Sotaro Ozaka, Takashi Kobayashi
2. 発表標題 Development of a rapid and simple reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for Chikungunya virus
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神山長慶, 渡辺 景, Benjawan Saechue, 飛弾野真也, 野口香緒里, 玄同淑子, 尾崎貴士, 園田光, 広瀬 晴奈, 小坂 聡太郎, 佐知望美, 鈴木 亮介, 小林隆志
2. 発表標題 アフリカ株とアジア株SRIPsを用いた、ジカウイルスの宿主細胞侵入効率の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大村雄一、前島圭佑、梅木達仁、清永恭弘、鳥越雅隆、今田千晴、尾崎貴士、堀田美鈴、安倍いとみ、熊木美登里、石井宏治、柴田洋孝
2. 発表標題 可溶性インターロイキン2受容体の全身性エリテマトーデスにおけるバイオマーカーとしての有用性の検討
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今田千晴、梅木達仁、大村雄一、鳥越雅隆、尾崎貴士、前島圭佑、石井宏治、柴田洋孝
2. 発表標題 急速に進行する皮膚硬化を呈した全身性強皮症に対し、トシリズマブ (TCZ) が著効したと考えられる一例
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田春菜、梅木達仁、大村雄一、鳥越雅隆、尾崎貴士、今田千晴、前島圭佑、加島尋、堀之内登、宮崎英士、石井宏治、柴田洋孝
2. 発表標題 不明熱を呈した抗PL-12抗体陽性抗ARS抗体症候群の1例
3. 学会等名 第322回 日本内科学会九州地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 児玉尚吾、今田千晴、前島圭佑、梅木達仁、大村雄一、鳥越雅隆、尾崎貴士、石井宏治、柴田洋孝
2. 発表標題 トシリズマブが有効であった蛋白漏出性胃腸症合併全身性エリテマトーデスの一症例
3. 学会等名 第56回九州リウマチ学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 尾崎貴士、柴田洋孝	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 12
3. 書名 レジデントノート増刊 日常診療の質が上がる新常識 「生物学的製剤の新常識（関節リウマチの治療を中心に）」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関