

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08682

研究課題名(和文)炎症性皮膚疾患患者における末梢血リポクオリティの解析

研究課題名(英文) Analysis of peripheral blood lipoquality in patients with inflammatory skin diseases

研究代表者

藤田 英樹 (FUJITA, Hideki)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：10323544

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)：アトピー性皮膚炎患者においては健常人と比べて、血漿中のTXB2とRvD2が有意に高値であった。一方で、PGD2、PGF2、5-oxo-EETE、LXA4、LXB4、8-HETEはアトピー性皮膚炎患者で有意に低値であった。慢性特発性蕁麻疹患者においては健常人と比べて、血漿中の5-HETE、LTE4、5-HEPE、PD1、RvD2が有意に高値であった。一方で、PGF2とLXA4は有意に低値であった。以上の結果から、特に慢性特発性蕁麻疹においては、炎症性脂質メディエーターの上昇のみならず、抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機構の異常が病態に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、アトピー性皮膚炎や慢性特発性蕁麻疹のような炎症性皮膚疾患患者におもいても、末梢血の脂質メディエータープロファイルの変化がみられることが判明した。変化の見られた個々の脂質メディエーターの各疾患の病態への寄与の解明が今後の課題であるが、脂質メディエータープロファイル異常が皮膚疾患においても重要であることが初めて明らかになった。特に慢性蕁麻疹患者においては、炎症性脂質メディエーターの上昇および抗炎症性脂質メディエーターの低下がみられていることから、炎症性脂質メディエーターの受容体の阻害薬や、抗炎症性脂質メディエーターの受容体の作動薬が新しい創薬コンセプトとして期待される。

研究成果の概要(英文)：In atopic dermatitis patients, plasma concentrations of TXB2 and RvD2 were significantly elevated compared to those of normal controls. On the other hand, plasma levels of PGD2, PGF2, 5-oxo-EETE, LXA4, LXB4, and 8-HETE were significantly reduced in atopic dermatitis patients as compared to normal controls. In patients with chronic spontaneous urticaria, plasma concentrations of 5-HETE, LTE4, 5-HEPE, PD1, and RvD2 were significantly increased compared to those of normal controls. On the other hand, plasma levels of PGF2 and LXA4 were significantly decreased in chronic spontaneous urticaria patients as compared to normal controls. These results indicate that in particular in patients with chronic spontaneous urticaria, not only elevated inflammatory lipid mediators but also decreased anti-inflammatory lipid mediators are involved in the sustained inflammatory process in the pathophysiology of their condition.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：皮膚免疫 慢性特発性蕁麻疹 アトピー性皮膚炎 脂質メディエーター リポクオリティ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内に存在する脂質分子の中でも標的細胞膜上の受容体に作用してシグナルを伝達し、速やかに不活性化される微量生理活性脂質の一群を脂質メディエーターと呼ぶ。アラキドン酸由来のプロスタグランジンやロイコトリエンがその代表である。脂質メディエーターは生殖や発生から生体の恒常性維持などのみならず、免疫や代謝等の様々な生体応答の調節に関わる。例えば、 ω -3 脂肪酸は Th1 や Th17 応答に抑制的に働く一方でマスト細胞を活性化することが報告されている。近年、脂質分子の生体内・組織内分布が非常に多様であり、さらに脂質の多様性や不均一性が生体の恒常性の維持や疾患発症に重要であることが判明してきており、このような脂質分子種の多様性が司る機能的な特質をリポクオリティーと呼ぶ。近年、このリポクオリティーのバランスの変化が免疫疾患、代謝疾患、循環器疾患、癌等の病態と密接に関係していることが明らかになっており、疾患特異的リポクオリティーが注目されている。炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎や蕁麻疹はしばしば難治であり、患者の生活の質を大きく損なう。アトピー性皮膚炎では、病変部や末梢血中の PGE₂、TXA₂、LTB₄、CysLT などの脂質メディエーターの上昇や、病態形成に重要な Th2 細胞の浸潤や Th22 細胞の活性化における脂質メディエーターの関与が報告されている。さらに、蕁麻疹はマスト細胞が媒介し皮膚に限局性浮腫を生じる疾患であるが、蕁麻疹の病態における脂質メディエーターの関わりはほとんど知られていない。そこで今回、アトピー性皮膚炎および蕁麻疹における免疫応答の修飾因子として脂質メディエーターに注目した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アトピー性皮膚炎および慢性特発性蕁麻疹の患者における末梢血中の脂質全体を網羅的に解析し、疾患ごとのリポクオリティーを明らかにすることである。これらの炎症性皮膚疾患におけるリポクオリティーを明らかにすることで、新規脂質バイオマーカーや創薬ターゲットの発見につながることを期待される。

3. 研究の方法

<対象>

日本大学医学部附属板橋病院皮膚科を受診した、アトピー性皮膚炎および慢性特発性蕁麻疹の患者のうち、研究内容および目的について十分な説明を行い、文書による同意が得られた患者を対象とした。

<末梢血脂質の抽出方法>

ヘパリン管で 5 mL の採血を行い、2~3 回軽く転倒混和した。速やかに氷水に浸して 15 分以上冷やした後に、遠心分離機にて 4℃ 下に 3000 rpm の速度で 10 分間遠心を行った。上清の血漿成分を 2.5 mL の 18G 針付きシリンジで採取し、ろ過フィルターを通して、1.8 mL のクライオチューブに分離した。液体窒素にて直ちに凍結させ、凍結したクライオチューブに窒素を充填し密閉した状態にて -80℃ で保存した。

保存した血漿を氷冷のまま融解し、血漿 200 μ L と Tris 800 μ L を 1.5 mL のエッペンドルフチューブに入れた。Vortex 後、4℃ 下に 9000 rpm の速度で 10 分間遠心し、不溶物を沈殿させて上清を採取した。ガラスチューブに採取した上清 1 mL と H₂O 8 mL、メタノール 1 mL を混合し、10% MeOH のサンプル溶液を 10 mL 作成した。これに内部標準として、d₄-PGE₂ と d₅-EPA を各々 500 pmol/sample とするよう加えて vortex した。ここに 0.1N 塩酸を加え、pH 4.0 になるように調製した。カラム (oasis HLB 3 mL) に H₂O、メタノール、H₂O の順にそれぞれ 5 mL ずつ通し、カラムを平衡化した。カラムの下にガラスチューブをセットし、カラムに 10% MeOH サンプル溶液を数回に分けて全量通した。その後、カラムに H₂O、ヘキサンを 5 mL ずつ順に通し、最後にギ酸メチル 3 mL を通して目的の酸化脂肪酸を溶出させた。ガラスチューブごと N₂ ガスで一度完全乾燥させ、90 μ L の MeOH で再溶解し -80℃ で保存した。

<質量分析>

液体クロマトグラフィー質量分析計に、サンプル溶液 10 μ L を注入し、測定を行った。

<データ解析>

専用の解析ソフトウェア (MultiQuant) を使って、各種脂質のピーク面積値 (AUC) を算出した。内部標準物質の検出値と組織重量の値を用いて標準化し、各サンプルを AUC/ml として補正した。得られた脂質プロファイル健康人群と各疾患群で比較した。また、各疾患群内で重症度ごとの脂質プロファイル変化を検討した。

4. 研究成果

<アトピー性皮膚炎>

アトピー性皮膚炎 (AD) 患者群 (36 人) および健康人 (NC) 群 (31 人) のアラキドン酸 (AA) 由来脂質メディエーターの結果を図 1 に示す。図 1 左側のヒートマップでは、各メディエーター

の AUC の平均値から、AD と NC の比を算出し、カラーバーに示した色で可視化している。赤が濃くなるほど AD/NC の比は大きくなり、青が濃くなるほど AD/NC の比は小さいことを示している。AD 患者群において TXB2 や LTB4 など、NC 群と比較して増加していたが、多くの脂質メディエーターは減少していた。図 1 右側では、濃度既知の脂質分子から作成した検量曲線をもとに、濃度を算出し、ボックスプロットで示している。TXB2 は AD 患者群で有意に高値であった。一方で、PGD2、PGF2、5-oxo-EETE、LXA4、LXB4 および 8-HETE は AD 患者群で有意に低値であった。

AA代謝物 AD患者群とNC群における2群間比較

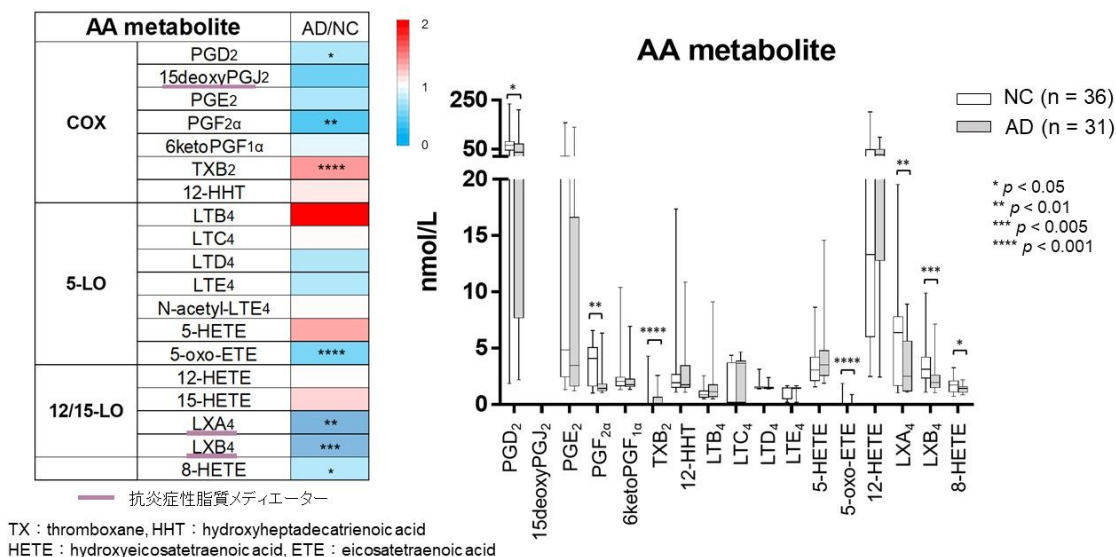
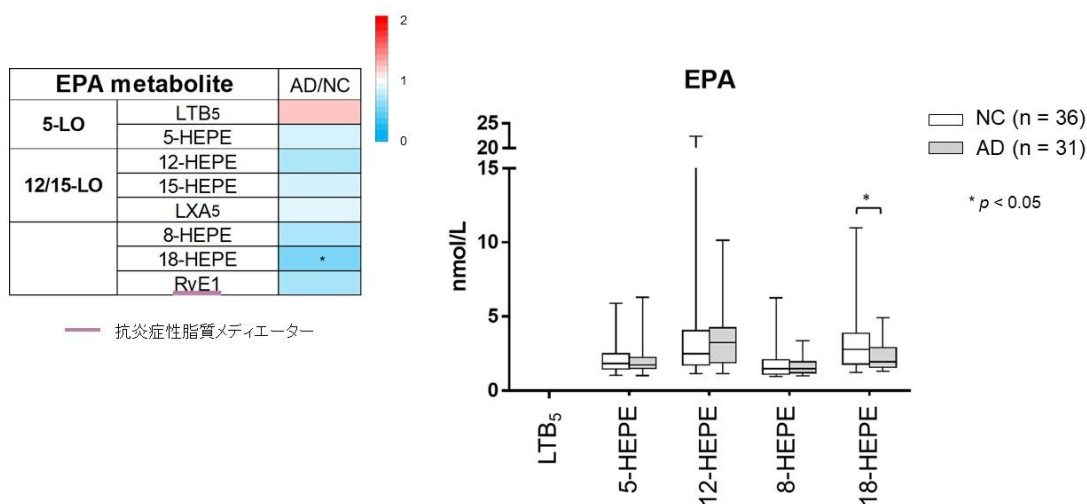


図 1. アトピー性皮膚炎患者の末梢血中におけるアラキドン酸差代謝物

次に、エイコサペンタエン酸 (EPA) 代謝物では、ほとんどの脂質メディエーターが AD 患者群で低い傾向があり、特に 18-HEPE は有意に減少していた。LTB₅ のみやや高い傾向にあったが、ほとんどのサンプルで検出限界以下であった (図 2)。

EPA代謝物 AD患者群とNC群における2群間比較



HEPE : hydroxy eicosapentaenoic acid, RvE : resolvin E

図 2. アトピー性皮膚炎患者の末梢血中におけるエイコサペンタエン酸代謝物

さらに、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 代謝物に関しても、EPA 代謝物同様に、ほとんどの脂質メディエーターが AD 患者群で低下する傾向にあり、PD1 と 10-HDoHE が有意に低下していた。一方で、抗炎症性メディエーターである RvD2 は AD 患者群で NC 群よりも有意に高値であった (図 3)。

DHA代謝物 AD患者群とNC群における2群間比較

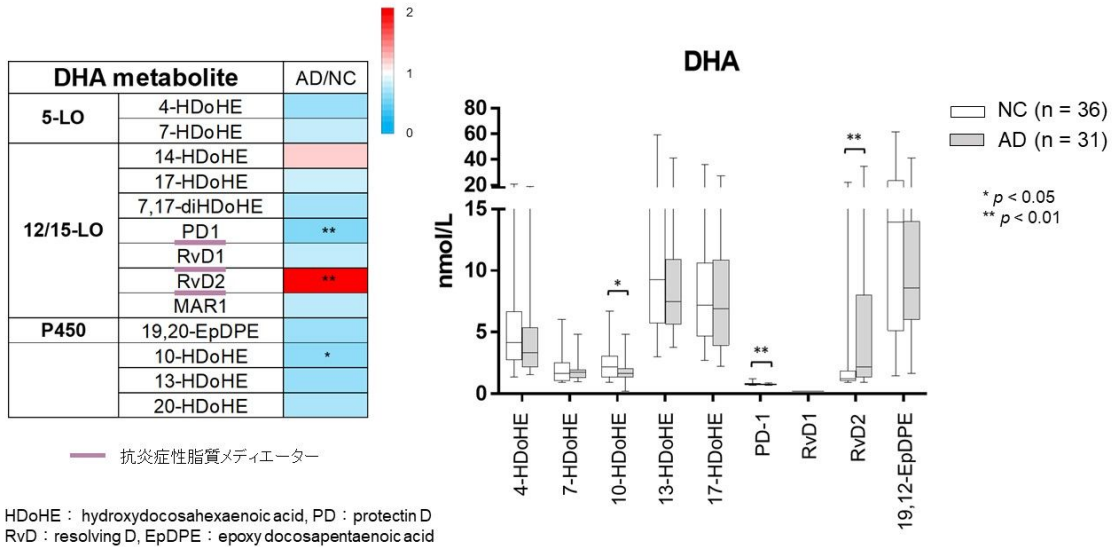


図3. アトピー性皮膚炎患者の末梢血中におけるドコサヘキサエン酸代謝物

脂質メディエーターの大部分は、AD患者群で低値となる傾向があったが、遊離脂肪酸（FFA）の測定では、AD患者群とNC群の血漿中FFAに有意差はみられなかったことから、合成酵素発現レベルの低下や脂質メディエーター産生細胞の機能抑制、炎症局所での消費の亢進などといった脂肪酸代謝の過程がこれらの変化に関連していると考えられた。AD患者群では、脂肪酸代謝物の全体的な低下がみられており、脂肪酸代謝機能の低下がADの病態に関与している可能性が示唆された。

<慢性特発性蕁麻疹>

慢性特発性蕁麻疹（CSU）患者群（67人）およびNC群（27人）のAA由来脂質メディエーターの結果を図4に示す。PGE₂やLTB₄などの大部分の炎症性メディエーターは、CSU患者群で高くなる傾向があった。一方で、LXA₄やLXB₄などの抗炎症性メディエーターは、CSU患者群で低下していた。5-HETEとLTE₄は、CSU患者群でNC群よりも有意に高値であった。一方PGF₂とLXA₄は、CSU患者群で有意に低値であった。

AA代謝物のCSU患者群とNC群における2群間比較

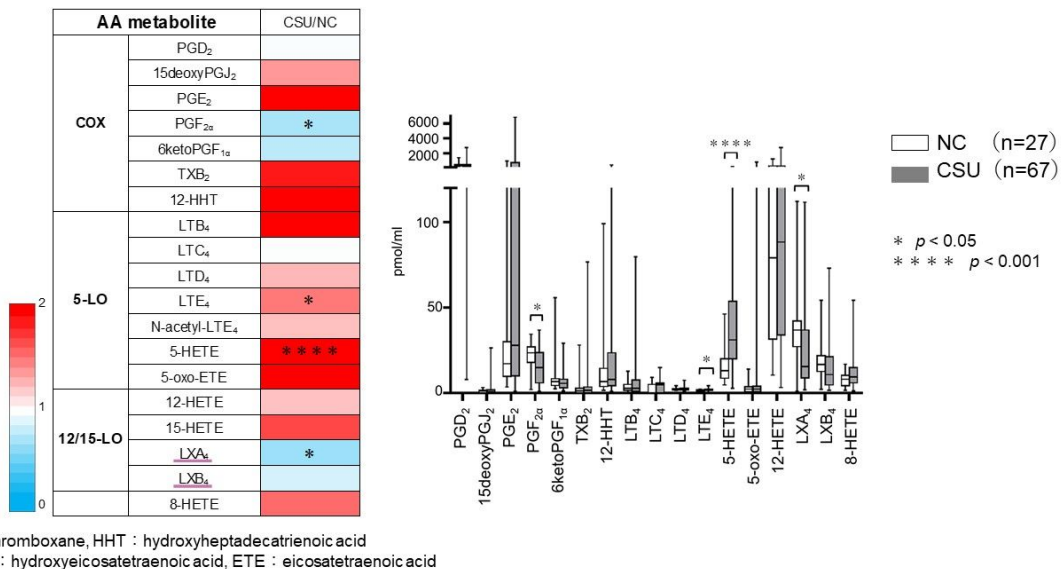
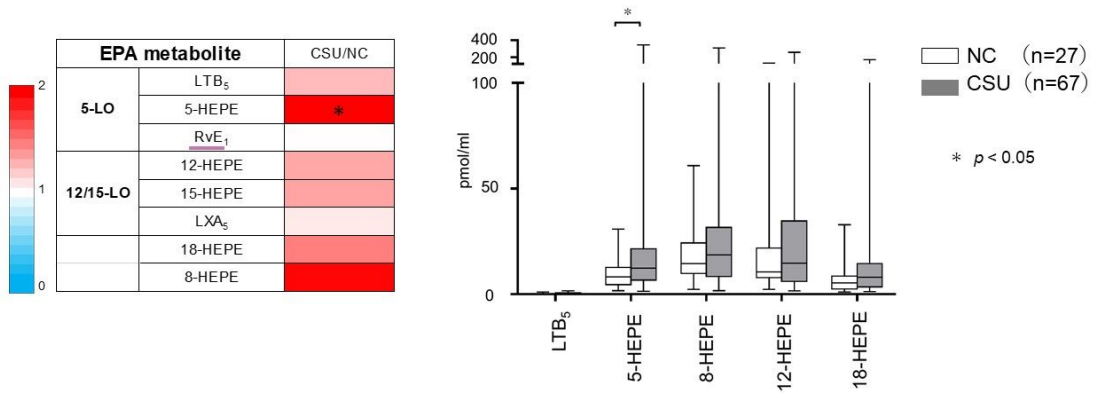


図4. 慢性特発性蕁麻疹患者の末梢血中におけるアラキドン酸差代謝物

次に、EPA代謝物に関しては、ほとんどの脂質メディエーターは、CSU患者群で高くなる傾向にあった。5-HEPEがCSU患者群でNC群よりも有意に高値であった。CSU患者群で有意に低値のものはみられなかった（図5）。

EPA代謝物のCSU患者群とNC群における2群間比較

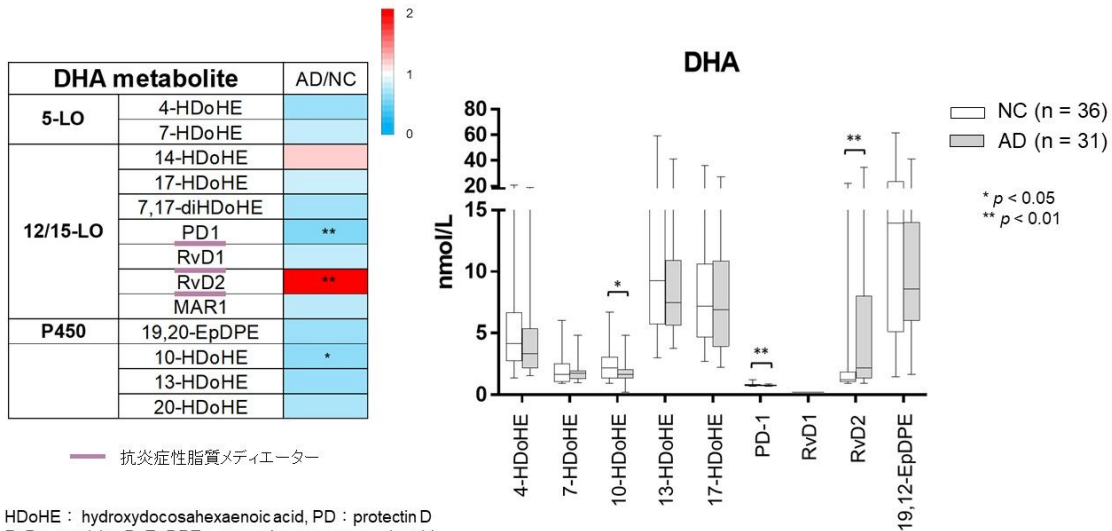


HEPE : hydroxy eicosapentaenoic acid, RvE : resolvin E

図 5. 慢性特発性蕁麻疹患者の末梢血中におけるエイコサペンタエン酸代謝物

さらに、DHA 代謝物に関しても、EPA 代謝物と同様に、ほとんどの脂質メディエーターは、CSU 患者群で増加する傾向にあった。PD1 と RvD2 が CSU 患者群で NC 群よりも有意に高値であった。CSU 患者群で有意に低値のものはみられなかった (図 6)。

DHA代謝物 AD患者群とNC群における2群間比較



— 抗炎症性脂質メディエーター

HDoHE : hydroxydocosahexaenoic acid, PD : protectin D
RvD : resolving D, EpDPE : epoxy docosapentaenoic acid

図 6. 慢性特発性蕁麻疹患者の患者末梢血中におけるドコサヘキサエン酸代謝物

CSU 患者においては、炎症性メディエーターである LTE₄ の有意な上昇だけでなく、抗炎症性メディエーターである LXA₄ の有意な低下がみられ、炎症収束機能の異常が起きていることが考えられた。DHA 代謝物では、抗炎症性メディエーターである PD1 や RvD2 が有意に上昇しており、

3 脂肪酸由来の抗炎症性メディエーターは、慢性炎症の病態では恒常的に産生が亢進している可能性が示唆された。多価不飽和脂肪酸全体の代謝経路では、5-LO 系の代謝物が高値を示していた。CSU では、炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機構の異常が病態に関与していると考えられる。よって、炎症性脂質メディエーターの受容体の阻害薬や、抗炎症性脂質メディエーターの受容体の作動薬が蕁麻疹の新しい創薬コンセプトとして期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊東真奈, 田杭真帆, 遠藤嵩大, 豊島翔太, 三木寿美, 武富芳隆, 葉山惟大, 坂本朋美, 村上誠, 照井正, 藤田英樹, 岡山吉道
2. 発表標題 慢性特発性蕁麻疹患者血漿中の脂質メディエーターの病態への関与
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田杭真帆, 豊島翔太, 三木寿美, 伊東真奈, 武富芳隆, 葉山惟大, 坂本朋美, 村上誠, 藤田英樹, 照井正, 岡山吉道
2. 発表標題 リポミクスを用いたアトピー性皮膚炎患者の脂質プロファイルの解析
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	葉山 惟大 (HAYAMA Koremasa) (40647187)	日本大学・医学部・助教 (32665)	
研究分担者	岡山 吉道 (OKAYAMA Yoshimichi) (80292605)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	

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
---------	---------