

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09754

研究課題名(和文) 上気道炎症に対するエイコサペンタエン酸代謝物の作用についての基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on the effects of eicosapentaenoic acid metabolites on upper airway inflammation

研究代表者

戸嶋 一郎 (TOJIMA, Ichiro)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：80567347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：17,18-EpETEやその代謝物17,18-diHETEは、IL-33刺激による培養ヒトILC2からのIL-5/IL-13産生を抑制し、その作用はGPR40やPPAR $\alpha$ を介してGATA-3を抑制していた。17,18-EpETEや17,18-diHETEの点鼻投与は、IL-33で刺激したマウス鼻粘膜への好酸球浸潤や粘液産生を抑制し、肺やBAL中のIL-5/IL-13産生も抑制した。17,18-EpETEは、TNF- $\alpha$ 刺激による培養ヒト気管支上皮細胞からのIL-6/IL-8/MUC5AC産生を抑制した。17,18-EpETEの点鼻/腹腔内投与は、マウス鼻粘膜への好中球性炎症も抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

17,18-EpETEやその代謝物17,18-diHETEは、ヒト生体内で合成される脂質代謝物であるため、安全な治療手段となる可能性を秘めている。今回のわれわれの結果から、17,18-EpETEや17,18-diHETEはIL-33で刺激したヒトILC2からの2型サイトカイン産生を抑制し、これらの点鼻投与はマウスの上気道好酸球炎症を抑制した。またTNF- $\alpha$ で刺激したヒト気管支上皮細胞からの炎症性メディエーターの産生も抑制し、マウスの上気道好中球性炎症に対しても抑制作用を示した。17,18-EpETEは、好酸球性鼻副鼻腔炎や好中球性の上気道炎症などに対する安全な新規治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：17,18-EpETE and its metabolites 17,18-diHETE attenuated human ILC2-derived productions of IL-5 and IL-13 in response to IL-33 through the inhibition of GATA-3. These anti-inflammatory effects on ILC2s may be mediated by the receptors of GPR40 and PPAR $\alpha$ . Intranasal administration of 17,18-EpETE and 17,18-diHETE attenuated IL-33-induced eosinophil infiltrations and mucus productions in mouse nasal epithelium, and the productions of IL-5/IL-13 in lung tissues and BALs.

17,18-EpETE attenuated human airway epithelial cell-derived productions of IL-6, IL-8, and MUC5AC in response to TNF- $\alpha$ . These effects may be mediated by GPR40. Intranasal or intraperitoneal administration of 17,18-EpETE attenuated lipopolysaccharide-induced neutrophil infiltrations and mucus productions in mouse nasal epithelium. Inflammatory cytokine/chemokine productions in lung tissues and BALs was also inhibited. These effects of 17,18-EpETE might apply for eosinophilic and neutrophilic airway inflammatory disorders.

研究分野：上気道炎症

キーワード：17,18-EpETE 17,18-diHETE ILC2 IL-33 eosinophil airway epithelial cells TNF- $\alpha$  neutrophil

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 1) エイコサペンタエン酸 (EPA) 代謝物の抗炎症作用

近年、生体内における脂肪酸やリン脂質代謝の網羅的・定量的解析の結果、3脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸に多数の代謝物が存在し、その抗炎症作用が注目されている。多価不飽和脂肪酸は6脂肪酸と3脂肪酸に分かれ、6脂肪酸が多い肉中心の食事よりも、3脂肪酸を多く含む魚中心の食事の方が各種炎症疾患を抑制し、喘息やアトピー性皮膚炎など2型アレルギー疾患も抑制する。多数存在するEPA代謝物の詳細な機能は分かっていない。

われわれは、培養気管支上皮細胞を利用した予備実験から、17,18-epoxy-eicosatetraenoic acid (17,18-EpETE)の抗炎症作用に着目した。17,18-EpETE やその代謝物17,18-diHETE は、生体内で合成されるため安全にヒトに対し応用できる可能性を秘めている。しかし、これらの上気道炎症に対する作用を検討した研究は皆無である。

#### 2) 難治性上気道炎症に対する新規治療法の開発

近年、好酸球性炎症の病態における自然型アレルギーの重要性が注目されている。外来環境抗原の刺激によって気道上皮細胞から産生されるIL-33等によって、組織中の2型自然リンパ球 (ILC2) から産生される2型サイトカインが好酸球炎症を誘導する。われわれは、好酸球性副鼻腔炎の病態には上皮から産生されるIL-33と鼻粘膜組織中のILC2が自然型アレルギー炎症の誘導に重要であることを明らかにしてきた。しかし、指定難病である好酸球性副鼻腔炎に対する治療手段は限られており、自然型アレルギー炎症を安全に制御する新たな治療法の開発が求められている。また好中球性の気道炎症である非好酸球性副鼻腔炎においても、従来有効とされてきたマクロライド療法は耐性菌を誘導する問題があり、新たな抗炎症薬の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

(1) 上気道自然型アレルギー炎症に対する17,18-EpETE やその代謝物である17,18-diHETEの抗炎症作用の解明 (2) 上気道好中球性炎症に対する17,18-EpETEの抗炎症作用の解明

### 3. 研究の方法

(1) ヒトILC2における17,18-EpETEや17,18-diHETEの受容体候補として、GPR40やGPR120、PPARに着目し、その発現をFACSやRT-PCR法で確認した。末梢血由来のヒトILC2をIL-33とともに17,18-EpETEや17,18-diHETEを加えて培養し、上清中の2型サイトカイン産生をELISA法で測定した。BALB/cマウスにIL-33をday 1, 4, 7に点鼻し、17,18-EpETEを連日点鼻もしくは腹腔内投与した。鼻粘膜組織、肺組織、BALを採取し、鼻粘膜の好酸球浸潤・粘液産生、サイトカイン産生について検討した。鼻粘膜の好酸球浸潤はSirius Red染色で、粘液産生はAB-PAS染色を行い、image analyzerで解析した。

(2) 免疫組織化学染色やRT-PCR法を用い、ヒト鼻粘膜上皮細胞やヒト気管支上皮細胞 (NHBE細胞、NCI-H292細胞)における、GPR40の発現を検討した。培養したヒト気管支上皮細胞をTNF- $\alpha$ で刺激し17,18-EpETEを加え、上清中のサイトカインやMUC5AC $\mu$ チン産生をELISA法で測定した。BALB/cマウスにLPSをday 1, 2, 3に点鼻投与した気道好中球炎症モデルマウスに、17,18-EpETEを連日腹腔内または点鼻投与した。鼻粘膜組織、肺組織、BALを採取し検討した。鼻粘膜の好中球浸潤はHE染色で、粘液産生はAB-PAS染色を行い、image analyzerで解析した。

### 4. 研究成果

(1) ヒトILC2にGPR40とPPARの発現を認めたが、GPR120の発現はほとんど認めなかった。17,18-EpETEや17,18-diHETEは、IL-33刺激によるヒトILC2からのIL-5/IL-13産生を有意に抑制し、転写因子であるGATA-3の発現も抑制した。この17,18-EpETEや17,18-diHETEによるILC2抑制効果は、GPR40阻害薬 (GW1100) やPPAR阻害薬 (GW9662) により解除された (図1)。IL-33点鼻による気道アレルギー炎症モデルマウスにおいて、17,18-EpETEや17,18-diHETEの点鼻投与は、鼻粘膜の好酸球浸潤・粘液産生を有意に抑制した。また17,18-EpETEはBALや肺組織中のIL-5/IL-13産生を抑制したが、17,18-diHETEには有意な抑制を認めなかった。17,18-EpETEの腹腔内投与はこのような炎症抑制作用を認めなかった。

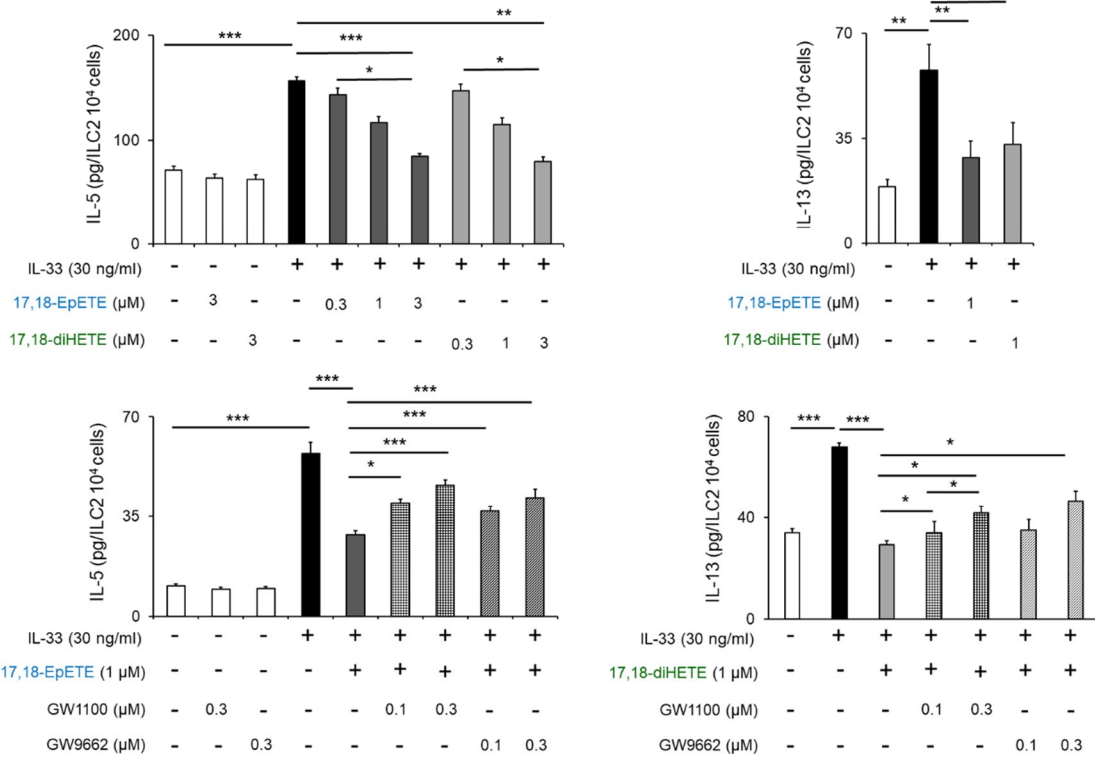


図 1. IL-33 で刺激した培養ヒト ILC2 に対する 17,18-EpETE や 17,18-diHETE の作用とその受容体の関係

(2) ヒト鼻粘膜上皮細胞やヒト気道上皮細胞に GPR40 の発現がみられた。 17,18-EpETE は、TNF- 刺激によるヒト気管支上皮細胞からの IL-6 や IL-8、MUC5AC 産生を抑制した (図 2)。 17,18-EpETE による NHBE 細胞からの IL-6 や IL-8 産生抑制作用は、GPR40 阻害薬により失われた。 LPS 点鼻による気道好中球炎症モデルマウスにおいて、17,18-EpETE の腹腔内もしくは点鼻投与は、それぞれ鼻粘膜の好中球浸潤・粘液産生を抑制した (図 3)。 17,18-EpETE の腹腔内投与は肺組織中の TNF- と KC 産生を抑制し、点鼻投与は BAL 中の KC 産生を抑制した。

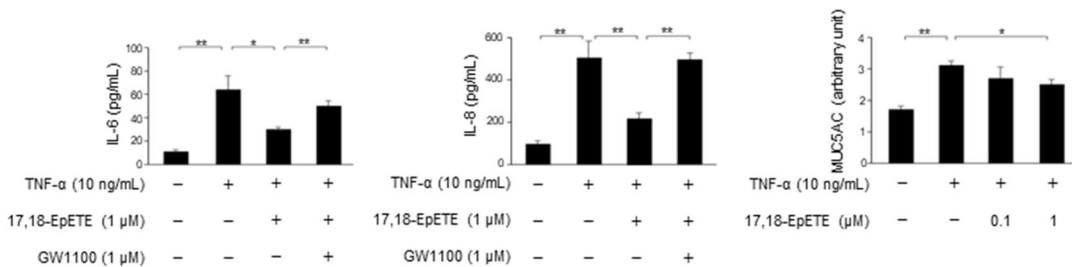


図 2. TNF- で刺激した培養ヒト気管支上皮細胞からの IL-6 や IL-8、MUC5AC 産生に対する 17,18-EpETE の作用

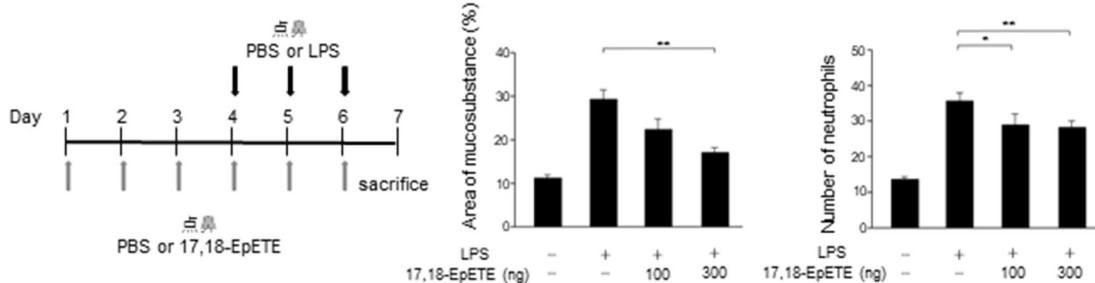


図 3. LPS で刺激したマウス鼻粘膜好中球浸潤や粘液産生に対する 17,18-EpETE の作用

以上の結果より、17,18-EpETE は ILC2 を介した上気道好酸球炎症、そして上皮細胞を介した

上気道好中球炎症を抑制する作用を有していることが、in vitro、in vivo 両面から明らかになった。難治性上気道炎症である好酸球性副鼻腔炎や非好酸球性副鼻腔炎に対する、安全な新規治療薬としての 17, 18-EpETE の可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiori Hara, Ichiro Tojima, Shino Shimizu, Hideaki Kouzaki, Takeshi Shimizu.	4. 巻 36
2. 論文標題 17,18-Epoxyeicosatetraenoic Acid Inhibits TNF- $\alpha$ -Induced Inflammation in Cultured Human Airway Epithelium and LPS-Induced Murine Airway Inflammation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Rhinol Allergy	6. 最初と最後の頁 106-114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/19458924211027682	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 戸嶋一郎	4. 巻 255
2. 論文標題 好酸球性副鼻腔炎の治療におけるインフォームド・コンセント	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MB ENTONI	6. 最初と最後の頁 17-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 戸嶋 一郎	4. 巻 61
2. 論文標題 ILC2を介した好酸球性炎症	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nihon Bika Gakkai Kaishi (Japanese Journal of Rhinology)	6. 最初と最後の頁 237 ~ 239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7248/jjrhi.61.237	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ichiro Tojima, Shiori Hara, Keigo Nakamura, Sayuri Yamamoto, Masatomo Toyama, Hiroyuki Arai, Hideaki Kouzaki, Shino Shimizu, Takeshi Shimizu
2. 発表標題 Anti-inflammatory effects of epoxygenated eicosapentaenoic acid metabolite on IL-33-induced innate eosinophilic inflammation in upper airway
3. 学会等名 18th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ichiro Tojima, Shiori Hara, Keigo Nakamura, Sayuri Yamamoto, Masatomo Toyama, Hiroyuki Arai, Hideaki Kouzaki, Shino Shimizu, Takeshi Shimizu
2. 発表標題 Anti-inflammatory effects of 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid and its metabolite on IL-33-induced innate eosinophilic inflammation in upper airway
3. 学会等名 JSA/WAO joint congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸嶋 一郎、原 思織、山本 小百合、神前 英明、清水 志乃、清水 猛史
2. 発表標題 上気道自然型アレルギー炎症における 3脂肪酸代謝物の抑制作用
3. 学会等名 第38回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸嶋 一郎、原 思織、中村 圭吾、山本 小百合、新井 宏幸、神前 英明、清水 志乃、清水 猛史
2. 発表標題 17,18-epoxy-eicosatetraenoic acidとその代謝物による上気道自然型好酸球炎症抑制作用
3. 学会等名 第59回日本鼻科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸嶋 一郎
2. 発表標題 2型自然リンパ球ILC2を介した上気道好酸球炎症に対するエイコサペンタエン酸代謝物を用いた新規治療法の開発
3. 学会等名 第37回滋賀医科大学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原思織、戸嶋一郎、神前英明、清水志乃、清水猛史
2. 発表標題 3脂肪酸代謝物 17,18-EpETEによる上気道好中球性炎症抑制作用
3. 学会等名 第38回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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