様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　6 年　6 月 18 日現在

機関番号：１３６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ０５８８９

研究課題名（和文）脂肪酸のTLR10発現誘導機構の解明と生体塗布での抗炎症作用の検証

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of induction of TLR10 expression by fatty acids and verification of their anti-inflammatory effects in biological applications

研究代表者
河原　岳志（Kawahara, Takeshi）

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：３０３４５７６４

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）：遊離型の脂肪酸がヒト皮膚角化細胞においてToll様受容体10（TLR10）の発現を誘導する作用機序の解明のため、生体を構成する脂肪酸に加え、生体が酸化ダメージを受けた際に生じる過酸化脂質も対象に含めた研究を行った。脂肪酸によるTLR10誘導には、TLR等を介したNF-κBの活性化は関与していないことを明らかにする一方で、長鎖脂肪酸をリガンドとして認識すると報告のある核内受容体PPAR-α、-β/δ、-γならびにGタンパク質共役受容体GPR40、GPR120が複合的に関与している可能性を示唆する研究成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究は皮膚への塗布により治癒効果を発揮するとされる動物由来の油脂の生物学的機能性を解明するための研究による成果から着想を経て行われた。本研究で関与が示唆されたTLR10は自然免疫応答を担うToll様受容体ファミリー分子でありながら、抗炎症作用に関与していると考えられているオーファン受容体である。本研究を通じて、油脂由来の遊離型脂肪酸がTLR10を誘導することで、慢性的な炎症状態に陥っている自然免疫応答を鎮静化し、皮膚再生への機会をもたらす可能性が示された。本研究により得られた成果は、油脂の皮膚における薬効について、新たな洞察をもたらすものであると考えている。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the mechanism of action by which free fatty acids induce the expression of Toll-like receptor 10 (TLR10) in human skin keratinocytes, using long chain fatty acids including lipid peroxide. I found that While NF-κB activation is not involved, PPAR-α, -β/δ, and -γ, which are reported to recognize long-chain fatty acids as ligands, as well as the G protein-coupled receptors GPR40 and GPR120, was suggested to involved in the induction of TLR10 by these fatty acids.

研究分野：食品機能学

キーワード：脂肪酸　Toll様受容体10　皮膚角化細胞

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

スキンケア商品として用いられるものに、特定の生物種の油脂が知られている。ダチョウ油や馬油などその一部は薬効の高さから高額で取引され、走鳥類のエミュー油など海外では医薬品扱いになっている。しかし、油脂の皮膚塗布の効果は物理的なバリア形成や保湿という以外のことは不明な点が多く、特に皮膚角化細胞を介した生物学的な作用については明らかになっていない。オメガ 3 系脂肪酸が有効成分であると考察されているが、それが豊富な魚油の塗布による治癒効果は話題にならない。なぜ特定の動物種の油にだけこのような作用がみられるのであろうか。申請者らがダチョウ油を対象に、皮膚角化細胞の遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的遺伝子発現解析を行った結果、最も顕著に発現上昇を示したのが TLR10 であった。

２．研究の目的

本研究は遊離脂肪酸が TLR10 を誘導する現象に着目して、生体での薬効についての作用機序の解明を目的とした。

３．研究の方法

試薬

リノール酸とこれらの過酸化物にあたる 9S-Hydroperoxy-10E, 12Z-Octadecadienoic Acid（9-HpODE）、13S-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid（13-HpODE）、DHA の過酸化物である 17S-hydroperoxy-4E,7Z,10Z,13Z,15Z,19Z-docosahexaenoic acid（17-HpDHA）は、Cayman Chemical 社より入手した。これらの脂肪酸は、エタノールに溶解させた脂肪酸または過酸化脂肪酸と 10％牛血清アルブミン（Bovine serum albumin：BSA）溶液（ナカライテスク）を 1 : 9 で混合し、37℃インキュベーター内で 90 分間保温する方法で可溶化を行った。

脂肪酸をリガンドにもつ脂質受容体を介した経路の調査のため、PPAR-α 選択的アゴニストである GW7647（Cayman Chemical）、PPAR-β/δ 選択的アゴニストである L-165041（Cayman Chemical）、PPAR-γ 選択的アゴニストである BRL49653（Cayman Chemical）、GPR40 選択的アゴニストである TAK-875（Cayman Chemical）、GPR120 選択的アゴニストである GSK137647（Tocris Bioscience, Bristol, UK）、PPAR-α 選択的アンタゴニストである MK-886（Cayman Chemical）、PPAR-β/δ 選択的アンタゴニストである PT-S58（Sigma-Aldrich）、PPAR-γ 選択的アンタゴニストである GW9662（Cayman Chemical）、GPR40 選択的アンタゴニストである GW1100（ChemScene）、GPR120 選択的アンタゴニストである AH7614（Tocris Bioscience）をそれぞれジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解させて用いた。

細胞の入手と培養

ヒト皮膚角化細胞株である HaCaT 細胞は、Cell Lines Service 社より入手した。これを Dulbecco's Modified Eagle's Medium（D-MEM、富士フイルム和光純薬,）と非働化ウシ胎児血清（FBS）（Hyclone）を 9 : 1 の割合で混合し作成した培地と、10 mL 細胞培養用ディッシュ（Wuxi NEST Biotechnology, Wuxi, Jiangsu, China）を用いて、5%CO_2/95%Air、37℃のインキュベーター内で培養した。

脂肪酸による処理が TLR10 発現に及ぼす影響の評価

HaCaT 細胞を 1.5×10^5 cells/mL/well となるよう 24 ウェル培養ディッシュ（FALCON, Durham, NC, USA）に播種し、24 時間程度培養して底面に定着させた。新しい D-MEM（750 µL/well）に交換し、上記のいずれかの可溶化済み脂肪酸または過酸化脂肪酸（50 µL/well）を終濃度 0.1～100 µM になるよう添加した。コントロール群には 10%BSA 溶液のみを同量添加した。それぞれ一定時間の培養後に培地を除去し、PBS で 1 回洗浄した後、TRI Reagent（Merck）を 1 試験区につき 1 mL ずつ加えて細胞を溶解させて回収した。

逆転写反応

TRI Reagent に溶解させた細胞から、製品の使用法に準じた方法で総 RNA を抽出した。これに対し、First Strand Buffer、0.1 M DTT、10 mM dNTP Mix、10 pmol/µL ランダムプライマー、M-MLV Reverse Transcriptase（Thermo Fisher Scientific）を加え、サーマルサイクラーPTC-200（MJ Research）を用いて 42°C で 50 分間の逆転写反応を行い、得られた cDNA を定量遺伝子発現解析に使用した。

ポリメラーゼ連鎖反応

逆転写反応で得られた cDNA に Table 1 に示した各種プライマーと TB Green Premix Ex Taq II（Takara Bio）を加え、Eco Real-Time PCR System（Illumina）を用いてポリメラーゼ連鎖反応法に

よる遺伝子発現解析を行った。PCR は 95℃で 10 秒と 60℃で 30 秒を 1 セットとして 40 サイクルの条件で行った。得られた結果は、Eco software（Illumina）を用いて ΔΔCT 法で解析を行い、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）の発現量をもとに標準化を行った。

NF-κB 活性化の評価

HaCaT 細胞を 10 mL 細胞培養用ディッシュで培養し、コンフルエント状態になったものを使用した。培地を新しいもの（2 mL）に交換し、13-HpODE、リノール酸のいずれか（100 µL）を終濃度 1.4 µM となるよう添加した。コントロールの試験区には 10%BSA 溶液のみを同量添加した。30 分間の培養後、培地を除去して PBS で 1 回洗浄した後、セルスクレーパーで細胞を剥がし、回収した。

細胞からの核タンパク質抽出物は、RayBio Nuclear Extraction Kit（RayBiotech）を用い、製品の使用法に従って得た。

NF-κB の活性化は、核タンパク質抽出物の NF-κB の標的配列への結合量を指標に ELISA 法により確認を行った。前項で得た核タンパク質抽出物に対し、RayBio Human NF-κB p65 Transcription Factor ELISA Kit（RayBiotech）を用い、製品の使用法に従って結合反応を行った。その後、450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー（iMark, Bio Rad）を用いて読み取ることで、NF-κB の標的配列への結合量を評価した。

NF-κB 応答性 SEAP 発現細胞株の樹立

NF-κB 活性化レベルの定量を行うため、NF-κB の活性化に応答して培養液中に分泌型胎盤アルカリホスファターゼ（Secreted alkaline phosphatase : SEAP）を分泌する細胞株の樹立を試みた。樹立にあたり、Zeocin 耐性遺伝子を含む市販 NF-κB 応答性 SEAP 発現プラスミドである pNiFty2-SEAP（InvivoGen）を用い、これらをトランスフェクション試薬である LyoVec（InvivoGen）と混合したものを 24 ウェルディッシュに播種した HaCaT 細胞の培養系に添加した。72 時間後から 300 µg/mL の Zeocin（InvivoGen）による選択培養を開始し、良好に生育した細胞を候補株として取り出した。プラスミドが目的どおりに細胞にトランスフェクションされたかの確認には、市販 TLR2 リガンドである Pam2CSK4 による刺激を行い、発光量 をルシフェラーゼアッセイにより評価することで行った。

ルシフェラーゼアッセイ

SEAP Reporter Gene Assay Kit（Cayman Chemical）を使用した。SEAP 応答プラスミドを導入した HaCaT 細胞に、上記 3 - 1 と同様の方法でサンプル添加を行い、一定時間経過後に 1 試験区当たり 450 µL の培養上清を回収した。これをヒートブロックによって 65℃で 30 分間加熱し、10 µL/well ずつ 96 ウェルディッシュへ移したのち、50 µL/well の発光基質を加えた。これをインキュベーター内で保温し、30 分後にルミノメーター（SpectraMax L, Molecular Devices）を用いて 5 秒間の発光量を測定した。

脂肪酸受容体アンタゴニストによる阻害試験

脂肪酸が TLR10 発現を誘導する機序の解析のため、脂質受容体アンタゴニストによる阻害試験を行った。HaCaT 細胞を 1.5×10^5 cells/mL/well となるよう 24 ウェル培養ディッシュに播種し、24 時間程度培養して底面に定着させた。新しい D-MEM（750 µL/well）に交換し、は脂肪酸受容体アンタゴニストの混合液（各アンタゴニストの終濃度を記載）を 1 µL/well で添加した。1 時間後、過酸化脂肪酸（50 µL/well）を終濃度 0.1～100 µM になるよう添加した。コントロール群には 10%BSA 溶液のみを同量添加した。それぞれ一定時間の培養後に培地を除去し、PBS で 1 回洗浄した後、TRI Reagent を 1 試験区につき 1 mL ずつ加えて細胞を溶解させて回収し、定量 RT-PCR 法により TLR10 発現に及ぼす影響をみた。

脂肪酸受容体特異的 siRNA による阻害試験

脂肪酸受容体特異的な市販 siRNA（Thermo Fisher Scientific）を用いた。24 ウェルプレートに播種した HaCaT 細胞を、未処理、RNAiMAX のみ（SiRNA 無添加）、Negative Control siRNA + RNAiMAX 添加 、標的遺伝子（GAPDH や TLR2）特異的 siRNA＋RNAiMAX 添加条件の試験区に区分した。対象にウェルに各 siRNA を Lipofectamine RNAiMAX Transfection reagent (Invitrogen) を用いて導入した。導入処理後に培地を新鮮な血清入りの抗生物質不含 DMEM に交換し、48 時間後に細胞の生存状態を顕微鏡観察により確認するとともに、目的遺伝子の発現状況についてリアルタイム RT-PCR 法により確認を行った。目的遺伝子の発現抑制状態が見られた条件で、各種遊離脂肪酸による処理を行い、TLR10 発現の初期応答（脂肪酸処理 1 時間後）に及ぼす影響を評価した。

統計解析

得られた結果の統計解析は、スチューデントの t 検定（両側検定）、もしくは多重比較検定の Tukey-Kramer 法により行った。結果間の p 値が 0.05 より小さい場合を有意差ありと判定した。

４．研究成果

過酸化脂肪酸が TLR10 発現に及ぼす影響

今回検討に用いるリノール酸の過酸化物である脂肪酸 9-HpODE ならびに 13-HpODE が TLR10 発現に及ぼす影響を評価した。予備検討として、過去の遊離型脂肪酸処理で有意な TLR10 発現誘導がみられていた 100 μM 以上で 6 時間の処理条件で HaCaT 細胞に作用させたところ、細胞毒性が観察された（データは示していない）。この結果を受けて、過酸化脂肪酸を用いた検討を 10 μM のオーダー以下で実施することとした。

上記の結果をもとに、9-HpODE と 13-HpODE を終濃度 0.1～10 μM になるよう培養系に添加して TLR10 の発現量に及ぼす影響を調べた結果、どちらも 1 μM 以上の処理を行った条件で有意な上昇がみられた。これと同じ処理条件を含むリノール酸の処理（終濃度 0.1～100 μM）が TLR10 発現誘導に及ぼす影響を調べた結果、1 μM 以上の処理条件で TLR10 の発現量が有意に増加した。また有意な TLR10 誘導がみられた濃度処理条件において、処理時間の違いが TLR10 の発現誘導に及ぼす影響を 13-HpODE を用いて評価したところ、1 時間の処理において 6 時間の処理と同程度の TLR10 発現誘導が確認された。

以上の結果を受けて、過酸化脂肪酸とリノール酸の TLR10 発現誘導能を 1.6 μM で 1 時間という同一の処理条件に設定し、より直接的と考えられる短時間での TLR10 の発現量に及ぼす影響の比較を行った。1.6 μM の処理濃度による 1 時間の処理において、BSA のみで処理を行ったネガティブコントロールに比べ、リノール酸の処理では TLR10 の発現量が有意に増加した。さらに 9-HpODE や 13-HpODE での処理では、リノール酸と比較しても有意に増加し、酸化部位による違いはみられなかった。また、この TLR10 の誘導傾向は、処理濃度を 10 μM、処理時間を 6 時間に変更して行った検討でも同様であることが確認できた。

過酸化脂肪酸が炎症性サイトカイン誘導に及ぼす影響

脂肪酸が TLR10 発現を誘導するシグナル伝達経路は明らかでない。一つの可能性として TLR を介した NF-κB シグナル伝達の関与が考えられるため、過酸化脂肪酸による処理と市販 TLR2 リガンドである Pam2CSK4 による処理をそれぞれ行い、TLR を介した自然免疫応答に関わる一般的な炎症性サイトカインである IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α を指標として、それらの発現に及ぼす影響について比較を行った。9-HpODE の処理では IL-1β のみ僅かに増加したが、他の炎症性サイトカインの発現に大きな影響はみられなかった。その前駆体であるリノール酸についても、これらのサイトカインのいずれにも有意な変化は観察されなかった。しかしながら、Pam2CSK4 による処理においては、IL-8 を筆頭として指標としたすべてのサイトカインに有意な発現誘導が観察された。

ドコサヘキサエン酸（DHA）過酸化物が TLR10 発現に及ぼす影響

これまでみてきた過酸化脂肪酸による TLR10 発現誘導作用がリノール酸の過酸化物に限ったものでないことを確認するため、DHA の過酸化物にあたる 17-HpDHA で処理を行った細胞でも TLR10 の発現量を確認。その結果、1 μM 以上の処理において 9-HpODE や 13-HpODE と同様に有意に TLR10 を誘導し、濃度依存的な上昇がみられた。

過酸化脂肪酸が NF-κB 活性化に及ぼす影響

NF-κB の活性化レベルを高い精度で定量するため、NF-κB 活性化に応じて SEAP を発現するプラスミドを導入した HaCaT 細胞を樹立し、ルシフェラーゼアッセイによる解析を試みた。過酸化脂肪酸である 13-HpODE を用いて、処理濃度や処理時間といった条件を様々に変えながら NF-κB の活性化レベルを調査した。しかし、ポジティブコントロールとして設定した Pam2CSK4 で処理を行った群でみられた発光量が増加したのに対し、13-HpODE による処理では有意な発光量の増加はみられなかった。

脂肪酸受容体アゴニストが TLR10 発現に及ぼす影響

脂質受容体を介したシグナル伝達経路の活性化が TLR10 発現の誘導につながっている可能性について、市販アゴニストを用いて検討を行った。上記の 5 種類の脂質受容体それぞれのアゴニストで HaCaT 細胞を処理し、TLR10 の発現に及ぼす影響を確認した。その結果、今回用いた全てのアゴニストによる単独処理で TLR10 の発現が誘導された。

脂肪酸受容体アンタゴニストが脂肪酸による TLR10 発現に及ぼす影響

脂肪酸による TLR10 の誘導が脂質受容体を介したシグナル伝達によって誘導されている可能性を検証するため、細胞質内で脂肪酸をリガンドとする受容体である PPAR-α、PPAR-β/δ、PPAR-γ、ならびに細胞膜上で脂肪酸をリガンドとして認識する G タンパク質共役型脂質受容体である GPR40 と GPR120 を対象に、以下の検討を行った。

HaCaT 細胞を上記 5 種の受容体の市販アンタゴニストの混合条件による前処理を行い、9-HpODE 処理により TLR10 発現を誘導して評価したところ、9-HpODE により誘導される TLR10 の発現がアンタゴニスト混合条件による前処理を行った細胞においては有意に低下した。。

脂肪酸受容体特異的 siRNA 処理が脂肪酸による TLR10 発現に及ぼす影響

上記受容体特異的 siRNA による前処理により、PPARβ/δ および PPARγ 特異的な siRNA 処理時に 9-HpODE による TLR10 誘導が有意に抑制された。また検討を実施した HaCaT 細胞においては、上記受容体の発現量で PPARβ/δ が最も優勢で、PPARα と PPARγ にそれに続くが、GPR40 と GPR120 の発現量はほとんどみられなかった。以上の結果から、皮膚角化細胞における脂肪酸による TLR10 の発現は、長鎖脂肪酸をリガンドとする PPARs と GPRs の複合的な関与が考えられるものの、とくに発現量の大きな PPARβ/δ と PPARγ が深く関与している可能性が示唆された。

５．主な発表論文等

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

１．著者名 河原岳志，芦部文一朗，松見 繁	４．巻 51(2)
２．論文標題 クロモジ熱水抽出物の 抗インフルエンザウイルス活性成分の検討	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Japanese Pharmacology & Therapeutics	６．最初と最後の頁 193-201
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 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 河原岳志、芦部文一朗、松見繁	４．巻 50
２．論文標題 クロモジ熱水抽出物のコロナウイルスOC43に対する感染抑制作用	５．発行年 2022年
３．雑誌名 薬理と治療（Japanese Pharmacology & Therapeutics）	６．最初と最後の頁 195-201
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 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 Takeshi Kawahara, Issei Shimizu, Yuuki Tanaka, Keisuke Tobita, Mikado Tomokiyo, Itsuki Watanabe	４．巻 13
２．論文標題 Lactobacillus crispatus strain KT-11 S-layer protein inhibits rotavirus infection	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Frontiers in Microbiology	６．最初と最後の頁 783879
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.783879	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3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 馬場琢都、河原岳志
２．発表標題 過酸化脂肪酸によるTLR10発現誘導作用の評価
３．学会等名 日本畜産学会 第130回大会
４．発表年 2022年

1．発表者名 西野遥希，大木妙子，渡邉樹，河原岳志
2．発表標題 Bifidobacterium longum KMH001株のヒト腸管上皮細胞におけるコレステロール吸収抑制効果
3．学会等名 日本畜産学会 第130回大会
4．発表年 2022年

1．発表者名 河原岳志，芦部文一朗，松見　繁
2．発表標題 コロナウイルスOC43 に対するクロモジ熱水抽出物の作用
3．学会等名 日本生薬学会第67回年会
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

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