

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：84420

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20769

研究課題名（和文）腸内細菌由来のオメガ3脂肪酸代謝物を介した宿主免疫制御システムの解明

研究課題名（英文）The impact of omega-3 fatty acid metabolites from intestinal bacteria on host

研究代表者

雑賀 あずさ（Saika, Azusa）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ワクチン・アジュバント研究センター・研究員

研究者番号：70909754

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトをはじめとする哺乳類が持つ酵素により、内因的に産生される脂肪酸代謝物が種々の抗炎症作用を示す実効分子であることが明らかとなり、新たな創薬シーズとしての応用が期待されている。本研究では、腸内細菌由来の複数の脂肪酸代謝物を含む内因性脂肪酸代謝物ライブラリを活用し、機能性脂肪酸代謝物の宿主免疫系に対する機能解明を進めた。アレルギー性接触皮膚炎モデルなどアレルギー炎症性疾患モデルマウスを用いた検討の結果、抗炎症作用を示す腸内細菌由来のオメガ3脂肪酸代謝物を複数見いだすことができた。さらに免疫学的機能解析を行うことで、その詳細な作用機序を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オメガ3脂肪酸が生体内で機能性脂肪酸代謝物に変換されることが明らかになり、免疫制御機構や炎症反応に影響を与えることが示されている。また最近では、腸内細菌も脂肪酸の変換に関与することが分かってきた。本研究では、腸内細菌由来の機能性脂肪酸代謝物に着目した研究を進め、いくつかの脂肪酸代謝物の抗炎症機序を明らかにした。本研究により見いだした機能性脂肪酸代謝物は、アレルギー炎症性疾患の治療や予防に有効な医薬品や機能性食品の開発に役立つ可能性がある。加えて、脂肪酸代謝物を介した腸内細菌、宿主の相互作用に関する知見は、今後発展が期待される個人に適した食事栄養摂取指導や腸内環境の管理に向けて重要な情報となる。

研究成果の概要（英文）：Fatty acid metabolites produced endogenously by enzymes in humans have been shown to be effective molecules that exhibit various anti-inflammatory effects. Therefore, these fatty acid metabolites are expected to be developed as new seeds for medicines. In this study, we tried to reveal the function of fatty acid metabolites on the host immune system by using a fatty acid metabolite library containing several fatty acid metabolites derived from intestinal bacteria. We identified omega-3 fatty acid metabolites that exhibited anti-inflammatory activity by using allergic and inflammatory disease murine models and showed their anti-inflammatory mechanisms.

研究分野：食品免疫学

キーワード：オメガ3脂肪酸 腸内細菌 微生物由来代謝物 脂肪酸代謝物 リピドミクス解析 ミード酸 アレルギー性接触皮膚炎 刺激性接触皮膚炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

オメガ 3 脂肪酸が抗炎症作用を持つことは古くから知られており、その代謝を解明することは病態に関連する複雑な生命現象を理解するために重要である。申請者を含めた近年の研究から、ヒトをはじめとする哺乳類が持つ酵素により内因的に産生される脂肪酸代謝物が種々の抗炎症作用を示す実効分子であることが明らかとなり、新たな創薬シーズとしての応用が期待されている。さらに、腸内細菌をはじめとする微生物も脂肪酸を代謝し、哺乳類が産生できないユニークな構造を持つ代謝物を産生することが分かってきた。

近年、食と同様、腸内細菌も健康との関わりが注目され、腸内細菌叢を制御することが種々の疾患の予防・改善に重要であると指摘されている。一方、腸内細菌は哺乳類が保有しない独自の脂肪酸代謝経路により特殊な構造を持つ代謝物を産生すること、さらにその代謝物は生体内に取り込まれ様々な生体機能に影響を与えることから、腸内細菌叢を介した脂肪酸の産生能力が腸内細菌叢と宿主の健康状態とを結ぶ一つの要素であると考えられる。しかし、腸内細菌が産生する脂肪酸代謝物の機能のほとんどは明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

腸内細菌由来のオメガ 3 脂肪酸代謝物を含む内因性脂肪酸代謝物ライブラリを活用し、脂肪酸代謝物の免疫学的機能評価を行うことで、腸内細菌と宿主の相互作用を介した免疫制御システムの解明を目指した。具体的には、腸内細菌と宿主とを結ぶ因子として腸内細菌由来のオメガ 3 脂肪酸代謝物に着目し、認識に関わる責任受容体とその下流のシグナルに関する網羅的解析を統合的に進めることで、「機能性オメガ 3 脂肪酸代謝物の産生を介した宿主免疫恒常性維持」という腸内細菌叢の持つ新たな役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

まず、内因性脂肪酸代謝物ライブラリを活用し、長鎖遊離脂肪酸の受容体として働くことが報告されている各種受容体に対する脂肪酸代謝物の活性化レベルの評価を行った。核内受容体の一種である Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 、Retinoid X receptor (RXR)  $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ 、Liver X receptor (LXR)  $\alpha$ 、LXR $\beta$  の活性化レベルをレポーターアッセイにより評価し、G protein-coupled receptor (GPCR) の一種である GPR40、GPR120 の活性化レベルを GPCR シグナル検出系の Transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) 切断アッセイを用いて評価した。

次に、各種受容体に対するリガンド活性が高かった脂肪酸代謝物を対象に、アレルギー炎症性疾患モデルマウスを用いた生理機能の評価を進めた。下記のモデルマウスを活用し、候補脂肪酸代謝物をマウスに投与した際の病態や免疫学的機能の解析を行うことで、脂肪酸代謝物の生理機能と作用機序の解明に取り組んだ。

アレルギー性接触皮膚炎は、ハプテンとして 2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) を耳介に塗布することで炎症を誘導した。DNFB を感作 (0 日目)、惹起 (5 日目) の際に耳介に塗布する 30 分前に評価対象の脂肪酸代謝物を塗布し、7 日目に炎症の指標となる耳介の腫れを測定した。加えて、免疫応答を調べるために組織学的解析やフローサイトメトリー解析、遺伝子発現量解析などを行った。

高脂肪食誘導性肥満モデルでは、高脂肪食を 3 ヶ月間マウスに給餌することで肥満、糖尿病の病態を誘導した。糖尿病病態を調べるためにグルコース負荷試験やインスリン抵抗性試験を行ったほか、病態や免疫応答を調べるために肝臓や脂肪組織の組織学的解析、フローサイトメトリー解析を行った。また、エネルギー生成に関わる物質として知られる一次代謝産物の定量解析を高速液体クロマトグラフ三連四重極型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて行った。

レチノール誘導性皮膚炎は、4 日間続けてレチノールを耳介に塗布することで誘導した。評価対象の脂肪酸代謝物をレチノール塗布後に耳介に塗布し、炎症の指標となる耳介の腫れを測定した。免疫応答を調べるために、5 日目に耳介を回収し、組織学的解析やフローサイトメトリー解析、セルソーターで分取した目的細胞の遺伝子発現量解析などを行った。

表皮角化細胞を対象にした解析は、ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT 細胞) を用いて行った。HaCaT 細胞を Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) で刺激した後、リン酸化 p38 をウェスタンブロット法により検出することで p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) のリン酸化を評価した。

また、内因性脂肪酸代謝物ライブラリを活用し、LC-MS/MS を用いた脂肪酸代謝物の一斉定量分析システムを確立した。さらに、本システムを用いて、マウス血清や糞便、ヒト血清中に含まれる脂肪酸代謝物の定量分析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) アレルギー性接触皮膚炎抑制活性を持つオメガ 3 脂肪酸代謝物の同定

腸内細菌由来のオメガ 3 脂肪酸代謝物の責任受容体を明らかにするために、内因性脂肪酸代謝物ライブラリに含まれる各種脂肪酸代謝物を対象に、核内受容体及び GPCR の活性化レベル

を測定した。その結果、異なる受容体を特徴的に活性化するオメガ3脂肪酸代謝物を複数見いだすことができた。

次に、異なる受容体を強く活性化したオメガ3脂肪酸代謝物を選抜し、アレルギー性接触皮膚炎モデルを用いた抗炎症機能の評価を行った。その結果、DNFB誘導性の耳介の腫れを抑制するオメガ3脂肪酸代謝物を複数同定することができた。そこで、作用機序の解明を進めたところ、各種オメガ3脂肪酸代謝物が、異なる標的細胞に作用することで、アレルギー性接触皮膚炎における耳介の腫れを抑制することを示す結果を得た。例えば、代表的な食事由来オメガ3脂肪酸である $\alpha$ リノレン酸の腸内細菌代謝物の1種は、表皮角化細胞に発現するRXRに作用し、Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)の遺伝子発現を抑制することで、アレルギー性接触皮膚炎の病態として観察される表皮細胞間浮腫、海綿状態の症状を改善することを明らかにした。さらに、別種の $\alpha$ リノレン酸代謝物は樹状細胞の遊走を抑制することで、アレルギー性接触皮膚炎における耳介の腫れを抑制することを示唆する結果を得た。

また、高脂肪食を給餌したマウスに $\alpha$ リノレン酸由来の腸内細菌代謝物の1種を3ヶ月間経口投与すると、高脂肪食誘導性の体重増加が抑制されることを見いだした。糖尿病病態を調べるためにグルコース負荷試験やインスリン抵抗性試験を実施した結果、本脂肪酸代謝物は高脂肪食負荷による耐糖能異常やインスリン抵抗性を改善することが分かった。さらに、エネルギー代謝に関わる主要な組織として知られる肝臓、筋肉における一次代謝産物の解析を行ったところ、本脂肪酸代謝物を経口投与することで肝臓におけるエネルギー代謝が亢進されることが分かった。本研究により見いだした腸内細菌由来の各種機能性オメガ3脂肪酸代謝物は、アレルギー・炎症性疾患の治療や予防に有効な医薬品や機能性食品の開発に役立つ可能性があると考えられる。

## (2) LC-MS/MSを用いた生体サンプルの分析

本研究により見いだした腸内細菌由来の各種機能性オメガ3脂肪酸代謝物の産生に腸内細菌の存在が寄与するのかを調べるために、Germ-free (GF) マウスを用いた検討を行った。GFマウス及びSpecific-pathogen free (SPF) マウスにオメガ3脂肪酸を豊富に含む亜麻仁油またはオメガ6脂肪酸を豊富に含む大豆油を給餌した。その後、糞便や腸管内容物、肝臓や肺などの組織、血液を回収し、LC-MS/MSを用いた各部位における脂肪酸代謝物の定量解析を行った。その結果、本研究にて見いだした機能性オメガ3脂肪酸代謝物を含む腸内細菌由来のオメガ3脂肪酸代謝物の存在量は、SPFマウスの糞便、腸管内容物中と比べてGFマウスにおいて顕著に少ないことが分かり、腸内細菌由来の機能性オメガ3脂肪酸代謝物は実際に腸内細菌の存在に依存して生体内で産生されることを確認した。加えて、SPFマウスにおける機能性オメガ3脂肪酸代謝物の存在量は亜麻仁油を給餌したマウスにおいて大豆油を給餌したマウスよりも多く、食事由来の脂肪酸を基質として機能性オメガ3脂肪酸代謝物は産生されることも確認できた。一方、亜麻仁油を給餌したマウスの糞便中で高濃度検出されるにも関わらず、血清中ではほとんど検出されない腸内細菌由来の脂肪酸代謝物も存在した。さらに、SPFマウスの血清や組織における腸内細菌由来の脂肪酸代謝物存在量とGFマウスにおける存在量との間で差が認められない代謝物もあった。また、ヒトの血清中に含まれる腸内細菌由来の脂肪酸代謝物の網羅解析を実施したところ、腸内細菌由来の脂肪酸代謝物の存在量には大きな個人差が認められた。脂肪酸代謝物を介した腸内細菌と宿主の相互作用の解明に向け、今後、腸内細菌叢の個人差や、生活習慣の個人差のほか、脂肪酸代謝物の吸収や体内動態も考慮した取り組みを進めたいと考える。

## (3) ミード酸のレチノール誘導性刺激性接触皮膚炎抑制機序の解明

オレイン酸の内因性代謝物であるミード酸 (5,8,11-eicosatrienoic acid) は、DNFB誘導性アレルギー性接触皮膚炎における皮膚炎症を好中球浸潤と好中球によるロイコトリエン $B_4$ 産生の抑制によって改善することをこれまでに報告していた。一方で、ミード酸の免疫系に対する詳細な作用機序は明らかになっていなかった。そこで、レチノール誘導性刺激性接触皮膚炎モデルマウスを用いてミード酸の機能的受容体の同定及び抗炎症機序の解明を行った。

まず初めに、レチノール誘導性刺激性接触皮膚炎モデルマウスを用いて、ミード酸を耳介に塗布することで炎症の指標となる耳介の腫れが抑制されることを確認した (図1A)。次に、各種核内受容体に対するレポーターアッセイを行ったところ、ミード酸はPPAR $\alpha$ 及びPPAR $\beta$ を強く活性化することが分かった。そこで、炎症抑制に関わるミード酸の機能的受容体を調べるためにPPAR $\alpha$ 及びPPAR $\beta$ に対するアンタゴニストを用いた検討を行ったところ、ミード酸はPPAR $\alpha$ を介して耳介の腫れを抑制することが分かった。さらに耳介の組織学的な解析から、ミード酸は表皮過形成に必須のシグナル伝達経路であるp38 MAPKリン酸化を

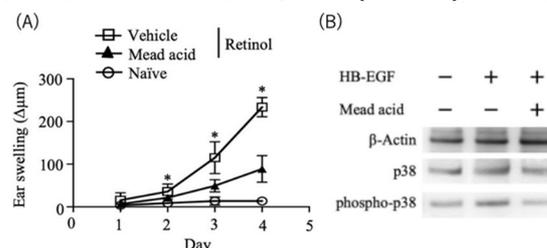


図1. ミード酸によるレチノール誘導性刺激性接触皮膚炎抑制活性  
(A) 耳介の腫れ (Δμm)  
(B) HaCaT細胞におけるphospho-p38、p38、およびβ-actinの発現量

抑制することで、表皮過形成を抑制することが明らかになった。そこで、HaCaT細胞を用いてミード酸の表皮角化細胞に対する直接作用を調べたところ、ミード酸はレチノール刺激によって発現が誘導される HB-EGF を介した p38 MAPK リン酸化を抑制することが分かった（図 1 B）。このことから、ミード酸は表皮角化細胞に発現する PPAR $\alpha$  を介して p38 MAPK のリン酸化を抑制することで表皮過形成を抑制し、レチノール誘導性刺激性接触皮膚炎における耳介の腫れを抑制することを示すことができた。レチノール及びその誘導体はニキビやシワを治療するためのスキンケア製品に広く使用されている一方で、刺激性接触皮膚炎を誘発するなどの副作用を示すことが指摘されている。本研究から、ミード酸の使用により、レチノールやその誘導体を用いた処置における副作用のリスクを最小限に抑えることができる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Saika A, Tiwari P, Nagatake T, Node E, Hosomi K, Honda T, Kabashima K, Kunisawa J.	4. 巻 10
2. 論文標題 Mead acid inhibits retinol-induced irritant contact dermatitis via peroxisome proliferator-activated receptor alpha	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1097955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2023.1097955	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Saika A, Nagatake T, Hosomi K, Matsunaga A, Honda T, Arita M, Kabashima K, Kunisawa J
2. 発表標題 12-hydroxyeicosapentaenoic acid, inhibits allergic contact dermatitis through retinoid X receptor alpha in keratinocytes
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saika A, Tiwari P, Nagatake T, Hosomi K, Honda T, Kabashima K, Kunisawa J
2. 発表標題 Mead acid (5,8,11-eicosatrienoic acid) inhibits retinol-induced irritant contact dermatitis through PPAR $\gamma$ -mediated pathway
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------