

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11018

研究課題名（和文）血中脂肪酸アミド類のバイオマーカーとしての有用性の解析

研究課題名（英文）Investigation of serum fatty acid amides as useful biomarkers

研究代表者

吉武 淳（Yoshitake, Jun）

名古屋大学・未来社会創造機構・特任助教

研究者番号：70414349

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：脂質メディエーターである脂肪酸アミド類を高感度に定量するために、質量分析と安定同位体希釈法を用いた脂肪酸アミドの高感度定量法を確立した。マウスの血中脂肪酸アミド濃度を定量したところ、LPS処理マウスの血中オレアミド濃度が低下することを見出した。オレアミドをLPS処理マウスに投与したところ、血中炎症性サイトカイン濃度の低下とマウスの生存率の上昇が認められた。またLPS刺激細胞の炎症性サイトカイン産生がオレアミド前処理によって抑制されたことから、オレアミドの抗炎症作用が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで脂肪酸アミドの脂質メディエーターとしての役割についての研究は多く行われている。今後恒常性維持の観点から、生体局所における脂肪酸アミドの定量や動向が重要となることが予想できる。本研究により構築した脂肪酸アミド類の高感度な定量法は、各種疾患と脂肪酸アミド類の関連の網羅的な解析や食品の機能性評価など、多くの分野への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：To quantify the fatty acid amides acting as a lipid mediator with high sensitivity, a quantification method that uses mass spectrometry coupled with a stable isotope dilution method was established. When quantify the fatty acid amides in mice, we observed reduced oleamide concentration of serum in LPS-induced acute inflammatory model mice. The administration of oleamide to the model mice decreased inflammatory cytokines in serum and increased survival rate. These results and the observation that the pre-treatment of the cells with oleamide reduced the production of pro-inflammatory cytokines by LPS stimulation suggest that oleamide has a possibility to exert anti-inflammatory effect.

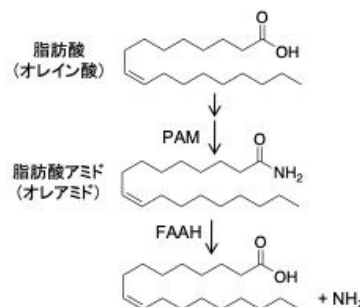
研究分野：細胞生物学

キーワード：血中脂肪酸アミド濃度 オレアミド 抗炎症作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

主に食品から体内に取り入れられる脂質は、糖質、タンパク質と並ぶ重要な成分である。脂質は細胞膜の主要な構成成分としてやエネルギー源としての役割を持つだけでなく、脂質二重膜より切り出されたアラキドン酸から炎症時に酵素的に産生されるプロスタグランジン類や、活性酸素種と脂肪酸類の反応によって生じる過酸化脂質など、酵素や内因性物質との反応によって脂質メディエーターと呼ばれる生理活性を持った分子に変換されることが知られている。生体において、脂肪酸のカルボキシ基(R_1 -CO-OH)と窒素との結合で生成される脂肪酸アミド類(R_1 -CO-NH- R_2)が産生されることが知られている。脂肪酸アミド類は動植物界に広く存在し且つ非常に種類が多く、動物では主に Peptidylglycine - amidating monooxygenase (PAM)による生合成と Fatty acid amide hydrolase (FAAH)による分解によって代謝が制御されていると考えられている。アラキドン酸がエタノールアミンとアミド結合したアナンダミドがカンナビノイド受容体の内因性リガンド活性を有する(Devane et al., *Science*, 1992)報告や、オレイン酸のアミド体であるオレアミドの睡眠誘導活性(Cravatt et al., *Science*, 1995; Mendelson et al., *Neuropsychopharmacology*, 2001)が報告されるなど脂肪酸アミド類の多様な生理作用が報告されつつあるが、これまで一級脂肪酸アミド類についての生理学的役割や疾患との相関はあまり研究されておらず不明な点が多い。



2. 研究の目的

本研究では脂肪酸アミド類の高感度かつ特異的な測定法を確立し、LPS 誘導急性炎症モデルマウスにおける脂肪酸アミド類の血中濃度の変化を解析する。特に血中に多く存在するオレアミドに着目して、LPS 投与がマウスに与える影響を血中オレアミド濃度やサイトカイン濃度の変化に焦点を当てた解析を行う。また、LPS 誘導炎症モデルマウスへのオレアミド投与が生体に与える効果や、LPS 刺激細胞に対するオレアミドの効果を分子生物学的手法により解析することで、炎症におけるオレアミドの生理学的意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) LPS 誘導炎症モデルマウス血中脂肪酸アミドの定量および脂肪酸アミド代謝酵素の評価

Balb/c マウス (雄、7 週齢) に 2.5 mg/kg LPS を腹腔内投与した。採血は尾静脈より LPS 投与前、1 時間後および 2 4 時間後に採血を行い、血清を回収した。回収した血清に既知量の脂肪酸アミドの安定同位体を内部標準として添加した後、アセトンを加えてタンパク質を沈殿させた。遠心上清を回収乾固した後に脂肪酸アミド類をクロロホルム・メタノール抽出ならびに固層抽出にて回収、乾固後にエタノールに再溶解したものをサンプルとして UPLC-質量分析装置に供して定量した。脂肪酸アミドの定量はサンプルの脂肪酸アミドのピークの面積と内部標準との面積比による、安定同位体希釈法によって算出した。

脂肪酸アミド合成酵素である PAM とオレアミド分解酵素である FAAH について LPS 投与・非投与群の組織における発現量をウエスタンブロッティングにより評価した。Balb/c マウス (雄、7 週齢) に 2.5 mg/kg LPS を腹腔内投与して 1 時間後に組織を回収した。プロテアーゼ阻害剤を含む溶解液中で組織をポリトロンにて破碎・遠心した上清をウエスタンブロッティングに供した。

(2) オレアミド投与が LPS 誘導マウスに与える影響

Balb/c マウス (雄、7 週齢) にオレアミド (50 mg/kg) を経口投与 5 分後に致死量 (15 mg/kg) の LPS を腹腔内投与後に経過観察による生存率の測定ならびに経時的な採血を行った。血中オレアミド濃度の定量は、血液より回収した血清を UPLC-質量分析装置に供して行った。また、血中 TNF および IL-6 濃度の定量は ELISA を用いて行った。

(3) オレアミドの抗炎症作用の検討

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を、オレアミド (50 μM) を含む無血清培地で 1 時間前培養後に LPS (100 ng/ml) を添加した。24 時間培養後に培養液を回収し、細胞より放出された TNF および IL-6 を ELISA によって定量した。また同じ条件下での細胞破碎液を回収し、LPS 刺激による誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) および誘導型シクロオキシゲナーゼ (COX-2) 発現に対するオレアミドの効果をウエスタンブロッティングによって評価した。さらに、TLR4 遺伝子および NF- κ B プロモーター領域下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーター遺伝子を HEK 細胞にトランスフェクション後、オレアミドを含む無血清培地で 1 時間処理後に LPS で 24 時間処理した際の NF- κ B の活性化をルシフェラーゼアッセイによって評価した。

4. 研究成果

(1) LPS 誘導炎症モデルマウス血中脂肪酸アミド濃度変化

LPS 投与前、投与後 1 時間及び 24 時間後のマウス血中のステアリン酸アミド、オレイン酸アミド(オレアミド)、ミリスチン酸アミド、パルミチン酸アミド、パルミトレイン酸アミドを測定した結果、いずれも LPS を投与後 1 時間において優位な血中濃度の低下が認められた。これら脂肪酸アミドのうち、オレアミドにおいて LPS 投与前後における血中濃度差が一番大きかったことから、オレアミドに焦点を当てて LPS 投与による血中濃度の経時変化を測定した。その結果血中オレアミド濃度は、LPS 投与前と比較して投与 1-4 時間後まで有意に減少しその後緩やかに回復していった。対してオレイン酸の血中濃度は投与 4 時間後をピークとしてその後投与前の濃度に戻ることが確認された。続いて LPS 投与 1 時間後における PAM と FAAH の組織での発現量を比較した。その結果 LPS 投与群の肝臓において、非投与群と比較して減少傾向にある PAM の発現が認められた。この時の FAAH の発現量に LPS 投与群と非投与群の間に差は認められなかった。これらの結果からマウス LPS 誘導炎症モデルにおいて、肝臓における PAM 発現量の減少が血中オレアミド濃度の減少に關与している可能性が示唆された。

(2) オレアミド投与が LPS 誘導炎症モデルマウスに与える影響

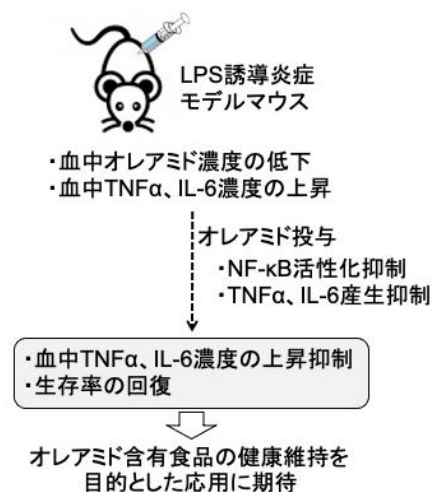
マウスに 50 mg/kg のオレアミドを経口投与した 5 分後に致死量(15 mg/kg)の LPS を腹腔内投与した結果、LPS 投与 5 日後に対照群での生存率が 10%を下回ったのに対して、オレアミド投与群において有意な生存率の回復(約 80%)が認められた。LPS 誘導炎症モデルマウスの血中の TNF および IL-6 濃度を測定した結果、LPS 処理 1-2 時間においてオレアミド投与群において対照群と比較して有意な TNF および IL-6 濃度の減少が認められた。LPS 処理 4 時間後の血中 TNF および IL-6 濃度にオレアミド投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

(3) オレアミドの抗炎症作用の検討

RAW264.7 細胞の LPS 刺激による培地中の TNF および IL-6 産生量は、オレアミドの前処理によってオレアミド濃度依存的に抑制された。オレアミド前処理(50 μ M)が LPS 刺激細胞のサイトカイン産生に与える効果を経時的に検討したところ、オレアミド非処理群と比較して培地中の TNF 量は LPS 処理後 4 時間から、IL-6 量は LPS 処理後 8 時間後から有意に抑制された。また LPS 刺激後 24 時間における iNOS および COX-2 発現をウエスタンブロッティングにより検討した結果、iNOS および COX-2 発現はオレアミドの前処理によって抑制された。これらの結果はオレアミドが細胞の LPS 刺激に対して抗炎症作用を発揮していることを示唆している。

加えてオレアミドの抗炎症作用の発現メカニズムを解明するために、ルシフェラーゼアッセイを用いて細胞の LPS 処理による NF- κ B の活性化に対するオレアミドの効果を評価したところ、オレアミドの前培養によって LPS 刺激による NF- κ B の活性化が抑制された。

これらの結果より、オレアミドは NF- κ B の活性化の抑制を介して抗炎症作用を発揮し、炎症に対して生体防衛的に作用する可能性が示唆される。加えて炎症と生活習慣病は深い相互関係を有することから、オレアミドを含有する食品に対して健康維持の視点に立った新たな知見が得られる可能性が期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井大智、柴田貴広、岡本拓也、吉武淳、上久保綾祐、内田浩二
2. 発表標題 オレアミドによる抗炎症作用機序の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019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
---------	---------