

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780096
 研究課題名（和文） 腸内細菌による脂質代謝産物の網羅的解析
 研究課題名（英文） Analysis of lipid metabolites produced by gut flora and studies on the mechanism of anti-inflammatory activity exerted by the compounds
 研究代表者
 西谷 洋輔 (NISHITANI YOSUKE)
 神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・助教
 研究者番号：80457093

研究成果の概要（和文）：生体内では様々な脂質が代謝され、生理活性物質として作用することが知られている。しかしながら、脂質代謝における腸内細菌の関与および代謝産物の宿主腸管免疫への影響は不明な点が多い。我々は、LC-MS/MS を用いた脂質代謝産物の解析を試みたが、夾雑物の影響により未だ成功していない。一方、既知の脂質代謝産物である lipoxin A4 および resolvin E1 について、腸管において抗炎症作用を示すこと、さらにその作用機序を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：It is known that various lipids are metabolized in vivo, and act as physiologically active substances. However, the participation of gut flora to lipid metabolism and the effect of lipid metabolites on gut immune system have yet to be fully elucidated. In this study, we tried to analyze lipid metabolites produced by intestinal microflora by using LC-MS/MS, though it had yet to be succeeded because of the effect of impurities. Meanwhile, we revealed that known lipid metabolites, including lipoxin A4 and resolvin E1, exert anti-inflammatory activity in intestinal tract.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細菌学、免疫学

科研費の分科・細目：ライフサイエンス（共通基礎研究）

キーワード：腸内細菌、脂質代謝産物、腸管免疫

1. 研究開始当初の背景

生体内ではさまざまな脂質が代謝され、生理活性物質として作用することが知られている。近年、アラキドン酸は従来知られている phospholipase A₂ や cyclooxygenase などに

より急性炎症時に産生される prostaglandin などのエイコサノイドに変換されるだけでなく、lipoxygenase や cyclooxygenase により急性炎症の回復期に産生される代謝産物である lipoxin (LXs) が特異的な受容体を介し

て抗炎症作用、免疫制御作用を持つことが明らかにされた。また同様の経路により、魚油などに多量に含まれる eicosapentaenoic acid (EPA) より resolvin (RvE1) が産生され、その特異的受容体を介して炎症を制御することも明らかにされている。一方、腸内細菌は 400 種以上、約 100 兆個、大腸では糞便 1 グラムあたり 1,000 億個存在することが知られている。これらの腸内細菌の持つさまざまな酵素により、生体内の脂質が分解され、その由来産物が宿主の生体内で生理活性を示すことで免疫系を中心としてさまざまな作用を及ぼすことが想定される。

2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌の産生する酵素による脂質の分解産物を網羅的に解析し、その中で新たな脂質由来の生理活性物質を同定して、その生物学的作用を腸管免疫制御という点から明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 細菌由来 P450 リコンビナント酵素の作製

脂質代謝酵素の Positive control として、細菌由来 P450 リコンビナント酵素の作製を行った。既に P450 活性が論文報告されている *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* より、P450 遺伝子を特異的プライマーを用いて PCR 増幅した。PCR 産物を pGEX4T-1 ベクターにサブクローニングし、大腸菌での発現を行った。組み換え蛋白は、GST タグに対するアフィニティーカラムを用いて精製した。P450 活性は、EPA を基質として用い、NADPH から NADP への反応を A_{340} 値の変化として測定することによって定量した。

(2) SPF マウス腸内細菌における脂質代謝産物の網羅的解析

マウスは体内に存在する微生物の種類により、Conventional (CV) マウス、Specific Pathogen Free (SPF) マウス、ノトバイオトマウス (素性の明らかな微生物のみを無菌マウスに感染させたもの)、及び無菌マウスの 4 種類に分類される。そこで、腸内細菌の構成が比較的明らかにされている SPF のマウスを用いて、投与した脂質 (エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、アラキドン酸、対照としてステアリン酸などの不飽和脂肪酸) がどのようにマウスの生体内で代謝されるのかを高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトル (HPLC-MS/MS) で解析を試みた。実際には、SPF で飼育されたマウスの便にエイコサペンタエン酸を一定量混合し培養した後、メタノールを用いて脂質の抽出を行った。さらに Sep-Pak C18 を用いて脂肪酸の粗精製を行った。これらのサンプルについて、4000 Q TRAP LC/MS/MS System を用いた条件検討および解析を行った。

(3) 脂質代謝産物の宿主免疫系とくに粘膜免

疫における生物活性の評価

これまでにアラキドン酸やエイコサペンタエン酸は、生体内または *Bacillus megaterium* などの細菌のもつ酵素により変換され、生理活性物質となり、抗原提示細胞に発現する特異的受容体を介して、免疫応答を制御することが明らかになっている。しかしながら、腸管の粘膜免疫系への影響については不明な点が多い。そこで、アラキドン酸およびエイコサペンタエン酸の代謝産物である lipoxin A4 および resolvin E1 について、粘膜免疫系に対する生物活性の評価を行った。

① lipoxin A4 の粘膜免疫系への影響について

マウス腹腔内マクロファージおよびマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いて、LPS 刺激によって誘導される活性化に対する lipoxin A4 の影響を検討した。TNF- α および IL-12 mRNA 発現量は、Real-time PCR によって解析を行った。NF- κ B の核内移行は、特異抗体を用いたウェスタンブロッティングもしくは蛍光顕微鏡を用いた画像解析により行った。また、*in vivo* における検討として、マウス腹腔内に LPS を投与することによって誘導される急性炎症モデルを用いた。Lipoxin A4 を前投与した後、LPS 刺激を行い、1 時間後に採血および 24 時間後に小腸上皮細胞を採取した。血清中の TNF- α 量は ELISA 法で測定し、上皮細胞における TNF- α mRNA 発現量は Real-time PCR によって解析を行った。さらに、上皮細胞中の NF- κ B シグナリング関連分子について、特異抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析を行った。また、作用機序を明らかにするため、腸管上皮様 Caco-2 細胞および RAW264.7 の共培養系を用いて検討を行った。Lipoxin A4 を前処理した後、RAW264.7 細胞を LPS 刺激することによって産生される TNF- α および Caco-2 細胞中の IL-8 の解析を行った。

② resolvin E1 の腸炎抑制効果について

これまでの研究で既に明らかにされている resolvin E1 の特異的受容体である ChemR23 が、マウス腹腔内マクロファージに発現しているかについて FACS を用いて調べた。また、マウス腹腔内マクロファージを用いて、LPS 刺激によって誘導される活性化に対する resolvin E1 の影響を検討した。TNF- α および IL-12p40 mRNA 発現量は、Real-time PCR によって解析を行った。また、ChemR23 を高発現させた HEK293 細胞を用いて、TNF- α 刺激によって誘導される NF- κ B の核内移行に対する resolvin E1 の影響を、特異抗体を用いたウェスタンブロッティングもしくは蛍光顕微鏡を用いた画像解析により検討した。また、*in vivo* における検討として、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸炎マウスモデルを用いた。Resolvin E1 は腹腔内

投与した。連日、体重測定を行った。終了時に屠殺・解剖を行い、結腸の長さを測定した。また、結腸組織切片の HE 染色像の観察から病理学的スコアを算出した。結腸組織における NF- κ B のリン酸化について、特異抗体を用いた免疫染色により検討した。結腸組織中の炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) および ChemR23 mRNA 発現量は、Real-time PCR によって解析を行った。

4. 研究成果

(1) 細菌由来 P450 リコンビナント酵素の作製

脂質代謝酵素の Positive control として、bacterial P450 のリコンビナント酵素の作製を行った。既に P450 活性が論文報告されている *B. megaterium*、*B. subtilis* より、P450 遺伝子を特異的プライマーを用いて PCR 増幅した。PCR 産物を pGEX4T-1 ベクターにサブクローニングし、大腸菌での発現を行った。さらに組み換え蛋白を GST タグに対するアフィニティークラムを用いて精製した。精製蛋白は、EPA を基質とした活性測定により活性を確認した。また、ヒト腸内細菌のメタデータより cytochrome P450、lipoxigenase、cyclooxygenase と相同性の高い遺伝子を抽出した。今後は、これらの遺伝子を実際にヒト便サンプルより抽出した DNA からクローニングし、大腸菌で発現・精製し、脂質代謝活性を調べる。それと同時に、これらの遺伝子をもつ細菌を特定する。

(2) SPF マウス腸内細菌における脂質代謝産物の網羅的解析

大腸菌を用いて作製を行った細菌由来 P450 のリコンビナント酵素を Positive control に、HPLC-MS/MS を利用した脂質代謝産物の網羅的解析を行うための条件検討を行った。SPF マウスの便に EPA を混ぜ培養した後に、メタノール抽出および Sep-Pak C18 を用いて脂肪酸の粗精製を行った。これらのサンプルについて解析を試みたが、夾雑物の影響のためピークの強度が十分でなかった。現在、便からの抽出および精製法について検討を行っており、この点が今後の課題である。

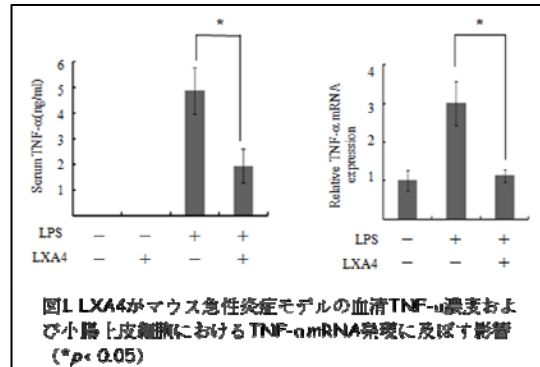
(3) 脂質代謝産物の宿主免疫系とくに粘膜免疫における生物活性の評価

アラキドン酸由来の lipoxin A4 およびエイコサペンタエン酸由来の RvE1 について、宿主の粘膜免疫、特に腸管における生物活性の評価を行った。

① lipoxin A4 の粘膜免疫系への影響について

マウス腹腔内マクロファージを用いて、LPS 刺激によって誘導される活性化に対する lipoxin A4 の影響を検討したところ、前処理により TNF- α および IL-12 mRNA 発現が有意に

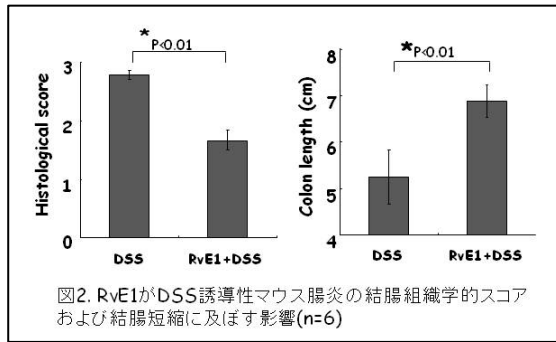
抑制された。マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞においても同様に、lipoxin A4 の前処理により、LPS 刺激によって産生される TNF- α を蛋白レベルおよび mRNA レベルで有意に抑制した。またその際に、RAW264.7 細胞において NF- κ B の核内移行が抑制されていることが明らかとなった。また動物レベルの実験から、lipoxin A4 の投与は LPS によって引き起こされる血清 TNF- α 量の上昇および小



腸上皮細胞中の TNF- α mRNA 発現を有意に抑制することを明らかにした (図 1)。また、小腸上皮細胞においては、NF- κ B 核内移行の有意な抑制が観察された。さらに、マクロファージ様細胞および腸管上皮様細胞の共培養系を用いた細胞レベルの実験から、lipoxin A4 が上皮細胞中の IL-8 mRNA 発現およびマクロファージからの TNF- α 産生を有意に抑制することが明らかとなった。以上の結果から、lipoxin A4 は腸上皮細胞へ直接作用するだけでなく、マクロファージを含む粘膜免疫系の細胞へも作用し、NF- κ B の活性化を阻害することで、腸管における炎症反応を抑制すると考えられた。

② resolvin E1 の腸炎抑制効果について

FACS 解析の結果、マウス腹腔内マクロファージに ChemR23 の発現が認められた。また、resolvin E1 の前処理によって LPS 刺激されたマウス腹腔内マクロファージ中の TNF- α および IL-12p40 mRNA 発現が有意に抑制された。さらに、ChemR23 を高発現させた HEK293 細胞に TNF- α 刺激を行ったところ、resolvin E1 の前処理によって NF- κ B の核内移行が有意に抑制された。これらの結果から、resolvin E1 は ChemR23 を介して受容され、NF- κ B の核内移行を抑制することによりマクロファージからの炎症性サイトカイン産生を抑制すると考えられた。DSS 腸炎マウスモデルにおいて、resolvin E1 の投与により腸炎による体重減少が有意に抑制された。また、腸管の炎症に起因する結腸短縮および結腸組織の病理学的スコアにおいても、有意な改善が認められた (図 2)。



さらに、結腸組織中のリン酸化 NF- κ B 陽性細胞数および炎症性サイトカイン mRNA 発現において、resolvin E1 の投与により有意な減少が認められた。一方、腹腔内マクロファージおよび結腸組織中の ChemR23 mRNA 発現は、resolvin E1 の投与により有意に増加していることが明らかとなった。以上の結果から、resolvin E1 は特異的受容体である ChemR23 を介して NF- κ B の核内移行を抑制することにより、DSS 誘導性マウス腸炎モデルにおいて炎症抑制効果を発揮すると考えられた。

これら脂質代謝産物の腸管における生理活性はこれまでにほとんど報告がなく、今後の研究発展に資する成果であると考えられる。将来的には、生理活性を有する脂質代謝産物の疾病治癒などを目的とした応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Kure I, Nishiumi S, Nishitani Y他 8 名、Lipoxin A(4) reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages and intestinal epithelial cells through inhibition of nuclear factor- κ B activation.、J Pharmacol Exp Ther.、査読有、332、2010、541-548.
2. Ishida T, Yoshida M, Arita M, Nishitani Y他 10 名、Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis.、Inflamm Bowel Dis.、査読有、16、2010、87-95.

[学会発表] (計 1 件)

西谷 洋輔、「EPA 由来生理活性物質の抗炎症作用」、日本農芸化学会関西支部 第 454 回 講演会、2008 年 5 月 31 日、京都府立大学

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西谷 洋輔 (NISHITANI YOSUKE)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点

研究部・助教

研究者番号：80457093