

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2023

課題番号：20K22865

研究課題名（和文）新規抗炎症性物質ResolvinE3の気管支喘息に対する効果と作用機序の検討

研究課題名（英文）Role of Resolvin E3 for allergic airway inflammation

研究代表者

佐藤 真季子（Sato, Makiko）

群馬大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10873606

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000 円

研究成果の概要（和文）：ResolvinE3 (RvE3)は新規に同定された抗炎症性脂質メディエーターである。RvE3は生体内に存在する物質であるが、申請者らのこれまでの研究から、RvE3を喘息モデルに投与すると、気道炎症を抑制することがわかった。本研究では創薬やバイオツールとしての利用を目指し生体内でより安定的な誘導体を作成し、細胞レベルでの効果を解析した。RvE3誘導体は骨髄由来樹状細胞からのIL-23産生を抑制したり、単球に対して作用し、炎症性サイトカインであるTGF- β の産生を抑制することがわかった。これらの結果から、RvE3誘導体は抗炎症性作用をもたらすことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RvE3は炎症収束の効果が期待できる内在性の炎症収束物質であり、副作用が少なく、安全性が高い、これまでにない新しい創薬研究につながると期待できる。本研究は、生体が本来持つ恒常性維持機能を利用して炎症を制御するという特異なアプローチであり、学術的独自性がある。さらに、RvE3の臨床応用への障壁であった生体内での不安定性を改善した誘導体を作製しており、これらを用いた細胞レベルでの解析の結果、抗炎症性作用を確認できたことは、創薬の対象として検討できる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：Resolvins are products of ω -3 fatty acids with potent anti-inflammatory properties. ResolvinE3 (RvE3) is a newly identified anti-inflammatory lipid mediator. We also investigated the role of RvE3 in a murine model of HDM-induced airway inflammation. We created RvE3 derivatives and analyzed its effect at the cellular level. We designed and synthesized RvE3 derivatives as oxidatively stable congeners to avoid the unstable bisallylic structure. They suppressed the production of IL-23 from bone marrow derived dendritic cells and suppressed the production of TGF- β from monocyte. These findings suggest that RvE3 derivatives may be key substituents for the potent anti-inflammatory effect.

研究分野：アレルギー性気道炎症

キーワード：喘息 脂質メディエーター レゾルビン

※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。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は慢性気道炎症を主体とした疾患である。吸入ステロイド薬の登場により予後は飛躍的に改善したが、標準的治療への反応が乏しい難治性喘息患者が 10%前後存在する。喘息患者には様々なフェノタイプが存在し、好酸球や Th2 サイトカインが高い Th2 型喘息と、それ以外の非 Th2 型喘息の区分が重要である。Th2 優位の喘息に対しては、近年 Th2 サイトカインをターゲットとした各種の抗体製剤が登場し、効果が示されてきている。しかし、Th2 サイトカインの関与が想定されない非 Th2 型の難治性喘息に対する治療は未だ不十分であり、病態解明や新規治療法の開発が待たれる。ResolvinE3 (RvE3)は新規に同定された抗炎症性脂質メディエーターである。RvE3 は生体内に存在する物質であるが、申請者らのこれまでの研究から、RvE3 を喘息モデルに投与すると、非 Th2 喘息で主要な役割を果たす IL-23、IL-17 を制御し、喘息の気道炎症を抑制することがわかった。

2. 研究の目的

このことから RvE3 は Th2 サイトカイン非依存性に炎症を抑制する可能性があり、未だ十分な治療法のない非 Th2 型の喘息フェノタイプに対する効果も期待される。本研究では RvE3 のより細胞レベルでの詳細な作用機序を明らかにし、新たな創薬の標的に成り得るか解析を行なうことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) RvE3 誘導体の作成

これまでの研究結果から、RvE3 が気管支喘息など好酸球性炎症に対して有効である可能性が示唆された。しかし、RvE3 は構造内に二重結合を多く含むため、生体内での安定性が求められる創薬やバイオツールとしての利用は困難であるという問題点があった。より詳細な生体内での作用機序を解析するために、誘導体を用いることにした。

- 17deoxy-RvE3、18deoxyRvE3

酵素による代謝を受けやすい水酸基が結合する C17、C18 基のヒドロキシ基をデオキシ化することで、構造的に安定した誘導体 17deoxy-RvE3,18deoxyRvE3 を作成した（北海道大学薬学部との共同研究）。これら誘導体を用いて、*in vitro* でその抗炎症活性を評価する。

- α -CP-RvE3、 β -CP-RvE3

C8、C9 基を *cis*-シクロプロパンに置き換えて不安定な二重構造を回避することで、酸化、代謝に対して安定な RvE3 誘導体を作成した（北海道大学薬学部との共同研究）。これら誘導体を用いて、*in vitro* でその抗炎症活性を評価する。

(2) RvE3 誘導体の抗炎症性作用の解析

- 17deoxy-RvE3,18deoxyRvE3

① 腹腔内多角白血球を用いた解析

6-7 週齢の雄マウスを用いて、アクネ菌を腹腔内投与することで炎症を惹起し、12 時間後に野生型 RvE3 もしくは誘導体を投与し、さらに 12 時間後に腹腔内の多核白血球数を測定し、その増減を抗炎症活性の指標とする。

② 骨髄由来樹状細胞を用いた解析

マウス骨髄由来樹状細胞を用いて、RvE3 誘導体の作用について解析する。ハウスダストマイトを予め点鼻し感作した Balb/c マウス骨髄から単球を採取し、GM-CSF, IL-4 による共刺激により樹状細胞を作成する。第 7 日目にハウスダストマイト刺激に相当する IL-4, IL-33 刺激を加え、同時に RvE3 もしくは RvE3 誘導体である 17deoxy-RvE3, 18deoxyRvE3 を 100nM 加え、24 時間後に上清中の IL-23 を ELISA 法で測定する。

- α -CP-RvE3、 β -CP-RvE3

- ① 誘導体の酸化安定性については高速液体クロマトグラフ法を用いて、代謝安定性についてはヒト肝ミクロソームを用いて化合物の残存率を算出して評価した。
- ② 抗炎症性効果については、マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞を培養(12well, 80%confluence) 後、無血清培地に交換し、 α -CP-RvE3、 β -CP-RvE3、RvE3 を 100nM ずつ各 well に添加した。その後 0.01 μ g/ml LPS で刺激し、48 時間後に上清中の TGF- β を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

- 17deoxy-RvE3, 18deoxyRvE3 の抗炎症性効果について

- ① アクネ菌を接種させると炎症が誘起されるため、無処置群と比べて多核白血球数が増加した。RvE3 を腹腔内に 300ng 投与すると有意に多核白血球数が減少し、炎症収束作用が確認できた。17deoxy-RvE3 投与群は、非投与群と比べて多角白血球数が変化せず抗炎症活性が確認できなかったのに対し、18deoxy-RvE3 投与群では好中球数が有意に減少した。この結果からは 18 位水酸基は RvE3 の抗炎症作用に関与せず、17 位水酸基が RvE3 の抗炎症作用に非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。
- ② IL-33、IL-4 共刺激では樹状細胞からの IL-23 産生が増強されたが、RvE3 投与で抑制された。また、17deoxy-RvE3, 18deoxy-RvE3 でも同様に IL-23 産生が抑制された。しかし、3 群に優位な差は認められなかった。
- ③ これらの結果から、17-deoxy-RvE3、18-deoxy-RvE3 は生物学的安定性を獲得し、RvE3 と同等、もしくはそれ以上に炎症収束性作用をもたらす可能性があることがわかった。

- α -CP-RvE3、 β -CP-RvE3 の抗炎症性効果について

- ① 酸化安定性試験では室温での空気中の CP-RvE3 の残存率 (2 時間後値 <5%) は、RvE3 の残存率 (2 時間後値 >30%) よりも短かった。酸化に対する RvE3 の不安定性は、二重構造を除去しても改善されなかった。
- ② 代謝安定性試験では α -CP-RvE3 と RvE3 の残存率も同様に時間依存的に減少し、6 時間後には 60%未満になった。 β -CP-RvE3 は、RvE3 よりも代謝的に 3.7 倍安定していた。
(β -CP-RvE3 : $t_{1/2}$ 値=19 時間、RvE3 : $t_{1/2}$ 値=5.2 時間)
- ③ α -CP-RvE3、 β -CP-RvE3 とともに RvE3 と同様に RAW 細胞における LPS 刺激による TGF- β の産生を抑制した。
- ④ RvE3 誘導体として作成した α -CP-RvE3、 β -CP-RvE3 は RvE3 と比べて、酸性化安定性は得られなかったが、代謝的安定性を得ることができた。
- ⑤ α -CP-RvE3、 β -CP-RvE3 は RvE3 と同様に強い抗炎症性効果をもつ可能性がある。

作成された RvE3 誘導体はいずれも RvE3 と同様に抗炎症性作用をもたらすことが示唆さ

れた。しかし、細胞種や解析条件で作用の差異があることから更なる解析が必要である。
マウスを用いた気管支喘息モデル、炎症性細胞を用いた in vitro 解析をさらに進めていき、
創薬、バイオツールとしての可能性を広げていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐藤真季子
2. 発表標題 ResolvinE1, E3のアレルギー性気道炎症に対する効果の検討
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤真季子
2. 発表標題 Resolvin E1 and E3 dampens asthmatic inflammation in a murine model
3. 学会等名 European Respiratory Society Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤真季子
2. 発表標題 樹状細胞に対する炎症収束性メディエーターResolvinE3の作用の検討
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
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
研究協力者	周東 智 (Shuto Satoshi)	北海道大学大学院・薬学研究院・創薬有機化学研究室 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	渡邊 瑞貴 (Watanabe Mizuki)	北海道大学大学院・薬学研究院・創薬有機化学研究室 (10101)	
研究協力者	福田 隼 (Fukuda Hayato)	長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・薬品製造化学研究室 (17301)	

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