

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860816

研究課題名(和文)15-リポキシゲナーゼによる好酸球制御機構の解明

研究課題名(英文)Role of 15-lipoxygenase in the regulation of pulmonary eosinophilic inflammation

研究代表者

宮田 純(Miyata, Jun)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：80464866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫による好酸球性気道炎症モデルにおける12/15-リポキシゲナーゼ(以下、12/15-LOX)遺伝子欠損動物を用いた解析によって、12/15-LOXの保護的作用が見出された。12/15-LOX欠損動物では、好酸球を誘導するサイトカインであるIL-5の主要な産生細胞の数の増加が認められた。気道炎症惹起時の肺の網羅的な脂質解析によって、プロテクチンD1に代表されるDHA由来の12/15-LOX代謝物が起炎時に産生され、遺伝子欠損動物では産生量が減少していた。これら代謝物の一部がIL-5産生細胞に対して、抑制的な作用を有することが確認された。

研究成果の概要(英文)：We identified that 12/15-lipoxygenase(12/15-LOX) has protective roles in the regulation of innate type of airway eosinophilic inflammation by using 12/15-LOX gene knockout mice. The numbers of main IL-5-producing lymphocytes were increased in 12/15-LOX knockout mice. Lipidomic analysis of lung revealed large amounts of 12/15-lipoxygenase metabolites during the initiation phase of pulmonary inflammation, which are impaired in 12/15-lipoxygenase knockout mice. We also showed the direct suppressive effects of these 12/15-LOX-derived metabolites on the functions of IL-5-producing lymphocytes.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：15-リポキシゲナーゼ 12/15-リポキシゲナーゼ プロテクチンD1 DHA 自然免疫 好酸球

1. 研究開始当初の背景

重症喘息・アレルギー性気管支肺アスペルギルス症・慢性好酸球性肺炎などステロイド治療抵抗性の難治性好酸球性炎症が遷延する疾患が未だ存在しているが、その機序は十分に解明されていない。ステロイドは好酸球性炎症を制御可能な治療薬であるが、免疫抑制作用・高血圧・糖尿病・骨粗鬆症等の副作用が問題となっており、副作用のない新たな治療薬が求められている。

好酸球は気管支喘息に代表される慢性アレルギー疾患において重要な役割を果たしている炎症細胞であり、炎症性脂質メディエーターである 5-リポキシゲナーゼ(以下、5-LOX)代謝物のロイコトリエンやシクロオキシゲナーゼ(以下、COX)代謝物のトロンボキサンなどを産生することで気道炎症を増強する。一方で、好酸球はリポキシン・レゾルピン・プロテクチン等の抗炎症作用を有する脂質メディエーターの産生に必要な 15 リポキシゲナーゼ(以下、15-LOX)を強く発現しているが、好酸球性気道炎症の制御における役割は十分に解明されていない。

好酸球が DHA 由来の 15-LOX 代謝物である抗炎症脂質メディエーター、プロテクチン D1 (PD1) を産生し、重症喘息患者の好酸球において PD1 産生が減弱していることが明らかとなっており、15-LOX 代謝物の 15-HETE の産生も減弱していることと併せて、重症喘息患者の好酸球では 15-LOX の機能が障害されている可能性を示されている (Jun Miyata et al. J Allergy Clin Immunol 2013)。他の報告でも、15-リポキシゲナーゼ代謝物のリポキシン A4 やプロテクチン D1 が重症喘息・喘息増悪期に産生が減少していることが示唆されている。

以上の結果より、15-LOX の機能異常に伴う抗炎症性脂質メディエーターの産生低下が重症喘息における好酸球性炎症の遷延を引き起こしていることが推察される。その機序を解明するため、肺における 15-LOX 代謝物の動態、15-LOX 代謝物の標的となる炎症細胞を解析・特定していくことが期待されている。更に、既存もしくは新規の 15-LOX 代謝物を用いて、動物実験で好酸球性気道炎症モデルに対する投与、細胞実験では好酸球機能に対する直接作用を詳細に検討することが重症喘息の治療戦略への臨床応用につながると思われる。

2. 研究の目的

本研究は 15-LOX の好酸球性気道炎症における代謝動態の把握と気道炎症の制御機構を明らかとすることが目的である。

3. 研究の方法

本研究では、15 リポキシゲナーゼ欠損マウス(以下、KO マウス)において、好酸球性気道炎症に 12/15 リポキシゲナーゼ(以下、12/15 LOX)が与える影響を、主に自然免疫応答を介したモデルを用いて解析する。

(1) IL-25・IL-33 点鼻による好酸球性気道炎症モデルの確立・解析

IL-25・IL-33 を連日点鼻投与する(IL-25 : 1000ng/day, 4days、IL-33 : 500ng/day, 3days)ことで、感作相を介さずに好酸球性気道炎症を惹起する自然免疫応答を介したモデルを確立した。このモデルを 6-10 週齢の野生型と KO マウスで作成した。点鼻終了後から 1-4 日後までの期間において、肺胞洗浄液中炎症細胞数・気道過敏性・肺組織(HE 染色・PAS 染色)・肺組織の各種サイトカインの mRNA 発現を比較検討した。フローサイトメトリー及び IL-5 レポーターマウスを用いて、上記モデルにおける IL-5 産生細胞を同定し、その細胞群を 12/15-LOX がどのように制御しているか検討した。

(2) 好酸球性気道炎症に伴う肺の脂質動態・炎症細胞動態の解析

実際の生体内の臓器、特に肺において好酸球性気道炎症時にどのような脂質動態を呈するか検討するため、上記の炎症モデルにおける肺の網羅的脂質解析を LC-MS/MS を用いた脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析手法を用いて施行した。一般に脂肪酸およびその代謝物は、分子の疎水的性質から逆相 LC での分離に優れる。また末端にカルボキシル基を持ち、負イオンになりやすいため、エレクトロスプレーイオン化(ESI)によるソフトイオン化が適している。さらに脂肪酸代謝物の場合、水酸基が付加した部位の近傍で特異的なフラグメントイオンを生成しやすいことから、測定にはプレカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせで分子構造特異的なシグナルを検出する multiple reaction monitoring(MRM)が適している。このような特性を有する三連四重極型の質量分析計を用いた MRM チャンネルを、保持時間の違いを加味しながら複数組み合わせることで、何百種類もの脂肪酸代謝物の一斉定量分析を行った。特に好酸球性気道炎症時の肺においてど

のメディエーターが主に 12/15-LOX 依存的に産生されるかを検討した。

4 . 研究成果

(和文)

自然免疫による好酸球性気道炎症モデルにおける 12/15- リポキシゲナーゼ(以下、12/15-LOX)遺伝子欠損動物を用いた解析によって、12/15-LOX の保護的作用が見出された。12/15-LOX 欠損動物では、好酸球を誘導するサイトカインである IL-5 の主要な産生細胞の数の増加が認められた。気道炎症惹起時の肺の網羅的な脂質解析によって、プロテクチンD1 に代表される DHA 由来の 12/15-LOX 代謝物が起炎時に産生され、遺伝子欠損動物では産生量が減少していた。これら代謝物の一部が IL-5 産生細胞に対して、抑制的な作用を有することが確認された。

(英文)

We identified that 12/15-lipoxygenase (12/15-LOX) has protective roles in the regulation of innate type of airway eosinophilic inflammation by using 12/15-LOX gene knockout mice. The numbers of main IL-5-producing lymphocytes were increased in 12/15-LOX knockout mice. Lipidomic analysis of lung revealed large amounts of 12/15-lipoxygenase metabolites during the initiation phase of pulmonary inflammation, which are impaired in 12/15-lipoxygenase knockout mice. We also showed the direct suppressive effects of these 12/15-LOX-derived metabolites on the functions of IL-5-producing lymphocytes.

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1件)

Miyata J, Arita M. Role of omega-3 fatty acids and their metabolites in asthma and allergic diseases. *Allergol Int.* 2015 Jan;64(1):27-34. 査読有

[学会発表](計1件)

Miyata J, Fukunaga K, Asano K, Arita

M. Dysregulated 15-lipoxygenase activity and biosynthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma. 6th international conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, 2/10-12/2015, Shinjuku, Tokyo, Japan.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮田 純 (MIYATA, Jun)

独立行政法人理化学研究所

統合生命医科学研究センター

基礎科学特別研究員

研究者番号: 80464866

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号：