

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462704

研究課題名(和文) 3系脂肪酸の腸管免疫調整作用の解明

研究課題名(英文) Role of omega-3 fatty acids in intestinal immunomodulating

研究代表者

和田 基 (Wada, Motoshi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80372291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：G蛋白共役型受容体であるGPR120は、 ω -3不飽和脂肪酸を含む中・長鎖脂肪酸を主なりガンドとして様々な生体機能を担っている。本研究ではマウス腸管組織を用い免疫染色法によりGPR120蛋白質の発現局在について解析を行った。その結果、遠位小腸及び近位結腸にGPR120が局在していることがわかった。また、F4/80陽性細胞とGPR120との共局在が認められた。以上より、GPR120は遠位腸管、特に回盲部周辺においてマクロファージを介した生理作用及び炎症抑制作用に関与することが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：GPR120, which is one of G protein-coupled receptors, has many physiological functions through medium-chain or long-chain fatty acids like omega-3 fatty polyunsaturated acids as their ligands. We examined the pathological and functional distribution of GPR120 expression in mice gut tissue with immunofluorescent staining and found that GPR120 is especially highly expressed in distal small intestine and proximal colon tissue. We also found out that GPR120 and F4/80 positive cells co-localized. Thus, it is suggested that in distal intestine, especially ileocecal portion, GPR120 has some physiological functions and anti-inflammatory functions via gut macrophages.

研究分野：小児外科学

キーワード：腸管免疫 マクロファージ GPR120

1. 研究開始当初の背景

-3 不飽和脂肪酸を含む中・長鎖脂肪酸は G 蛋白共役型受容体である GPR120 のリガンドとして作用し、様々な生体機能を担っている。近年、腸管不全あるいは静脈栄養関連肝障害における 3 系脂肪酸の抗炎症効果が注目されている。研究開始当初、腸管免疫における 3 系脂肪酸の炎症抑制効果の詳細な機序は明らかにされていなかった。申請者の研究グループでは、ラット小腸移植モデルにおいて、マクロファージの特定サブセットが増加していることを発見した。また、2 型糖尿病に関する研究で、脂肪組織において 3 系脂肪酸がマクロファージの機能を制御することが報告された。これらのことから、炎症時の腸管免疫系において、3 系脂肪酸がマクロファージの機能制御を介して腸炎症を抑制するという仮説のもと、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、腸管組織の炎症における 3 系脂肪酸の作用機序を明らかにすることを目的とする。まず、3 系脂肪酸の特異的受容体である GPR120 の腸管組織における局在を同定する。次に、3 系脂肪酸の抗炎症効果をマウス、ラットの腸炎モデル（小腸移植モデル、虚血再灌流モデル、自己免疫性腸炎モデルなど）を用いて検証する。さらに 3 系脂肪酸が作用する腸炎症の原因細胞を同定し、分子生物学的な作用機序を明らかにする。これらにより、3 系脂肪酸の腸管免疫調整作用とその詳細なメカニズムを解明し、腸炎症疾患の新たな治療法への応用を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス腸管組織を用い凍結組織標本を作製し、免疫組織化学染色法により GPR120 蛋白質の発現局在について解析を行った。さらに、マクロファージ特異的な細胞表面マーカーである F4/80 について、GPR120 との重染色を行った。

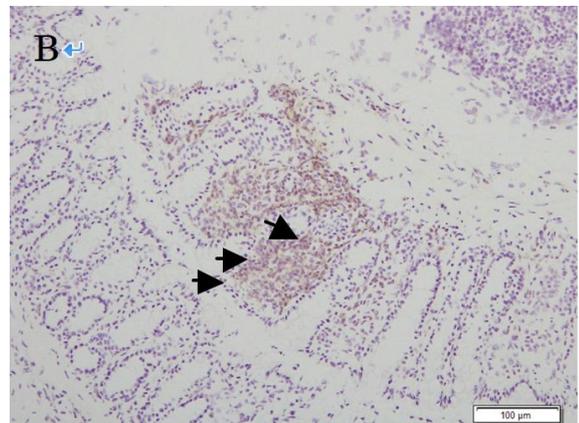
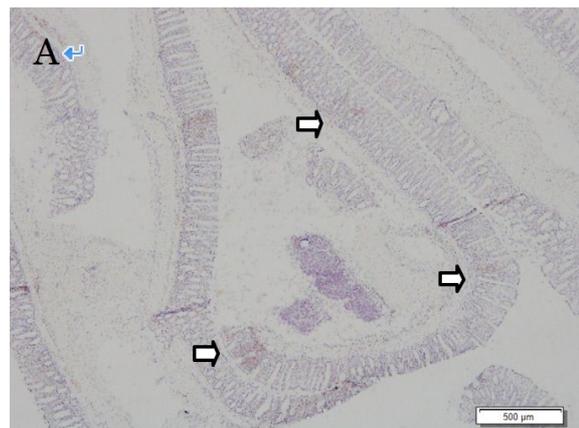
(2) マウス腸管組織を採取し、その粘膜組織を分離し、セルソーターを用い各分画のマクロファージを単離した。また、上皮組織より EpCAM 陽性の上皮細胞を単離した。それら各細胞集団より RNA を精製し、cDNA を作製して GPR120 の mRNA 発現量についてリアルタイム PCR 法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 免疫染色法を施行した結果、特に遠位小腸及び近位結腸に GPR120 が高発現していることがわかった(図 1)。さらに、マクロファージ特異的な細胞表面マーカーである F4/80 について、GPR120 との重染色を行ったところ、F4/80 陽性細胞と GPR120 との共局在が認められた(図 2)。以上より、GPR120 は遠位腸管、特に回盲部周辺においてマクロファージを介した生理作用及び炎症抑制作用に関与することが強く示唆された。

(2) マウス腸管組織より単離したマクロファージを含めた各分画の遺伝子増幅を確認した結果、粘膜固有層のマクロファージにおいては GPR120 の発現は検出されなかった。一方、EpCAM 陽性の上皮細胞分画において GPR120 の mRNA 発現が検出された(図 3)。(1)の結果と合わせ以上より、腸管組織、特に上皮細胞におけるマクロファージサブセットが GPR120 を介して腸管免疫の制御を行っていることが示唆された。今後さらに腸管上皮組織に局在するマクロファージサブセットの 3 系脂肪酸による機能制御機序について解析を行う。

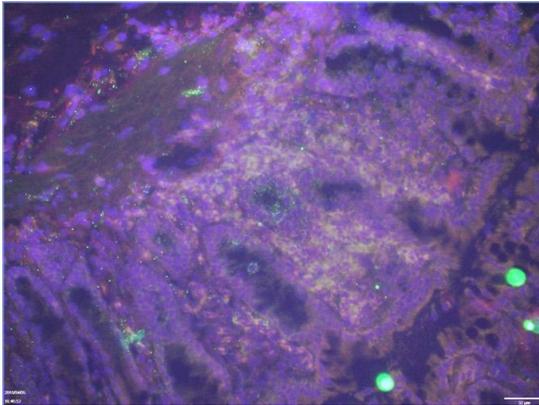
図 1.マウス大腸における FFAR4/GPR120 抗体を用いた免疫組織染色



(A)低倍率:大腸の近位側に DAB による茶褐色の発色が見られ、FFAR4/GPR120 が局在していることが認められた(☞)。

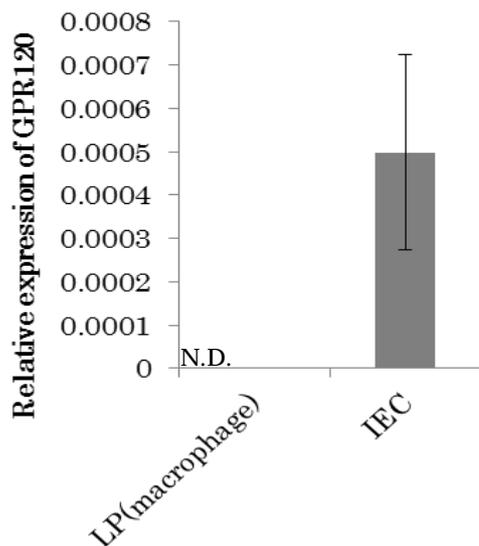
(B)高倍率:粘膜層よりも腸管上皮に FFAR4/GPR120 の発現が強いことが認められた(▶)。

図 2.マウス大腸に対する FFAR4/GPR120 抗体(緑) F4/80 抗体(赤) DAPI(青)を用いた免疫組織化学法による多重染色



腸管のより表層に存在する F4/80 陽性細胞と FFAR4/GPR120 が共同存在していることが認められた。

図 3.マウス大腸の粘膜組織マクロファージ及び上皮組織における GPR120 の mRNA 定量



マウス大腸より粘膜組織(LP)の CD11b 陽性かつ F4/80 陽性細胞及び上皮組織(IEC)を分離精製した。それぞれの細胞における GPR120 の mRNA レベルを定量した

(GAPDH との相対値より算出)。粘膜組織内の F4/80 陽性細胞には GPR120 の mRNA 発現は認められず、上皮組織においてのみ発現が認められた。

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5件)

1. Sato M, Hamada Y, Kohno M, Ise K, Uchida K, Ogata H, Masuyama H, Morotomi Y, Yasufuku M, Wada M. Neonatal gastrointestinal perforation in Japan: a nationwide survey. *Pediatric Surgery International* 査読有 2017;33(1):33-41. doi: 10.1007/s00383-016-3985-z.
2. 工藤 博典, 和田 基, 佐々木 英之, 風間 理郎, 田中 拓, 中村 恵美, 大久保 龍二, 櫻井 毅, 仁尾 正記. 腸閉塞症. 小児外科. 査読なし 48(3): 282-284, 2016
3. 和田 基. わが国における IFALD に対する 3 系脂肪酸製剤の保険診療における展望. 小児外科. 査読なし 48(1): 31-35, 2016
4. Yagi M, Kohno M, Asagiri K, Ikeda T, Okada T, Kanada S, Kawashima S, Goto Y, Takano S, Yasufuku M, Wada M. Twenty-year trends in neonatal surgery based on a nationwide Japanese surveillance program. *Pediatric Surgery International* 査読有 2015; 31(10): 955-62. doi: 10.1007/s00383-015-3775-z.
5. Yamaki S, Ine S, Kawabe T, Okuyama Y, Suzuki N, Soroosh P, Mousavi SF, Nagashima H, Sun SL, So T, Sasaki T, Harigae H, Sugamura K, Kudo H, Wada M, Nio M, Ishii N. OX40 and IL-7 play synergistic roles in the homeostatic proliferation of effector memory CD4⁺ T cells. *European Journal of Immunology* 査読有 2014;44(10):3015-25. doi: 10.1002/eji.201444701.

[学会発表](計3件)

- 1) 和田 基, 工藤博典, 中村恵美, 佐々木 英之, 風間理郎, 田中 拓, 仁尾正記 腸管不全に対する腸管リハビリテーションの臨床的意義と小腸移植の適応 第 54 回日本小児外科学会学術集会ワークショップ(2017.5.11 仙台)

2) 和田 基

Key Note Lecture 腸管リハビリテーションにおける栄養管理 特に静注用脂肪製剤をとりまく問題を中心に
第 33 回日本小児外科学会秋季シンポジウム
(2017.10.28 川崎)

3) 和田 基

Omegaven® 治験と保険適応にむけた取り組みの報告
第 47 回日本小児外科代謝研究会
(2017.10.27 川崎)

〔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：
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

和田 基 (Wada, Motoshi)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：80372291

(2)研究分担者

工藤 博典 (Kudo, Hironori)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00723032

仁尾 正記 (Nio, Masaki)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：70228138

(3)連携研究者

(4)研究協力者

櫻井 毅 (Sakurai, Tsuyoshi)
東北大学・医学系研究科・大学院生