

研究課題別評価書

1. 研究課題名

炎症反応の収束に関わる脂質性メディエーターの代謝と網羅的解析

2. 氏名

有田 誠

3. 研究のねらい

急性炎症反応は「起炎反応」とそれに続く「収束過程」に分けられ、その進行は浮腫、好中球の浸潤、マクロファージの浸潤と続く一連の連鎖反応である。起炎反応は好中球が炎症部位に浸潤して異物を排除する過程であり、サイトカイン、ケモカイン、プロスタグランジン、ロイコトリエンなどの起炎性メディエーターの関与が示されている。一方の収束過程においては、好中球が減少する一方でマクロファージの流入が増大し、アポトーシスした好中球や組織片がマクロファージに貪食され、さらにリンパ管から所属リンパ節へ向かうドレナージを介する炎症浸出液の吸収および炎症細胞の消散が認められる。このような収束過程は、一旦炎症が生じた組織が正常な状態に回復する上で重要であると考えられるが、その分子機構に関してはいまだ不明な点が多い。一方で、魚油に含まれるオメガ3系脂肪酸(エイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA))に由来する抗炎症性代謝物が、炎症の収束に関わる可能性が示唆されている。そこで本研究では、炎症反応の収束に関わる脂質性メディエーターの代謝フローを総合的に捉えるためのメタボローム解析を行い、さらに炎症部位で必要な時期に炎症収束性メディエーターが産生される機構を明らかにすることによって、炎症の収束を制御するメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

4. 研究成果

4-1. 脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析システムの確立

分子中に二重結合を含む多価不飽和脂肪酸の多くは、酵素的な酸化反応によって生理活性を獲得し、脂質メディエーターとして生体機能の調節的役割を果たしている。例えば、アラキドン酸由来のプロスタグランジンやロイコトリエンが炎症の初期過程において機能することは良く知られており、一方で炎症の収束過程において

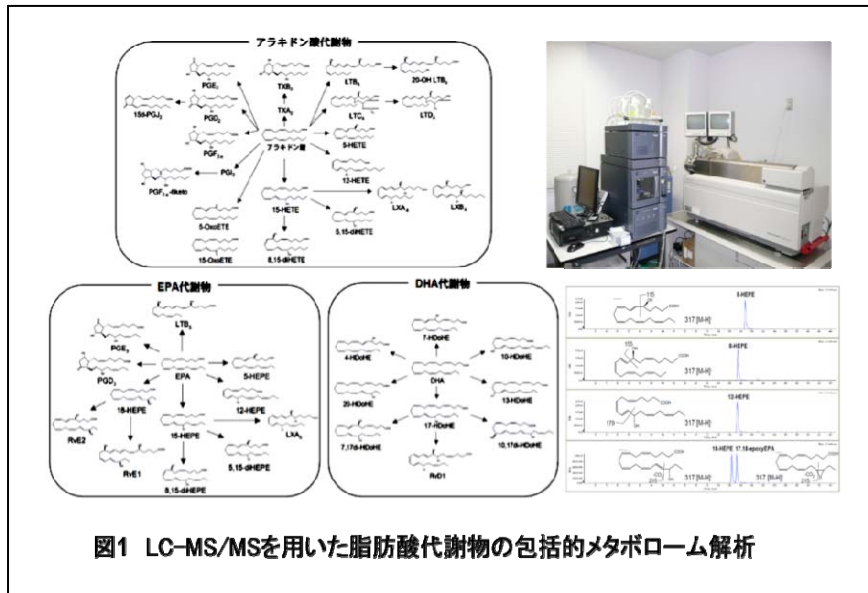


図1 LC-MS/MSを用いた脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析

は、アラキドン酸由来のリポキシン、およびエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)などオメガ3系脂肪酸に由来する抗炎症性代謝物(レゾルビン、プロテクチン)の関与が示唆されている。我々は、これら炎症を制御する脂質性メディエーターの代謝フローを総合的に捉える目的で、三連四重極型質量分析計の multiple reaction monitoring (MRM)を利用した脂肪酸代謝物の一斉定量分析システムを確立した。この系を用いることで、アラキドン酸、オメガ3系脂肪

酸代謝物を網羅する約 120 種類の代謝物をピコグラム感度で一斉定量分析することが可能になった。

4-2. 炎症の収束期に誘導される脂肪酸代謝物についての解析

酵母ザイモザンで惹起したマウス急性腹膜炎の炎症局所から経時的に炎症浸出液を採取し、脂肪酸フラクションを固相抽出で調製し、高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー(LC-MS/MS)によるメタボローム解析を行った。その結果、シクロオキシゲナーゼ(COX)、リポキシゲナーゼ(LOX)などの脂肪酸代謝酵素の産物がそれぞれ特徴的な挙動を示すことが明らかになった。中でもとくにマウス 12/15-LOX によって産生される一連の代謝物の挙動が、炎症の開始とともに減少し、炎症の収束期にかけて再び増加するといったユニークなパターンを示し、その中には DHA から 12/15-LOX によって産生される抗炎症性メディエーター、プロテクチン D1(PD1)が含まれていた。この結果から、12/15-LOX を発現してPD1を産生する何らかの細胞が、収束期に炎症部位に集積している可能性が考えられ、次にそのような細胞の探索を行った。

4-3. 炎症の収束期に出現するPD1 産生細胞の同定と機能解析

ザイモザンを投与後、経時的に炎症巣に集積する細胞をフローサイトメトリーで解析した。その結果、収束期にはマクロファージのマーカ分子であるF4/80 陽性の細胞群の増加が認められた。さらに、このF4/80 陽性細胞群が、蛍光色素Rhodamine123 (R123)によって、2群に分かれることを見出した(図2)。このとき、R123で強く染まる細胞はマクロファージに特徴的な形状および遺伝子発現を示し、一方、弱く染まる細胞はマクロファージとは異なる形状および遺伝子発現を示した。以下この細胞をF4/80 + R123^{lo}細胞と呼ぶことにする。図2に示すように、F4/80 + R123^{lo}細胞は炎症の収束期(24-48h)に出現する細胞群であり、炎症の収束に積極的に参与している可能性が

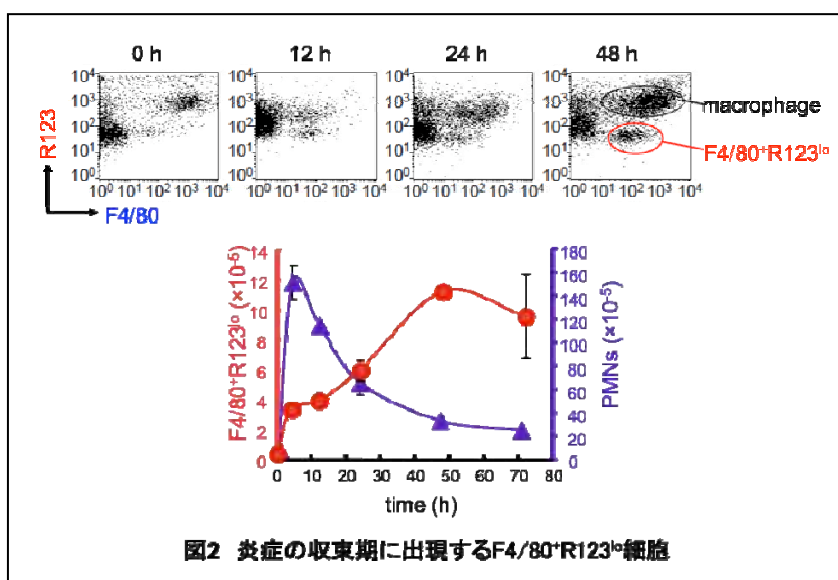
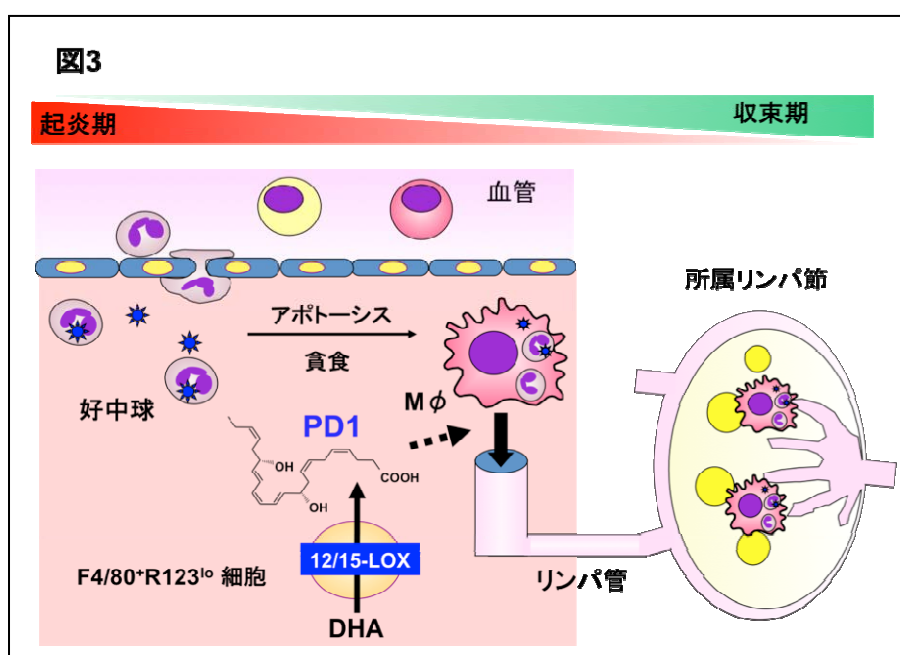


図2 炎症の収束期に出現するF4/80⁺R123^{lo}細胞

状および遺伝子発現を示し、一方、弱く染まる細胞はマクロファージとは異なる形状および遺伝子発現を示した。以下この細胞をF4/80 + R123^{lo}細胞と呼ぶことにする。図2に示すように、F4/80 + R123^{lo}細胞は炎症の収束期(24-48h)に出現する細胞群であり、炎症の収束に積極的に参与している可能性が



考えられた。

そこで次に、F4/80⁺R123^{lo}細胞がPD1 産生細胞である可能性について検討した。炎症収束期であるザイモザン投与後 24 時間の時点において、F4/80⁺R123^{lo}細胞をdepletionしたマウスの炎症浸出液中の脂質メディエーター量をLC-MS/MSを用いて測定したところ、コントロールマウスに比べてPD1 をはじめとする 12/15-LOX代謝物のレベルが著しく低いことが明らかになった。さらに腹腔内から回収された細胞を *ex vivo*で刺激したところ、F4/80⁺R123^{lo}細胞をdepletionした状態では明らかにPD1 の産生量が低下していた。また、F4/80⁺R123^{lo}細胞はPD1 の産生酵素である 12/15-LOXの発現量が、同時期に存在する好中球やマクロファージと比べても非常に高いことが確認された。以上の結果より、F4/80⁺R123^{lo}細胞は炎症収束期においてPD1 を産生する主要な細胞であることが明らかになった。

次に、F4/80⁺R123^{lo}細胞のdepletionによって炎症収束に及ぼす影響について調べた。炎症の収束は、(1)腹腔内に残存する好中球の数、(2)蛍光標識したザイモザンを取り込んだ炎症細胞の所属リンパ節への移行、を指標に評価した。その結果、炎症収束期であるザイモザン投与後 24 時間の時点において、F4/80⁺R123^{lo}細胞をdepletionしたマウスは明らかな炎症収束の遅延が認められた。以上の結果から、炎症収束期に現れるF4/80⁺R123^{lo}細胞は炎症の収束に促進的に働く細胞であることが示された。さらにPD1 を炎症部位に直接投与すると、F4/80⁺R123^{lo}細胞をdepletionした際に認められる炎症収束の遅延がほぼ完全に回復した。以上から、F4/80⁺R123^{lo}細胞は炎症部位でPD1 などの炎症収束性メディエーターの産生を介して周囲の組織に作用し、炎症が速やかに収束する環境を整えるような役割を果たしている可能性が考えられた(図3)。

5. 自己評価

脂肪酸代謝物の網羅的メタボローム解析系の確立と、それを用いた新しい抗炎症性脂質メディエーターの同定を目指した本研究課題は、当初の計画通り順調に進んでいる。とくにオメガ3脂肪酸代謝物に重点を置いたMRMライブラリーの完成度は高く、検出感度と網羅性において世界最先端のメタボローム解析システムが完成したことは特筆に値する。このシステムを用いてこれまでにオメガ3脂肪酸由来の新規活性代謝物の同定にも成功しており、今後それぞれの化合物の作用機構について解析を進める予定である。また、炎症の収束機構の解析において、炎症収束期に出現する細胞としてF4/80⁺R123^{lo}細胞を見だし、この細胞が炎症収束性の脂質メディエーターの産生細胞であり、炎症細胞がリンパ組織へクリアランスされていく過程を促進する活性を有していることを明らかにした。今後の創薬標的として大いに注目されるポイントである。

6. 研究総括の見解

脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析等により、炎症収束期に誘導される脂質性メディエーターの同定とその産生にかかわる細胞の同定、並びに Fat-1 トランスジェニックマウスを用いた新しい抗炎症性脂質性メディエーターを発見するなど、研究は順調に進められ、極めて優れた研究成果を挙げた。炎症を収束させるメカニズムの研究として世界的に見ても非常にレベルの高い研究成果であり、創薬につながる成果でもある。脂質代謝物の高感度な包括的メタボローム解析の開発は、他の病態代謝研究などへの波及効果も大である。今後は、メディエーターの受容体の同定とその下流のメカニズムの解明も重要課題であろう。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J. Immunol.* 178, 3912–3917, 2007
2. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869–874, 2007
3. Ohira T, Arita M, Omori K, Recchiuti A, Van Dyke TE, Serhan CN. Resolvin E1 receptor

activation signals phosphorylation and phagocytosis. *J Biol Chem.* in press

4. Seki H, Fukunaga K, Arita M, Arai H, Nakanishi H, Taguchi R, Miyasho T, Takamiya R, Asano K, Ishizaka A, Takeda J, Levy BD. The anti-inflammatory and pro-resolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. *J Immunol.* in press

②特許

研究期間累積件数: 1 件

1. 発明者: 有田誠、新井洋由、磯部洋輔、田口良
発明の名称: 新規抗炎症性化合物
出願人: 東京大学
出願日: 2009年2月20日

③受賞

1. 平成 21 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞(2009年4月6日)

④著書

1. Bannenberg G, Arita M, Serhan CN. Endogenous receptor agonists: resolving inflammation. *Scientific World Journal.* 7, 1440-1462, 2007
2. Seki H, Tani Y, Arita M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89, 126-130, 2009

⑤招待講演

1. Makoto Arita, Lipidomic analysis of Fat-1 transgenic mice. 2nd Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics (ISNN), Geneva, Switzerland, October 2008
2. Makoto Arita, Anti-inflammatory lipid mediators derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids. Lipid Peroxidation 2008, Karuizawa, Japan, October 2008
3. Makoto Arita, Functional lipidomics of omega-3 PUFA derived lipid mediators. 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2009), Tokyo, Japan, May 2009

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Campell EL, Louis NA, Tomassetti SE, Canny GO, Arita M, Serhan CN, Colgan SP. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *FASEB J.* 21, 3162-3170, 2007

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Hattori, H. Imai, H. Kirai, N., Furuhashi, K., Sato, O., Konishi, K., Nakagawa, Y. Identification of a responsible promoter region and a key transcription factor, CCAAT/enhancer-binding protein epsilon, for up-regulation of PHGPx in HL60 cells stimulated with TNF-alpha. **Biochem.J.** 408, 277-286 (2007)
2. Imai, H., Hakkaku, N., Iwamoto, R., Suzuki, J., Suzuki, T., Tajima, Y., Konishi, K., Minami, S., Ichinose, S., Ishizaka, K., Shioda, S., Arata, S., Nishimura, M., Naito, S., Nakagawa, Y. Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice. **J. Biol. Chem.** 284, 32522-32532(2009)
3. Imai, H. New strategy of functional analysis of PHGPx knockout mice model using transgenic rescue method and Cre-loxP system. **J. Clin. Biochem. Nutri.** 46, 1-13 (2010)

②特許

研究期間累積件数: 0 件

③受賞

1. 日本酸化ストレス学会学術賞(2008年6月19日)

④著書

1. 今井浩孝、中川靖一 リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼの体内機能—新たな細胞機能制御因子としての脂質ヒドロペルオキシド 細胞工学 26, 1269-1275 (2007)
2. 今井浩孝、グルタチンペルオキシダーゼ4(GPx4、PHGPx)による胚発生・精子形成の制御機構、実験医学増刊号 酸化ストレスと病態 1, 細胞分化増殖・シグナル異常と再生医療 27, 112-117 (2009)
3. 今井浩孝、セレン酵素PHGPx欠損と男性不妊症との関連 総説 Biomed. Res. Trace Elements 20, 3, 232-239 (2009)

⑤招待講演

1. Hirotsugu Imai, Depletion of GPx4 in testis and sperm caused male infertility in mice and human. BOSH 2008 “Biomarkers of oxidative Stress in Health and Diseases”, Osaka, Japan, January 2008
2. Hirotsugu Imai, Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is essential for spermatogenesis and development of functional spermatozoa, Lipid Peroxidation 2008 Session 6 Antioxidant enzymes, Karuizawa, Japan, October 2008
3. Hirotsugu Imai, The physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase during embryogenesis and spermatogenesis, The 4th International Conference of Phospholipase A2 and Lipid Mediators, Tokyo, Japan, May 2009
4. 今井浩孝 3つのタイプのリン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ(PHGPx)の個体レベルでの機能解析(日本酸化ストレス学会学術賞講演)第62回日本酸化ストレス学会(福岡)2009,6,11
5. Hirotsugu Imai, Phenotype analysis of tissue specific phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase knockout mice, The 1st International Conference of Lipid Hydroperoxide Biology and Medicine, Sendai, Japan, November 2009

⑥シンポジウム

1. 今井浩孝、抗酸化酵素PHGPxと男性不妊症との関連 第8回日本抗加齢医学総会シンポジウム6 フリーラジカルの医学・生物学(東京)2008,6,6
2. 今井浩孝、抗酸化酵素PHGPxと男性不妊症との関連 第61回日本酸化ストレス学会シンポジウム5 遺伝子改変マウスが解き明かす抗酸化遺伝子の真の役割(京都)2008,6,20
3. 今井浩孝、セレン酵素PHGPxと男性不妊症との関連 第19回日本微量元素学会 シ

ンポジウム セレン研究の最前線（東京）2008,7,4

4. 今井浩孝、オルガネラ選択的、臓器特異的PHGPx欠損マウスを用いた個体レベルでの PHGPxの機能解析 第82回日本生化学会 シンポジウム 翻訳されうる21番目のアミノ酸 セレノシステインを含有するタンパク質研究のブレーク・スルー（神戸）2009,10,22
5. 今井浩孝、新規膜酸化ストレス細胞死におけるリポドミクス解析 第4回メタボロームシンポジウム リポドミクス（横浜）2009,11,19

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Imai, H., Saito, M., Kirai, N., Hasegawa, J., Konishi, K., Hattori, H., Nishimura, M., Naito, S., Nakagawa, Y. Identification of the positive regulatory and distinct core regions of promoters, and transcriptional regulation in three types of mouse phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **J. Biochem (Tokyo)**, 140, 573–590 (2006)
2. Kadota Y., Suzuki, S., Ideta, S., Fukinbara, Y., Kawakami, T., Imai, H., Nakagawa, Y., Sato, M. Enhanced metallothionein gene expression induced by mitochondrial oxidative stress is reduced in phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase overexpressed cells. **Eur. J Pharmacol.** 626, 166–170 (2010)