

# 研究報告書

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

(研究領域:「代謝と機能制御」)

研究者氏名: 有田 誠

(研究期間: 2006年10月1日～2010年3月31日)

# 研究報告書

## 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

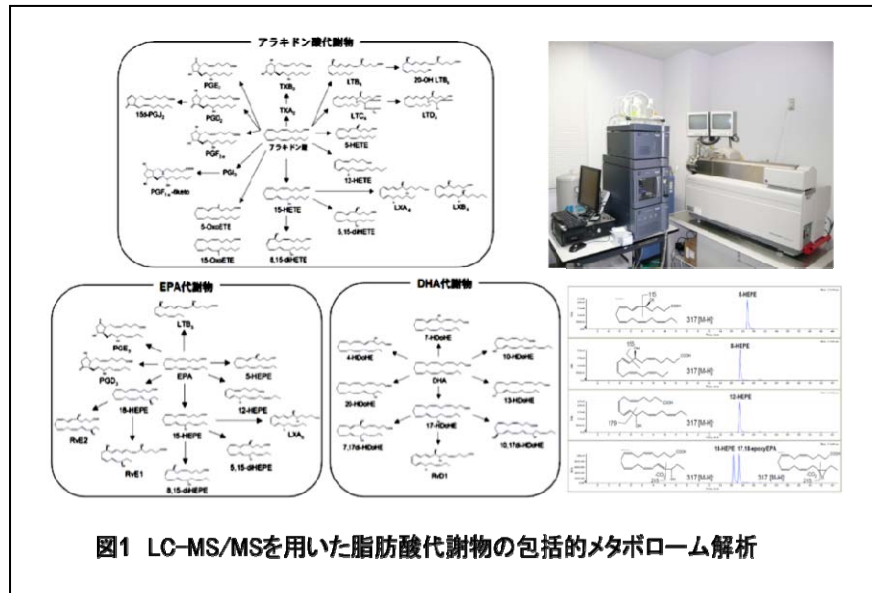
## 3. 研究のねらい

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



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<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>細胞と呼ぶことにする。図2に示すように、F4/80<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>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関与している可能性が

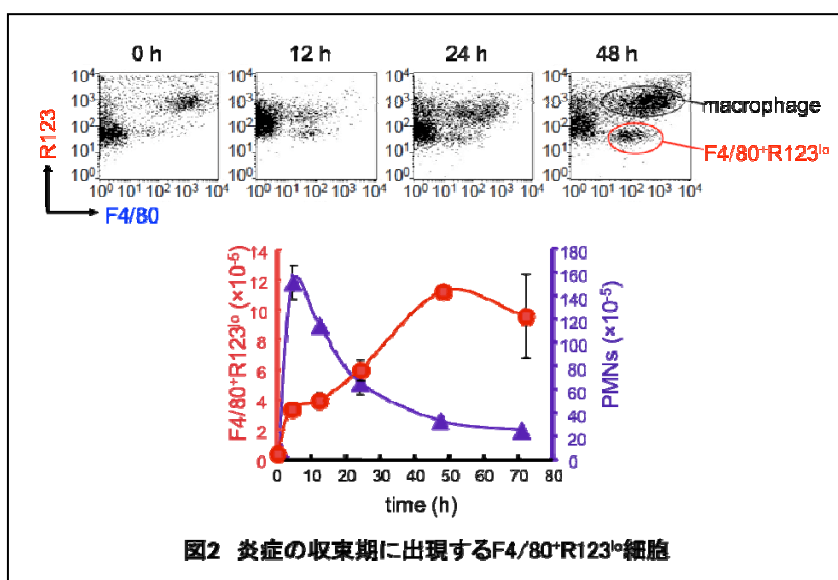
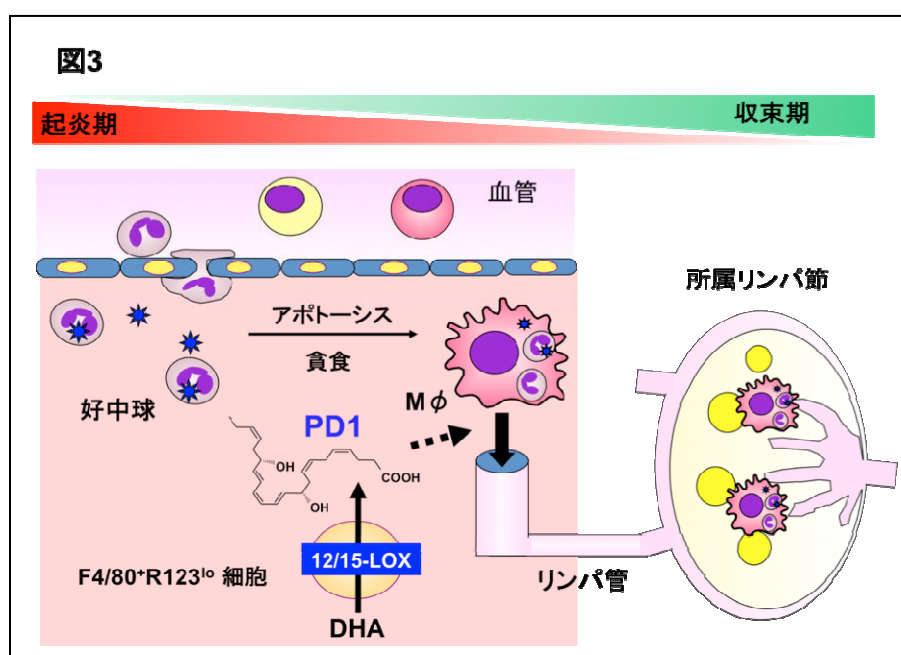


図3



考えられた。

そこで次に、F4/80<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>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<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>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<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>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<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>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<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>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<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>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<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>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<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>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<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>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<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>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. 今後の展開

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<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>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. 研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Tjonahen E, Oh SF, Siegelman J, Elangovan S, Percarpio KB, Hong S, Arita M, Serhan CN, Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis, *Chemistry and Biology*, vol. 13, 1193-1202 (2006)
2. 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, *Journal of Immunology*, vol. 178, 3912-3917 (2007)
3. Campbell 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 Journal*, vol. 21, 250.4 (2007)
4. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN, Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes, *Nature*, vol. 447, 869-874 (2007)
5. Bannenberg GL, Arita M, Serhan CN, Endogenous receptor agonists: resolving inflammation, *Scientific World Journal*, vol. 7, 1440-1462 (2007)
6. Haas-Stapleton EJ, Lu Y, Hong S, Arita M, Favoreto S, Nigam S, Serhan CN, Agabian N, *Candida albicans* Modulates Host Defense by Biosynthesizing the Pro-Resolving

- Mediator Resolvin E1, PLoS ONE, vol. 2, e1316 (2007)
7. Dona M, Fredman G, Schwab JM, Chiang N, Arita M, Goodarzi A, Cheng G, von Andrian UH, Serhan CN, Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets, *Blood*, vol. 112, 848-855 (2008)
  8. Ishida T, Yoshida M, Arita M, Nishitani Y, Nishiumi S, Masuda A, Mizuno S, Takagawa T, Morita Y, Kutsumi H, Inokuchi H, Serhan CN, Blumberg RS, Azuma T, Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis, *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 16, 87-95 (2010)
  9. Ogawa S, Urabe D, Yokokura Y, Arai H, Arita M, Inoue M, Total synthesis and bioactivity of resolvin E2, *Org Lett.*, vol. 11, 3602-3605 (2009)
  10. Seki H, Tani Y, Arita M, Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, vol. 89, 126-130 (2009)
  11. Jin Y, Arita M, Zhang Q, Saban DR, Chauhan SK, Chiang N, Serhan CN, Dana R, Anti-angiogenesis effect of the novel anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 50, 4743-4752 (2009)
  12. Marcheselli VL, Mukherjee PK, Arita M, Hong S, Antony R, Sheets K, Winkler JW, Petasis NA, Serhan CN, Bazan NG, Neuroprotectin D1/protectin D1 stereoselective and specific binding with human retinal pigment epithelial cells and neutrophils, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2009 Nov 18 [Epub ahead of print]
  13. 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.*, vol. 184, 836-43 (2010)
  14. Ohira T, Arita M, Omori K, Recchiuti A, Van Dyke TE, Serhan CN, Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis, *J. Biol. Chem.*, vol. 285, 3451-61 (2010)

## (2) 特許出願

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) その他の成果

### (A) 学会発表

1. 有田誠、炎症を緩和する脂質メディエーター - オメガ 3 脂肪酸由来の Resolvin と Prprotectin-、第 128 回東京脂質談話会(東京)(2006年10月18日)
2. 有田誠、オメガ3脂肪酸から産生される抗炎症性脂質メディエーター、第 16 回 日本脂質栄養学会(島根)(2007年8月31日)
3. Arita, M., Ohira, T., Chiang, N., Serhan, C.N., RvE1 selectively interacts with two different receptors to regulate acute inflammation, 40th Annual Meeting of Society for Leukocyte Biology, Boston, USA (2007/10/11)
4. 有田誠、Novel protective lipid mediators in the resolution of inflammation、BMB2007(横浜)(2007年12月11日)
5. 有田誠、オメガ3脂肪酸由来の新しい抗炎症性脂質メディエーター、日本薬学会第 128 年会(横浜)(2008年3月26日)
6. 有田誠、オメガ3脂肪酸から産生される新しい炎症収束性メディエーター、日本農芸化学会 2008 年度大会(名古屋)(2008年3月29日)

7. 有田誠、オメガ3脂肪酸の酸化反応から生成する抗炎症性メディエーター、第 61 回日本酸化ストレス学会(京都) (2008 年 6 月 20 日)
  8. 有田誠、抗炎症性脂質メディエーターの代謝と機能制御、第 33 回日本医用マズスペクトル学会(東京) (2008 年 9 月 26 日)
  9. Makoto Arita, Lipidomic Analysis of fat-1 Transgenic Mice, 2nd Congress of International Society on Nutrigenetics/Nutrigenomics, Geneva, Switzerland (2008/10/6)
  10. Makoto Arita, Anti-inflammatory mediators derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, Lipid peroxidation 2008, Karuizawa, Japan (2008/10/17)
  11. 有田誠、オメガ3脂肪酸由来の活性代謝物の構造と機能、第 3 回メタボロームシンポジウム(鶴岡)(2008 年 10 月 31 日)
  12. 有田誠、磯部洋輔、佐々木崇晴、中西広樹、田口良、新井洋由、Lipidomic Analysis of fat-1 Transgenic Mice、BMB2008(神戸) (2008 年 12 月 11 日)
  13. 有田誠、脂肪酸代謝と炎症のメタボロミクス、第 32 回日本臨床検査医学会東北支部例会(秋田) (2008 年 12 月 13 日)
  14. 有田誠、 $\omega$ 3系脂肪酸と炎症のメタボロミクス、日本薬学会第 129 年会(京都)(2009 年 3 月 28 日)
  15. Makoto Arita, Functional lipidomics of omega-3 PUFA derived lipid mediators, 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, Tokyo, Japan (2009/5/26)
  16. Y Isobe, M Arita, H Nakanishi, R Taguchi, H Arai, Lipidomic analysis of anti-inflammatory lipid mediators in fat-1 transgenic mice rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids, The 9th World Congress on Inflammation, Tokyo, Japan (2009/7/7)
  17. 有田誠、脂肪酸代謝と炎症のメタボロミクス、第 82 回日本生化学会(神戸) (2009 年 10 月 24 日)
  18. 有田誠、炎症の制御に関わる脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析、第 59 回日本アレルギー学会(秋田) (2009 年 10 月 29 日)
  19. Makoto Arita, Novel roles of eosinophils in inflammation and resolution, International symposium; Eosinophils, other Inflammatory Cells and Molecules in Allergy, Akita, Japan (2009/10/31)
  20. 有田誠、 $\omega$ 3系脂肪酸の抗炎症作用についてのメタボローム解析、第4回メタボロームシンポジウム(横浜) (2009 年 11 月 19 日)
  21. 有田誠、炎症を制御する活性代謝物のメタボロミクス研究、慶応義塾大学大学院教育改革支援プログラム 創薬に向けた医薬科学を先導する人材の養成(東京) (2010 年 3 月 6 日)
  22. 有田誠、炎症を制御する脂肪酸代謝物のメタボロミクス研究、千葉大学スタートアップ COE プログラム 代謝変換プログラムの生体制御への応用(千葉) (2010 年 3 月 10 日)
- (B) 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)
- (C) 著作物
1. 有田誠, Charles N. Serhan, 炎症を緩和するケミカルメディエーター, 蛋白質核酸酵素, vol. 52, 348-354 (2007)
  2. 有田誠, オメガ3脂肪酸から産生される抗炎症性脂質メディエーター, ファルマシア, vol. 43, 533-536 (2007)
  3. 有田誠, 高度不飽和脂肪酸由来の抗炎症性メディエーター, 細胞工学, vol. 26, 1241-1245 (2007)
  4. 有田誠,  $\omega$ 3高度不飽和脂肪酸の抗炎症作用, Adiposcience, vol. 5, 37-42 (2008)
  5. 有田誠,  $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸に由来する活性代謝物, The Lipid, vol. 19, 42-47 (2008)
  6. 有田誠,  $\omega$ 3系脂肪酸由来の抗炎症性代謝物の構造と機能, 生化学, vol. 80, 1042-1046 (2008)

7. 磯部洋輔, 中西広樹, 田口良, 有田誠,  $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸と炎症のメタボロミクス, 臨床化学, vol. 37, 347-353 (2008)
8. 谷友香子, 有田誠, 血小板-内皮細胞相互作用と抗炎症性脂質メディエーター, 血管医学, vol. 10, 143-149 (2009)
9. 有田誠, 多価不飽和脂肪酸と疾患:炎症性腸疾患, 治療学, vol. 43, 56-60 (2009)
10. 有田誠, n-3系多価不飽和脂肪酸の抗炎症作用のメタボロミクス, 食品と開発, vol.45, 21-23 (2010)