Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

# Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium induced colitis

石田, 司

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2009-09-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲4729
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004729

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 石田　司 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学） |
| 学 位 記 番 号 | 博い第 4729 号 |
| 学位授与の 要 件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当 |
| 学位授与の 日 付 | 平成 21 年 9 月 25 日 |

【 学位論文題目 】

Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium induced colitis （エイコサペンタエン酸由来生理活性物質であるリゾルビン E1 の DSS 誘導腸炎に対する抗炎症効果）

審 査 委 員

主 査　教 授　堀田　博
　　教 授　熊谷　俊一
　　教 授　横崎　宏

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

# 論文審査の結果の要旨

| 受付番号 | 甲 第 2047 号 | 氏 名 | 石 田 司 |
|---|---|---|---|
| 論文題目 Title of Dissertation | Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium induced colitis<br><br>エイコサペンタエン酸由来生理活性物質であるリゾルビンE1 のDSS誘導腸炎に対する抗炎症効果 | | |
| 審査委員 Examiner | 主 査 Chief Examiner 堀田 博<br>副 査 Vice-examiner 熊谷 俊一<br>副 査 Vice-examiner 横崎 哀 | | |

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

魚油に多く含まれるeicosapentaenoic acid（EPA）、docosahexaenoic acid（DHA）などの不飽和脂肪酸は、炎症性腸疾患を含む様々な慢性炎症性疾患に対して抗炎症効果が報告されている。近年、炎症部位にEPA とアスピリンを投与した際の抽出物にResolvin E1（RvE1）という物質が産生されることが見出された。この物質は、炎症の終息期にも産生されることから、炎症を積極的に終息させる物質であると考えられる。実際、RvE1 は好中球の浸潤抑制、マクロファージによる貪食能向上などの作用が報告されている。さらに、RvE1 は2 つのG蛋白共役受容体のリガンドとして作用していることが明らかにされている。一つは、マクロファージ及び樹状細胞の一部に発現しているChemR23 と呼ばれる受容体であり、もう一つは、好中球に発現し元来ロイコトリエンB4の受容体として知られているBLT-1 である。RvE1 はこれらの受容体を介したシグナル伝達により、前述のような作用を発揮すると考えられている。一方、炎症性腸疾患の病態として、マクロファージの役割が重要である。実際、炎症性腸疾患患者は、TNF-α、IL-1β、IL-6 などのマクロファージが主に産生する炎症性サイトカインが高値であることが知られている。これらのことから、本申請者は、マクロファージに対するRvE1 の効果、及び広く炎症性腸疾患モデルとして利用されておりマクロファージや好中球の浸潤を誘発させるdextran sulfate sodium（DSS） 誘発腸炎に対するRvE1 の効果を検討した。その結果、以下の事柄を明らかにした。

(1) マウス腹腔内細胞のうちCD11b 陽性細胞のほぼすべてがChemR23 を発現していた。さらに、マウス腹腔内細胞に対してLPS刺激4 時間前にRvE1処理したものでは、LPS 刺激のみと比較して、TNF-αおよびIL-12p40のmRNA 発現量が有意に低下した。

(2) ChemR23強制発現細胞（HEK293-ChemR23 細胞）をTNF-αで1 時間刺激してNF-κB の核内移行を免疫染色及びウエスタンブロット法で評価したところ、刺激2 時間前にRvE1投与した群において、NF-κB の核内移行が抑制された。

(3) 8-10 週令のC57BL/6 マウスに3.5%DSS 溶液を5 日間投与すると、5 日目より下痢、体重減少など著明な腸炎を生じ、8日目には体重減少率は78.1±2.6%となった。しかし、DSS に加えてRvE1 を投与した群では8日目の体重減少率は90.7±2.4%であり、体重減少は有意に改善した。

また大腸長の比較解析や、大腸組織切片のH.E 染色による比較解析においても、RvE1 投与による潰瘍の改善、炎症細胞浸潤の改善が認められた。さらに、大腸組織においてNF-κB の活動性を検討するためにNF-κB p65 のリン酸化に対する抗体を用いて免疫染色を行い検討したところ、RvE1 投与群は大腸遠位側において、NF-κB リン酸化抗体染色要請細胞数が有意に低下していた。また、RvE1 投与群において、NF-κB 関連性の炎症性サイトカインであるTNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA の有意な低下が認められた。

(4) マウス腹腔内マクロファージをLPSで刺激するとChemR23 mRNA が増加した。さらに、DSS 誘発腸炎の大腸組織でも、コントロール群と比較して、ChemR23 mRNA が増加していた。

(5)上記の結果より、RvE1 は、マクロファージや好中球において、その受容体の１つであるChemR23への結合を介してNF-κB の転写活性を抑制し、TNF-α、IL-1β、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を抑制することによって、炎症性腸疾患の病態を改善させると推論された。

以上、本研究は、炎症を積極的に終息させる RvE1 について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったマクロファージに対する RvE1 の効果を DSS 誘発腸炎を用いて検討し、RvE1 の効果はマクロファージや好中球浸潤に対する抑制効果が主であることを示し、炎症のメカニズムの解明とともにヒト慢性炎症疾患の治療薬への応用が期待される重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

# Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium induced colitis

エイコサペンタエン酸由来生理活性物質であるリゾルビン E1 の
DSS 誘導腸炎に対する抗炎症効果

神戸大学大学院医学系研究科消化器内科学専攻
消化器内科学
（指導教員：東　健　教授）

石田　司

1. はじめに

魚油に多く含まれる eicosapentaenoic acid（EPA）、docosahexaenoic acid（DHA）などの不飽和脂肪酸は、 虚血性心疾患、関節リウマチ、乾癬、さらに炎症性腸疾患などの様々な慢性炎症性疾患に対して抗炎症効果が報告されている。以前より炎症状態においては、不脂肪酸由来物質が様々な作用を発揮していることが知られており、例えば何らかの障害があった場合、不飽和脂肪酸由来物質であるプロスタグランジンやロイコトリエンなどの物質が産生され、好中球の浸潤に代表される炎症が生じる。一方で、我々の生体内ではその炎症をスムーズに終息させることができるが、その機序は明らかではなかった。

近年、Serhan らの研究で、炎症部位に EPA とアスピリンを投与した際の抽出物に Resolvin E1（RvE1）という物質が産生されることが見出された。この物質は、炎症の終息期にも産生されることから、炎症を積極的に終息させる物質であると考えられた。実際、RvE1 は好中球の浸潤抑制、マクロファージによる貪食能向上などの作用が報告されている。さらに、RvE1 は 2 つの G 蛋白共役受容体のリガンドとして作用していることが明らかにされている。一つは、マクロファージ及び樹状細胞の一部に発現している ChemR23 と呼ばれる受容体であり、もう一つは、好中球に発現し元来ロイコトリエン B4 の受容体として知られている BLT-1 である。また、RvE1 はこれらの受容体を介したシグナル伝達により、前述のような作用を発揮すると考えられている。

炎症性腸疾患の病態として、マクロファージの役割は非常に重要である。実際、炎症性腸疾患患者は、TNF-α、IL-1β、IL-6 などのマクロファージが主に産生する炎症性サイトカインが高いことが知られている。これらのことから、今回我々はマクロファージに対する RvE1 の効果、及び広く炎症性腸疾患モデルとして利用されており、マクロファージや好中球の浸潤を誘発させる DSS 誘発腸炎を用いて RvE1 の効果を検討した。

2．結果

（1）マウス腹腔内マクロファージでの RvE1 の抗炎症効果の検討

以前より、マウス腹膜炎モデルに対して RvE1 は抗炎症に働くことが報告されている。このため、in vitro でのマウス腹腔内細胞に対して、どのような機序で RvE1 が作用しているか検討した。6-8 週齢の C57BL/6 マウスより採取した腹腔内細胞の CD11b 陽性細胞のほぼすべての細胞が、ChemR23 を発現していることがフローサイトメトリーを用いて示された。さらに、マウス腹腔内細胞に対して LPS（100ng/ml）で刺激 4 時間前に RvE1（100ng/ml）処理したものでは、LPS 刺激のみと比較して TNF-αおよび IL-12p40 mRNA の有意な低下がリアルタイム PCR で示された。

（2）RvE1 の ChemR23 発現細胞における NF-κB 活動性の抑制効果の検討

HEK293 細胞に ChemR23 発現遺伝子を持つプラスミドを遺伝子導入した ChemR23 移入細胞（HEK293-ChemR23 細胞）が、フローサイトメトリーで ChemR23 を発現していることを確認した。さらに HEK293-ChemR23 細胞に対して、TNF-α（4ng/ml)で 1 時間刺

激した後、NF-κB の核内移行を免疫染色で評価したところ、刺激 2 時間前に RvE1（100ng/ml)投与した群において、核内移行を抑えることが示された。一方、野生型 HEK293 細胞においては、RvE1 の効果は認められなかった。同様に、HEK293-ChemR23 細胞に対して、TNF-α（4ng/ml）で刺激した際の核内蛋白中の NF-κBp65 をウエスタンブロット法で評価したところ、RvE1 投与群において NF-κB の核内移行を抑制した。このことから、RvE1 は ChemR23 依存的に NF-κB の活動性を低下させていることが示唆された。

(3) DSS 誘発腸炎に対する RvE1 の効果の検討

8-10 週令の C57BL/6 マウスに 3.5%DSS 溶液を 5 日間投与し、その後、水に変更し 8 日目まで観察した。DSS 投与後 5 日目より下痢、体重減少など著明な腸炎を生じ、8 日目には体重減少率は 78.1±2.6%となった。しかし、RvE1 投与群（Day0-5 まで 1μg/mouse RvE1 投与）において 8 日目の体重減少率は 90.7±2.4%と有意に体重減少を改善した。また大腸長においても、有意に RvE1 投与群において改善が認められた。大腸組織切片を H.E 染色してその炎症の程度を比較しても、RvE1 投与群において潰瘍の改善、炎症細胞浸潤の改善が認められた。スコアリングでも、有意な改善効果が認められた。

さらに、大腸組織において NF-κB の活動性を検討するために NF-κBp65 のリン酸化に対する抗体を用いて、免疫染色を行い検討した。大腸遠位側で、RvE1 投与群は有意に NF-κB のリン酸化に対する抗体で染色されている細胞数が低下しており大腸組織においても NF-κB の活動を低下させていることが考えられた。また、RvE1 投与群において NF-κB 関連性の炎症性サイトカインである TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA の有意な低下が DSS 誘発腸炎の大腸組織において認められ、RvE1 は NF-κB 依存的に炎症をコントロールしていることが示唆された。

（4）炎症による RvE1 受容体である ChemR23 の発現の変化の検討

マクロファージなどの細胞に RvE1 の受容体である ChemR23 が発現しているが、炎症により発現が変化しているかどうか検討した。マウス腹腔内マクロファージに対して、LPS（100ng/ml）で刺激した際、ChemR23 mRNA が増加することが示された。さらに、DSS 誘発腸炎の大腸組織でも、DSS 投与群がコントロール群と比較して ChemR23 mRNA が増加していた。このように炎症に対して、受容体を増加させることにより RvE1 の効果をより効率よく発揮させていることが示唆された。

3.考察

炎症性腸疾患の病態として、食事や腸内細菌に対する免疫反応が過剰に反応していると考えられており、実際炎症性腸疾患患者が主にマクロファージの産生する TNF-α、IL-1β、IL-6 などのサイトカインが高いことがわかっている。このように炎症性腸疾患において、マクロファージは非常に重要な役割を担っていると考えられている。以前の報告から、RvE1 はマクロファージに対して効果的であること、RvE1 の受容体の 1 つである ChemR23 が単核球細胞系に発現していることから、炎症性腸疾患にも RvE1 が効果的であると考えられた。実際、今回の実験でもマクロファージを LPS で刺激した際に、RvE1 は TNF-α、IL-12p40 mRNA 発現を低下させている。

さらに我々は、炎症性腸疾患などの様々な炎症のキーレギュレーターである NF-κB の活動性についても RvE1 の効果を検討した。HEK293 細胞上に発現した ChemR23 という受容体を介して RvE1 は、NF-κB の活動性を抑制した。また、好中球に発現する BLT-1 に対して RvE1 は、NF-κB の活動性を低下することが報告されている。さらに、DSS 誘導腸炎で RvE1 投与群において NF-κB のリン酸化を低下させることから、生体内でも同様に RvE1 が NF-κB の活動を抑制させ、炎症性サイトカインの低下に導くと考えられた。

DSS 誘導腸炎は、上皮を破壊することにより腸内細菌などが粘膜下細胞を刺激し、マクロファージや好中球の浸潤を誘導する腸炎モデルとして知られている。以前に RvE1 は、TNBS 誘導腸炎を改善させることが報告され、Th1 型有意の炎症反応の低下が考えられた。TNBS 誘導腸炎メカニズムとして早期の炎症においては、マクロファージや好中球がメインに浸潤しているが、その後、炎症後期において IFN-γを有意に産生する CD4 陽性 T 細胞の浸潤が生じ、その結果 Th1 型の炎症反応を誘導すると考えられている。今回我々は、TNBS 誘導腸炎での結果を踏まえ、DSS 誘導腸炎を用いてマクロファージや好中球の浸潤を低下させているのかあるいはその後の T 細胞の浸潤を低下させるかを検討した。今回の検討で、RvE1 投与により DSS 誘導腸炎を臨床症状及び組織学的にも改善させ、マクロファージなどが産生するサイトカインである TNF-α、IL-1β、IL-6 を低下させることから、RvE1 の効果はマクロファージや好中球浸潤に対する抑制効果がメインであると示唆された。RvE1 は、マクロファージの貪食能の向上、Zymosan 誘導腹膜炎モデルの改善などの報告もあり、これらの結果と合致するものと考えられた。

慢性炎症は、炎症を修復するメカニズムの欠如とも考えられている。RvE1 などの不飽和脂肪酸由来生理活性物質は炎症の収束期に誘導され、優れた抗炎症効果を示している。このことから、炎症のメカニズムの解明とともにヒト慢性炎症疾患の治療薬への応用が期待される。