



Title	食事性オメガ3脂肪酸由来代謝物によるアレルギー性皮膚炎抑制メカニズムの解明
Author(s)	雑賀, あずさ
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82188
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

2020 年度 博士学位論文

食事性オメガ3脂肪酸由来代謝物による
アレルギー性皮膚炎抑制メカニズムの解明

雑賀 あずさ

大阪大学大学院 薬学研究科
創成薬学専攻 ワクチン材料学分野

目次

略語一覧	2
緒論	5
第一章 アレルギー性皮膚炎に対する 17,18-EpETE の構造活性相関の解明	
背景	11
方法	14
結果	24
考察	39
小括	46
第二章 皮膚に特徴的なオメガ 3 脂肪酸代謝環境を介して産生される脂肪酸代謝物の 同定とアレルギー性皮膚炎抑制機序の解明	
背景	48
方法	52
結果	63
考察	89
小括	95
総括	97
謝辞	100
参考文献	102

略語一覽

- ACD : allergic contact dermatitis
- AhR : aryl hydrocarbon receptor
- APC : allophycocyanin
- BSA : bovine serum albumin
- ChemR23 : chemokine-like receptor 1
- CHS : contact hypersensitivity
- COX : cyclooxygenase
- CXCL : C-X-C motif chemokine ligand
- CYP : cytochrome P450
- DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DC : dendritic cell
- DHA : docosahexaenoic acid
- diHETE : dihydroxyeicosatetraenoic acid
- dLNs : draining lymph nodes
- DNFB : 2,4-dinitrofluorobenzene
- DPA : docosapentaenoic acid
- EET : epoxyeicosatrienoic acids

- EPA : eicosapentaenoic acid
- EpETE : epoxyeicosatetraenoic acid
- FBS : fetal bovine serum
- FC ϵ RI : high affinity immunoglobulin E receptor
- FITC : fluorescein isothiocyanate
- fMLP : N-formyl-methionylleucyl-phenylalanine
- GPCR : G-protein coupled receptor
- HE : hematoxylin and eosin
- HDPA : hydroxydocosapentaenoic acid
- HEPE : hydroxyeicosapentaenoic acid
- HETE : hydroxyeicosatetraenoic acid
- HPLC : high performance liquid chromatography
- IFN- γ : interferon- γ
- IgE : immunoglobulin E
- IL : interleukin
- i.p. : intraperitoneally
- iSALT : inducible skin-associated lymphoid tissue
- LC-MS/MS : liquid chromatography-tandem mass spectrometry
- LOX : lipoxygenase

- LTB₄ : leukotriene B₄
- LXR : liver X receptor
- NCS : newborn calf serum
- NF-κB : nuclear factor-κB
- NSAIDs : non-steroidal anti-inflammatory drugs
- TNF-α : tumor necrosis factor-α
- PE : phycoerythrin
- PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor
- qPCR : quantitative real-time PCR
- RvE : resolvin E
- RvD : resolvin D
- RXR : retinoid X receptor

緒論

脂質は糖質・タンパク質に並ぶ三大栄養素の一種であり、我々の生命維持・身体活動に欠かせないエネルギー源である。一方で、脂質のエネルギー価は糖質やタンパク質と比べて2倍以上であることから、脂質の過剰摂取が肥満や高脂血症を引き起こし、冠動脈疾患や生活習慣病のリスクになることが指摘されてきた^{1,2}。従って、従来の栄養学的観点から、健康増進のためには脂質摂取「量」を制限した食事の摂取が重要であると推奨されてきた。

食用油（食事性脂質）はグリセロール骨格に3つの脂肪酸が結合したトリグリセリドを主成分としているが、使用する原材料や抽出工程の違いなどにより、含まれる脂肪酸の種類は大きく異なる。例えば、調理用として一般に用いられる植物性食用油のうち、亜麻仁油や荳胡麻油はメチル基末端から数えて3番目の炭素にはじめて二重結合を持つオメガ3脂肪酸の α リノレン酸を主な構成脂肪酸とするのに対して、大豆油や綿実油はメチル基末端から数えて6番目の炭素にはじめて二重結合を持つオメガ6脂肪酸のリノール酸を主な構成脂肪酸とする。ヒトを含む哺乳類は、脂肪酸のオメガ3位、オメガ6位に二重結合を導入する不飽和化酵素を持たないため、オメガ3脂肪酸とオメガ6脂肪酸は体内で合成することができない³。また、食事から摂取した α リノレン酸は、脂肪酸伸長酵素や不飽和化酵素を介してエイコサペンタエン酸（eicosapentaenoic acid; EPA）やドコサペンタエン酸（docosapentaenoic acid; DPA）、ドコサヘキサエン酸

(docosahexaenoic acid; DHA) へと代謝される一方で、オメガ6脂肪酸のリノール酸はアラキドン酸へと代謝され、オメガ3脂肪酸とオメガ6脂肪酸を体内で相互変換することもできない³⁻⁵。従って、オメガ3脂肪酸とオメガ6脂肪酸は食事として体外から摂取する必要がある必須脂肪酸として認識されており、その体内存在量は食事の影響を強く受ける³⁻⁵。これら脂肪酸の種類の違いは脂肪酸のエネルギー源としての機能にはほとんど影響を与えない一方で、オメガ3脂肪酸とオメガ6脂肪酸とでは生体に与える影響が大きく異なることが知られている。その理由として、脂肪酸の免疫応答調節因子としての働きが脂肪酸の種類によって異なることがあげられる。脂肪酸の免疫応答調節因子としての機能は、疾患制御を考えるうえで重要な要素であり、例えば、アラキドン酸はシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase; COX) やリポキシゲナーゼ (lipoxygenase; LOX) が作用するアラキドン酸カスケードと呼ばれる経路を介して、プロスタグランジン類やロイコトリエン類などの炎症反応を促進させる脂肪酸代謝物へと代謝されることから、起炎症反応に関わることが古くから指摘されてきた⁴。実際、アラキドン酸カスケードで働く COX の阻害剤は非ステロイド系抗炎症剤 (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) として開発され、一般用医薬品として現在広く用いられている⁶。

一方、オメガ3脂肪酸は炎症抑制活性を持つことが知られている。オメガ3脂肪酸摂取による抗炎症作用が特に注目されるようになったのは、1970年代後半に行われたグリーンランドに居住する先住民族イヌイットの人々を対象とした疫学調査の結

果からである。この本研究では、イヌイットの人々とデンマークの人々が同じ遺伝的背景を持つにも関わらず、魚やアザラシなどを主食としていたイヌイットの人々はデンマークの人々に比べて冠動脈疾患での死亡率が低いことが示されており、実際に、イヌイットの人々の血中には、魚油やアザラシ油に多く含まれる EPA が豊富に含まれていたことから、オメガ3 脂肪酸の摂取が冠動脈疾患の予防に有益であることが示唆された⁷。この報告をきっかけに、魚油に多く含まれる EPA や DHA が持つ疾患予防効果、健康増進効果に関する研究が活発になされ、疫学研究や食事介入試験、マウスやラットなど実験動物を用いた多数の研究により、オメガ3 脂肪酸が心血管疾患やアルツハイマー病、炎症性腸疾患、関節リウマチ、喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなど様々なタイプの疾患の予防、炎症抑制に有効であることが示されてきた⁸⁻¹³。つまり、摂取する食事性脂質の「量」と共に「質」を考慮することもまた免疫学的に重要であることが分かってきた。

一方、オメガ3 脂肪酸の摂取により抗炎症効果が得られるメカニズムとして、これまでの研究においては、オメガ3 脂肪酸がオメガ6 脂肪酸由来の起炎症性脂肪酸代謝物の産生に対して拮抗的作用を示すためであると考えられていた。しかしながら、近年の質量分析計や高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography; HPLC) を中心とした分析システムの発展により、体内に極微量しか存在しないオメガ3 脂肪酸代謝物の検出や機能解析が可能となり、抗アレルギー、抗炎症活性を示すオメガ3 脂肪酸由来の代謝物が同定されてきた。例えば、EPA や DHA を COX や LOX、シトクロム

P450 (cytochrome P450; CYP) が代謝して生じるオメガ3 脂肪酸代謝物として、レゾルビン E1 (resolvin E1; RvE1)、RvE2、RvE3 などの RvEs や、レゾルビン D1 (resolvin D1; RvD1)、RvD2、RvD3 などの RvDs、プロテクチン D1、マレシンなどがあり¹⁴⁻¹⁷、その標的分子や細胞を含めた作用メカニズムが明らかになってきている。これら知見の集積と連動し、オメガ3 脂肪酸代謝物の機能性や代謝産生機構に関する研究に大きな注目が集まり、脂質研究は新しい時代を迎えている^{4,18}。さらに、オメガ3 脂肪酸代謝物は多くの研究において nM レベルと極めて低濃度で生理活性が認められることから、アレルギー、炎症性疾患に対する新たな創薬シーズとして注目されている¹⁹⁻²¹。

アレルギー性皮膚炎の一種であるアレルギー性接触皮膚炎 (Allergic contact dermatitis; ACD) は、金属アレルギーや植物アレルギーを代表とする「かぶれ」と呼ばれる一般的な皮膚疾患の1つであり、一般人口の約20%がACDに罹患していると言われている^{22,23}。ACDの原因となる外来抗原はハプテンと呼ばれる分子量1000 Da以下の低分子であり、ハプテンそれ自体に抗原性は通常ないが、低分子量であることから容易に皮膚バリアを透過して真皮深部まで侵入し、体内の高分子タンパク質と結合することで抗原性を獲得する²⁴。ハプテンは金属や植物成分の他、香料や化粧品、保存料、樹脂、薬剤、防腐剤、家庭用品など我々が生活するうえで接触頻度の高い製品にも含まれることから、誰にでも起こり得る身近な皮膚疾患である。一般にアレルギー性皮膚炎の治療にはステロイド剤が用いられるが、ステロイド外用剤は皮膚萎縮

症やステロイド誘発性皮膚炎、紫斑、毛細血管拡張、真菌感染症など皮膚における副作用の懸念や、個人により発症の原因となる因子が異なることによる治療効果の個人差が課題となっており^{25,26}、アレルギー性皮膚炎に対する有効性と安全性の高い、新たな予防、治療法の開発が望まれている。

ACDの成立過程は感作相と惹起相に大別され、初めてハプテンと接する感作相では、皮膚常在樹状細胞(dendritic cell; DC)として知られるランゲルハンス細胞や真皮DCが抗原を捕捉する²⁷。抗原を捕捉したDCは、所属リンパ節(drainig lymph nodes; dLNs)へと遊走し、ナイーブT細胞に抗原提示を行うことで、エフェクターT細胞への分化を誘導し、その結果、感作を成立させる²⁷。DCの所属リンパ節への遊走は、ハプテンにより活性化された角化細胞から産生される腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α)やinterleukin (IL) -1、プロスタグランジンE₂などによって促進される²⁷。

ハプテンが再度皮膚に侵入する惹起相では、抗原非特異的な炎症と抗原特異的な炎症が引き起こされ、抗原非特異的な炎症には角化細胞や好中球、肥満細胞が主に関与する。ハプテンにより角化細胞が活性化されると、IL-1やTNF- α などの炎症性サイトカインや好中球を誘引するC-X-C motif chemokine ligand (CXCL) 1やCXCL2、T細胞を誘引するCXCL9やCXCL10などのケモカインの産生が誘導される^{27,28}。ハプテンは真皮深部まで到達するため、皮膚に常在する肥満細胞を直接活性化し、ヒスタミンやTNF- α などの炎症性メディエーターの放出を促す²⁷。これら炎症性メディエーターやケモカインが血管透過性の亢進や血管内皮細胞の活性化、好中球やT細胞の炎症部位への浸潤を

促すことで、抗原非特異的な炎症反応が誘導される²⁹。一方、抗原特異的な炎症にはエフェクターT細胞が関与する。ハプテンによる刺激を受けて角化細胞から産生されたIL-1 α は、真皮血管周囲のマクロファージによるCXCL2産生を誘導することで、DCを血管周囲へと集め、マクロファージとDCの集塊形成を促す³⁰。ここでは、DCによるエフェクターT細胞への抗原提示が行われ、エフェクターT細胞が活性化される。これにより、エフェクターT細胞からのIFN- γ などの炎症性サイトカインの産生が進み、抗原特異的な炎症が引き起こされる³⁰。DCとT細胞からなる細胞集塊は、誘導型皮膚関連リンパ組織(inducible skin-associated lymphoid tissue; iSALT)と呼ばれ、炎症誘導時にのみ認められる構造である³⁰。このように多様な免疫細胞や角化細胞が絡んだ一連の炎症反応の結果、かゆみや痛みを伴う紅斑や腫れ、湿疹、水疱などの皮膚炎症状が引き起こされる。

本研究では新規創薬シーズとしてオメガ3脂肪酸代謝物に着目し、ACDに対する効果とその作用メカニズムの解明をACDの動物モデル実験系である接触過敏症(contact hypersensitivity; CHS)モデルマウスを用いて進めた。第一章では、著者の所属する研究室で近年見いだされた抗アレルギー・抗炎症性脂肪酸代謝物17,18-エポキシエイコサテトラエン酸(epoxyeicosatetraenoic acid; EpETE)の構造活性相関の解明と本代謝物の産生系の確立を行った。続く第二章では、臓器によってオメガ3脂肪酸代謝が異なることに着目し、皮膚において特徴的に産生されるオメガ3脂肪酸代謝物の同定とその抗炎症メカニズムの解明を行った。

第一章

アレルギー性皮膚炎に対する 17,18-EpETE の構造活性相関の解明

背景

著者の所属する研究室ではこれまでに、機能性脂肪酸代謝物の源となる食事性脂質の脂肪酸組成の違いに着目した研究を行ってきており、マウスの飼料に一般的に配合されるオメガ 6 脂肪酸のリノール酸を約 50%含む大豆油の代わりに、オメガ 3 脂肪酸である α リノレン酸を約 60%含む亜麻仁油を配合した特殊飼料を給餌したマウスを用い、アレルギー、炎症性疾患に対する食事性脂質の脂肪酸組成の影響を調べてきた。例えば、卵白アルブミンを抗原とする食物アレルギーモデルをマウスに適用すると、大豆油を給餌したマウスでは多くのマウスでアレルギー性の下痢が認められたのに対して、亜麻仁油を給餌したマウスではアレルギー性の下痢の発症率が低下することを明らかにしている³¹。その有効成分を同定する目的で、腸管組織における脂肪酸の網羅解析を行った結果、大豆油を給餌したマウスに比べて亜麻仁油を給餌したマウスの腸管では α リノレン酸代謝物の EPA とともにその CYP 代謝物である 17,18-EpETE が強く産生されることを見いだした。実際に、大豆油を給餌したマウスに 17,18-EpETE を投与するとアレルギー性の下痢の発症率が減少したことから、17,18-EpETE が食物アレルギー抑制活性を持つことを報告した³¹。さらに、17,18-EpETE がマウスならびにカニクイザルにおいてアレルギー性皮膚炎を抑制することを明らかにし、そのメカニズムとして 17,18-EpETE が

好中球に高発現する G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) である GPR40 を介して好中球の仮足形成を阻害し、炎症部位への好中球の遊走を抑制する結果、CHS の発症を抑制することを解明している³²。

上述のように抗アレルギー・抗炎症活性を持つ 17,18-EpETE にはエポキシ環構造部位における立体構造の違いにより、17(*S*),18(*R*)-EpETE と 17(*R*),18(*S*)-EpETE の 2 種類の鏡像異性体が存在する。鏡像異性体が存在する物質の医薬品としての活用を考える際には、各種鏡像異性体の生理活性に注意を払う必要があり、特に、片方の異性体の持つ望ましくない影響を回避し、薬効を最適化するために、単一の鏡像異性体を用いた医薬品素材の開発が推奨されている。化学的に合成された市販の 17,18-EpETE は 17(*S*),18(*R*)-EpETE と 17(*R*),18(*S*)-EpETE の等量混合物であるラセミ体(±)17,18-EpETE であったことから、17,18-EpETE に関するこれまでの研究では(±)17,18-EpETE を用いていた。従って、17(*S*),18(*R*)-EpETE と 17(*R*),18(*S*)-EpETE のどちらの鏡像異性体が生理活性を担うのか明らかでなかった。しかしながら、17,18-EpETE は新規抗アレルギー・抗炎症剤の創薬シーズとしての実用化が期待されることから、17,18-EpETE のどちらの鏡像異性体が生理活性を担うのかを明らかにする必要があると考えた。

生体内で起こる酵素反応は、酵素の種類毎に異なる機能上の特性の影響を受け、例えば、生成物の立体選択性の高い酵素を用いると、片方の鏡像異性体のみが立体選択的に産生される。EPA のエポキシ化を触媒する CYP にはヒトでは 58 種、マウスでは 108 種と多数のサブタイプが存在し、各種 CYP は EPA の 17,18-EpETE への変換活性

や生成物の立体選択性など、酵素活性が異なることが報告されている³³。さらに CYP は哺乳類だけでなく、微生物中にも存在し、微生物種によって異なる 1000 種以上の CYP が見いだされている³⁴。中でも、*Bacillus megaterium* 由来の CYP である BM-3 は、EPA を立体選択的に 17(*S*),18(*R*)-EpETE へと変換することが報告されていた³⁵⁻³⁷。酵素を用いたバイオ変換反応は、高い立体選択性、位置選択性を示すことや、常温・常圧下の穏やかな環境条件下で反応が進むために低環境負荷かつ低エネルギーコストであるといった利点があり^{38,39}、医薬品前駆体の合成や化学工業の分野で実際に利用されている。このことから、微生物酵素を活用した脂肪酸代謝物の産生技術を確立し、生理機能を認めることができれば、機能性脂肪酸代謝物の大量生産が可能になると考えた。

そこで本研究では、2,4-ジニトロフルオロベンゼン (2,4-dinitrofluorobenzene; DNFB) 誘導性 CHS モデルマウスを用いて、17,18-EpETE 鏡像異性体のうちどちらの異性体が抗炎症活性を担うのかを明らかにし、さらに、抗炎症作用を有する 17,18-EpETE 鏡像異性体の立体選択的な産生系の確立を行った。

方法

【実験動物】

6～8 週齢の C57BL/6 の雌マウスを日本 SLC より購入し、実験に供するまで 1 週間以上医薬基盤・健康・栄養研究所内の動物施設で飼育管理した。GPR40 欠損マウスは P. Steneberg らが作製したもの⁴⁰を使用し、医薬基盤・健康・栄養研究所内の動物施設で飼育管理した。

解剖時はイソフルランを用いて麻酔後、頸椎脱臼をすることでマウスの苦痛を最小限にして安楽死させた。動物の飼育及び実験は全て、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所動物実験規程に準じ、承認を得た計画に従って行った（DS27-47R9、DS27-48R10）。

【CHS の誘導】

シェーバーを用いてマウスの腹部の毛を剃った後、0.5% (vol/vol) DNFB (Nacalai Tesque) /アセトン:オリーブオイル (4:1 [vol/vol], Nacalai Tesque) 溶液を腹部に 25 μ L 塗布し、感作を行った (Day 0)。感作の 5 日後 (Day 5)、0.2% (vol/vol) DNFB/アセトン:オリーブオイル (4:1 [vol/vol]) 溶液をマウスの両耳の表裏に各 10 μ L 塗布することで惹起を行い、2 日後 (Day 7) にマイクロメーター (MDC-25MJ 293-230, ミットヨ) を用いて耳介の厚さを測定した (Figure 1-1)。

評価対象の脂肪酸として、(±)17,18-EpETE (Cayman (±)17,18-EpETE; Cayman Chemical)、化学的に合成した(±)17,18-EpETE (Synthesized (±)17,18-EpETE)、化学的に合成した(±)17,18-EpETE から分取した 17(*S*),18(*R*)-EpETE (>99% ee)及び 17(*R*),18(*S*)-EpETE (>99% ee)、微生物酵素 BM-3 で EPA を変換した 17(*S*),18(*R*)-EpETE (BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE) を、DNFB を塗布する 30 分前に腹腔内投与 (intraperitoneally; i.p.; 一回あたり 10 ng、100 ng、1 µg) した。コントロールとして 0.5% (vol/vol) エタノール/PBS を用いた。

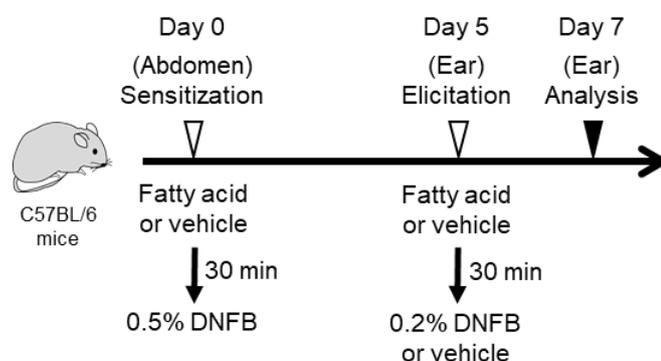


Figure 1-1. Experimental protocol for induction of CHS by DNFB and treatment with fatty acids

【細胞調製】

マウスから切り取った耳組織を内側と外側に裂き、ピンセットを用いて軟骨を除去した。2 mg/mL (wt/vol) コラゲナーゼ (Wako) を加えた 2% (vol/vol) 仔ウシ血清 (newborn calf serum; NCS; Fquitech-Bio) /RPMI 1640 培地 (Sigma Aldrich) 内で、細かく刻んだ組織を攪拌しながらインキュベート (90 分、37°C) することで組織を分散させた。分散した組織懸濁液をセルストレイナー (100 µm) でろ過後、2 回連続して遠心 (400×g、5 分、

4°C) し、沈殿した細胞を得た。得た細胞は 2% (vol/vol) NCS/PBS に懸濁し、フローサイトメトリーを用いた解析に供した。

【フローサイトメトリー解析】

反応抗体との非特異的な反応を防ぐために TruStain FcX (anti-mouse CD16/32) antibody (1:100; BioLegend) で細胞をブロッキングし、死細胞は 7-Aminoactinomycin D (7-AAD; 1:100; BioLegend) で染色することで解析から除外した。その後、fluorescein isothiocyanate (FITC) –anti-Ly6G mAb (1:100; BioLegend, 127606, clone 1A8)、allophycocyanin (APC) –Cy7–anti-CD11b mAb (1:100; BioLegend, 101226, clone M1/70)、BV421–anti-CD45 mAb (1:100; BioLegend, 103133, clone 30-F11) で細胞を染色した。

サンプルの分析は MACSQuant (Miltenyi Biotec) を用いて行い、データ解析は FlowJo 9.9 ソフト (TreeStar) を用いて行った。

【組織学的解析】

マウスから切り取った耳を PBS で洗浄した後、Tissue-Tek OCT Compound (Sakura Finetek) を用いて包埋し、液体窒素で凍結した。薄切組織凍結切片 (6 μm) はクライオスタット (Model CM3050 S, –20°C) を用いて包埋ブロックから作製した。

ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin; HE) 染色では、薄切組織凍結切片を –30°C で冷やした 95% (vol/vol) エタノール水溶液に浸漬 (30 分、4°C) した後、アセトンに浸漬 (1 分)、流水で洗浄 (10 分) し、ヘマトキシリン溶液に浸漬 (10 分)

することで核を染色した。その後、流水で洗浄（30分）し、エオジン Y に浸漬（1分）することで細胞質を染色した。流水で洗浄した後、70% (vol/vol)、80% (vol/vol)、90% (vol/vol) エタノール水溶液にそれぞれ 10 秒、15 秒、20 秒間浸漬することで脱水し、キシレンに浸漬（3分）することで透徹後、染色した組織を Permount（Falma）で封入した。

免疫組織染色では、薄切組織凍結切片を -30°C で冷やした 95% (vol/vol) エタノール水溶液に浸漬（30分、 4°C ）後、アセトンに浸漬（1分）、PBS で洗浄（10分）した。2% NCS/PBS でインキュベート（30分、室温）後、2% NCS/PBS に溶解した FITC-anti-Ly6G mAb（1:100）と反応させた（一晚、 4°C ）。0.1% (vol/vol) Tween-20/PBS と PBS で各 5 分間洗浄後、4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI; $1\ \mu\text{mol/L}$; AAT Bioquest）と反応（10分、室温）することで核を染色した。染色した組織は Fluoromount（Diagnostic BioSystems）で封入した。

HE 染色及び免疫組織染色したサンプルは、蛍光顕微鏡（Model BZ-9000, Keyence）を用いて観察した。

【マウス骨髄由来好中球の単離】

シリンジ（27 G, テルモ）を用いて 2% NCS/RPMI 1640 培地で骨髄をフラッシュすることで、大腿骨と脛骨から骨髄細胞を洗い出した。得た細胞をセルストレイナー（100 μm ）でろ過した後、溶血バッファ（ NH_4Cl 0.14 mol/L、Tris-dihydroxymethyl aminomethan

17 mmol/L、pH 7.2) を用いて溶血 (1 分、室温) し、2% NCS/RPMI 1640 培地を加えることで溶血反応を止めた。遠心後に得た細胞を 2% NCS/PBS に懸濁し、62% (vol/vol) Parcoll (GE Healthcare) -2% NCS/RPMI 1640 培地を入れたチューブに細胞懸濁液を重ねて加え、遠心 (990×g、30 分、20°C、アクセル：SLOW、ブレーキ：SLOW) することで沈殿した細胞を回収した。2% NCS/RPMI 1640 培地及び 2% NCS/PBS で各 1 回洗浄することにより、マウス骨髄細胞から好中球 (精製度 80%以上) を分離した。

【好中球仮足形成の評価】

0.2% (wt/vol) ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA; Sigma Aldrich) を含む HBSS (Nacalai Tesque) に懸濁した骨髄由来好中球を、フィブロネクチンをコーティングしたカバーガラス (Neuvitro) 上に添加し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 15 分間インキュベートした。1 μmol/L、100 nmol/L、10 nmol/L、1 nmol/L の Cayman (±)17,18-EpETE、BM-3 17(S),18(R)-EpETE、18-ヒドロキシエイコサペンタエン酸 (hydroxyeicosapentaenoic acid; HEPE; Cayman Chemical)、RvE1 (Cayman Chemical) を加え、反応 (15 分、37°C、5% CO₂) 後、1 μmol/L N-formyl-methionylleucyl-phenylalanine (fMLP ; Sigma Aldrich) または 100 nmol/L ロイコトリエン B₄ (leukotriene B₄; LTB₄; Cayman Chemical) で刺激 (2 分、37°C、5% CO₂) した。コントロールには、0.03% (vol/vol) エタノール/PBS を用いた。反応後の好中球を 4%パラホルムアルデヒド (Nacalai Tesque) で固定した後、0.5% (vol/vol) Triton X-100 (Nacalai Tesque) /PBS を

使用して透過処理を行った。F-アクチンを 100 nmol/L Acti-stain 488-phalloidin (Cytoskeleton) で染色 (30 分、室温) 後、核を DAPI で染色 (30 秒、室温) したサンプルを、共焦点顕微鏡 TCS SP8 (Leica Microsystems) により観察した。

【逆転写と定量 PCR】

皮膚からの RNA の精製はメーカーのプロトコルに従い、Relia Prep RNA Tissue Miniprep System (Promega) を用いて行った。

メーカーのプロトコルに従い、精製後の RNA サンプルを DNase I (Invitrogen) とインキュベートすることで混入しているゲノム DNA を除去し、さらに Super Script VILO cDNA Synthesis kit (Invitrogen) を用いて cDNA に逆転写した。逆転写した cDNA サンプルは FastStart Essential DNA Probes Master (Roche) を用いた定量 PCR (quantitative real-time PCR; qPCR) に使用し、LightCycler 480 II (Roche) で分析した。使用したプライマー配列を Table 1 に示した。

Table 1. Primers used for qPCR analysis

Species	Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Mouse	<i>Cxcl1</i>	gactccagccacactccaac	tgacagcgagctcattg
Mouse	<i>Cxcl2</i>	aaaatcatccaaaagatactgaacaa	ctttggttcttccgttgagg
Mouse	<i>Cxcl9</i>	cttttctcttgggcatcat	gcatcgtgcattccttatca
Mouse	<i>Cxcl10</i>	gctgccgtcattttctgc	tctcactggcccgtcatc

Mouse	<i>Ifng</i>	atctggaggaactggcaaaa	ttcaagactcaaagagtctgaggta
Mouse	<i>Il-17</i>	cagggagagcttcatctgtgt	gctgagctttgagggatgat
Mouse	<i>Actb</i>	aaggccaaccgtgaaaagat	gtggtacgaccagaggcatac

【17(*S*),18(*R*)-EpETE と 17(*R*),18(*S*)-EpETE の分取】

17(*S*),18(*R*)-EpETE 及び 17(*R*),18(*S*)-EpETE を取得するために、EPA を基質として (±)17,18-EpETE を合成した⁴¹。EPA をカルボニルジイミダゾールと共にジクロロメタン中で攪拌しながら反応（3 時間、室温）させ、反応後の混合液を氷上のエーテルと過酸化水素混合液に加えることで EPA をエポキシ化した。エポキシ化生成物をジエチルエーテルで抽出後、水洗し、溶媒を除去した後、Cosmosil Cholester カラム（5 μm、250 × 10 mm、Nacalai Tesque）を用いた HPLC（移動相：アセトニトリル:0.1% [vol/vol] ギ酸溶液 [60:40, vol/vol]、流速：5 mL/min、カラム温度：30°C、検出波長：205 nm）により (±)17,18-EpETE を精製した。化学合成品 17,18-EpETE が 17,18-EpETE の化学構造を持つことは、NMR による解析により確認した。また、CHIRALCEL OJ-RH packed column を用いた HPLC 分析により、化学合成品 17,18-EpETE がラセミ体であることを確認した。

化学合成した(±)17,18-EpETE からの 17(*S*),18(*R*)-EpETE 及び 17(*R*),18(*S*)-EpETE の分取は、CHIRALCEL OJ-RH packed column（5 μm、150 × 4.6 mm、Daicel）を用いた HPLC（移動相：メタノール:0.1% [vol/vol] ギ酸溶液 [75:25, vol/vol]、流速：1.2 mL/min、カ

ラム温度：30°C、検出波長：205 nm) により行った。CHIRALCEL OJ-RH packed column を用いた HPLC 分析により、分取して得た 17(*S*),18(*R*)-EpETE 及び 17(*R*),18(*S*)-EpETE はどちらも純度 99%以上であることを確認した。

【BM-3 発現プラスミドの構築と大腸菌の形質転換】

BM-3 発現プラスミドの構築と大腸菌の形質転換は神戸天然物化学株式会社に依頼した。

pET-24d(+) (Merck) 及び pFusionF87V⁴² を Nco I (New England Biolabs) と Xho I (New England Biolabs) でそれぞれ制限酵素処理した後、ECOS Competent *E. coli* DH5alpha (Nippon Gene) に導入して形質転換を行うことで、Kanamycin 耐性の pFusionF87V-Km プラスミドを構築した。次に、pFusionF87V-Km を鋳型として Primer 1, 5'-TTTACAAGCTGGACGCATGA-3' 及び Primer 2, 5'-TAACCCGTCTCCTGCAAAATCAC-3' を用いたインバース PCR を行い、T4 Polynucleotide Kinase (Takara Bio) による 5'末端のリン酸化を行った後、ECOS Competent *E. coli* DH5alpha に導入して形質転換を行うことで、変異を元に戻した pFusionBM-3-WT プラスミドを構築した。構築したプラスミドを ECOS Competent *E. coli* BL21 (DE3) (Nippon Gene) に形質転換することで組換え大腸菌 (pFusionBM-3-WT/BL21 (DE3)) を得た。

【BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE の産生と精製】

EPA の 17(*S*),18(*R*)-EpETE への変換と BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE の精製は神戸天然物化学株式会社に依頼した。

pFusionBM-3-WT/BL21 (DE3)を改変 LB 液体培地 (Select soytone 10 g/L、Yeast extract 5 g/L、NaCl 10 g/L、Kanamycin sulfate 25 mg/L) で振とう培養 (22 時間、25°C、120 rpm) 後、改変 2×YT 培地 (Select soytone 16 g/L、Yeast extract 10 g/L、NaCl 5 g/L、Kanamycin sulfate 25 mg/L、5-Aminolevulinic acid 80 mg/L、Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 28.4 mg/L、isopropyl β-D-thiogalactopyranoside 250 μmol/L) で攪拌しながら拡大培養 (47 時間、20°C、通気量 75 L/min、pH 7.0±0.1、DO 1.5±0.5 ppm) を行った。その後、培養槽に基質として EPA (Carbosynth) を添加して反応させた (71.5 時間、20°C、通気量 20 L/min、pH 7.0±0.1、DO 1.5±0.5 ppm) 後、エタノールを添加してインキュベート (46 時間、20°C、通気量 20 L/min、pH 7.0±0.1、DO 1.5±0.5 ppm) することで反応を停止させた。生菌がないことは、反応液を改変 LB 寒天培地に播種した際にコロニーが形成されないことで確認した。

EPA 反応液から Diaion HP20 (三菱ケミカル) を用いて 17,18-EpETE を回収後、ジーエルサイエンス製 Inertsil ODS-3 カラム (5 μm、250 mm×50 mm) を用いて、溶媒をエタノールに置換した。溶出は 0.05% (vol/vol) 酢酸含有 70% (vol/vol) エタノール水溶液 (流速 45 mL/min)、0.05% (vol/vol) 酢酸含有 55% (vol/vol) エタノール水溶液 (流速 10 mL/min)、エタノール (流速 15 mL/min) の 3 段階に分けて行った。溶媒がエタノールに置換されたサンプルを BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE として実験に用いた。

CHIRALCEL OJ-RH packed column を用いた HPLC 分析により、BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE の純度は 96.6%、光学純度 99%以上であることを確認した。

【統計解析】

統計解析は Prism 3.03 software (GraphPad Software) を用いて行い、多群間の比較は one-way ANOVA によって行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果

1. 17(S),18(R)-EpETE 及び 17(R),18(S)-EpETE の HPLC 分析

17,18-EpETE の鏡像異性体は市販されていないことから、17(S),18(R)-EpETE と 17(R),18(S)-EpETE の抗炎症活性を比較する目的で、(±)17,18-EpETE から 17(S),18(R)-EpETE と 17(R),18(S)-EpETE の単離を試みた。17(S),18(R)-EpETE 及び 17(R),18(S)-EpETE を(±)17,18-EpETE から分取するためには多量の(±)17,18-EpETE が必要であることから、まず初めに、EPA を基質として(±)17,18-EpETE を化学的に合成した。鏡像異性体の分離を得意とするキラルカラムを付けた HPLC を用いて、化学合成した(±)17,18-EpETE と保持時間確認用の標品として Cayman (±)17,18-EpETE を分析し、得られたピークを比較したところ、化学合成した(±)17,18-EpETE では、Cayman (±)17,18-EpETE で認められた 2 本のピークと保持時間が等しい 2 本のピークが認められた (Figure 1-2)。このことから、化学合成した(±)17,18-EpETE が 17(S),18(R)-EpETE 及び 17(R),18(S)-EpETE の混合物として合成できたと判断した。

次に、(±)17,18-EpETE を分析した際に得られる 2 本のピークの同定を行った。これまでに、*B. megaterium* 由来の CYP である BM-3 が 97%の変換率で EPA を 17(S),18(R)-EpETE に変換することが報告されていた³⁵⁻³⁷。本報告において Capdevila らは、まず BM-3 で EPA を変換して生成した 17,18-EpETE のエポキシ環構造を壊すことなく化学的に 3,4-epoxy-hexane-1-yl-benzoate へと変換し、次に標品として立体選択的に化学

合成可能な (3*R*,4*S*)-epoxy-hexane-1-yl-benzoate もしくは (3*S*,4*R*)-epoxy-hexane-1-yl-benzoate を合成し、これらを HPLC 分析した際の保持時間を比較することで、17,18-EpETE の鏡像異性体の同定を行っていた³⁵。そこで、BM-3 を用いて EPA を酵素変換した生成物を 17(*S*),18(*R*)-EpETE の保持時間確認用の標品として用いた。その結果、BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE を分析した際に得られたピークの保持時間は(±)17,18-EpETE を分析した際に認められた保持時間が遅い方のピークと一致した (Figure 1-2)。このことから、1 本目のピークを 17(*R*),18(*S*)-EpETE、2 本目のピークを 17(*S*),18(*R*)-EpETE と同定した。

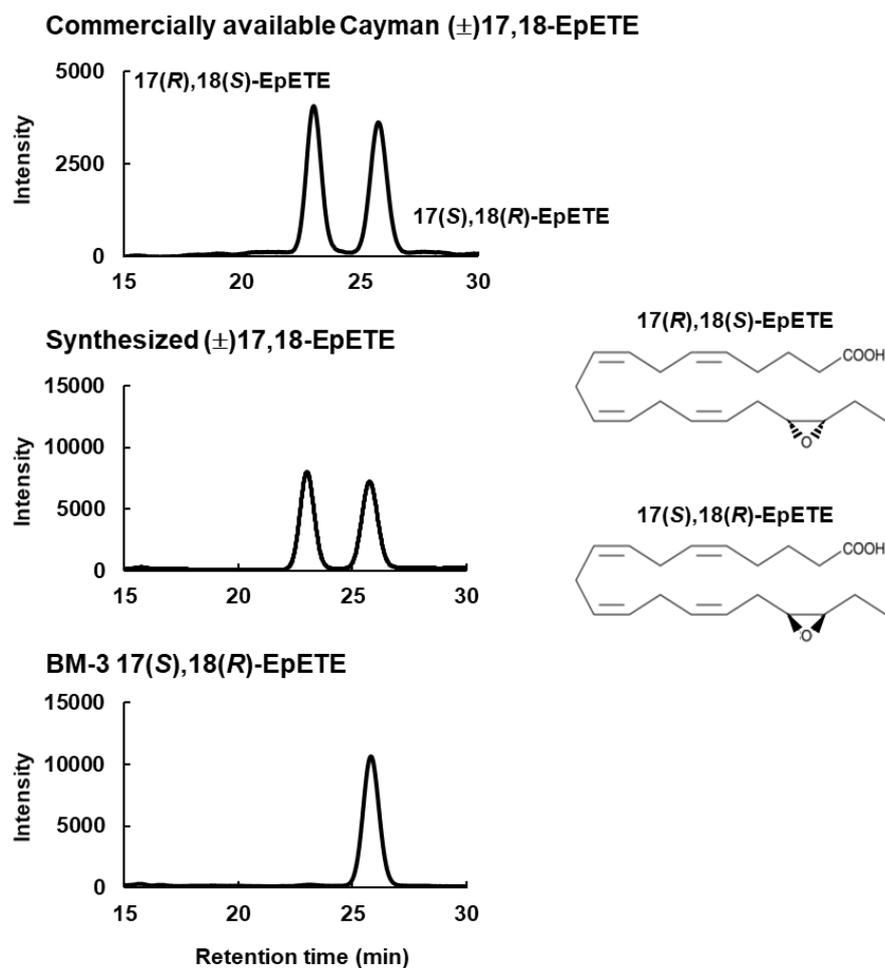


Figure 1-2. Identification of the peak of 17,18-EpETE enantiomers, 17(*S*),18(*R*)-EpETE

and 17(R),18(S)-EpETE

Commercially available Cayman (\pm)17,18-EpETE was used as the standard. The synthesized (\pm)17,18-EpETE showed the same two peaks as commercially available Cayman (\pm)17,18-EpETE, while the BM-3 17(S),18(R)-EpETE, which was used as a standard for identification of 17(S),18(R)-EpETE, showed one peak. Therefore, we decided the second peak is 17(S),18(R)-EpETE, whereas the first peak is 17(R),18(S)-EpETE.

2. (\pm)17,18-EpETE 鏡像異性体の CHS 抑制活性

次に、化学合成した(\pm)17,18-EpETE から分取して得た 17(S),18(R)-EpETE ならびに 17(R),18(S)-EpETE を CHS モデルマウスに投与し、抗炎症活性を比較した。以前報告されていた結果と同様に³²、DNFB で惹起して炎症を誘導することで増加した耳介の腫れが(\pm)17,18-EpETE を腹腔内投与することで抑制された (Figure 1-3A)。さらに、化学合成した(\pm)17,18-EpETE から分取して得た 17(S),18(R)-EpETE は耳介の腫れを抑制したが、17(R),18(S)-EpETE においては微弱な抑制効果のみが認められた。組織学的な解析の結果、(\pm)17,18-EpETE 及び 17(S),18(R)-EpETE を腹腔内投与した場合には、17(R),18(S)-EpETE を腹腔内投与するよりも強く表皮の浮腫が抑制されることが分かり、加えて、(\pm)17,18-EpETE や 17(S),18(R)-EpETE を投与することで、真皮へと浸潤した細胞数が減少する様子が観察された (Figure 1-3B)。このことから、17(S),18(R)-EpETE が 17(R),18(S)-EpETE よりも強い抗炎症活性を有することが明らかになった。

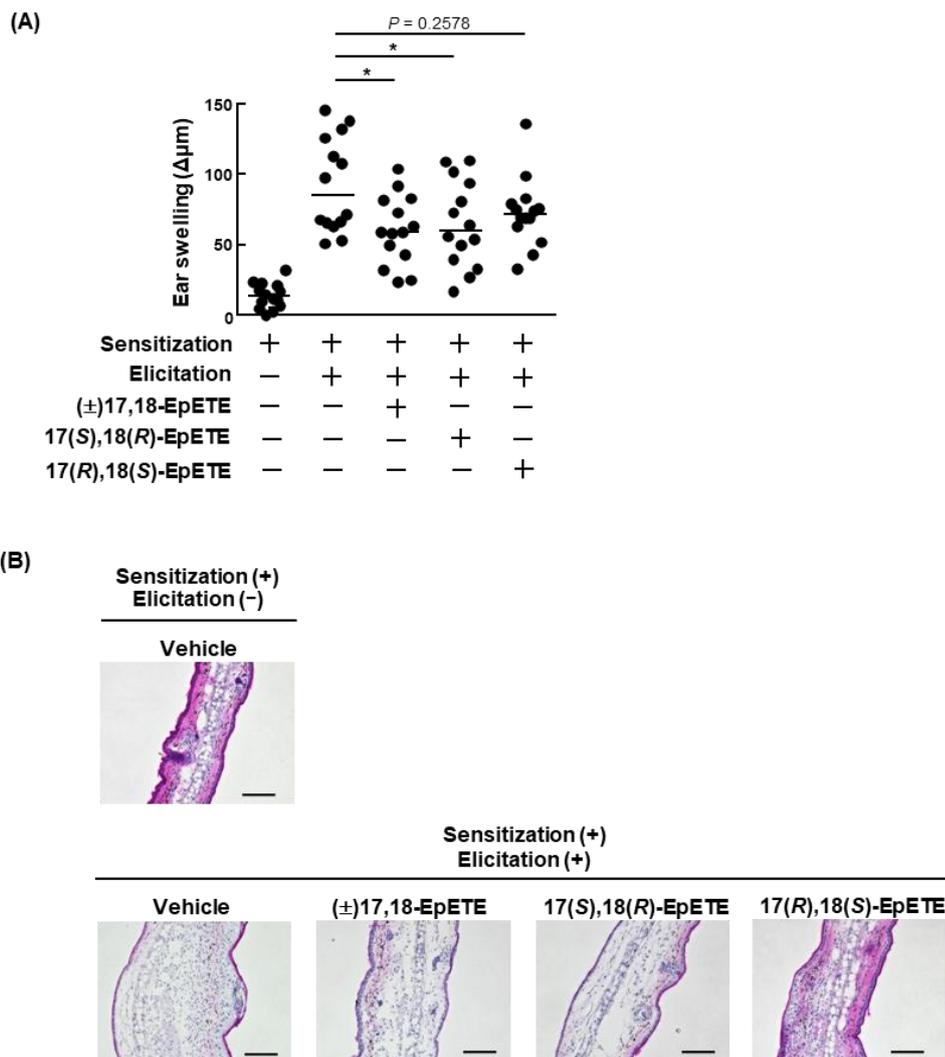


Figure 1-3. 17(S),18(R)-EpETE had strong CHS amelioration effect compared with 17(R),18(S)-EpETE

(A-B) Mice were i.p. injected either 100 ng/administration of commercially available Cayman (±)17,18-EpETE, 17(S),18(R)-EpETE, 17(R),18(S)-EpETE, or vehicle only on days 0 and 5 at 30 min before DNFB treatment. (A) On day 7, ear thickness was measured. Each point represents data from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians. Statistical significance between groups was calculated by using one-way ANOVA: *, $P < 0.05$. (B) Ear tissue samples were prepared on day 7, and stained with HE. Representative images from three independent experiments are shown. Bars, 100 μm .

3. 微生物酵素を用いて産生した 17(*S*),18(*R*)-EpETE の CHS 抑制活性

化学合成した(±)17,18-EpETE から得た 17(*S*),18(*R*)-EpETE が抗炎症作用を発揮したことから、次に微生物由来 CYP の BM-3 を用いて立体選択的に産生した 17(*S*),18(*R*)-EpETE が CHS を抑制するののかについて調べた。その結果、BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE もまた耳介の腫れを抑制し、抗炎症作用を示すことが分かった (Figure 1-4A)。さらに、組織学的解析の結果、BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE を腹腔内投与することで、耳介の腫れ及び真皮への細胞浸潤が抑制される様子が観察された (Figure 1-4B)。

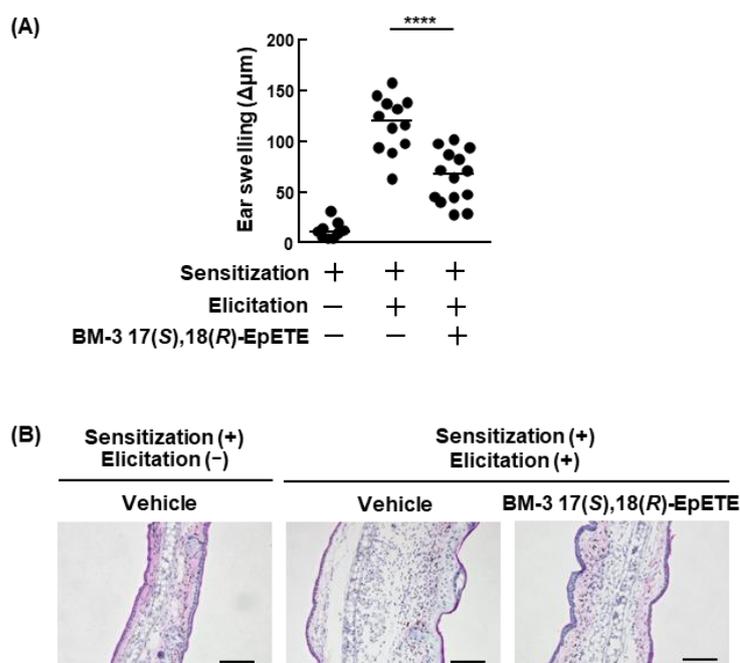


Figure 1-4. CHS was ameliorated by BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE

(A-B) Mice were injected i.p. with either 100 ng/administration of BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE or vehicle only on days 0 and 5 at 30 min before DNFB treatment. (A) Ear thickness was measured on day 7. Each point represents data from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians. Statistical significance between groups was calculated by using one-way ANOVA; ****, $P < 0.0001$. (B) Ear tissue samples were obtained on day 7. The frozen section was stained with

HE, and histologically analyzed. Data are representative of three independent experiments. Bars, 100 μm .

4. 微生物酵素 BM-3 を用いて産生した 17(S),18(R)-EpETE の好中球浸潤抑制活性

(\pm)17,18-EpETE は好中球の仮足形成を抑制することで好中球の炎症局所への遊走を抑制し、CHS を抑制することが報告されていた^{32,43}。そこで、フローサイトメトリー解析により皮膚における好中球数を測定したところ、(\pm)17,18-EpETE と同様に、BM-3 17(S),18(R)-EpETE を腹腔内投与することで皮膚における好中球数が減少することが分かった (Figure 1-5A)。さらに組織学的な解析の結果、BM-3 17(S),18(R)-EpETE を投与することで、真皮で認められる Ly6G 陽性の好中球数が減少することが分かった (Figure 1-5B)。

次に、CHS モデルマウスにおける BM-3 17(S),18(R)-EpETE の投与量依存性を調べた。その結果、一回あたり 1 μg または 100 ng を腹腔内投与すると耳介の腫れ及び皮膚における好中球数が有意に減少したが、10 ng を腹腔内投与しても両者の有意な減少は認められなかった (Figure 1-5C, D)。このことから、BM-3 17(S),18(R)-EpETE は感作ならびに惹起の際に一回あたり 100 ng 以上の量を腹腔内投与することで、好中球浸潤抑制作用を介した CHS 抑制効果を発揮することが分かった。

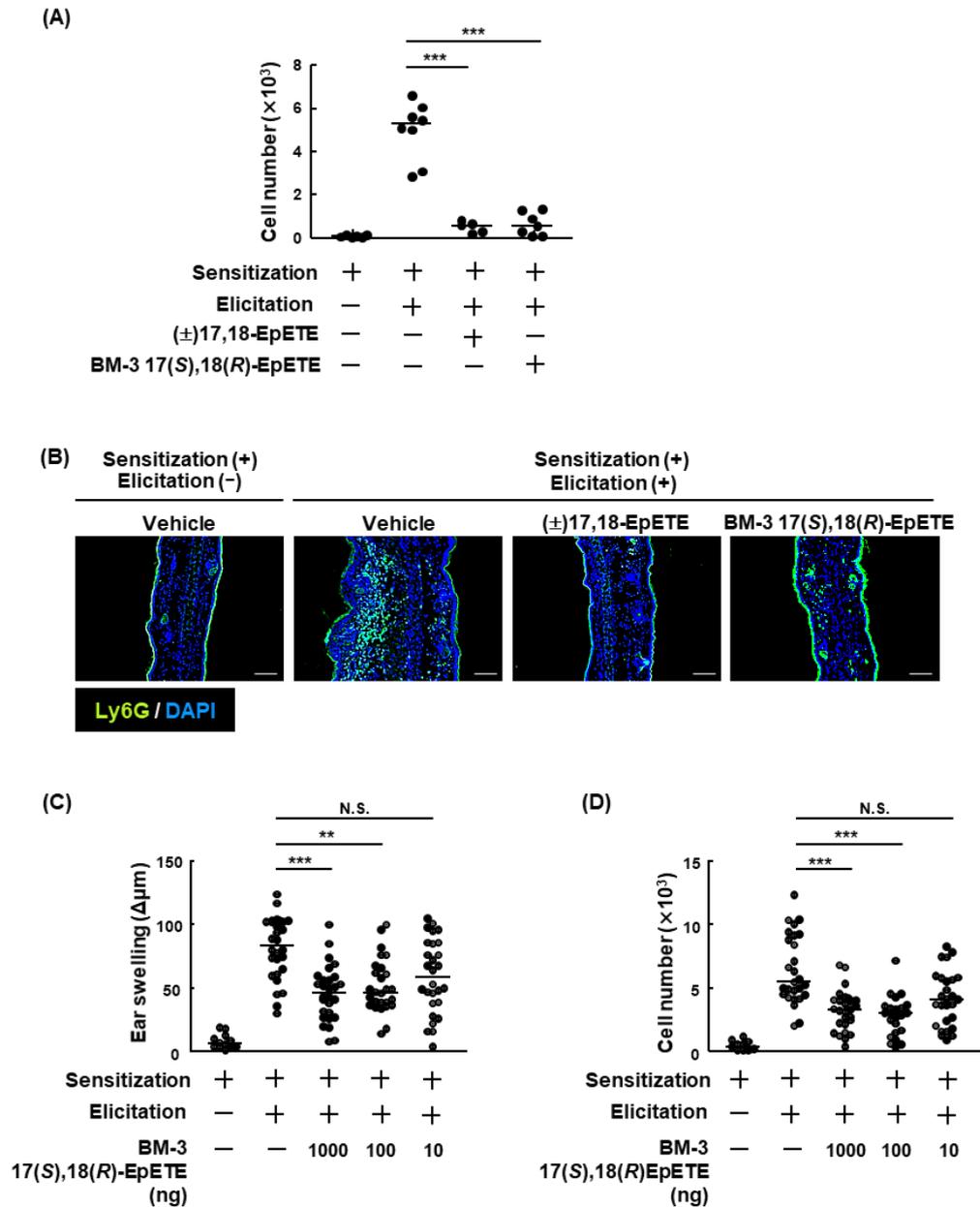


Figure 1-5. BM-3 17(S),18(R)-EpETE reduced the number of neutrophils in inflamed skin

(A-B) Mice were injected i.p. with either 100 ng/administration of commercially available Cayman (±)17,18-EpETE, BM-3 17(S),18(R)-EpETE, or vehicle only on days 0 and 5 at 30 min before DNFB treatment. (A) On day 7, the number of Ly6G⁺ CD11b⁺ neutrophils was measured by using flow cytometry. (B) Frozen ear sections obtained on day 7 were stained with FITC-labeled Ly6G mAb and DAPI for immunohistologic analysis. Data are representative of two independent experiments. Bars, 100 μm. (C-D) Mice were injected i.p. with either 1

$\mu\text{g}/\text{administration}$, 100 $\text{ng}/\text{administration}$ or 10 $\text{ng}/\text{administration}$ of BM-3 17(S),18(R)-EpETE, or vehicle only on days 0 and 5 at 30 min before DNFB treatment. (C) On day 7, ear thickness was measured. (D) On day 7, flow cytometry was used to count the cell number of Ly6G⁺ CD11b⁺ neutrophils. Each point represents data from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians. Statistical significance was calculated by using one-way ANOVA; **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, N.S., not significant.

5. BM-3 17(S),18(R)-EpETE の好中球仮足形成抑制活性

好中球走化性因子である fMLP による刺激を受け、好中球が移動する際に伸ばす仮足の形成を(±)17,18-EpETE は GPR40 依存的に抑制することが報告されていた³²。そこで次に、好中球の仮足形成に対する BM-3 17(S),18(R)-EpETE の影響を骨髄から分離した好中球を用いて調べた。

fMLP 刺激を受けた好中球は重合アクチンからなる突起構造（仮足）を形成することから、重合アクチンを蛍光標識 Phalloidin によって染色し、顕微鏡で観察した際に、重合アクチンが一方向に局在している状態を仮足が形成されていると判断した。仮足形成の有無を観察した結果、BM-3 17(S),18(R)-EpETE を添加することで fMLP 誘導性の好中球の仮足形成が抑制されることが分かった（Figure 1-6）。一方、GPR40 欠損マウスの骨髄由来好中球を用いた検討では、BM-3 17(S),18(R)-EpETE を添加しても好中球の仮足形成は抑制されなかった。このことから、Cayman (±)17,18-EpETE を用いて行われた以前の報告結果と一致して³²、BM-3 17(S),18(R)-EpETE は GPR40 依存的に好中球の仮足形成を抑制することが明らかになった。

fMLP は好中球の一次走化性因子として知られるのに対して、炎症局所へと浸潤してきた好中球自身が産生し、さらなる好中球の浸潤を促す LTB₄ は二次走化性因子として知られる。そこで、LTB₄ 誘導性の仮足形成に対しても同様の検討を行った。その結果、野生型マウス由来の好中球を用いた際には、BM-3 17(S),18(R)-EpETE が LTB₄ 誘導性の仮足形成を抑制したのに対して、GPR40 欠損マウス由来の好中球では仮足形成を抑制しなかった (Figure 1-6)。このことから、BM-3 17(S),18(R)-EpETE は好中球の一次ならびに二次走化性因子による刺激に対して、GPR40 依存的に好中球の仮足形成を阻害することが明らかになった。

次に、CHS 発症に関わるケモカインとして、好中球を誘引するケモカインである CXCL1、CXCL2 及び T 細胞を誘引するケモカインである CXCL9、CXCL10 の遺伝子発現に対する BM-3 17(S),18(R)-EpETE の影響を調べた。その結果、炎症惹起後の耳における *Cxcl1*、*Cxcl2*、*Cxcl9*、*Cxcl10* 遺伝子発現量に対する BM-3 17(S),18(R)-EpETE 投与の影響は認められなかった (Figure 1-7)。さらに、CHS 増悪のエフェクターとして知られる IFN- γ をコードする遺伝子 *Ifng* の耳における遺伝子発現量を調べたところ、BM-3 17(S),18(R)-EpETE は *Ifng* 遺伝子発現量に影響を与えなかった (Figure 1-7)。このことから、BM-3 17(S),18(R)-EpETE は CHS 発症に関わる反応のケモカイン遺伝子発現増加や T 細胞活性化の抑制作用は示さず、好中球選択的に作用することが示唆された。

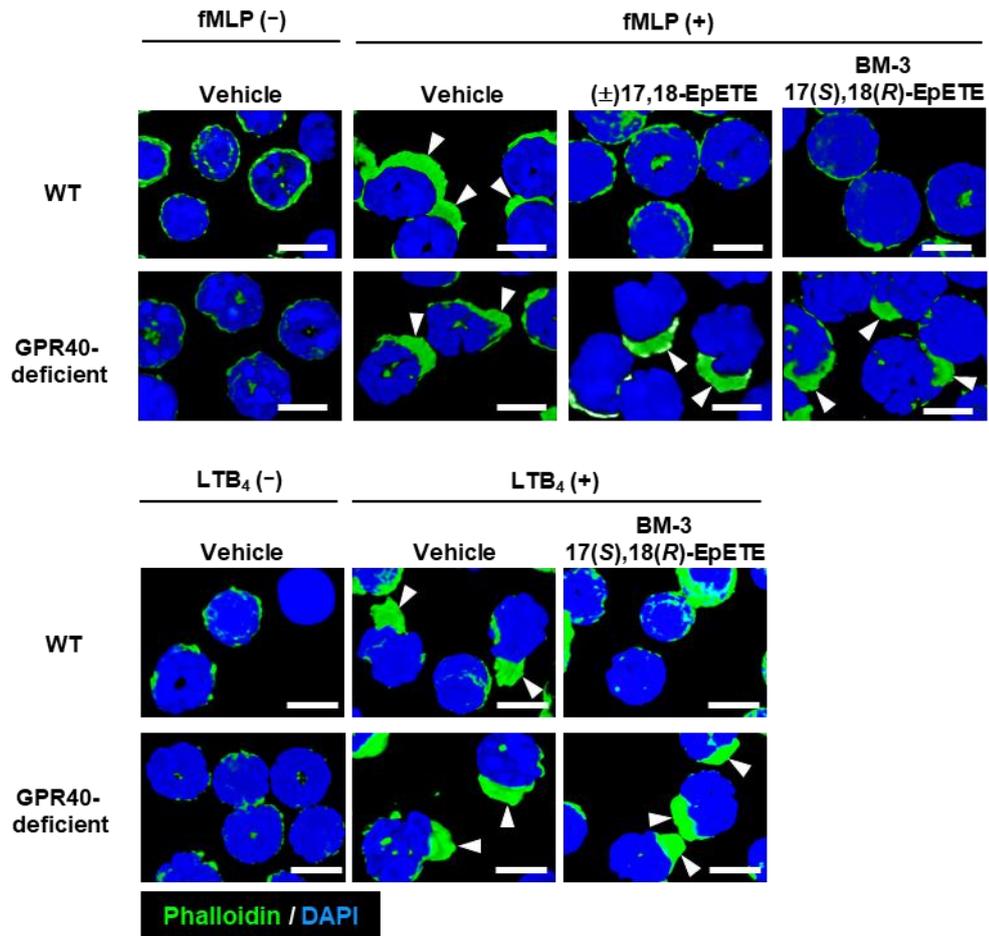


Figure 1-6. BM-3 17(S),18(R)-EpETE inhibited fMLP- and LTB₄-induced neutrophil pseudopod formation through GPR40

Neutrophils were isolated from the bone marrow of wild type and GPR40-deficient mice and stained with Acti-stain 488–phalloidin and DAPI for evaluation of pseudopod formation. Neutrophils were incubated with commercially available Cayman (±)17,18-EpETE, BM-3 17(S),18(R)-EpETE, or vehicle only for 15 min before stimulation with fMLP or LTB₄ for 2 min. Data are representative of two to four independent experiments. Arrowheads indicate pseudopods. Bars, 5 μm.

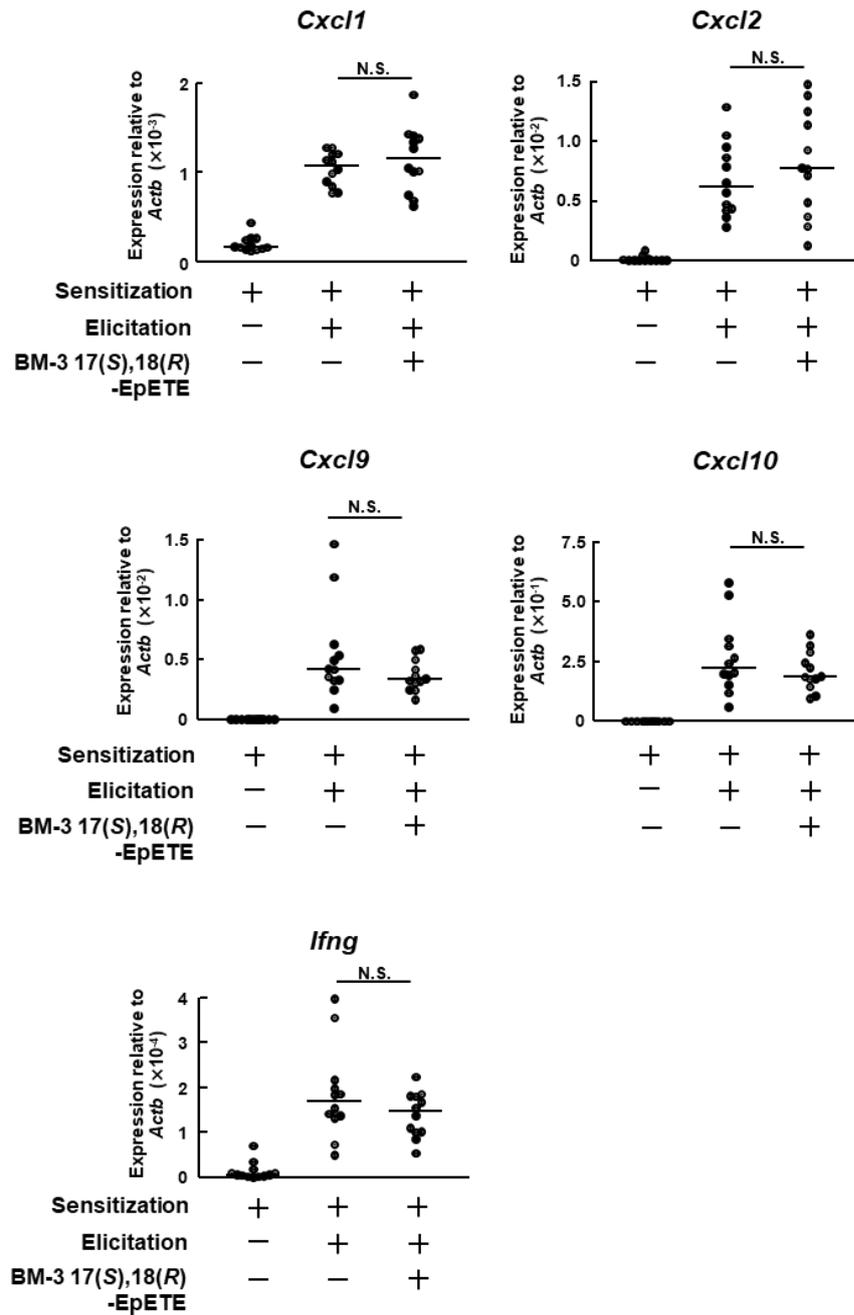


Figure 1-7. BM-3 17(S),18(R)-EpETE did not affect gene expressions of chemokines and cytokine

Mice were i.p. injected 100 ng/administration of BM-3 17(S),18(R)-EpETE, or vehicle only on days 0 and 5 at 30 min before DNFB application. On day 7, ear tissues were homogenized for isolation of mRNA, and qPCR analysis was performed to measure *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, and *Ifng* expression, which was normalized to the expression of *Actb*. Each point represents data

from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians. The statistical significance was calculated by using one-way ANOVA; N.S., not significant.

6. BM-3 17(S),18(R)-EpETE 及び 18-HEPE、RvE1 の添加濃度依存的な好中球仮足形成抑制活性

CYP はサブタイプによって触媒する反応が異なり、例えば EPA の 17,18-EpETE への変換に関わるエポキシ化反応の他、水酸化反応や脱アルキル化反応など多岐にわたる酸化反応を触媒する。従って、CYP は EPA を基質とした際に 17,18-EpETE の生成を担うだけでなく、RvE1 の前駆体であり、それ自身も心臓の炎症や線維化を抑制する作用を持つ 18-HEPE の生成にも関わる^{44,45}。さらに、18-HEPE と RvE1 の機能の一つとして好中球の遊走を抑制することが報告されていたことから^{44,46}、18-HEPE 及び RvE1 と BM-3 17(S),18(R)-EpETE の好中球の仮足形成抑制活性を比較した。

マウス骨髄由来好中球を fMLP で刺激すると、BM-3 17(S),18(R)-EpETE、18-HEPE、RvE1 の全てが 1 $\mu\text{mol/L}$ 、100 nmol/L で仮足形成を抑制することが分かった (Figure 1-8A, B)。一方、BM-3 17(S),18(R)-EpETE は 10 nmol/L でも仮足形成を抑制したが、18-HEPE ならびに RvE1 は仮足形成を抑制しなかった。BM-3 17(S),18(R)-EpETE の仮足形成抑制活性は 1 nmol/L で消失した。

さらに、好中球を LTB₄ で刺激した場合には、BM-3 17(S),18(R)-EpETE、18-HEPE、RvE1 の全てが 1 $\mu\text{mol/L}$ 、100 nmol/L で仮足形成を抑制することが分かった (Figure 1-9A, B)。一方、fMLP で刺激した場合とは異なり、BM-3 17(S),18(R)-EpETE は 10 nmol/L で仮足

形成を抑制しなかったが、18-HEPE と RvE1 は仮足形成を抑制し、18-HEPE と RvE1 は共に 1 nmol/L で仮足形成抑制活性を消失した。

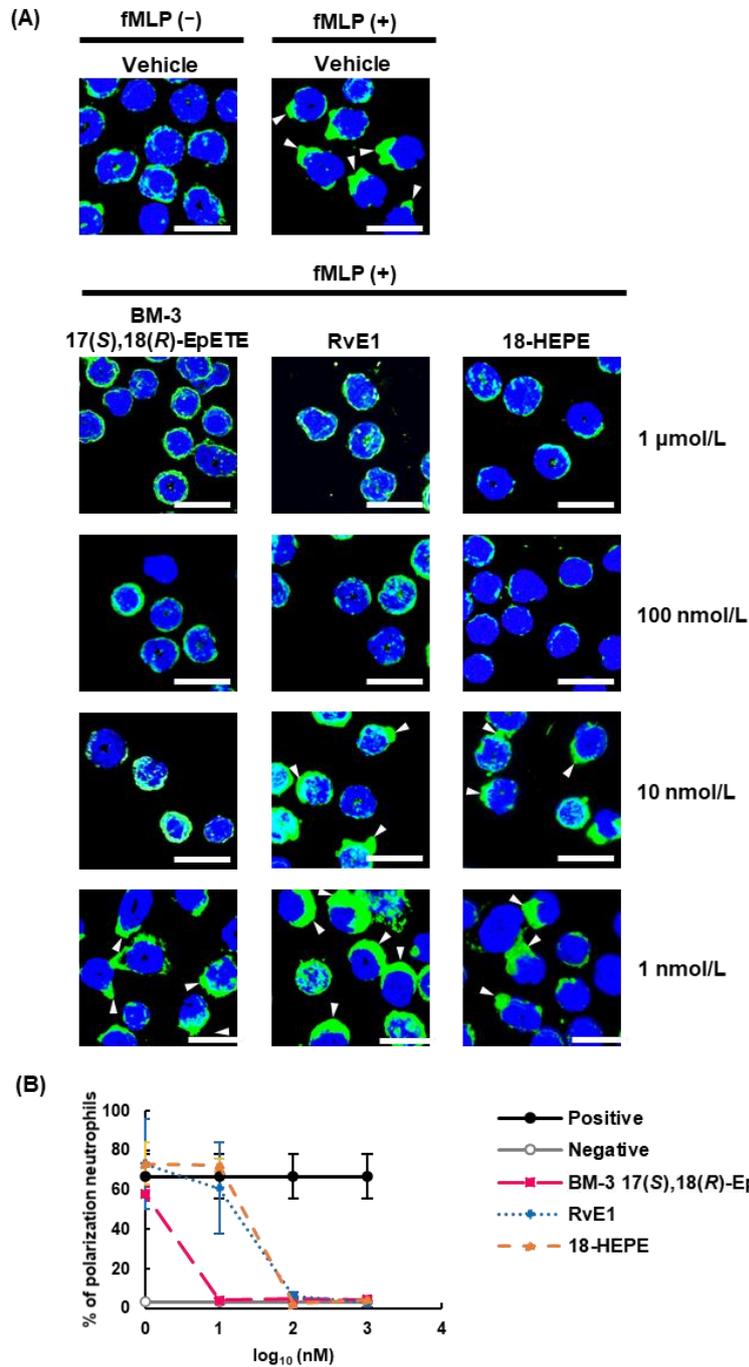


Figure 1-8. The inhibitory effects of BM-3 17(S),18(R)-EpETE, RvE1, and 18-HEPE on fMLP-induced neutrophil pseudopod formation

(A-B) Neutrophils were isolated from the bone marrow of wild type mice and stained with Acti-stain 488-phalloidin and DAPI for analysis of pseudopod formation. Neutrophils were incubated

with BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE, RvE1, or 18-HEPE (1 $\mu\text{mol/L}$, 100 nmol/L , 10 nmol/L , 1 nmol/L), or vehicle only (0.03% ethanol solution) for 15 min before stimulation with fMLP for 2 min. Representative images from two independent experiments are shown. Arrowheads indicate pseudopods. Bars, 10 μm . (B) The ratios of pseudopod formation of neutrophils were calculated from two independent experiments (mean \pm SEM).

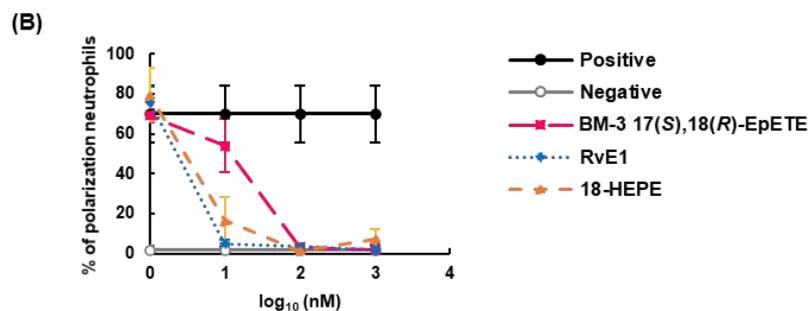
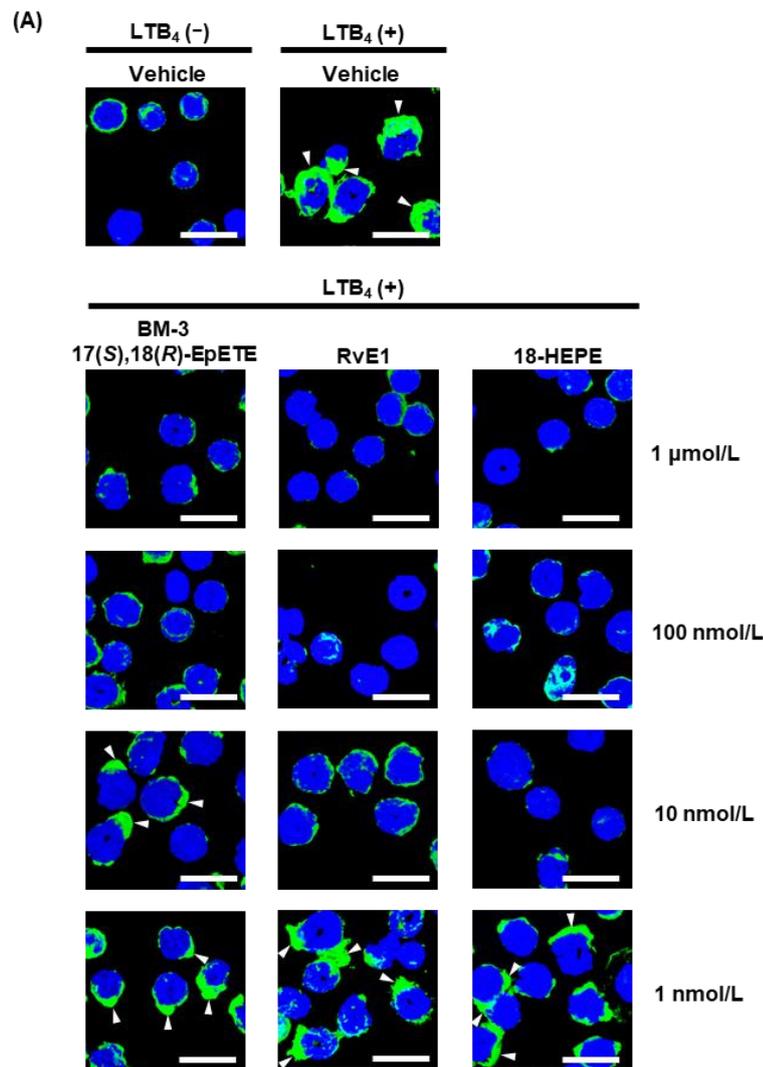


Figure 1-9. The inhibitory effects of BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE, RvE1, and 18-HEPE on LTB₄-induced neutrophil pseudopod formation

Neutrophils were isolated from the bone marrow of wild type mice and stained with Acti-stain 488-phalloidin and DAPI for analysis of pseudopod formation. Neutrophils were incubated with BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE, RvE1, or 18-HEPE (1 μmol/L, 100 nmol/L, 10 nmol/L, 1 nmol/L), or vehicle only (0.03% ethanol solution) for 15 min before stimulation with LTB₄ for 2 min. Representative images from two independent experiments are shown. Arrowheads indicate pseudopods. Bars, 10 μm. (B) The ratios of pseudopod formation of neutrophils were calculated from two independent experiments (mean ± SEM).

考察

一般的に不斉合成などの工夫を行わずに化合物の化学合成を行うと、S体とR体の鏡像関係にある化合物が等量ずつ混ざったラセミ体が生成される。2種類の鏡像異性体の物理化学的な性質はほとんど同じであるが、生理活性が大きく異なる事例が存在することから⁴⁷、片方の有効な活性を有する鏡像異性体のみを含有した医薬品を製造することで、効果の増強や副作用の低減、安全性の向上、服用量の減少などが期待できる。片方の異性体が有効な活性を示す一方で、もう片方の異性体の活性が副作用となり悪影響を及ぼした有名な事例として、1950年代後半に睡眠薬や鎮静薬として開発されたサリドマイドが挙げられる。サリドマイドが開発された当初はサリドマイドのS体とR体の2つの鏡像異性体を分離することが難しく、2つの異性体が混ざった状態で販売された。サリドマイドはR体が鎮静・催眠作用を持つのに対して、S体には催奇形性作用があった^{48,49}。このことから、R体の持つ活性が望む活性であったのに対して、S体の活性が副作用として現れ、大規模な薬害が起こった^{48,49}。この事件をきっかけに、特に医学・薬学の分野において鏡像異性体の生理活性に注意が払われるようになり、現在では、片方の異性体の持つ望ましくない影響を回避し、薬の治療効果を最適化するために単一の鏡像異性体を用いた医薬品の開発が推奨されている。

本研究から(±)17,18-EpETEの2種類の鏡像異性体のうち17(S),18(R)-EpETEが強いアレルギー性皮膚炎抑制活性を示すことが明らかになったが、反対に17(R),18(S)-EpETE

もまた、17(*R*),18(*S*)-EpETE 特有の生理機能を示すことが報告されている^{50,51}。例えば、新生児ラット心筋細胞を用いた検討から、17(*R*),18(*S*)-EpETE はカルシウム活性化カリウムチャンネルを活性化することで心拍数を減少させる負の変時作用を示す一方で、17(*S*),18(*R*)-EpETE は影響を与えないことが報告されている⁵⁰。交感神経の興奮は心臓への作用として強心作用を示すが、長期的には心臓への負担を増すことで心臓の疲弊ならびに心不全を誘発するため、負の変時作用を持つ医薬品が心不全の治療に用いられている^{50,52}。従って、17(*R*),18(*S*)-EpETE は心不全の治療に役立つ可能性がある。さらに、17(*R*),18(*S*)-EpETE はラット大脳動脈血管平滑筋細胞におけるカルシウム活性化カリウムチャンネルを活性化することで、血管拡張を促進する一方で、17(*S*),18(*R*)-EpETE にその活性は認められないことが報告されている⁵¹。これらのことから、17(*R*),18(*S*)-EpETE はカルシウム活性化カリウムチャンネルを、17(*S*),18(*R*)-EpETE は GPR40 を介して、それぞれ異なる生理機能を制御することが示唆された。従って、17(*R*),18(*S*)-EpETE と 17(*S*),18(*R*)-EpETE はラセミ体としてではなく、単一の鏡像異性体として医薬品原料に用いられるべきであり、特に 17,18-EpETE の抗炎症作用を主とした医薬品を開発する際には、17(*S*),18(*R*)-EpETE 単一で用いることで、17(*R*),18(*S*)-EpETE の持つ血管拡張作用に起因する血圧の急激な低下や、赤ら顔などの副作用のリスクを低減できると期待する。

好中球は重合アクチンを網目状にした仮足を形成することで、細胞の移動を可能にしている⁵³。特に、細胞内シグナル伝達因子である Rac の活性化は、細胞移動に働く

葉状仮足の形成を促進するため、細胞遊走過程において重要なプロセスである^{54,55}。著者の所属する研究室ではこれまでに、(±)17,18-EpETE が GPR40 依存的に好中球の fMLP 誘導性の Rac 活性化を抑制することで仮足形成を阻害することを報告していた³²。さらに本研究から、BM-3 17(S),18(R)-EpETE が GPR40 依存的に fMLP と LTB₄ の両方の刺激に起因する仮足形成を抑制することが明らかになった。好中球の Rac 活性化は fMLP だけでなく LTB₄ によっても引き起こされることから⁵⁶、BM-3 17(S),18(R)-EpETE は fMLP 及び LTB₄ 刺激により誘導される Rac 活性化を抑制することで好中球の仮足形成を阻害することが示唆された。一方、RvE1 は LTB₄ 受容体の BLT1 のアンタゴニストとして作用する他、chemokine-like receptor 1 (ChemR23) のアゴニストとしても作用することが報告されている⁵⁷。このことから RvE1 は、BLT1 アンタゴニストとしての作用を介して LTB₄ 誘導性の仮足形成を抑制したと考えられる。さらに、ChemR23 を介したシグナルの活性化が fMLP 誘導性の好中球の走化性を減弱することが報告されていることから⁵⁸、ChemR23 のアゴニストとしての作用を介して fMLP 誘導性の仮足形成を抑制したと考えられる。18-HEPE は好中球が発現する 5-LOX を介して RvE1 へと変換されることから⁵⁹、18-HEPE 自身が好中球の仮足形成を抑制した可能性の他、RvE1 への代謝を介して好中球の仮足形成を抑制した可能性が考えられる。これらのことから、RvE1 とその前駆体の 18-HEPE は GPR40 非依存的に fMLP と LTB₄ の両方の刺激に起因する好中球の仮足形成を抑制したと考えられ、GPR40 依存的に好中球の仮足形成を抑制し

た 17(S),18(R)-EpETE とは異なる作用メカニズムで好中球遊走抑制活性を示すことが示唆された。

好中球は ACD の制御において重要な標的細胞となることが知られており、例えば、抗 Ly6G 抗体により好中球を特異的に除去すると、CHS の耳介の腫れが減弱することが報告されている⁶⁰。通常好中球は血中を循環しているが、炎症性サイトカインやケモカインの刺激を受けて炎症局所へと浸潤した活性化好中球は、プロテアーゼなどの顆粒の放出及び活性酸素種や炎症性サイトカイン、LTB₄ などの炎症性メディエーターの産生を介して、炎症増強と組織傷害を引き起こす⁶¹。このような、好中球の浸潤を介した炎症の増悪は ACD だけでなく、乾癬や腹膜炎、アテローム性動脈硬化など多様な炎症性疾患でも認められることから⁶²⁻⁶⁴、好中球の浸潤を直接抑制する 17(S),18(R)-EpETE は好中球性の炎症性疾患の発症抑制・改善に対して幅広く活用できる可能性がある。また、17,18-EpETE の受容体として同定された GPR40 は、DC や T 細胞、マクロファージ、肥満細胞に比べて好中球で高く発現することや³²、17(S),18(R)-EpETE は CHS 誘導に関わる T 細胞の活性化及び炎症性サイトカインやケモカインの産生には影響を与えないことから、17(S),18(R)-EpETE は他の免疫細胞の活性を不適切に制御することで引き起こされる副作用を示す可能性が低いと考えられる。

これまでに、 α リノレン酸を豊富に含む亜麻仁油を摂取すると、体内で α リノレン酸代謝物である EPA や DHA とそれらの代謝物の量が増加することが報告されてお

り、特に 17,18-EpETE が腸で高産生される EPA 代謝物であることが分かっていた³¹。

従って、腸における CYP 活性は LOX や COX などの他の脂質代謝酵素と比べて高い可能性はある。さらに CYP は肝臓や肺、腎臓、脳、皮膚などその他の臓器にも存在することから、体内の様々な部位で 17,18-EpETE が産生されると考えられる⁶⁵⁻⁶⁹。しかしながら、ヒトでは 58 種、マウスでは 108 種類の CYP が存在し^{34,70,71}、各種 CYP の基質特異性や生成物の立体選択性が異なるため、どちらの異性体が生成されるのかは反応を触媒する CYP の種類に依存する。例えば、EPA を 17,18-EpETE へと変換可能なマウスの体内に存在する CYP の中でも、CYP1A2 は EPA を 17(R),18(S)-EpETE へと立体選択的に変換する一方で、CYP4F18 は 17(S),18(R)-EpETE へと変換し、CYP2C50 や CYP4A12A、CYP4A12B は生成物の立体選択性が低く 17(R),18(S)-EpETE と 17(S),18(R)-EpETE の混合物を産生する³³。ヒトの CYP の場合、CYP1A1 や CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2E1、CYP2J2、CYP3A4 は高い 17(R),18(S)-EpETE 変換活性を示す一方で、CYP2C8 や CYP2D6 は高い 17(S),18(R)-EpETE 変換活性を示す^{72,73}。加えて、CYP には多様な遺伝子多型が存在し、遺伝子多型の影響を受けて酵素活性が変わることが知られていることから^{67,74,75}、17(S),18(R)-EpETE の体内産生量には個人差があると考えられる。また、CYP 遺伝子発現量は様々な因子により調節されており、例えば、17(R),18(S)-EpETE を立体選択的に産生する *Cyp1a2* 遺伝子発現は芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AhR) リガンドの影響を受け、ブロッコリーやキャベツ、カリフラワーなど様々な野菜中に豊富に含まれているインドール-3-カルビノールなど天然に存在する AhR リガンド

によって活性化されることが報告されている^{72,76,77}。また、CYP4A12を含むCYP4A10やCYP4A14などのCYP4Aファミリーの遺伝子発現は、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体（peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR） α の活性化によって抑制されることから、PPAR α の強力なリガンドとして働くEPAやDHAを含む長鎖多価不飽和脂肪やポリフェノール、カロテノイド類の影響を受けることが示唆される⁷⁸⁻⁸⁴。これらのことから、EPAの代謝効率つまり、体内における17(S),18(R)-EpETE産生量は基質となるオメガ3脂肪酸摂取量だけでなく、脂質と一緒に摂取する食事成分による影響も受けると考えられる。さらに、腸内細菌をはじめとする微生物もまた脂肪酸代謝に関わることから^{4,85}、体内に存在する腸内細菌や、*B. megaterium*など*Bacillus*属微生物を含むみそや納豆など発酵食品由来の微生物が17(S),18(R)-EpETE産生量に影響を与える可能性がある。このように、17(S),18(R)-EpETE産生活性は様々な因子による影響を受けると考えられることから、抗炎症作用や抗アレルギー作用など望ましい生理活性を得るためには、前駆体となる α リノレン酸やEPAを摂取するよりも、生理活性を有する目的の脂肪酸代謝物を直接摂取した方が個人差なく、効率良く効果を得ることができる。と考える。

本研究において確立した微生物酵素を用いた17(S),18(R)-EpETE合成方法を活用することで、低環境負荷、低エネルギーコストといったバイオ変換の利点を生かした17(S),18(R)-EpETEの大量供給が可能になると考え、17(S),18(R)-EpETEの医薬品や健康食品素材としての実用化が可能になると期待する。さらに、EPAから17(S),18(R)-

EpETE への変換効率が高い CYP を保持する食経験のある微生物の探索を進めることで、プロバイオティクスとしての展開も可能であると考え。プロバイオティクスが生み出す微生物由来の有益な代謝物はポストバイオティクスと呼ばれ、新たな概念として近年注目を集めていることから、17(*S*),18(*R*)-EpETE の素材としての応用展開に加えて、将来的にはその産生能を持つ微生物を活用した健康食品としての応用展開も可能であると期待する。

小括

本研究により、17,18-EpETE の 2 種類の鏡像異性体のうち 17(*R*),18(*S*)-EpETE よりも 17(*S*),18(*R*)-EpETE に強い抗炎症活性があることが明らかになった (Figure 1-10)。さらに、*B. megaterium* 由来 CYP の BM-3 を用いて産生した BM-3 17(*S*),18(*R*)-EpETE もまた CHS 抑制活性を有し、そのメカニズムとして GPR40 を介して好中球の仮足の形成を阻害し、炎症部位への好中球の浸潤を抑制することを明らかにした。これらのことから、微生物酵素を活用した機能性脂肪酸代謝物の立体選択的な産生が有用であることが分かった。

今後、本研究成果を基盤として、微生物酵素を用いた機能性脂肪酸代謝物の立体構造特異的かつ安定した大量生産と供給が可能になり、17(*S*),18(*R*)-EpETE が医薬品素材や機能性食品素材などとして幅広く利用されることを期待する。

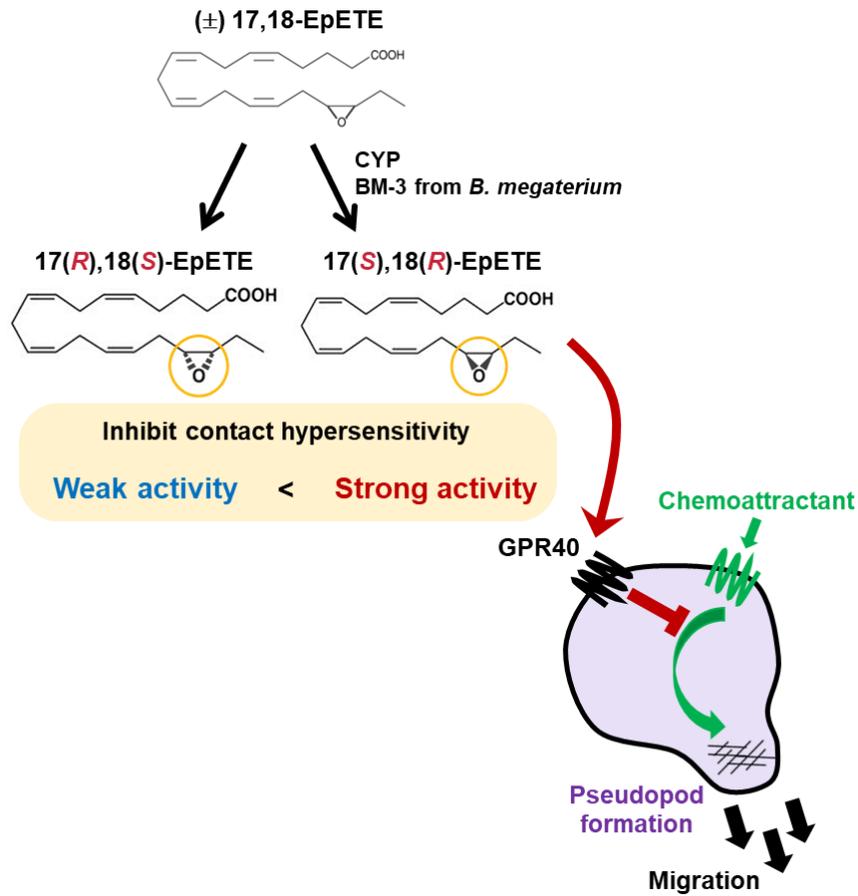


Figure 1-10. Graphical summary⁴³

17(*S*),18(*R*)-EpETE has strong anti-inflammatory activity compared with 17(*R*),18(*S*)-EpETE. In addition, 17(*S*),18(*R*)-EpETE, which is converted stereoselectively from EPA by CYP BM-3 derived from *B. megaterium*, inhibited the CHS development by inhibiting neutrophil pseudopod formation in a GPR40-dependent manner. Our findings revealed that bacterial enzymatic conversion of fatty acid is a promising strategy for mass production of functional lipid metabolites.

第二章

皮膚に特徴的なオメガ3脂肪酸代謝環境を介して産生される

脂肪酸代謝物の同定とアレルギー性皮膚炎抑制機序の解明

背景

炎症収束作用・抗炎症作用を持つオメガ3脂肪酸代謝物の産生は、アラキドン酸カスケードで働く酸化酵素である COX、LOX、CYP によって主に触媒される¹⁶。前章でも述べているように、これら酵素には反応特異性や基質特異性など酵素活性が異なる多様なサブタイプが存在し、酵素の機能上の特性が異なるだけでなく、発現分布や遺伝子発現制御機構も異なることが知られている。例えば、COX には酵素活性がそれぞれ異なる COX-1 と COX-2 の 2 種類が存在し、特に COX-2 は広い基質特異性を有するという特徴がある⁸⁶。また、COX-1 は正常動物細胞や組織において定常的に発現する一方、COX-2 は炎症性サイトカインや炎症性メディエーターによって発現が誘導される誘導型酵素である⁸⁶。COX を標的とした抗炎症剤は一般用医薬品としても広く用いられており、例えば、NSAIDs の一種であるアスピリンは COX-1 と COX-2 を不活性化し、COX-1 及び COX-2 により触媒されるアラキドン酸からプロスタグランジン類前駆体のプロスタグランジン G₂ への変換を阻害することで解熱、鎮痛作用といった抗炎症作用を示す⁸⁷。しかし、アスピリン処理された COX-2 の酸化活性は完全に消失せず、LOX 様活性を保持したままとなることから、アスピリン処理さ

れた COX-2 はアラキドン酸をプロスタグランジン G₂ とは異なる代謝物 5-ヒドロキシエイコサテトラエン酸へ変換するといった特徴を持つ^{86,88}。この COX-2 の特性を利用した反応により、EPA から RvEs 前駆体である 18-HEPE を産生できることが報告されている⁴⁴。

LOX にはそれぞれ添加する酸素の位置及び生成物の立体選択性が異なる酵素が見いだされており⁸⁹、例えば EPA を基質とした場合には、15-LOX と 15-LOX-2 の作用により 15(S)-HEPE が、12-LOX の作用により 12(S)-HEPE が、12R-LOX の作用により 12(R)-HEPE が、5-LOX の作用により 5(S)-HEPE が主に産生される⁸⁹。また、マウスに発現する LOX はヒトと比べて生成物の特異性が低く、例えば、*Alox15b* にコードされる 15-LOX-2 は 15-LOX としての活性だけでなく、不飽和脂肪酸の 8 位に酸素を添加する 8-LOX 様活性も持つ⁸⁹。体内における各種 LOX の分布は細胞の種類によって異なり、15-LOX-2 や 12-LOX、12R-LOX は主に皮膚や上皮細胞、血小板において発現が認められる一方で、15-LOX 及び 5-LOX は白血球に局在して発現すると言われている⁸⁹。また、EPA 代謝物であり強い抗炎症活性を示す RvEs は、18-HEPE を共通の基質とした LOX 代謝を経て産生され、RvE1 と RvE2 は共に好中球に高発現する 5-LOX によって^{16,44,90}、RvE3 は好酸球に高発現する 15-LOX によって産生される⁹¹。

CYP は肝臓や腸、皮膚、腎臓、肺、脳などほとんど全ての臓器において発現が認められる酵素であり、多数のサブタイプが同定されている。各種 CYP はそれぞれ代謝効率や酵素活性に違いがあるものの、一般に基質特異性は低いことが知られている⁹²。CYP

を介して産生される脂肪酸代謝物として、例えば、アラキドン酸を基質とした場合には血管新生作用や血管拡張作用などを持つ生理活性物質であり、腫瘍形成との関連が指摘されている 11,12-エポキシエイコサトリエン酸 (epoxyeicosatrienoic acids; EET) や 14,15-EET^{93,94}、EPA を基質とした場合には抗アレルギー、抗炎症作用を持つ 17,18-EpETE があげられる³¹。また、EET や 17,18-EpETE といったエポキシ環構造を持つ脂肪酸は、体内で可溶性エポキシド加水分解酵素の働きによりさらに代謝され、ジヒドロキシエイコサトリエン酸やジヒドロキシエイコサテトラエン酸 (dihydroxyeicosatetraenoic acid; diHETE) が産生されることが知られている^{32,93,94}。

著者の所属する研究室ではこれまでに、オメガ3脂肪酸の1種である α リノレン酸を豊富に含む亜麻仁油を摂取したマウスの腸管では α リノレン酸とその代謝物のEPAが増加するのに伴い、EPAがCYPによって代謝されて生じる17,18-EpETEが高生産され、本代謝物が亜麻仁油を摂取した際に認められる食物アレルギー誘導性の下痢の抑制効果を担う抗アレルギー物質として機能することを明らかにした³¹。一方、亜麻仁油を摂取したマウスの母乳中には、EPA代謝物のDPAがさらに12-LOXによって代謝された14-ヒドロキシドコサペンタエン酸 (hydroxydocosapentaenoic acid; HDPA) が高濃度含まれることを報告しており、実際、乳腺において認められた特徴的な脂肪酸代謝環境を介して14-HDPA産生が優位に行われていた⁹⁵。さらに、14-HDPAは母乳を介して仔マウスに移行し、形質細胞様樹状細胞に発現する抑制性分子の発現を誘導することで、仔マウスのCHSを抑制することを明らかにしていた⁹⁵。

これらのことから、食事として摂取したオメガ3脂肪酸は体内に吸収された後、強力な抗炎症・炎症収束作用を発揮する代謝物に変換されるが、産生される脂肪酸代謝物の量や種類は臓器によって異なると考えられた。つまり、オメガ3脂肪酸の各臓器特有の「代謝」が重要な役割を果たすことが分かってきている。

オメガ3脂肪酸代謝物は、炎症反応後期の炎症収束期にて濃度が増加し、積極的に炎症の収束に関わる炎症収束性脂質メディエーターとして見いだされたことから、炎症発症前後の脂肪酸代謝物量を比較した際に、濃度が増加するオメガ3脂肪酸代謝物の同定と生理活性評価がこれまで活発に行われてきた。例えば、マウス急性腹膜炎の炎症局所では、炎症誘導後の収束期に RvE1 やプロテクチン D1 などの抗炎症活性を持つ脂肪酸代謝物の産生量が増加し、その濃度は炎症の収束とともに減少していくことが報告されていた²⁰。一方で、臓器特異的なオメガ3脂肪酸代謝の解明はあまり進められておらず、特に皮膚局所における代謝はこれまで解明されてこなかった。このような背景から、皮膚特有のオメガ3脂肪酸代謝を介して高産生されるオメガ3脂肪酸代謝物が存在し、その代謝物が皮膚での免疫応答を制御することで抗炎症活性を発揮する可能性があると考えた。そこで本研究では、亜麻仁油を摂取したマウスの皮膚におけるオメガ3脂肪酸代謝を解析し、皮膚において特徴的に産生されるオメガ3脂肪酸代謝物の同定を試みた。さらに、同定したオメガ3脂肪酸代謝物の ACD 抑制活性の評価及び作用メカニズムの解明を行った。

方法

【実験動物】

日本クレアもしくは日本 SLC より購入した 6~8 週齢の C57BL/6 及び BALB/c の雌マウスを実験に用いた。特殊飼料 (Table 2) として、4% (wt/wt) 大豆油含有飼料 (オリエンタル酵母) または 4% (wt/wt) 亜麻仁油含有飼料 (オリエンタル酵母) を用い、2 カ月間マウスに給餌した後に実験に用いた。

解剖時はイソフルランを用いて麻酔後、頸椎脱臼をすることでマウスの苦痛を最小限にして安楽死させた。動物の飼育及び実験は全て、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所動物実験規程に準じ、承認を得た計画に従って行った (DS27-47R9、DS27-48R10)。

Table 2. Composition of diets

Ingredient	Concentration (% wt/wt)	
	Soybean oil diet	Linseed oil diet
Casein	14.0	14.0
L-Cysteine	0.18	0.18
Corn starch	46.5692	46.5692
Pregelatinized corn starch	15.5	15.5
Sucrose	10.0	10.0
Soybean oil	4.0	-
Linseed oil	-	4.0

Cellulose powder	5.0	5.0
AIN-93M mineral mix	3.5	3.5
AIN-93M vitamin mix	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.25	0.25
t-Butylhydroquinone	0.0008	0.0008
Total	100	100

【CHS の誘導】

第一章記載の方法で、CHS の誘導を行った。

評価対象の脂肪酸として、(±)12-HEPE (12-HEPE; Cayman Chemical)、12(*S*)-HEPE (Cayman Chemical)、12(*R*)-HEPE (Cayman Chemical)、(±)15-HEPE (15-HEPE; Cayman Chemical) を、DNFB を塗布する 30 分前に腹腔内投与または耳に塗布（一回あたり 100 ng または 1 μg）した。コントロールとして、腹腔内投与の場合は 0.5% (vol/vol) エタノール/PBS を、塗布の場合は 50% (vol/vol) エタノール/PBS を使用した。

レチノイド X 受容体 (retinoid X receptor; RXR) pan-antagonist である HX 531 (Cayman Chemical, 40 nmol/administration) は、12-HEPE を塗布する 60 分前に塗布した。コントロールとして 25% (vol/vol) ジメチルスルホキシド/PBS を使用した。

【FITC 誘導性 DC 遊走アッセイ】

シェーバーで毛を剃ったマウスの腹部に、1% (wt/vol) FITC (Sigma-Aldrich) /アセトン:フタル酸ジブチル (1:1 [vol/vol]) を 200 μL 塗布した。12-HEPE (一回あたり 1 μg)

もしくはコントロール (50% [vol/vol] エタノール/PBS) を、FITC を塗布する 30 分前及び 24 時間後に腹部に塗布し、FITC を塗布した 24 時間後及び 48 時間に腋窩リンパ節を回収した。

【細胞調製】

第一章記載の方法で、マウス耳組織からの細胞調製を行った。

リンパ節からの細胞回収においては、はさみを用いてリンパ節を細かく刻み、0.5 mg/mL コラゲナーゼを加えた 2% NCS/RPMI 1640 培地内で組織を攪拌しながらインキュベート (15 分、37°C) し、細胞懸濁液をセルストレイナー (100 µm) でろ過する操作を 2 回繰り返すことで、細胞懸濁液を得た。遠心 (400×g、5 分、4°C) 後、沈殿した細胞を溶血バッファーにより溶血 (1 分、室温) し、2% NCS/RPMI 1640 培地を添加して溶血反応を止めた。遠心 (400×g、5 分、4°C) 後の細胞を 2% NCS/PBS に懸濁し、セルカウントを行った。得た細胞は 2% NCS/PBS に懸濁し、フローサイトメトリーを用いた解析に供した。

【フローサイトメトリー解析】

第一章記載の方法で、フローサイトメトリー解析を行った。

下記の蛍光標識抗体 (1:100) で細胞を染色した。FITC-anti-Ly6G mAb、APC-Cy7-anti-CD11b mAb、FITC-anti-CD8α mAb (BioLegend, 100706, clone 53-6.7)、APC-anti-TCRβ mAb (BioLegend, 109212, clone H57-597)、Phycoerythrin (PE) -anti-CD31 mAb

(BD Biosciences, 553373, clone MEC 13.3)、APC–anti-CD49f mAb (BioLegend, 313616, clone GoH3)、APC–anti-CD34 mAb (BD Biosciences, 553733, clone RAM34)、BV421–anti-CD45 mAb、Alexa Fluor 647–anti-I-A^b mAb (BioLegend, 116412, clone AF6-120.1)。

細胞内サイトカイン染色時は、コラゲナーゼ処置の際に Brefeldin A (BioLegend) を加えて攪拌 (60 分、37°C) し、細胞を調製した。死細胞は Zombie-NIR Fixable Viability Kit (1:100; BioLegend) で染色した。細胞表面マーカーを染色した後、マーカーのプロトコルに従い、Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences) を用いて細胞の固定・透過処理を行った。サイトカインは PE–anti-IFN- γ mAb (1:100; BioLegend, 505808, clone XMG1.2) を用いて染色した。

サンプルの分析は MACSQuant または FACS Aria (BD Biosciences) を用いて行い、データ解析は FlowJo 9.9 ソフトを用いて行った。

【組織学的解析】

第一章記載の方法で、組織学的解析を行った。

免疫組織染色は、1 次抗体として purified anti-mouse I-A/I-E mAb (1:100; BioLegend, 107602, clone M5/114.15.2)、purified anti-mouse CD3 ϵ mAb (1:100; BioLegend, 100302, clone 145-2C11) を、2 次抗体として Alexa Fluor 488–anti-rat IgG (1:100; Thermo Fisher Scientific, A-11006)、Cy3–anti-Armenian hamster IgG (1:100; Jackson ImmunoResearch Laboratories, 127-165-160) を用いた。Ly6G 陽性の好中球染色の際は FITC–anti-Ly6G mAb を用いた。

【逆転写と定量 PCR】

皮膚として耳介を使用し、腸としては大腸を採取後、ピンセットを押し当てることで糞便等の内容物を除いた組織を使用した。組織からの RNA の精製は、メーカーの protocols に従い、Relia Prep RNA Tissue Miniprep System を用いて行った。FACSaria を用いて分取した細胞からの RNA 抽出はセパゾール（ナカライテスク）を用いて行い、Pellet Paint（Novagen）により核酸ペレットを可視化して RNA の抽出及び精製操作を行った。

第一章記載の方法で、逆転写と qPCR を行った。使用したプライマー配列は Table 3 に示した。

Table 3. Primers used for qPCR analysis

Species	Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Mouse	<i>Alox12</i>	gatcactgaagtggggctgt	cacacatggtgaggaaatgg
Mouse	<i>Alox12b</i>	cttggctctgatggcaac	gacaatcaggcccaggagt
Mouse	<i>Cyp2c44</i>	ccaaccctcgggattacat	cagatttcaggttggtttctcc
Mouse	<i>Cyp4f16</i>	aggattgttgaccctgcatt	ggcttcaggaagcgtaaaa
Mouse	<i>Cxcl1</i>	gactccagccacactccaac	tgacagcgcagctcattg
Mouse	<i>Cxcl2</i>	aaaatcatccaaaagataactgaacaa	cttggttcttccgttgagg
Mouse	<i>Cxcl9</i>	cttttctcttgggcatcat	gcatcgtgattccttatca
Mouse	<i>Cxcl10</i>	gctgccgtcattttctgc	tctcactggcccgtcatc
Mouse	<i>Gpr40</i>	ggggtgtgtgtgtggctat	ggaagtctccaagccaagg
Mouse	<i>Gpr120</i>	ttggtgttgagcgtcgtg	ccagcagtgagacgacaaaag

Mouse	<i>Lxra</i>	caggaagagatgccttgagg	tctccacaactccgttgc
Mouse	<i>Lxrb</i>	tgccagggttcttgcaat	agcgtctggctgtttctagc
Mouse	<i>Ppara</i>	cacgcatgtgaaggctgtaa	gctccgatcacacttgctg
Mouse	<i>Pparb</i>	gctcacaggcagagttgcta	tggtacaagtgagtgaggagaga
Mouse	<i>Pparg</i>	gaaagacaacggacaaatcacc	gggggtgatatgtttgaactg
Mouse	<i>Rxra</i>	acatgcagatggacaagacg	gggttgagagccccttaga
Mouse	<i>Rxrb</i>	gccactggcatgaaaagg	atctccatccccgtctttgt
Mouse	<i>Rxrg</i>	cagaagtgcctggatcatgg	cctcactctctgctgctct
Mouse	<i>Tnf</i>	ctgtagcccacgtcgtagc	ttgagatccatgccgttg
Mouse	<i>Gapdh</i>	ccttgagatcaacacgtaccag	cgctgtacactccaccac
Human	<i>CXCL1</i>	tcctgcatccccatagtta	cttcaggaacagccaccagt
Human	<i>CXCL2</i>	cccatggtaagaaaatcatcg	cttcaggaacagccaccaat
Human	<i>GPR40</i>	gtgtcacctgggtctggtct	ccaggagggtgttctgt
Human	<i>GPR120</i>	gctcatctggggctattcg	gcaaatcgaaatttctggt
Human	<i>LXRA</i>	gttataaccgggaagactttgc	aaactcggcatcattgagttg
Human	<i>LXRB</i>	ccgagcctgtagacctatcg	tcacccttctggaagactc
Human	<i>PPARA</i>	gcaactggaactggatgacag	ttagaaggccaggacgatct
Human	<i>PPARB</i>	gggaaaagtgttggcagga	tgcccaaaactgtacaaca
Human	<i>PPARG</i>	gacaggaaagacaacagacaaatc	gggggtgatgtgtttgaactg
Human	<i>RXRA</i>	acatgcagatggacaagacg	tcgagagccccttgaggt
Human	<i>RXRB</i>	aggtgggtgttgggaaag	ccccaagttagacaggaagagata
Human	<i>RXRG</i>	cctgcgagccattgtactct	aagggtggcataaaccttctc
Human	<i>GAPDH</i>	gagtccactggcgtcttcac	gttcacacccatgacgaaca

【マウス骨髄由来好中球の単離】

第一章記載の方法で、マウス骨髄由来好中球を単離した。

【好中球仮足形成の評価】

精製した好中球は 0.2% BSA/HBSS に懸濁後、フィブロネクチンをコーティングしたカバーガラス上に添加し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 15 分間インキュベートした。好中球を 12-HEPE (1 μmol/L) 及び 0.3% (vol/vol) エタノール/PBS (コントロール) と反応 (15 分、37°C、5% CO) させた後、1 μmol/L fMLP で刺激 (2 分、37°C、5% CO₂) した。コントロールには、0.03% (vol/vol) エタノール/PBS を用いた。反応後の好中球を 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、0.5% Triton X-100/PBS を使用して透過処理を行った。F-アクチンを 100 nmol/L Acti-stain 488-phalloidin で染色 (30 分、室温) 後、核を DAPI で染色 (30 秒、室温) することで調製したサンプルを、共焦点顕微鏡 TCS SP8 を用いて観察した。

【血管透過性の評価】

1% (wt/vol) エバンスブルー (Nacalai Tesque) /PBS 溶液をマウスに静脈注射し、1 時間後に耳組織を回収した。耳組織を 3 N KOH (Nacalai Tesque) 1 mL 中で一晩インキュベート (37°C) することで溶解させた後、組織懸濁液に 1.24 mol/L H₃PO₄ 1 mL を加えることで中和した。さらに、アセトン 3 mL を加えて良く攪拌後、遠心 (1280×g, 15 分、20°C) し、室温で 30 分間以上静置した後、上清の吸光度 (波長 620 nm) を測定した (SmartSpec Plus; Bio-Rad Laboratories)。エバンスブルーの濃度は 0~10 μg/mL の間で検量線を引くことで算出した。

【リポドミクス解析用サンプル調製】

皮膚として耳介を使用し、腸としては大腸を採取後、ピンセットを押し当てることで糞便等の内容物を除いた組織を使用した。ジルコニアビーズ (3.0 φ; Tomy) 5 粒及び (5.0 φ; Tomy) 1 粒を入れたチューブに組織とメタノール (終濃度 皮膚: 25 mg/mL、腸: 100 mg/mL) を加え、ビーズ破碎 (Precellys24 高速細胞破碎システム; Bertin Technologies、6500 rpm、15 秒×2) を行った後、-80°C で一晩静置することで、組織から脂肪酸を抽出した。脂肪酸抽出液を遠心 (1600×g、10 分、4°C) した後に得た上清に、カラム精製抽出効率を算出するための重水素標識内部標準 (15-hydroxyeicosatetraenoic acid-d8) を添加し、メーカーのプロトコルに従って、Mono Spin イオン交換カラム C₁₈-AX (GL Science) を用いたリポドミクス解析用サンプルの前処理を行った。

【リポドミクス解析】

液体クロマトグラフィー質量分析法 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS) を用いたリポドミクス解析には、Acquity UPLC BEH C18 column (Waters; 1.7 μm、1.0 × 150 mm) を付けた高速液体クロマトグラフィー (UPLC システム ACQUITY; Waters) と QTRAP 5500 (AB Sciex) 及び Orbitrap ELITE (Thermo Fisher Scientific) を用い、データ解析には Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific) を用いた。また、Kinetex C8 column (Shimadzu; 2.6 μm、2.1 × 150 mm) を付けた三連四重極型質量分析計 LCMS-8050 (Shimadzu) システムを用い、LC-MS/MS method package Ver. 3 for lipid mediators

(Shimadzu) を分析条件に設定して分析を行った。データ解析には Shimadzu Lab solution LCMS software (Shimadzu) を用いた。

Cayman Chemical 社製の 5-HEPE、12-HEPE、15-HEPE、18-HEPE、17,18-EpETE、17,18-diHETE を用いて、脂肪酸代謝物定量のための検量線を作製した。

【HaCaT 細胞の培養】

CLS Cell Lines Service (Eppenheim) から HaCaT 細胞⁹⁶を購入し、10% (vol/vol) ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS)、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle's medium with high glucose (DMEM; Sigma Aldrich) で培養 (37 °C、5% CO₂) した。

HaCaT 細胞を 96 well plate に播種し (3 × 10⁴ cells/well)、24 時間培養した後、FBS を含まない DMEM に培地を交換し、12-HEPE (300 nmol/L) を加えてインキュベート (30 分、37 °C、5% CO₂) 後、Recombinant Human TNF-α (Pepro Tech; 100 ng/mL) で刺激 (90 分、37 °C、5% CO₂) した。12-HEPE 添加のコントロールとして、終濃度 0.2% (vol/vol) となるようにエタノールを培地中に添加した。

RXR pan-antagonist HX 531 (2 µmol/L) は 12-HEPE を添加する 60 分前に加えた。コントロールとして、終濃度 0.2% (vol/vol) となるようにジメチルスルホキシドを培地中に添加した。

【siRNA を用いた RXRα ノックダウン】

HaCaT 細胞を 24 時間培養後、Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションを行った。メーカーのプロトコルに従い、RXR α siRNA (Hs_RXRA_3 FlexiTube siRNA; Qiagen) –Lipofectamine 2000 混合液もしくは Silencer negative Control siRNA (AllStars Negative Control siRNA; Qiagen) –Lipofectamine 2000 混合液を、培地交換後の HaCaT 細胞培養ディッシュに添加した (各種 siRNA 終濃度 33 nmol/L)。CO₂ インキュベーター (37°C) 内で 48 時間培養した後、細胞を新しいディッシュに播種し、再度、Lipofectamine 2000 と各種 siRNA (終濃度 33 nmol/L) を用いてトランスフェクションを行った。2 度目のトランスフェクション後、48 時間培養した細胞を実験に用いた。

【ウェスタンブロッティング】

培養細胞を冷却した PBS で洗浄後、RIPA Lysis Buffer (Merck Millipore) を添加し、セルスクレーパーを用いて細胞を氷上で剥がした。細胞を回収し、氷上で 30 分静置した後、遠心 (13,000×g、4°C、15 分) することで得た上清を細胞溶解液とした。

細胞溶解液のタンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。NuPAGE antioxidant (Invitrogen) 及び NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen) を用いて細胞溶解液の還元、変性処理 (10 分、70°C) を行った後、NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gels (Invitrogen) の各ウェルに細胞溶解液 (10 μ g protein) をアプライし、電気泳動 (200 V、60 mA、60 分) を行った。電気泳動後のゲル上のバンドは Immobilon-P transfer membran (Merck Millipore) に転写した (30 V、240 mA、40 分)。

メンブレンを 5% (wt/vol) スキムミルク/0.5% (vol/vol) Tween-20-PBS でブロッキング後 (1 時間、室温)、Can Get Signal solution-1 (TOYOBO) で希釈した 1 次抗体 anti-rabbit RXR α mAb (1:1000; Cell Signaling Technology, 3085S, clone D6H10) もしくは anti-mouse β -actin mAb (1:1000; BioLegend, 643802, clone 2F1-1) と反応させた (1 時間、室温)。0.5% Tween-20-PBS でメンブレンを洗浄後、Can Get Signal solution-2 (TOYOBO) で希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識 2 次抗体 donkey anti-rabbit IgG antibody (1:5000; BioLegend, 406401) もしくは goat anti-mouse IgG antibody (1:5000; SouthernBiotech, 1030-05) と反応させた (1 時間、室温)。0.5% Tween-20-PBS 及び、PBS で洗浄後、化学発光試薬 Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque) と反応させ、バンドを LAS-4000 mini-luminescent image analyzer (GE Healthcare) を用いて検出した。

【統計解析】

統計解析は Prism 3.03 software を用いて行い、二群間の比較は Mann–Whitney U test によって、多群間の比較は Kruskal–Wallis test によって行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

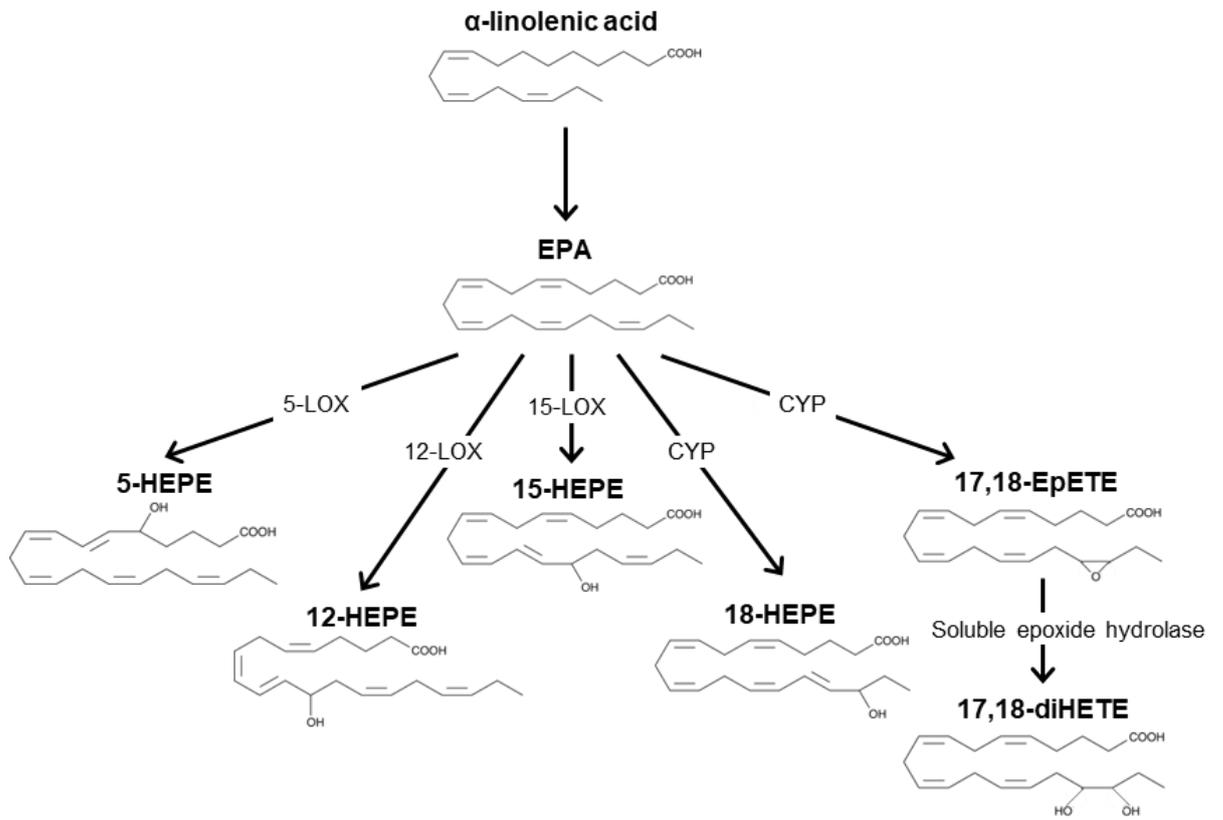
結果

1. オメガ 3 脂肪酸摂取時に皮膚において高生産される EPA 代謝物の同定

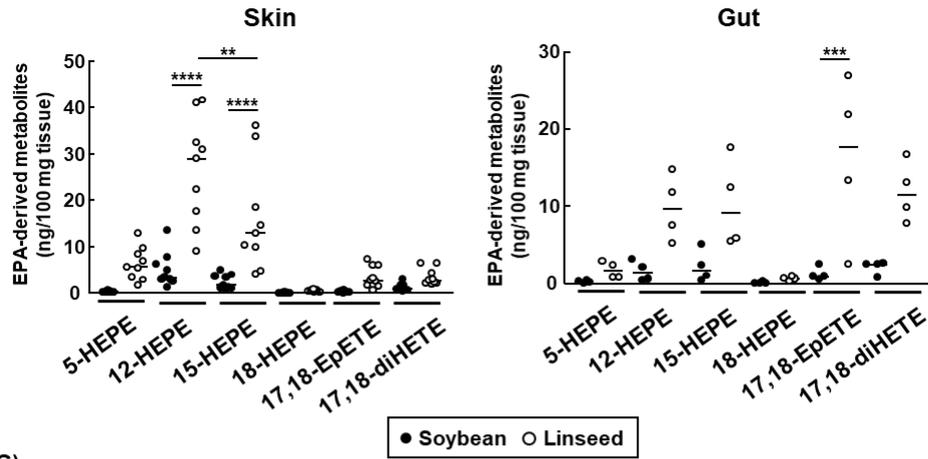
α リノレン酸を約 60%含む亜麻仁油を配合した特殊飼料を摂取した BALB/c マウスの腸管で、EPA 代謝物の 17,18-EpETE が高生産されることがこれまでに明らかにされていたことから³¹、まず初めに、亜麻仁油を摂取した BLAB/c マウスの皮膚（耳）とその比較臓器として腸におけるオメガ 3 脂肪酸代謝物を調べた。そこで亜麻仁油もしくはそのコントロールとして、 α リノレン酸を約 7%とオメガ 6 脂肪酸のリノール酸を約 50%含む大豆油を配合した特殊飼料を BLAB/c マウスに 2 か月間給餌し、皮膚と腸における EPA 代謝物を LC-MS/MS により分析した。その結果、大豆油を給餌したマウスと比べて亜麻仁油を給餌したマウスの皮膚では、EPA 代謝物（5-HEPE、12-HEPE、15-HEPE、18-HEPE、17,18-EpETE、17,18-diHETE : Figure 2-1A）の中でも 12-HEPE と 15-HEPE の量が有意に多かった（Figure 2-1B）。特に、亜麻仁油を摂取したマウスの皮膚では、12-HEPE が主要な代謝物として産生されることが分かった。一方、以前の報告と一致して³¹、亜麻仁油を給餌したマウスの腸では大豆油を給餌したマウスと比べて EPA 代謝物の中でも 17,18-EpETE の量が多かった（Figure 2-1B）。実際に、皮膚と腸における 12-HEPE 量を比べると、皮膚における 12-HEPE 量は腸よりも多く（Figure 2-1C）、皮膚と腸とではオメガ 3 脂肪酸代謝が異なることが分かった。

次に、皮膚と腸における各代謝酵素をコードする遺伝子の発現量を調べたところ、EPA の 12-HEPE への代謝を担う 12-LOX をコードする遺伝子 (*Alox12* 及び *Alox12b*) の発現量は、腸よりも皮膚において高かった (Figure 2-1D)。反対に、17,18-EpETE の産生を担う CYP をコードする遺伝子 (*Cyp2c44* 及び *Cyp4f16*) の発現量は、皮膚よりも腸において高く (Figure 2-1D)、各種遺伝子の発現パターンは LC-MS/MS による代謝物産生量の結果を反映していた。これら代謝酵素をコードする遺伝子の発現パターンは、BLAB/c マウスだけでなく C57BL/6 マウスにおいても同様の傾向が認められた (Figure 2-1E)。そこで、亜麻仁油を給餌した C57BL/6 マウスの皮膚における EPA 代謝物を LC-MS/MS によって分析したところ、BALB/c マウスと同様、C57BL/6 マウスにおいても 12-HEPE が皮膚における主要な代謝物として産生されることが分かった (Figure 2-1F)。さらに、CHS を誘導したマウスにおいても、12-HEPE が主要な代謝物として産生された (Figure 2-1G)。このことから、皮膚には 12-LOX 代謝が優位な特有のオメガ 3 脂肪酸代謝系が存在し、特に皮膚では 12-HEPE が最も多く産生されることが分かった。

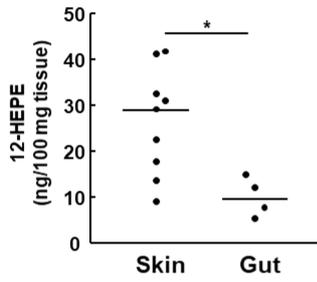
(A)



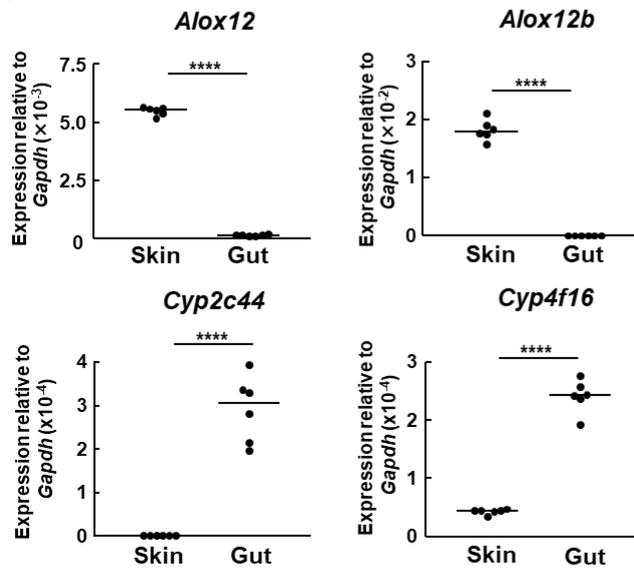
(B) BALB/c



(C)



(D) BALB/c



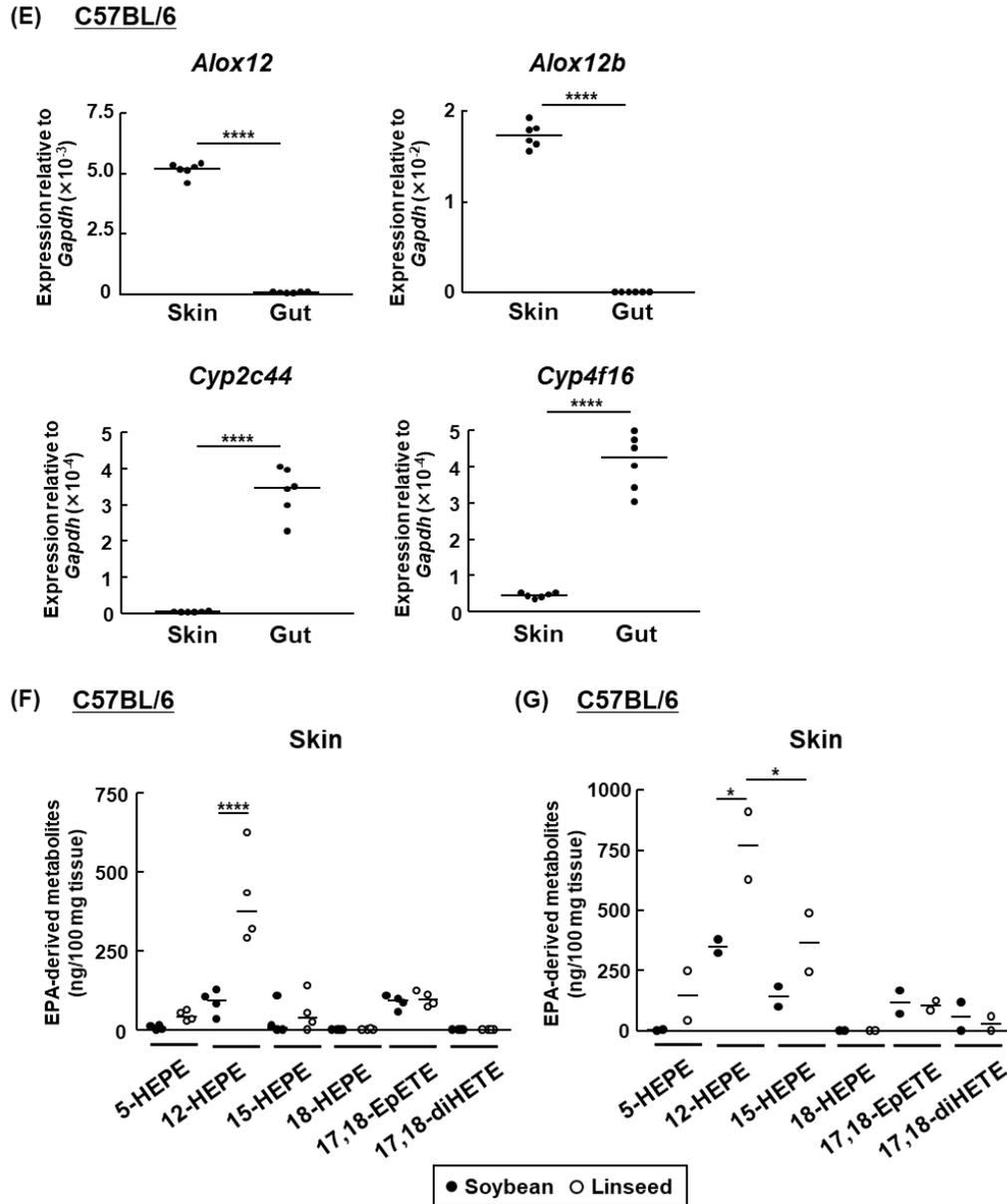


Figure 2-1. Identification of 12-HEPE as the dominant metabolite in the murine skin

(A) ω 3 EPA metabolites, which we detected by LC-MS/MS, were shown. (B-G) Mice were maintained with feed containing ω 3 fatty acid-rich linseed oil or control soybean oil. (B) EPA-derived metabolites in the ear skin and the gut of BALB/c mice were measured by LC-MS/MS. (C) 12-HEPE in the ear skin and the gut of BALB/c mice were measured by LC-MS/MS. (D, E) mRNA was isolated from samples of the ear skin and the gut of BALB/c mice (D) and C57BL/6 mice (E), and qPCR analyses were performed to measure the expression levels of *Alox12*, *Alox12b*, *Cyp2c44* and *Cyp4f16*, which were normalized to that of *Gapdh*. (F) EPA-derived metabolites in

the ear skin of C57BL/6 mice were measured by LC-MS/MS. (G) Mice were induced skin inflammation by DNFB treatment. On day 7, 12-HEPE in the ear skin of C57BL/6 mice were measured by LC-MS/MS. Each point represents data from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test or Mann–Whitney U test).

2. EPA 代謝物 (12-HEPE 及び 15-HEPE) の抗炎症活性

大豆油を摂取したマウスに比べて亜麻仁油を摂取したマウスの皮膚では、12-HEPE と 15-HEPE が増加していたことから、12-HEPE と 15-HEPE の抗炎症活性について DNFB 誘導性 CHS モデルマウスを用いて検討した。Day 0 の感作及び Day 5 の惹起の際に DNFB を塗布する 30 分前に 12-HEPE ならびに 15-HEPE を腹腔内投与し、Day 7 で耳介の腫れを測定したところ、DNFB で惹起することで誘導される耳介の腫れが 12-HEPE を腹腔内投与することで減少した (Figure 2-2)。一方、15-HEPE を腹腔内投与しても耳介の腫れは抑制されなかった。このことから、皮膚において最も多く産生された 12-HEPE が CHS における抗炎症活性を有することが明らかになった。

これまでに、脂肪酸代謝物の立体構造が生理活性を規定する重要な要因となることを見いだしており、例えば前章で示したように、17,18-EpETE の 2 種類の鏡像異性体のうち、17(*R*),18(*S*)-EpETE よりも 17(*S*),18(*R*)-EpETE が強い抗炎症活性を示すことを報告している³²。そこで、12-HEPE のヒドロキシ基における 2 種類の異性体 (12(*S*)-HEPE 及び 12(*R*)-HEPE) に着目して抗炎症活性を調べたところ、12(*S*)-HEPE と 12(*R*)-

HEPE は同程度の耳介の腫れの抑制効果を示した。このことから、12-HEPE は立体構造に依存せず、抗炎症作用を示すことが分かった (Figure 2-2)。

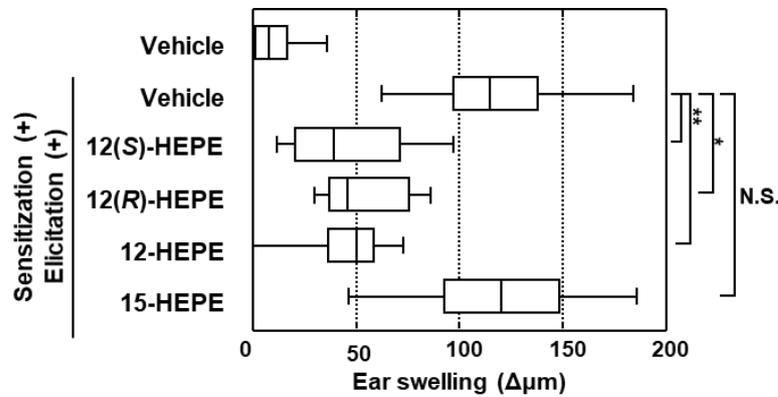


Figure 2-2. Ear swelling was decreased by 12-HEPE but not 15-HEPE

Mice were i.p. administered 12(*S*)- or 12(*R*)-HEPE, 12-HEPE, 15-HEPE (100 ng/administration) or vehicle on days 0 and 5 at 30 min before application of DNFB. Ear thickness was measured on day 7. The vertical line in each box plot indicates the median value (n = 10 to 28). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N.S., not significant (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test).

3. 12-HEPE の投与経路による CHS 抑制活性の違い

次に、12-HEPE の投与方法の違いによる抗炎症活性を比較した。その結果、12-HEPE を腹腔内投与した場合に比べて塗布した方がより強く耳介の腫れを抑制する傾向があることが明らかになった (Figure 2-3A)。特に、感作と惹起の際の 12-HEPE 投与量が 1 μg の場合においては、12-HEPE を腹腔内投与した場合に比べて、皮膚に塗布した場合の方が耳介の腫れを抑制した (Figure 2-3A)。HE 染色による組織学的な解析からも、DNFB で炎症を誘導することで認められた表皮の浮腫及び真皮への細胞の浸潤が、12-

HEPE を腹腔内投与または塗布することで抑制されることが分かったが、その効果は腹腔内投与よりも皮膚への塗布の方が強い様子が観察された (Figure 2-3B)。

また、投与経路によって皮膚局所で検出される 12-HEPE 量は大きく異なることが分かった。例えば、1 μg の 12-HEPE を腹腔内投与した 30 分後の皮膚における 12-HEPE 量は検出限界 (2 ng/ear) 以下であったのに対して、塗布した場合には塗布量の約 80%が検出された (Figure 2-3C)。12-HEPE は塗布によって強い抗炎症作用を示したこと、また、塗布することでより多くの 12-HEPE が皮膚で認められたことから、12-HEPE は血中を循環する細胞を標的とするよりも、皮膚局所に存在する細胞を標的として作用することが示唆された。

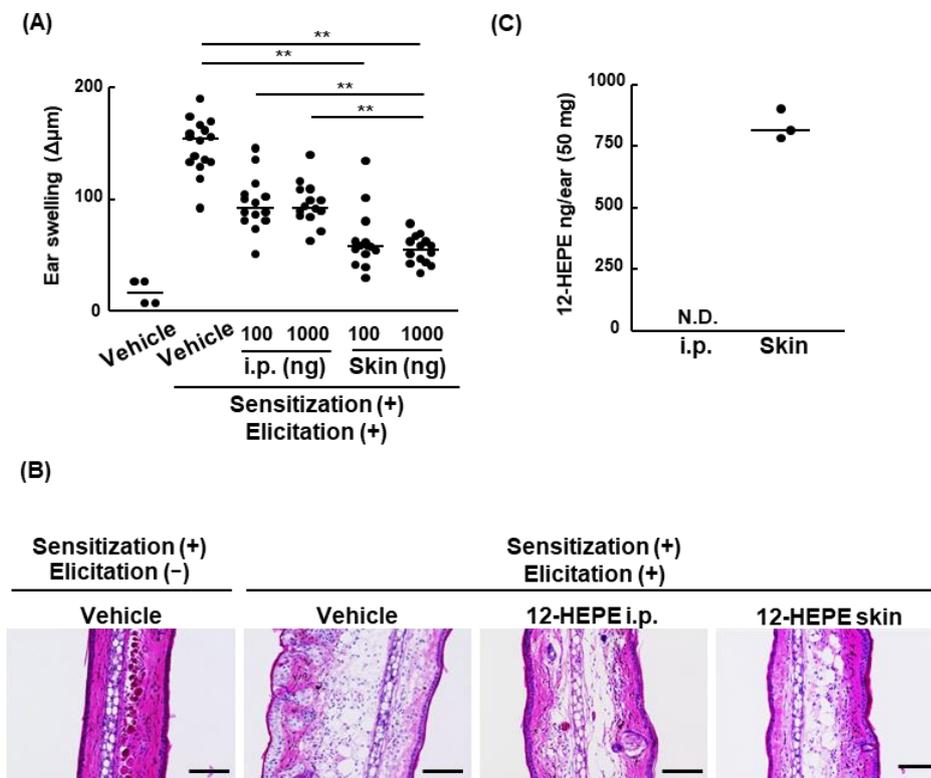


Figure 2-3. Topical application of 12-HEPE ameliorated inflammation more than did i.p.

administration

(A) Mice were administered 12-HEPE i.p. or topically (skin) with 100 ng/administration or 1 µg/administration, or vehicle topically, on days 0 and 5 at 30 min before DNFB treatment. Ear thickness was measured on day 7. Each point represents data from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians. **, $P < 0.01$ (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test). (B) Mice were administered 12-HEPE i.p. or topically with 1 µg/administration, or vehicle, on days 0 and 5 at 30 min before DNFB treatment. Ear tissue samples were prepared on day 7, and stained with HE. Representative images from two independent experiments are shown. Bars, 100 µm. (C) Mice were i.p. or topically administered 12-HEPE at 1 µg on 30 min before ear collection. The amount of 12-HEPE in the ear skin was measured by LC-MS/MS. The weight of both ears is about 50 mg. N.D.; below the detection limit (below 2 ng/ear [50 mg]).

4. 感作相における免疫応答に対する 12-HEPE の影響

12-HEPE による CHS 抑制活性の作用機序を明らかにするために、12-HEPE はどの免疫細胞に影響を与えるのかを検討した。まず、ハプテンに最初に接触した際に起こる感作成立過程において重要なイベントである DC の dLNs への遊走に着目した。

FITC 誘導性 DC 遊走アッセイでは、FITC を抗原として皮膚に塗布することで FITC を捕捉した DC の dLNs への遊走が引き起こされるため、DC の遊走度合いを dLNs 内の FITC 陽性の DC 数で評価できる。そこで、FITC 誘導性 DC 遊走アッセイを行ったところ、12-HEPE の塗布で DC 数の変化は認められなかった (Figure 2-4A, B)。このことから、12-HEPE は DC の dLNs への遊走に影響を与えないことが分かった。さらに、12-HEPE を惹起 (Day 5) の際だけに塗布しても耳介の腫れが抑制されたことから (Figure

2-4C)、12-HEPE は感作相でのイベントを制御するのではなく、惹起相でのイベントを制御することが示唆された。

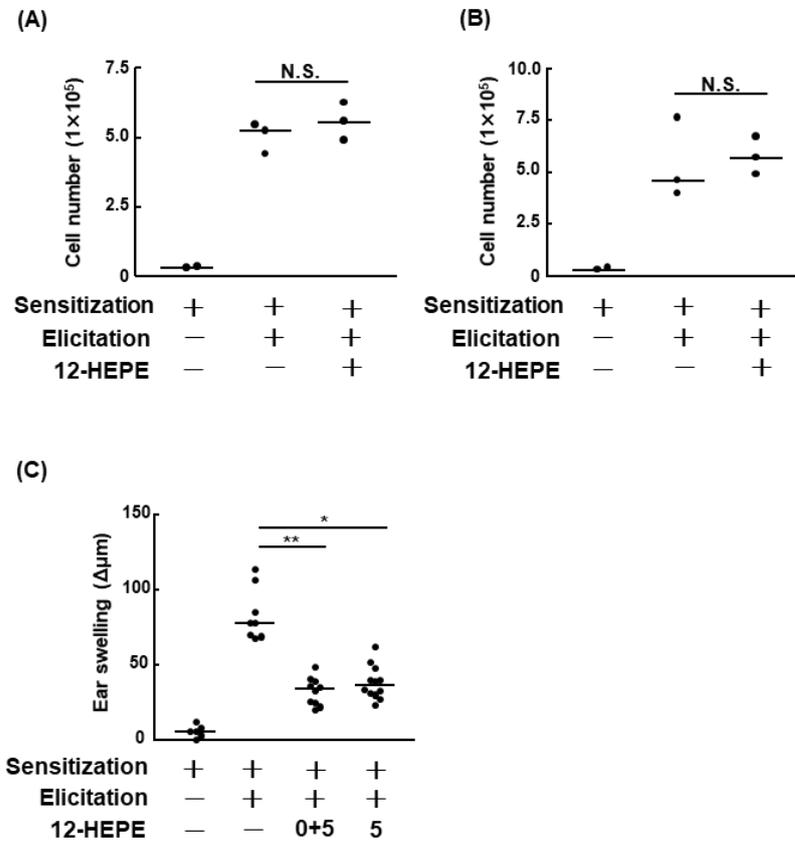


Figure 2-4. 12-HEPE did not affect the response in the sensitization phase

(A-B) Mice were topically administered 12-HEPE (1 μg /administration) or vehicle at 30 min before and 24 h after FITC application. Axillary lymph nodes were collected 24 h (A), and 48 h (B) after FITC application, and the number of FITC⁺ MHC classII⁺ DC was determined on the basis of total cell numbers and flow cytometric data. (C) Mice were topically administered 12-HEPE (1 μg /administration) or vehicle on days 0 and 5, or on day 5 only, at 30 min before DNFB treatment. On day 7, ear thickness was measured. Each point represents data from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N.S., not significance (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test).

5. 惹起相における免疫応答に対する 12-HEPE の影響

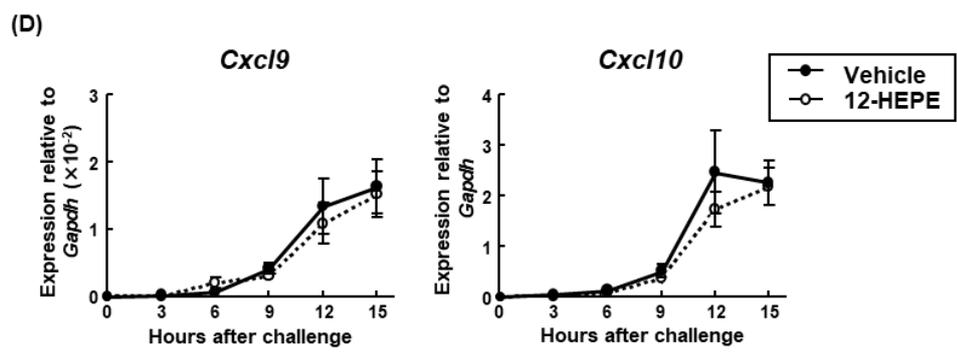
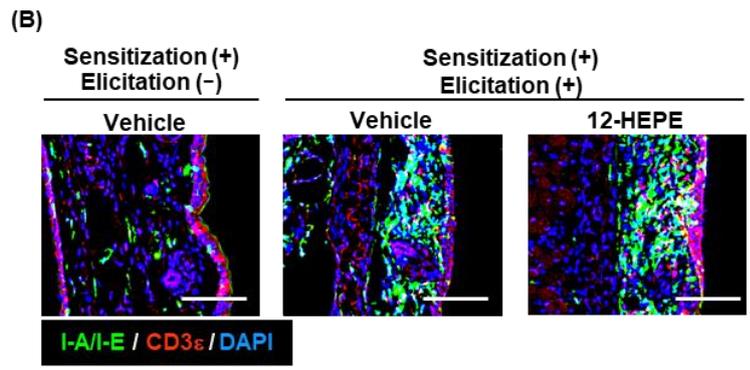
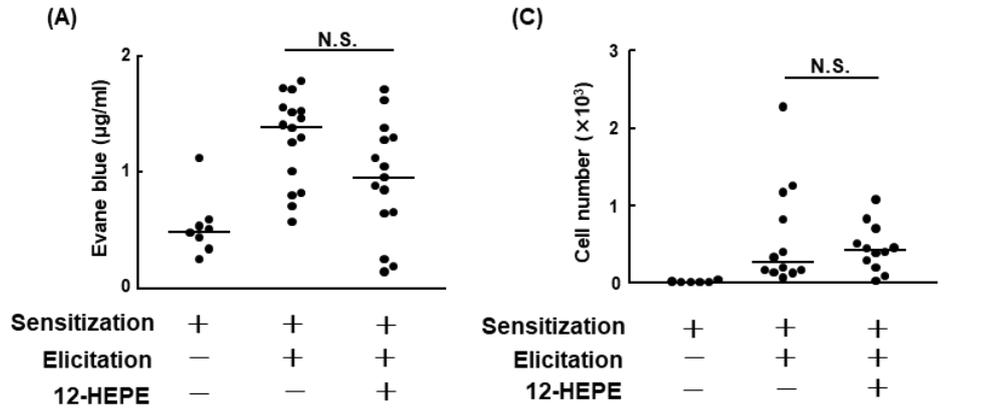
次に、惹起相における免疫応答に着目した検討を行った。惹起相では、ハプテン刺激により活性化された皮膚在住肥満細胞から産生されるヒスタミンにより血管透過性が亢進する他、同時に活性化された角化細胞が産生する炎症性サイトカインやケモカインにより炎症局所への好中球や T 細胞の浸潤が促される。また、角化細胞が産生する IL-1 α により、皮膚の組織在住マクロファージが活性化されることで、エフェクター T 細胞の活性化に重要な iSALT 形成が誘導される。

そこで、12-HEPE の肥満細胞の脱顆粒に対する影響を調べるために、炎症惹起後の皮膚における血管透過性を評価した。その結果、12-HEPE を塗布しても血管透過性は減少しなかった (Figure 2-5A)。このことから、肥満細胞の脱顆粒によって誘導される血管透過性の亢進に対して 12-HEPE は影響を与えないことが分かった。

次に、エフェクター T 細胞の活性化に重要な iSALT 形成を MHC Class II 陽性の DC 及び CD3 ϵ 陽性の T 細胞を染色することで組織学的に観察したところ、12-HEPE を塗布しても DC と T 細胞の集塊として観察される iSALT 形成は抑制されなかった (Figure 2-5B)。このことから、12-HEPE は iSALT 形成の誘導を担う組織在住マクロファージに影響を与えないことが分かった。さらに、CHS の抗原特異的な炎症反応において中心的な役割を果たす T 細胞に対する影響を調べるために、IFN- γ を産生する CD8 α 陽性の T 細胞数をフローサイトメトリーにより測定した。その結果、12-HEPE を塗布しても皮膚における IFN- γ を産生する CD8 α 陽性の T 細胞数に変化はなかった (Figure 2-5C)。この結

果と一致して、T細胞を誘引するケモカインである CXCL9 と CXCL10 をコードする遺伝子の DNFB 惹起後の耳における発現量は、12-HEPE を塗布しても減少しなかった (Figure 2-5D)。これらのことから、12-HEPE は肥満細胞やマクロファージ、DC、T細胞の活性化に影響を与えないことが分かった。

そこで、炎症誘導により皮膚で増加する好中球数を調べるために、皮膚における好中球数をフローサイトメトリーにより測定したところ、DNFB で惹起することで増加した皮膚における好中球数が、12-HEPE を塗布することで減少することが分かった (Figure 2-5E, F)。さらに組織学的な解析の結果、真皮に浸潤した Ly6G 陽性の好中球が、12-HEPE を塗布することで減少する様子が観察された (Figure 2-5G)。このことから、12-HEPE は炎症部位における好中球の増加を抑制することが明らかになった。



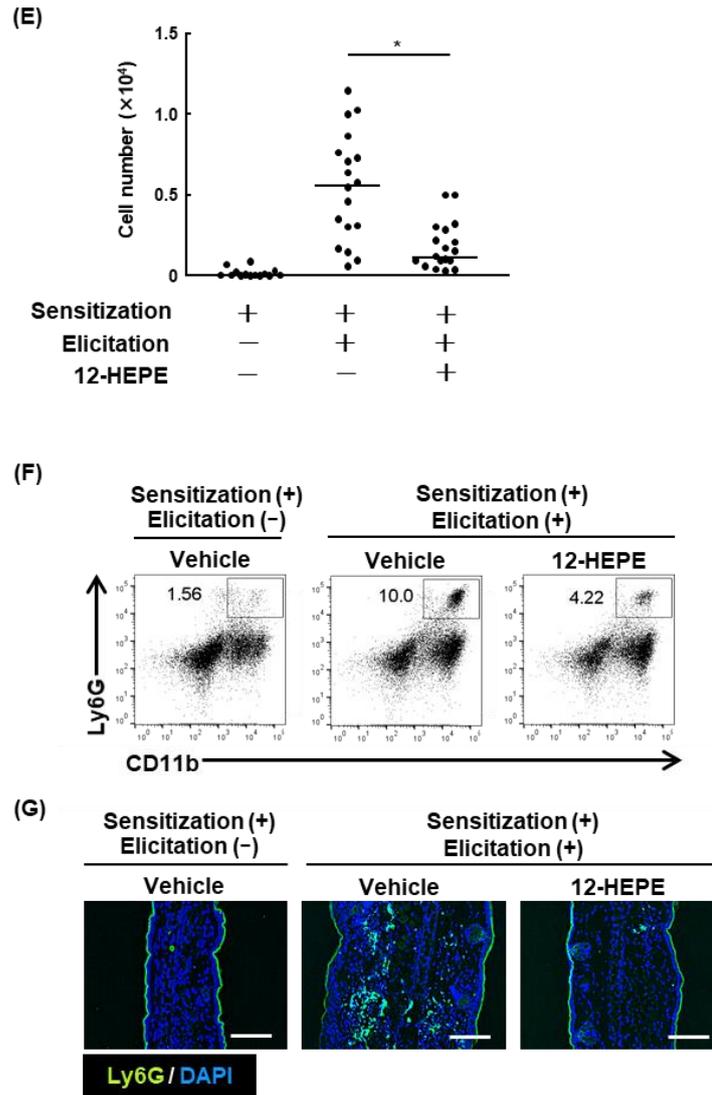


Figure 2-5. 12-HEPE reduced neutrophil recruitment into the inflamed skin

(A-G) Mice were topically administered 12-HEPE (1 μg /administration) or vehicle on days 0 and 5 at 30 min before DNFB treatment. (A) On day 7, Evans blue solution was injected intravenously. The amount of Evans blue was measured at OD₆₂₀. Each point represents data from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians. N.S.; not significant (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test). (B) Ear samples were obtained on day 7 and examined by immunohistologic analysis. Sections were stained with anti-I-A/I-E mAb, anti-CD3 ϵ mAb, and DAPI. Bars, 100 μm . (C) On day 6, the number of IFN- γ producing CD8 α^+ T cells was measured by using flow cytometry. Each point represents data from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians. N.S.; not significant (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple

comparison test). (D) On day 7, ear tissues were homogenized for isolation of mRNA, and qPCR analysis was performed to measure the expression levels of *Cxcl9* and *Cxcl10*, which were normalized to that of *Gapdh*. Mice treated with 12-HEPE are shown with open circles and a dashed line, whereas vehicle treated mice are shown as closed circles with a solid line. The indicated genes do not change after DNFB challenge by 12-HEPE treatment (mean \pm SEM values, $n = 7$ to 13). There was not significant difference at each time point (Mann–Whitney U test). (E) On day 7, the number of Ly6G⁺ CD11b⁺ neutrophils was measured by using flow cytometry. Each point represents data from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians. *, $P < 0.5$ (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test). (F) Representative flow cytometry profiles from four independent experiments showing neutrophils in ear samples on day 7. The numbers indicate the percentage of Ly6G⁺ CD11b⁺ neutrophils. (G) Frozen ear sections obtained on day 7 were stained with FITC-labeled Ly6G and DAPI for immunohistologic analysis. Representative images from two independent experiments are shown. Bars, 100 μ m.

6. 12-HEPE の好中球に対する直接もしくは間接的な作用

第一章で示した 17,18-EpETE と同様に、12-HEPE は皮膚における好中球数の増加を抑制したことから、12-HEPE の好中球への直接作用を検討した。そこで、fMLP 誘導性の好中球の仮足形成を評価したところ、fMLP で刺激することで認められた仮足形成は 12-HEPE を添加しても抑制されなかった (Figure 2-6A)。このことから、12-HEPE は好中球の遊走を直接抑制するのではなく、間接的に作用することで炎症誘導時の皮膚における好中球の増加を抑制することが示唆された。

そこで、好中球の遊走を間接的に制御する因子として、好中球を誘引するケモカインである CXCL1 及び CXCL2 に着目した。CXCL1、CXCL2 は CHS の炎症誘導において

重要な働きを担っており、CXCL1 及び CXCL2 の受容体である CXCR2 欠損マウスに CHS モデルを適用すると耳介の腫れが減弱することや、CHS モデルマウスに抗 CXCL1 抗体及び抗 CXCL2 抗体を腹腔内投与することで耳介の腫れが抑制されることが報告されている⁹⁷⁻⁹⁹。そこで、DNFB 惹起後の耳における *Cxcl1*、*Cxcl2* 遺伝子発現量を継続的に測定したところ、12-HEPE を塗布することで惹起後 6 時間の点における *Cxcl1*、*Cxcl2* 遺伝子発現量が減少することが分かった (Figure 2-6B)。

CXCL1 と CXCL2 の遺伝子発現は角化細胞や肥満細胞がハプテン刺激を受けて産生する TNF- α により誘導されることから^{100,101}、次に、DNFB 惹起後の耳における *Tnf* 遺伝子発現量を調べた。その結果、*Tnf* 遺伝子発現量は惹起後 0 時間と比べて惹起後 6 時間で有意に増加した一方で、12-HEPE は *Tnf* 遺伝子発現量に影響を与えなかった (Figure 2-6C)。このことから、12-HEPE は TNF- α 刺激により誘導される下流経路を抑制することで、*Cxcl1*、*Cxcl2* 遺伝子発現量を抑制したと考えられた。

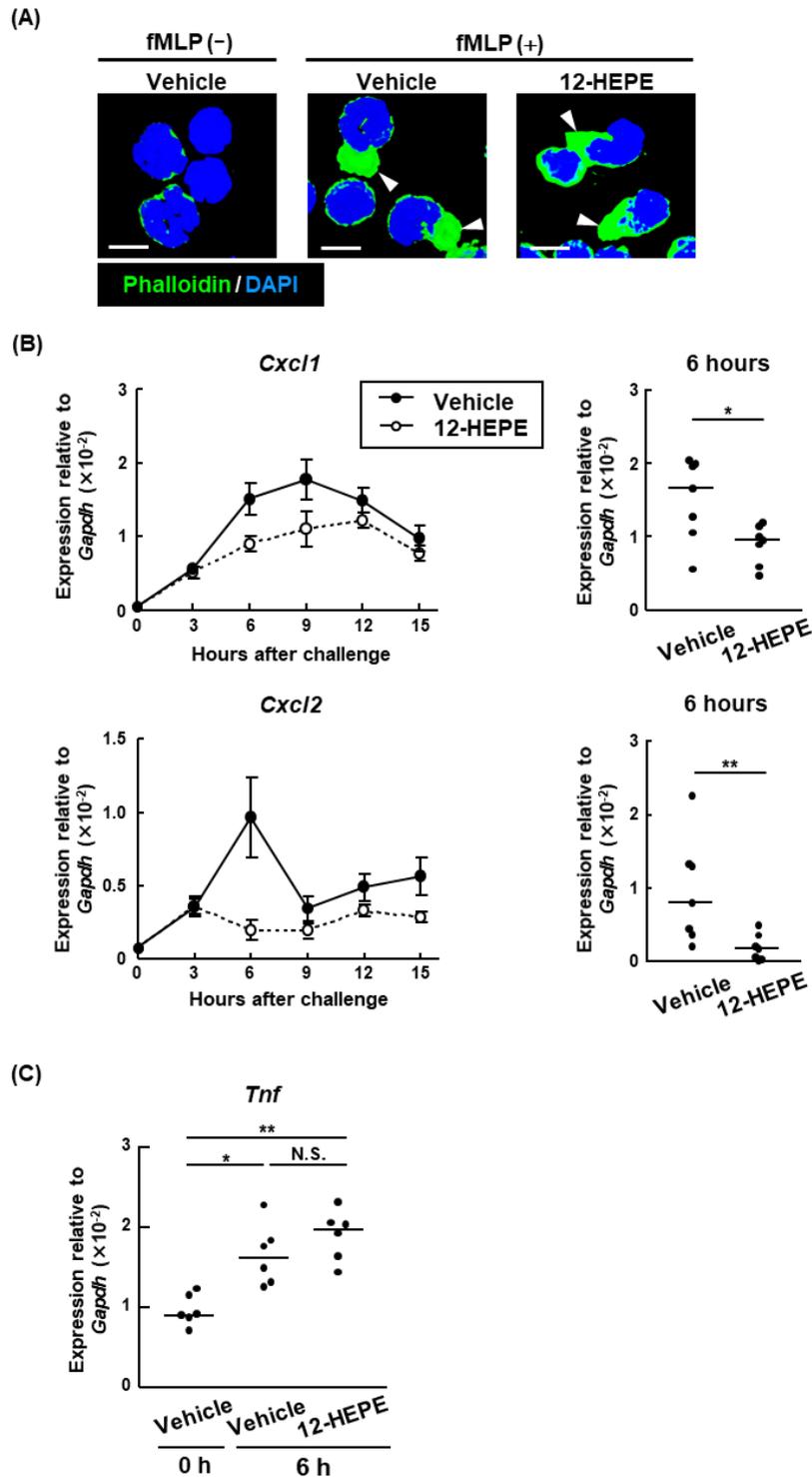


Figure 2-6. 12-HEPE downregulated gene expressions of *CXCL1* and *CXCL2*

(A) Neutrophils were isolated from mouse bone marrow and treated with either 12-HEPE (1 $\mu\text{mol/L}$) or vehicle for 15 min before stimulation with fMLP for 2 min. The panel shows representative images from two independent experiments. Arrowheads indicate actin

polymerization. Bars, 5 μm . (B) Mice were topically administered 12-HEPE (1 μg /administration, open circles and dashed line) or vehicle (closed circles and solid line) on days 0 and 5 at 30 min before DNFB treatment. After DNFB challenge on day 5, ear skin, which was taken at the indicated time points, was homogenized for isolation of mRNA, and qPCR analysis was performed to measure the expression levels of *Cxcl1* and *Cxcl2*, which were normalized to that of *Gapdh*. (Mean \pm SEM values, $n = 7$ to 13). Each point represents data from an individual mouse at 6 h after DNFB challenge, and horizontal lines indicate medians. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (Mann–Whitney U test). (C) Indicated hours after DNFB challenge on day 5, ear skin taken and homogenized for isolation of mRNA, and qPCR analysis was performed to measure the expression level of *Tnf*, which was normalized to that of *Gapdh*. Each point represents data from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians ($n = 5$ or 10). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N.S., not significant (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test).

7. 12-HEPE のヒト表皮角化細胞株における *CXCL1*、*CXCL2* 遺伝子発現抑制活性

CHS 誘導過程における主要なケモカイン産生細胞として角化細胞が知られることから、次にヒト表皮角化細胞株である HaCaT 細胞を用いた検討を行った。そこで、HaCaT 細胞を TNF- α で刺激した際の *CXCL1*、*CXCL2* 遺伝子発現量を測定したところ、12-HEPE を添加することで HaCaT 細胞における *CXCL1*、*CXCL2* 遺伝子発現量が減少することが分かった (Figure 2-7)。このことから、12-HEPE は好中球を誘引するケモカインである *CXCL1*、*CXCL2* の角化細胞における遺伝子発現を抑制することで、間接的に好中球の浸潤を抑制することが分かった。

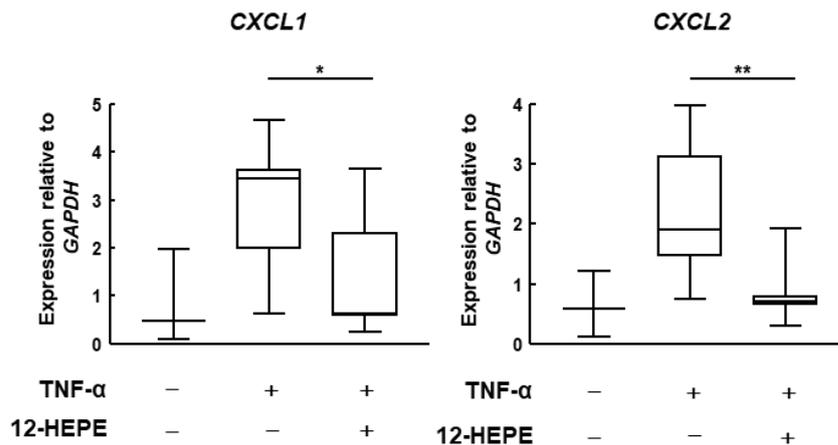


Figure 2-7. 12-HEPE downregulated gene expressions of *CXCL1* and *CXCL2*

HaCaT cells were treated with 12-HEPE (300 nmol/L) or vehicle for 30 min before stimulation with TNF- α . The mRNA was isolated from HaCaT cells and qPCR analysis was performed to measure the expression levels of *CXCL1* and *CXCL2*, which were normalized to the expression of *GAPDH*. The horizontal line in each box plot indicates the median value (n = 5 or 10). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test).

8. 角化細胞における長鎖脂肪酸受容体遺伝子発現

12-HEPE がどの受容体を介して抗炎症作用を発揮するのかを明らかにするために、長鎖脂肪酸の受容体として報告されている受容体 (GPR40、GPR120、PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 、肝臓 X 受容体 [liver X receptor; LXR] α 、LXR β 、RXR α 、RXR β 、RXR γ) の角化細胞における遺伝子発現を評価した¹⁰¹⁻¹⁰⁶。その結果、HaCaT 細胞及びマウスから単離した角化細胞 (CD45⁻ CD31⁻ CD34⁻ CD49f⁺ cells) は共に RXR α をコードする遺伝子を最も高く発現していた (Figure 2-8A, B)。このことから、12-HEPE は角化細胞に高発現する RXR α を介して作用すると考えた。

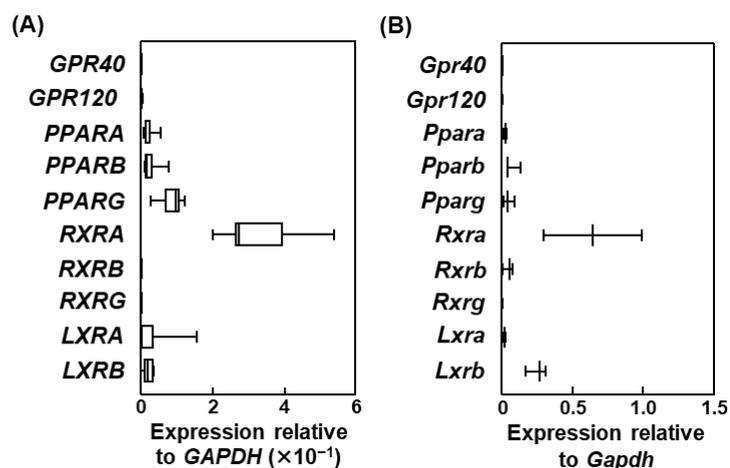


Figure 2-8. Receptor gene expressions in keratinocytes

(A-B) mRNA was isolated from HaCaT cells (A), or CD45⁻ CD31⁻ CD34⁻ CD49f⁺ keratinocytes from ear skin of naïve mouse (B), and qPCR analysis was performed to measure the expression levels of the indicated genes, which were normalized to that of *GAPDH* or *Gapdh*, respectively. The horizontal line in each box plot indicates the median value (n = 4 or 8).

9. RXR を介した 12-HEPE の抗炎症活性

12-HEPE が RXRs を介して抗炎症作用を示すのかを *in vitro* ならびに *in vivo* CHS モデルで確かめるために、RXR pan-antagonist である HX 531 を用いた検討を行った。HaCaT 細胞に 12-HEPE を添加する前に HX 531 を添加した際の TNF- α 誘導性 *CXCL1*、*CXCL2* 遺伝子発現量を測定したところ、HX 531 を添加することで 12-HEPE による *CXCL1*、*CXCL2* 遺伝子発現抑制活性が消失した (Figure 2-9A)。このことから 12-HEPE は、HaCaT 細胞に発現する RXRs を介して *CXCL1*、*CXCL2* 遺伝子発現抑制活性を示すことが分かった。

次に、HX 531 を CHS モデルマウスに塗布した際に 12-HEPE による抗炎症活性が阻害されるのかについて検討を行ったところ、12-HEPE を塗布する前に HX 531 を塗布すると、12-HEPE による耳介の腫れ抑制作用が消失した (Figure 2-9B)。HE 染色による組織学的な解析を行ったところ、12-HEPE を塗布することで認められた表皮の浮腫と真皮への細胞浸潤の抑制活性もまた、HX 531 を塗布した場合には認められなかった (Figure 2-9C)。さらに、HX 531 を塗布することで、12-HEPE による好中球浸潤抑制作用も消失した (Figure 2-9D, E)。これらのことから、12-HEPE は RXRs を介して CHS における抗炎症作用を示すことが分かった。

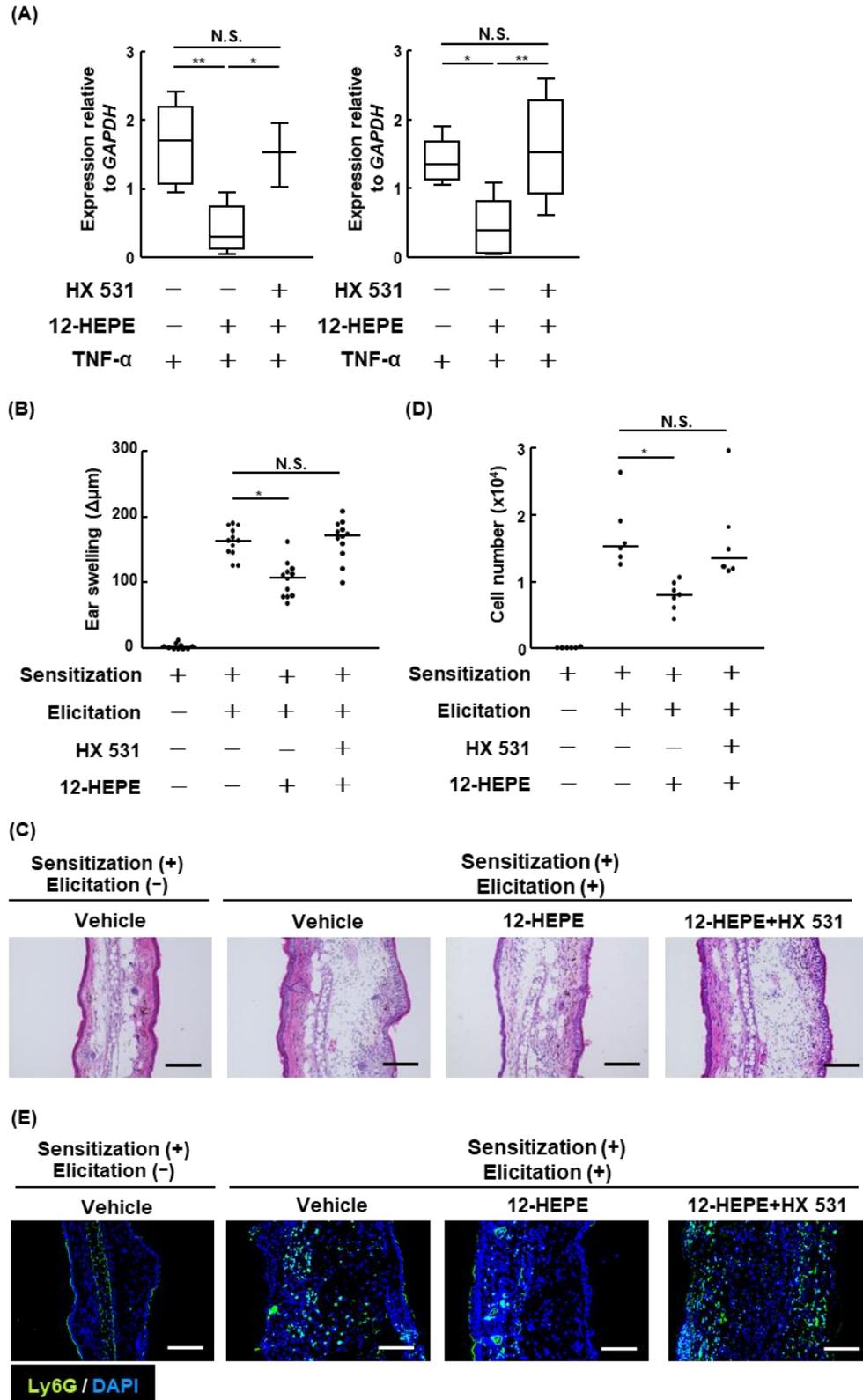


Figure 2-9. Inhibitory effects of 12-HEPE were canceled by RXR pan-antagonist treatment

(A) HaCaT cells were treated with the RXR pan-antagonist HX 531 (2 μ mol/L) or vehicle, and

12-HEPE (300 nmol/L) or vehicle at 90 min and 30 min before stimulation with TNF- α , respectively. mRNA was isolated from the HaCaT cells and qPCR analysis was performed to measure the expression levels of *CXCL1* and *CXCL2*, which were normalized to that of *GAPDH*. The horizontal line in each box plot indicates the median value (n = 7 or 9). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N.S., not significant (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test). (B-E) Mice were topically administered RXR pan-antagonist HX 531 with 40 nmol or vehicle at 60 min before 12-HEPE (1 μ g/administration) or vehicle treatment on days 0 and 5 at 30 min before DNFB treatment. (B) On day 7, ear thickness was measured. Each point represents data from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians. *, $P < 0.05$; N.S., not significant (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test). (C) Ear tissue samples were prepared on day 7, stained with HE, and analyzed histologically. Representative images from two independent experiments are shown. Bars, 100 μ m. (D) On day 7, the number of Ly6G⁺ CD11b⁺ neutrophils was measured by using flow cytometry. Each point represents data from an individual mouse, and horizontal lines indicate medians. *, $P < 0.05$; N.S., not significant (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test). (E) Frozen ear sections obtained on day 7 were stained with FITC-labeled Ly6G and DAPI for immunohistologic analysis. Representative images from two independent experiments are shown. Bars, 100 μ m.

10. RXR α をノックダウンした HaCaT 細胞における 12-HEPE の *CXCL1*、*CXCL2*

遺伝子発現抑制活性

HX 531 は RXR α 、RXR β 、RXR γ に対するアンタゴニストであることから、次に、RXR の 3 種類のサブタイプのうち角化細胞において最も遺伝子発現量が高かった RXR α を介して 12-HEPE が作用するのかを、RXR α 特異的な siRNA により RXR α をノックダウンした HaCaT 細胞を用いて検討した。

Control siRNA を導入した HaCaT 細胞に比べて、RXR α siRNA を導入した HaCaT 細胞では RXR α タンパク質発現量が減少することを確認した後 (Figure 2-10A)、RXR α をノックダウンした HaCaT 細胞を用いて TNF- α 誘導性 *CXCL1*、*CXCL2* 遺伝子発現量を測定した。その結果、Control siRNA を導入した HaCaT 細胞に 12-HEPE を添加すると *CXCL1*、*CXCL2* 遺伝子発現量が減少したのに対して、RXR α siRNA を導入した HaCaT 細胞では 12-HEPE による *CXCL1*、*CXCL2* 遺伝子発現抑制活性が認められなかった (Figure 2-10B)。このことから、12-HEPE は角化細胞に発現する RXR α を介して *CXCL1*、*CXCL2* 遺伝子発現を抑制することが分かった。さらに、12-HEPE が好中球に対して直接作用しないというこれまでに得た知見 (Figure 2-6A) と一致して、角化細胞と比べて骨髄由来好中球では *Rxra* 遺伝子発現量が低かった (Figure 2-10C)。

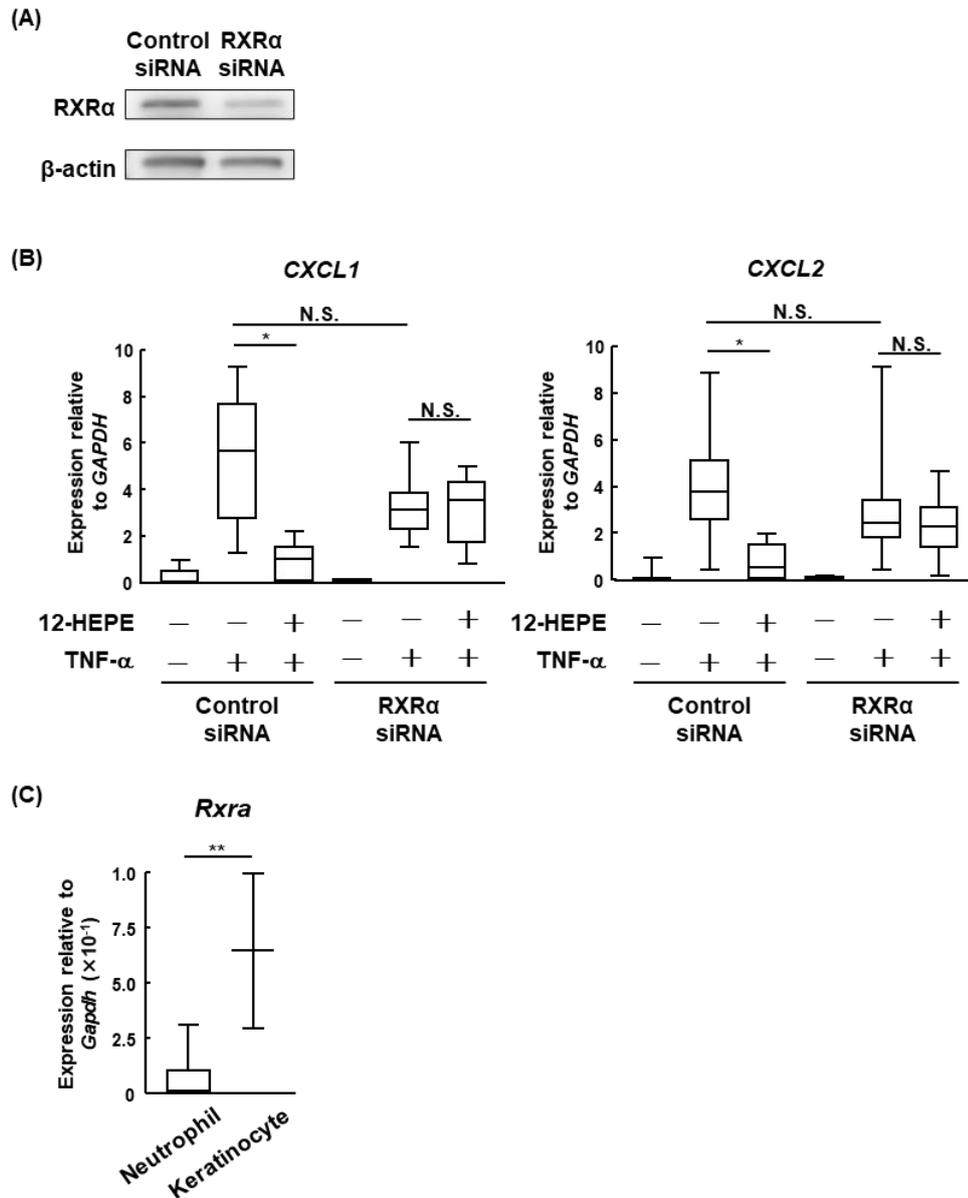


Figure 2-10. 12-HEPE reduced *CXCL1* and *CXCL2* gene expression through *RXRα*

(A) Analysis of the *RXRα* expression level in HaCaT cells treated with specific *RXRα* siRNA or with unspecific Control siRNA by western blotting using a specific anti-*RXRα* mAb. The β -actin levels were shown as a control for equal protein loading. (B) *RXRα* siRNA transfected HaCaT cells or unspecific Control siRNA transfected HaCaT cells were treated with 12-HEPE (300 nmol/L) or vehicle for 30 min before stimulation with *TNF-α*. The mRNA was isolated from HaCaT cells and qPCR analysis was performed to measure the expression levels of *CXCL1* and *CXCL2*, which were normalized to the expression of *GAPDH*. The horizontal line in each box

plot indicates the median value (n = 5 or 10). *, $P < 0.05$; N.S., not significant (Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test). (C) Ly6G⁺ CD11b⁺ neutrophils and CD45⁻ CD31⁻ CD34⁻ CD49f⁺ keratinocytes were isolated from bone marrow and ear skin of naïve mice, respectively. qPCR analysis was performed to measure the expression level of *Rxra*, which was normalized to that of *Gapdh*. The horizontal line in each box plot indicates the median value (n = 4 or 8). **, $P < 0.01$ (Mann–Whitney U test).

考察

アラキドン酸の 12-LOX 代謝物の 12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (hydroxyeicosatetraenoic acid; HETE) は好中球や白血球に対する強力な化学誘引物質として炎症促進作用を示す他、LTB₄ 受容体として知られる BLT2 のアゴニストとして作用し、痒みに関連したマウスのひっかき行動を誘導することが報告されていた¹⁰⁷。さらに、乾癬やアトピー性皮膚炎の皮膚病変部位で 12-HETE 量が多いことから^{108,109}、12-LOX を介した代謝系の活性化が皮膚炎を増悪させるとこれまで指摘されてきた。一方で、ヒト乾癬病変部位では通常部位に比べて 12-HEPE 量が多いことや¹¹⁰、紫外線曝露によりヒト皮膚水疱液中の 12-HEPE 量が増加することが報告されていた¹¹¹。本研究においても、CHS を誘導しない時に比べて CHS を誘導すると、皮膚における 12-HEPE 量が約 2 倍増加することが確認された (12-HEPE 量平均値 - CHS 未誘導; 350.3 ng/100 mg tissue, - CHS 誘導; 768.0 ng/100 mg tissue)。このように、炎症部位では 12-HETE ならびに 12-HEPE といった 12-LOX 代謝物が増加することから、炎症誘導に伴い炎症部位における 12-LOX 活性が上昇することが示唆された。12-LOX をコードする *Alox12* は T 細胞や好中球においても発現が認められることに加えて、白血球で発現が認められる *Alox15* がコードする 15-LOX は 12-LOX 活性も保持するため^{89,112,113}、12-LOX 活性を持つ酵素を発現する細胞が炎症誘導に伴い炎症局所に浸潤した結果、12-LOX 代謝物産生量が増加したと考えられる。12-HEPE の生理機能についてはこれまでに、脂肪細胞と骨

格筋へのグルコースの取り込みを促進することで糖代謝を改善する作用が報告されていたが¹¹⁴、12-HEPE の免疫応答制御作用は見いだされていなかった。本研究により、12-HEPE が皮膚において抗炎症活性を示すことが新たに明らかになったことから、12-LOX 代謝系が皮膚における炎症抑制において重要であることが分かった。さらに、12-LOX は皮膚バリアを構成するアシルセラミドの合成に必要な酵素であり、*Alox12b* または *Alox12* 欠損マウスでは皮膚のバリア機能が損なわれることが報告されている^{89,115,116}。従って、皮膚炎制御のためには、12-LOX 活性を阻害することよりも、角化細胞周辺の脂質環境をアラキドン酸ではなく EPA が豊富な環境にし、12-HEPE 産生を促すことが重要であることが示唆された。

著者の所属する研究室ではこれまでに、CHS 抑制活性を有する 17,18-EpETE を見だしており、17,18-EpETE についても 12-HEPE と同様に塗布することでマウスにおける CHS を抑制することを報告していた³²。しかしながら、17,18-EpETE はマウスに 1 µg/administration で塗布するよりも 100 ng/administration で腹腔内投与した際に強い抗炎症活性を示した³²。一方、12-HEPE は腹腔内投与するよりも皮膚に塗布することでより強い抗炎症活性を示した。17,18-EpETE は血中に存在する好中球を標的とする一方で、12-HEPE は角化細胞を標的とすることから、投与方法による抗炎症活性の違いは、脂肪酸代謝物の作用点の違いに起因すると考えられる。また、投与方法によって 12-HEPE の皮膚での存在量は異なり、腹腔内投与ではほとんど検出されなかった一方で、塗布では塗布量の約 80%が皮膚から検出された。このことから、12-HEPE

の標的細胞である角化細胞に効率的に作用する投与方法で、より強い抗炎症活性が認められたことが分かった。

本研究では 15-HEPE による CHS 抑制活性が認められなかったが、著者の所属する研究室では、EPA の 15-LOX 代謝物である 15-HEPE が肥満細胞の脱顆粒を阻害することでアレルギー性鼻炎を抑制することを報告していた¹¹⁷。15-HEPE による抗アレルギー作用が認められたアレルギー性鼻炎は、抗原特異的な IgE 産生を主として発症する I 型アレルギーに分類され、肥満細胞の細胞膜上に発現する高親和性 IgE 受容体 (high affinity Immunoglobulin E receptor; FC ϵ RI) が抗原によって架橋されることで IgE 依存性の肥満細胞の脱顆粒が誘導される¹¹⁸⁻¹²⁰。一方、CHS は IV 型アレルギー (遅延型アレルギー) に分類されており、I 型アレルギーのような IgE 産生を主体とした免疫応答ではなく、抗原特異的な T 細胞の活性化を主体とした免疫応答によって炎症が引き起こされる。しかし、肥満細胞欠損マウスでは DNFB 誘導性 CHS による耳介の腫れが減弱し、その際に DC の dLNs への遊走抑制及び抗原非特異的な応答として認められる血管透過性の亢進抑制が観察されることが報告されており¹²¹、肥満細胞もまた CHS 誘導に寄与することが分かっている。さらに、DNFB は IgE-FC ϵ RI の相互作用を介した経路とは独立した、Gai タンパク質を介したシグナル伝達を経て肥満細胞の脱顆粒を直接誘導することも報告されている¹²²。このことから、CHS の炎症誘導機構には、アレルギー性鼻炎では認められない IgE 非依存性のシグナル経路を介した肥満細胞の脱顆粒誘導機構が寄与すると考えられる。15-HEPE が肥満細胞の脱顆粒を阻害する詳細な分子機構は解明

されていないが、15-HEPE は IgE 依存性のシグナル経路による肥満細胞脱顆粒を抑制する一方で、CHS 誘導に寄与する IgE 非依存性のシグナル経路を介した肥満細胞の脱顆粒は抑制しないと考えられるため、CHS 抑制作用を示さなかったと考える。さらに、12-HEPE は CHS 抑制活性を持つ一方で、15-HEPE は CHS 抑制活性を持たないことから、同じ HEPE であっても、EPA のヒドロキシ基の位置の違いで生理活性が異なることが明らかになった。このことから、皮膚炎抑制活性を示す脂肪酸代謝物の産生には、LOX の中でも 12-LOX が EPA 代謝を担うことが重要であることが分かった。

上述の脂肪酸代謝物以外にも、いくつかの脂肪酸代謝物でアレルギー性皮膚炎抑制効果が認められることが報告されており、例えば、オメガ9 脂肪酸のオレイン酸代謝物であるミード酸は好中球に直接作用し、好中球の遊走と好中球からの LTB₄ の産生を抑制することで、CHS を抑制する¹²³。また、RvE1 は DC の dLNs への遊走及び iSALT 形成を抑制することで、CHS を抑制する¹²⁴。これら生理活性が既知の脂肪酸代謝物は免疫細胞を標的とするが、12-HEPE は角化細胞を標的とする点で新規性が高いと考える。また、角化細胞から産生される CXCL1 や CXCL2 は乾癬やアトピー性皮膚炎、刺激性接触皮膚炎などの皮膚炎の増悪にも寄与していることから、12-HEPE はアレルギー性接触皮膚炎に限らない幅広い皮膚疾患の改善にも有効であると期待する。

本研究において 12-HEPE は、角化細胞における CXCL1 及び CXCL2 の遺伝子発現を抑制した一方で、CXCL9 及び CXCL10 の遺伝子発現は抑制しなかった。CHS の感

作相では、ハプテンが角化細胞及び肥満細胞による TNF- α 産生を誘導し、それがオートクラインまたはパラクライン的に作用することで、角化細胞の NF- κ B (nuclear factor- κ B) シグナル伝達経路の活性化を介した CXCL1 や CXCL2、CXCL9、CXCL10 などのケモカインの産生が誘導される^{27,28}。これまでに、TNF- α -NF- κ B による CXCL9 及び CXCL10 の遺伝子発現が IFN- γ によって相乗的に増強される一方で、IFN- γ は CXCL1 及び CXCL2 の遺伝子発現にはほとんど影響を及ぼさず、TNF- α と IFN- γ による相乗的増強効果も認められないことが報告されている¹²⁵⁻¹²⁷。このことから 12-HEPE は、TNF- α -NF- κ B シグナル伝達経路を抑制することで、CXCL1 及び CXCL2 の遺伝子発現を抑制したと考えられる一方、炎症部位において T 細胞が産生する IFN- γ が角化細胞を刺激することで引き起こされる TNF- α と IFN- γ の相乗効果により、CXCL9 及び CXCL10 の産生が増強されたために、12-HEPE を塗布した際の耳における CXCL9 及び CXCL10 の遺伝子発現量は減少しなかったと考える。

本研究では、12-HEPE が角化細胞に発現する RXR α を介して CXCL1、CXCL2 遺伝子発現抑制作用を示すことを明らかにした。RXR β や RXR γ 欠損マウスでは外見的には正常な皮膚が観察される一方で^{128,129}、角化細胞における RXR α 欠損マウスでは角化細胞の過剰増殖や分化異常が認められることがこれまでに報告されており、RXR α が皮膚の恒常性の維持に重要な役割を果たすと考えられてきた¹³⁰⁻¹³³。この知見に一致して、12-HEPE は、RXRs の中で角化細胞に最も強く発現していた RXR α を介して抗炎症作用を

示すことが明らかになった。このことから、RXR α を介したシグナルが皮膚における炎症制御及び恒常性維持に重要な役割を果たすことが分かった。

前章にて微生物酵素（CYP BM-3）を用いた機能性脂肪酸代謝物の産生を提案したが、LOX 活性を持つ微生物も見いだされており、例えば、土壌細菌の一種である *Myxococcus fulvus* 由来の 12-LOX の 1 種（MF-LOX1）はアラキドン酸の 12 位を酸化し、12-HETE を産生する^{134,135}。従って、EPA を基質として本微生物酵素と反応させた際に、12-HEPE が産生されると考えられ、今後、微生物酵素を用いたバイオ変換反応による 12-HEPE の大量産生・供給も可能であると期待する。

小括

本研究から、腸では CYP を介した EPA の 17,18-EpETE への代謝が優位であるのに対して、皮膚では 12-LOX を介した 12-HEPE への代謝が優位であることが分かり、オメガ 3 脂肪酸の代謝が皮膚とその他の臓器（腸）では異なることが明らかになった。さらに、皮膚において優勢的に産生される 12-HEPE は、角化細胞に高発現する RXR α を介して作用し、角化細胞が TNF- α 刺激を受けることで発現が誘導される好中球を誘引するケモカイン CXCL1、CXCL2 の遺伝子発現を抑制することで、好中球の炎症部位への浸潤を抑制した結果、CHS を抑制したと考えられた (Figure 2-11)。

角化細胞の機能を直接制御する EPA 代謝物はこれまでに報告されていなかったことから、本研究により見いだした 12-HEPE は、角化細胞を起点とした炎症反応の制御に有効な貴重な脂肪酸代謝物となる。さらに、角化細胞が関与する皮膚疾患は数多く存在することから、12-HEPE は ACD に限らず、アトピー性皮膚炎や乾癬など炎症に角化細胞の活性化が寄与する疾患の抑制にも有効であると考え、今後、その他の病態モデルを用いて 12-HEPE の有用性を検討することで、幅広い応用展開が期待できる。

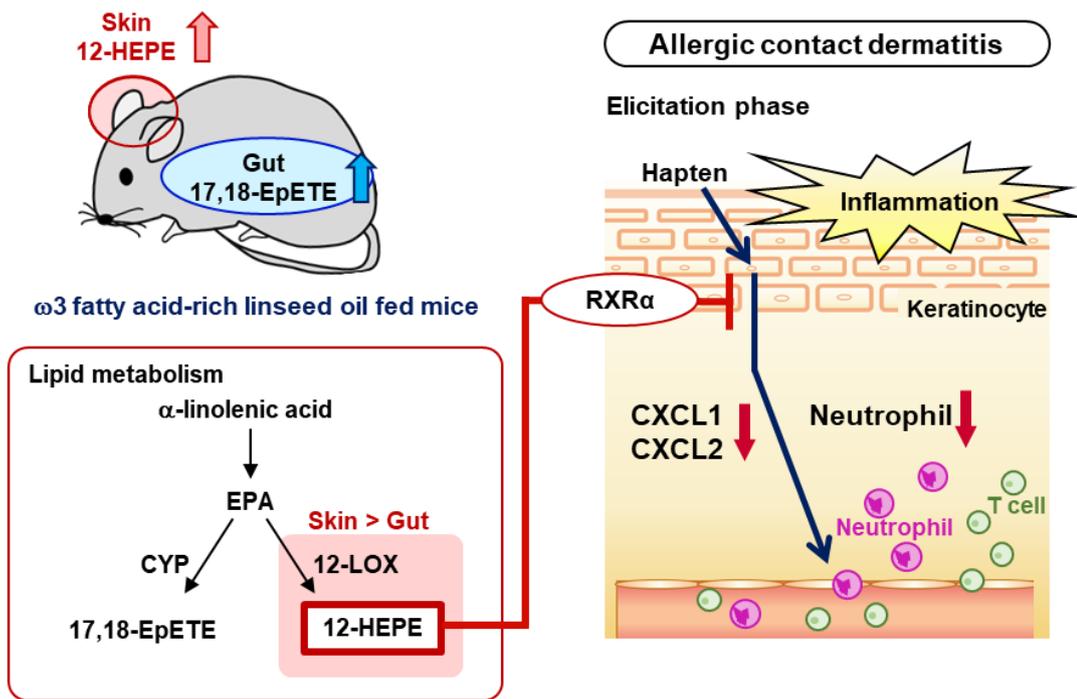


Figure 2-11. Graphical summary¹³⁶

12-HEPE, which is a 12-LOX metabolite of EPA, was the prominent metabolite accumulated in the skin when mice were fed ω 3 fatty acid-rich linseed oil. Consistently, the gene expression levels of *Alox12* and *Alox12b* were much higher in the skin compared with in the other tissues (e.g., gut). We found that topical application of 12-HEPE inhibited the inflammation associated with CHS by inhibiting neutrophil infiltration into the skin. Indeed, 12-HEPE inhibited the expression of two neutrophil chemoattractant-encoding genes, *CXCL1* and *CXCL2*, in human keratinocytes via RXR α .

総括

ACD は一般的な皮膚疾患であるが、未だに安全性と有効性の高い改善方法は見いだされていない。ACD 罹患者には抗原との接触の回避及びステロイド外用剤の使用が推奨されるが、抗原が判明していない場合または、適切に抗原からの防御が行われていない場合には難治性となり治療に苦慮することが多い。また、ステロイド外用剤には副作用の懸念があることや、その効き方には個人差があることが課題となっている。そこで本研究では、安全性と有効性の高い新規予防、治療薬候補分子として生体内の脂肪酸代謝物であるオメガ3脂肪酸代謝物に着目し、オメガ3脂肪酸代謝物のアレルギー性皮膚炎抑制効果とその作用メカニズムの解明に取り組んだ。

第一章では、これまでに当研究室で抗アレルギー、抗炎症活性を示すことを報告していた 17,18-EpETE の研究をさらに発展させ、17,18-EpETE に存在する 2 種類の鏡像異性体の構造活性相関の解明を行った。また、今後の展開として 17,18-EpETE の医薬品及び健康食品素材としての活用が期待されることから、17,18-EpETE の微生物酵素を用いた立体選択的な産生技術の確立に取り組んだ。その結果、(±)17,18-EpETE に存在する 2 種類の異性体のうち、17(R),18(S)-EpETE よりも 17(S),18(R)-EpETE により強い抗炎症活性があることが分かり、そのメカニズムとして、17(S),18(R)-EpETE は GPR40 依存的に好中球の仮足形成を阻害し、好中球の炎症部位への浸潤を抑制することを明らかにした⁴³。さらに、抗炎症活性を有する 17(S),18(R)-EpETE を *B. megaterium* 由来 CYP の BM-3 を

用いて立体選択的に産生する方法を確立した⁴³。

第二章では、亜麻仁油摂取時に皮膚で高生産されるオメガ 3 脂肪酸代謝物の同定と、その抗炎症活性の評価及び作用メカニズムの解明に取り組んだ。その結果、皮膚は他の臓器と比べて 12-LOX をコードする遺伝子 (*Alox12*、*Alox12b*) を強く発現していること、さらに、遺伝子発現量の結果と一致して、12-LOX を介した EPA から 12-HEPE への代謝が皮膚で優勢的に行われていることが分かり、皮膚には 12-LOX 代謝が優位なオメガ 3 脂肪酸代謝系が存在することが明らかになった¹³⁶。また、12-HEPE は角化細胞に発現する RXR α を介して好中球を誘引するケモカイン (CXCL1、CXCL2) の遺伝子発現を抑制し、好中球の炎症部位への浸潤を抑制することで CHS を抑制することを明らかにした¹³⁶。

アレルギー性皮膚炎の治療に一般に用いられるステロイド剤の治療効果に個人差があることの理由として、ACD 発症の原因となる因子に個人差があることが指摘されているが、実際に、ステロイド剤の受容体として知られるグルコルチコイド受容体の細胞特異的欠損マウスに CHS モデルを適用した検討から、ステロイド剤の標的細胞は好中球とマクロファージであることが報告されている¹³⁷。本研究では、好中球を標的とする 17(*S*),18(*R*)-EpETE と表皮角化細胞を標的とする 12-HEPE の 2 種類の異なる細胞を標的とする機能性オメガ 3 脂肪酸代謝物を同定していることから、本研究成果は、個々の炎症病態に合わせた個別化、層別化医療の実現及び選択薬剤の幅を広げる重要な知見を提供した。さらに、これら作用点の異なる複数のオメガ 3 脂肪酸代

謝物を併用することで、治療効果が高まることも期待できる。また、ステロイド剤の場合、過剰な免疫抑制作用が副作用の原因の一つとしてあげられるが、オメガ3 脂肪酸代謝物は炎症誘導時に認められる細胞の活性化を抑制することで抗炎症作用を示すことから、安全性が高いと考えられる。

脂肪酸代謝物の創薬開発の現状として、RvE1 の代謝安定性を高めた人工合成類縁体がヒトのドライアイ症候群の治療薬として有効であるとの臨床試験結果が報告されている他^{16,138}、白内障手術後の眼の炎症抑制に対する有効性を評価する第II相試験が実施されている¹³⁹。また、リポキシン A₄ の類縁体は歯周炎治療の用途で臨床試験が進められている¹⁴⁰。このように、脂肪酸代謝物は医薬品として現在開発途上にある。今後、17(S),18(R)-EpETE 及び 12-HEPE の安全性、代謝安定性に関する検討や、ヒト臨床サンプルを用いた臨床妥当性の検討など、ヒトへの適用に向けた検討を進めることで、本研究成果が脂質創薬研究ならびに皮膚疾患に対する医療の発展に貢献することを期待する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました、大阪大学薬学研究科ワクチン材料学分野 國澤 純 教授（国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチン・アジュバント研究センターワクチンマテリアルプロジェクト・腸内環境システムプロジェクト センター長）に深く感謝申し上げます。

また、副査としてご指導賜りました、大阪大学大学院薬学研究科ワクチン・免疫制御学分野 岡田 直貴 教授、医薬品・医療機器規制科学分野 近藤 昌夫 教授、生体応答制御学分野 齊藤 達哉 教授に深くお礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、日々種々のご指導を賜り、支えていただきました、医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチン・アジュバント研究センターワクチンマテリアルプロジェクト・腸内環境システムプロジェクト 長竹 貴広 博士、細見 晃司 博士、Prabha Tiwari 博士、野出 絵里 様、森本 紗貴子 様、昨年度まで同プロジェクトで特任研究員として所属され、現在、麻布大学 生命・環境科学部 食品生命科学科の松永安由 特任助教、Weill Cornell Medicine の平田 宗一郎 博士に心より感謝申し上げます。

接触過敏症モデルマウス立ち上げにご協力下さるとともに、皮膚科学について貴重なご指導、ご助言を賜りました、京都大学医学研究科皮膚科学講座 梶島 健治 教授、浜松医科大学皮膚科学講座 本田 哲也 教授に深くお礼申し上げます。

修士課程の学生として京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学分野に在籍していた時から引き続きご指導を賜り、本研究における脂肪酸の単離及び微生物酵素を用いた脂肪酸代謝物の生成にご協力下さるとともに、貴重なご助言を賜りました、京都大学大学院農学研究科発酵生理及び醸造学分野 小川 順 教授、岸野 重信 准教授、朴 時範 博士、北村 苗穂子 様に深くお礼申し上げます。

質量分析システムの立ち上げと利用についてご指導賜りました、慶應義塾大学薬学部代謝生理化学講座 有田 誠 教授、医薬基盤・健康・栄養研究所プロテオームリサーチプロジェクト・創薬標的プロテオミクスプロジェクト 足立 淳 プロジェクトリーダー、朝長 毅 博士、阿部 雄一 博士、磯山 純子 様に深くお礼申し上げます。

また、実験の技術的なサポート及び活発なディスカッションにより、日々の研究活動を支えていただきました、医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチン・アジュバント研究センターワクチンマテリアルプロジェクト・腸内環境システムプロジェクトの皆様、大阪大学大学院連携大学院生の皆様に感謝申し上げます。

最後に、学生生活を暖かく見守り、支えてくれた家族に心より感謝いたします。

参考文献

1. Frota KMG, Matias ACG, Arêas JAG. Influence of food components on lipid metabolism: scenarios and perspective on the control and prevention of dyslipidemias. *Food Science and Technology*. 2010;30:7-14.
2. Lichtenstein AH, Kennedy E, Barrier P, et al. Dietary fat consumption and health. *Nutr Rev*. 1998;56(5):S3-19.
3. Lee JM, Lee H, Kang S, Park WJ. Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*. 2016;8(1):23.
4. Saika A, Nagatake T, Kunisawa J. host- and microbe-dependent dietary lipid metabolism in the control of allergy, inflammation, and immunity. *Front Nutr*. 2019;6:36.
5. Nagatake T, Kunisawa J. Emerging roles of metabolites of ω 3 and ω 6 essential fatty acids in the control of intestinal inflammation. *Int Immunol*. 2019;31(9):569-577.
6. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol*. 2020;180:114147.
7. Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet*. 1978;2(8081):117-119.
8. Mozaffarian D, Rimm EB. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA*. 2006;296(15):1885-1899.
9. Miyata J, Arita M. Role of omega-3 fatty acids and their metabolites in asthma and allergic diseases. *Allergol Int*. 2015;64(1):27-34.
10. Del Gobbo LC, Imamura F, Aslibekyan S, et al. ω -3 polyunsaturated fatty acid biomarkers and coronary heart disease: Pooling project of 19 cohort studies. *JAMA Intern Med*. 2016;176(8):1155-1166.
11. Calder PC. Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future. *Proc Nutr Soc*. 2018;77(1):52-72.

12. Alshatwi AA, Subash-Babu P. Effects of increasing ratios of dietary omega-6/omega-3 fatty acids on human monocyte immunomodulation linked with atherosclerosis. *Journal of functional foods*. 2018;41:258-267.
13. Wang M, Zhang X, Ma LJ, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate ethanol-induced adipose hyperlipolysis: A mechanism for hepatoprotective effect against alcoholic liver disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(12):3190-3201.
14. Arita M. Mediator lipidomics in acute inflammation and resolution. *J Biochem*. 2012;152(4):313-319.
15. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014;510(7503):92-101.
16. Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J Clin Invest*. 2018;128(7):2657-2669.
17. Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy BD. Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;7(2):a016311.
18. Ishihara T, Yoshida M, Arita M. Omega-3 fatty acid-derived mediators that control inflammation and tissue homeostasis. *Int Immunol*. 2019;31(9):559-567.
19. Im DS. Omega-3 fatty acids in anti-inflammation (pro-resolution) and GPCRs. *Prog Lipid Res*. 2012;51(3):232-237.
20. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*. 2007;447(7146):869-874.
21. Dona M, Fredman G, Schwab JM, et al. Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets. *Blood*. 2008;112(3):848-855.
22. So JK, Hamstra A, Calame A, Hamann CR, Jacob SE. Another great imitator: allergic contact dermatitis differential diagnosis, clues to diagnosis, histopathology, and treatment. *Current Treatment Options in Allergy*. 2015;2(4):333-348.
23. Alinaghi F, Bennike NH, Egeberg A, Thyssen JP, Johansen JD. Prevalence of contact allergy in the general population: A systematic review and meta-analysis. *Contact*

- Dermatitis*. 2019;80(2):77-85.
24. Kabashima K, Honda T, Ginhoux F, Egawa G. The immunological anatomy of the skin. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(1):19-30.
 25. Taner S, Ozgen O. Corticosteroids for skin delivery: Challenges and new formulation opportunities. *IntechOpen*, DOI: 10.5772/53909.
 26. Coondoo A, Phiske M, Verma S, Lahiri K. Side-effects of topical steroids: A long overdue revisit. *Indian Dermatol Online J*. 2014;5(4):416-425.
 27. Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2013;133(2):303-315.
 28. Lee HY, Stieger M, Yawalkar N, Kakeda M. Cytokines and chemokines in irritant contact dermatitis. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:916497.
 29. Erkes DA, Selvan SR. Hapten-induced contact hypersensitivity, autoimmune reactions, and tumor regression: plausibility of mediating antitumor immunity. *J Immunol Res*. 2014;2014:175265.
 30. Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, et al. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1064-1069.
 31. Kunisawa J, Arita M, Hayasaka T, et al. Dietary ω 3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut. *Sci Rep*. 2015;5:9750.
 32. Nagatake T, Shiogama Y, Inoue A, et al. The 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid-G protein-coupled receptor 40 axis ameliorates contact hypersensitivity by inhibiting neutrophil mobility in mice and cynomolgus macaques. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(2):470-484.e412.
 33. Isobe Y, Itagaki M, Ito Y, et al. Comprehensive analysis of the mouse cytochrome P450 family responsible for omega-3 epoxidation of eicosapentaenoic acid. *Sci Rep*. 2018;8(1):7954.

34. Kelly SL, Kelly DE. Microbial cytochromes P450: biodiversity and biotechnology. Where do cytochromes P450 come from, what do they do and what can they do for us? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;368(1612):20120476.
35. Capdevila JH, Wei S, Helvig C, et al. The highly stereoselective oxidation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450BM-3. *J Biol Chem.* 1996;271(37):22663-22671.
36. Shirane N, Sui Z, Peterson JA, Ortiz de Montellano PR. Cytochrome P450BM-3 (CYP102): regiospecificity of oxidation of omega-unsaturated fatty acids and mechanism-based inactivation. *Biochemistry.* 1993;32(49):13732-13741.
37. Hammerer L, Winkler CK, Kroutil W. Regioselective biocatalytic hydroxylation of fatty acids by cytochrome P450s. *Catalysis Letters.* 2018;148(3):787-812.
38. Adrio JL, Demain AL. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules.* 2014;4(1):117-139.
39. Chapman J, Ismail A, Dinu C. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts.* 2018;8(6):238.
40. Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab.* 2005;1(4):245-258.
41. Yao FM, Palmer SL, Khanolkar AD, Tian X, Guo J, Makriyannis A. Synthesis of 15N-, 13C-, and 2H-labeled methanandamide analogs. *J Label Compd Radiopharm.* 2003;46(2):115-129.
42. Misawa N, Nodate M, Otomatsu T, et al. Bioconversion of substituted naphthalenes and β -eudesmol with the cytochrome P450 BM3 variant F87V. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90(1):147-157.
43. Saika A, Nagatake T, Kishino S, et al. 17(S), 18(R)-epoxyeicosatetraenoic acid generated by cytochrome P450 BM-3 from *Bacillus megaterium* inhibits the development of contact hypersensitivity via G-protein-coupled receptor 40-mediated neutrophil suppression. *FASEB BioAdvances.* 2020;2(1):59-71.

44. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med.* 2000;192(8):1197-1204.
45. Endo J, Sano M, Isobe Y, et al. 18-HEPE, an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages, prevents pressure overload-induced maladaptive cardiac remodeling. *J Exp Med.* 2014;211(8):1673-1687.
46. Ishida T, Yoshida M, Arita M, et al. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(1):87-95.
47. McConathy J, Owens MJ. Stereochemistry in drug action. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry.* 2003;5(2):70-73.
48. Eriksson T, Björkman S, Höglund P. Clinical pharmacology of thalidomide. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001;57(5):365-376.
49. Vargesson N. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2015;105(2):140-156.
50. Falck JR, Wallukat G, Puli N, et al. 17(*R*),18(*S*)-epoxyeicosatetraenoic acid, a potent eicosapentaenoic acid (EPA) derived regulator of cardiomyocyte contraction: structure-activity relationships and stable analogues. *J Med Chem.* 2011;54(12):4109-4118.
51. Lauterbach B, Barbosa-Sicard E, Wang MH, et al. Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators. *Hypertension.* 2002;39(2):609-613.
52. Dézsi CA, Szentes V. The real role of β -blockers in daily cardiovascular therapy. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2017;17(5):361-373.
53. Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubes P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol.* 2002;159(1):91-102.
54. Zhang H, Sun C, Glogauer M, Bokoch GM. Human neutrophils coordinate chemotaxis by

- differential activation of Rac1 and Rac2. *J Immunol.* 2009;183(4):2718-2728.
55. Wu D. Signaling mechanisms for regulation of chemotaxis. *Cell Res.* 2005;15(1):52-56.
 56. Okamoto F, Saeki K, Sumimoto H, Yamasaki S, Yokomizo T. Leukotriene B₄ augments and restores Fc gammaR_s-dependent phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem.* 2010;285(52):41113-41121.
 57. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):349-361.
 58. Cash JL, Bena S, Headland SE, McArthur S, Brancaleone V, Perretti M. Chemerin15 inhibits neutrophil-mediated vascular inflammation and myocardial ischemia-reperfusion injury through ChemR23. *EMBO Rep.* 2013;14(11):999-1007.
 59. Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:101-137.
 60. Weber FC, Németh T, Csepregi JZ, et al. Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *J Exp Med.* 2015;212(1):15-22.
 61. Mortaz E, Alipour SD, Adcock IM, Mumby S, Koenderman L. Update on neutrophil function in severe inflammation. *Front Immunol.* 2018;9:2171.
 62. Wang WM, Jin HZ. Role of Neutrophils in Psoriasis. *J Immunol Res.* 2020;2020:3709749.
 63. Bian Z, Guo Y, Ha B, Zen K, Liu Y. Regulation of the inflammatory response: enhancing neutrophil infiltration under chronic inflammatory conditions. *J Immunol.* 2012;188(2):844-853.
 64. Drechsler M, Megens RT, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation.* 2010;122(18):1837-1845.
 65. Choudhary D, Jansson I, Schenkman JB, Sarfarazi M, Stoilov I. Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. *Arch Biochem Biophys.* 2003;414(1):91-100.

66. Choudhary D, Jansson I, Stoilov I, Sarfarazi M, Schenkman JB. Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1-4) during development and in different adult tissues. *Arch Biochem Biophys*. 2005;436(1):50-61.
67. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013;138(1):103-141.
68. Nebert DW, Wikvall K, Miller WL. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013;368(1612):20120431.
69. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2006;2(6):875-894.
70. McLaughlin LA, Dickmann LJ, Wolf CR, Henderson CJ. Functional expression and comparative characterization of nine murine cytochromes P450 by fluorescent inhibition screening. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(7):1322-1331.
71. Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*. 2004;14(1):1-18.
72. Nebert DW, Karp CL. Endogenous functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR): intersection of cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized eicosanoids and AHR biology. *J Biol Chem*. 2008;283(52):36061-36065.
73. Lucas D, Goullitquer S, Marienhagen J, et al. Stereoselective epoxidation of the last double bond of polyunsaturated fatty acids by human cytochromes P450. *J Lipid Res*. 2010;51(5):1125-1133.
74. Ebisawa A, Hiratsuka M, Sakuyama K, Konno Y, Sasaki T, Mizugaki M. Two novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2D6 gene in Japanese individuals. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2005;20(4):294-299.
75. Pietarinen P, Tornio A, Niemi M. High frequency of CYP2D6 ultrarapid metabolizer

- genotype in the finnish population. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016;119(3):291-296.
76. Hooper LV. You AhR what you eat: linking diet and immunity. *Cell*. 2011;147(3):489-491.
 77. Jeuken A, Keser BJ, Khan E, Brouwer A, Koeman J, Denison MS. Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits. *J Agric Food Chem*. 2003;51(18):5478-5487.
 78. Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res*. 2010;2010.
 79. Kim YI, Hirai S, Takahashi H, et al. 9-Oxo-10(E),12(E)-Octadecadienoic acid derived from tomato is a potent PPAR α agonist to decrease triglyceride accumulation in mouse primary hepatocytes. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(4):585-593.
 80. Takahashi H, Kamakari K, Goto T, et al. 9-Oxo-10(e),12(z),15(z)-octadecatrienoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor α in hepatocytes. *Lipids*. 2015;50(11):1083-1091.
 81. Rigano D, Sirignano C, Tagliatalata-Scafati O. The potential of natural products for targeting PPAR. *Acta Pharm Sin B*. 2017;7(4):427-438.
 82. Sanderson LM, de Groot PJ, Hooiveld GJ, et al. Effect of synthetic dietary triglycerides: a novel research paradigm for nutrigenomics. *PLoS One*. 2008;3(2):e1681.
 83. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(9):4318-4323.
 84. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell*. 1999;3(3):397-403.
 85. Kishino S, Takeuchi M, Park SB, et al. Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(44):17808-17813.
 86. Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S29-34.

87. Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem.* 1999;274(33):22903-22906.
88. Rowlinson SW, Crews BC, Goodwin DC, Schneider C, Gierse JK, Marnett LJ. Spatial requirements for 15-(*R*)-hydroxy-5Z,8Z,11Z, 13E-eicosatetraenoic acid synthesis within the cyclooxygenase active site of murine COX-2. Why acetylated COX-1 does not synthesize 15-(*R*)-hete. *J Biol Chem.* 2000;275(9):6586-6591.
89. Mashima R, Okuyama T. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biol.* 2015;6:297-310.
90. Tjonahen E, Oh SF, Siegelman J, et al. Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis. *Chem Biol.* 2006;13(11):1193-1202.
91. Isobe Y, Arita M, Matsueda S, et al. Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid. *J Biol Chem.* 2012;287(13):10525-10534.
92. Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: A Review. *Curr Drug Targets.* 2018;19(1):38-54.
93. Panigrahy D, Greene ER, Pozzi A, Wang DW, Zeldin DC. EET signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30(3-4):525-540.
94. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):131-185.
95. Hirata SI, Nagatake T, Sawane K, et al. Maternal ω 3 docosapentaenoic acid inhibits infant allergic dermatitis through TRAIL-expressing plasmacytoid dendritic cells in mice. *Allergy.* 2020.
96. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988;106(3):761-771.

97. Cattani F, Gallese A, Mosca M, et al. The role of CXCR2 activity in the contact hypersensitivity response in mice. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17(1):42-48.
98. Dilulio NA, Engeman T, Armstrong D, Tannenbaum C, Hamilton TA, Fairchild RL. G α -mediated recruitment of neutrophils is required for elicitation of contact hypersensitivity. *Eur J Immunol.* 1999;29(11):3485-3495.
99. Takeshita K, Yamasaki T, Nagao K, et al. CRTH2 is a prominent effector in contact hypersensitivity-induced neutrophil inflammation. *Int Immunol.* 2004;16(7):947-959.
100. Guilloteau K, Paris I, Pedretti N, et al. Skin inflammation induced by the synergistic action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1 α , and TNF- α recapitulates some features of psoriasis. *J Immunol.* 2010;184(9):5263-5270.
101. Wahli W, Michalik L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(7):351-363.
102. Lengqvist J, Mata De Urquiza A, Bergman AC, et al. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3(7):692-703.
103. Alvarez-Curto E, Milligan G. Metabolism meets immunity: The role of free fatty acid receptors in the immune system. *Biochem Pharmacol.* 2016;114:3-13.
104. Ecker J, Liebisch G, Patsch W, Schmitz G. The conjugated linoleic acid isomer trans-9,trans-11 is a dietary occurring agonist of liver X receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;388(4):660-666.
105. Bedi S, Hines GV, Lozada-Fernandez VV, et al. Fatty acid binding profile of the liver X receptor α . *J Lipid Res.* 2017;58(2):393-402.
106. Dawson MI, Xia Z. The retinoid X receptors and their ligands. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(1):21-56.
107. Kim HJ, Kim DK, Kim H, et al. Involvement of the BLT2 receptor in the itch-associated scratching induced by 12-(S)-lipoxygenase products in ICR mice. *Br J Pharmacol.* 2008;154(5):1073-1078.

108. Hammarström S, Lindgren JA, Marcelo C, Duell EA, Anderson TF, Voorhees JJ. Arachidonic acid transformations in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 1979;73(2):180-183.
109. Hong SH, Han JE, Ko JS, Do SH, Lee EH, Cho MH. Quantitative determination of 12-hydroxyeicosatetraenoic acids by chiral liquid chromatography tandem mass spectrometry in a murine atopic dermatitis model. *J Vet Sci.* 2015;16(3):307-315.
110. Sorokin AV, Norris PC, English JT, et al. Identification of proresolving and inflammatory lipid mediators in human psoriasis. *J Clin Lipidol.* 2018;12(4):1047-1060.
111. Pilkington SM, Rhodes LE, Al-Aasswad NM, Massey KA, Nicolaou A. Impact of EPA ingestion on COX- and LOX-mediated eicosanoid synthesis in skin with and without a pro-inflammatory UVR challenge report of a randomised controlled study in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(3):580-590.
112. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220):1260419.
113. Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108839-ALOX12>. Accessed January 7, 2021
114. Leiria LO, Wang CH, Lynes MD, et al. 12-Lipoxygenase regulates cold adaptation and glucose metabolism by producing the omega-3 lipid 12-HEPE from brown fat. *Cell Metab.* 2019;30(4):768-783.e767.
115. Johnson EN, Nanney LB, Virmani J, Lawson JA, Funk CD. Basal transepidermal water loss is increased in platelet-type 12-lipoxygenase deficient mice. *J Invest Dermatol.* 1999;112(6):861-865.
116. Epp N, Fürstenberger G, Müller K, et al. 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. *J Cell Biol.* 2007;177(1):173-182.
117. Sawane K, Nagatake T, Hosomi K, et al. Dietary omega-3 fatty acid dampens allergic rhinitis via eosinophilic production of the anti-allergic lipid mediator 15-hydroxyeicosapentaenoic acid in mice. *Nutrients.* 2019;11(12).

118. Buyanravjikh S, Han S, Lee S, et al. Cryptotanshinone inhibits IgE-mediated degranulation through inhibition of spleen tyrosine kinase and tyrosine-protein kinase phosphorylation in mast cells. *Mol Med Rep.* 2018;18(1):1095-1103.
119. Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, et al. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol.* 2002;3(8):741-748.
120. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med.* 2012;18(5):693-704.
121. Dudeck A, Dudeck J, Scholten J, et al. Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity.* 2011;34(6):973-984.
122. Manabe Y, Yoshimura M, Sakamaki K, et al. 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene and its derivatives act as secretagogues on rodent mast cells. *Eur J Immunol.* 2017;47(1):60-67.
123. Tiwari P, Nagatake T, Hirata SI, et al. Dietary coconut oil ameliorates skin contact hypersensitivity through mead acid production in mice. *Allergy.* 2019.
124. Sawada Y, Honda T, Hanakawa S, et al. Resolvin E1 inhibits dendritic cell migration in the skin and attenuates contact hypersensitivity responses. *J Exp Med.* 2015;212(11):1921-1930.
125. Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA. Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J Biol Chem.* 1997;272(23):14899-14907.
126. Kanda N, Shimizu T, Tada Y, Watanabe S. IL-18 enhances IFN-gamma-induced production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes. *Eur J Immunol.* 2007;37(2):338-350.
127. Burke SJ, Lu D, Sparer TE, et al. NF- κ B and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306(2):E131-149.
128. Kastner P, Mark M, Leid M, et al. Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev.* 1996;10(1):80-92.
129. Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Retinoic acid actions through mammalian nuclear

- receptors. *Chem Rev.* 2014;114(1):233-254.
130. Gericke J, Ittensohn J, Mihály J, et al. Regulation of retinoid-mediated signaling involved in skin homeostasis by RAR and RXR agonists/antagonists in mouse skin. *PLoS One.* 2013;8(4):e62643.
 131. Li M, Chiba H, Warot X, et al. RXR-alpha ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal alterations. *Development.* 2001;128(5):675-688.
 132. Li M, Indra AK, Warot X, et al. Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis. *Nature.* 2000;407(6804):633-636.
 133. Li M, Messaddeq N, Teletin M, Pasquali JL, Metzger D, Chambon P. Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(41):14795-14800.
 134. Goloshchapova K, Stehling S, Heydeck D, Blum M, Kuhn H. Functional characterization of a novel arachidonic acid 12S-lipoxygenase in the halotolerant bacterium *Myxococcus fulvus* exhibiting complex social living patterns. *Microbiologyopen.* 2018:e775.
 135. Porta H, Rocha-Sosa M. Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event? *Microbiology (Reading).* 2001;147:3199-3200.
 136. Saika A, Nagatake T, Hirata S, et al. ω 3 fatty acid metabolite, 12-hydroxyeicosapentaenoic acid, alleviates contact hypersensitivity by downregulation of *CXCL1* and *CXCL2* gene expression in keratinocytes via retinoid X receptor α . *FASEB J.* 2021 (in press)
 137. Tuckermann JP, Kleiman A, Moriggl R, et al. Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1381-1390.
 138. Resolvix Pharmaceuticals Inc. Safety and efficacy study of RX-10045 on the signs and symptoms of dry eye. ClinicalTrials.gov Website. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00799552>. Accessed November 3, 2020
 139. A.T. Resolve SARL. Efficacy and safety of RX-10045 ophthalmic solution for ocular inflammation and pain in cataract surgery. ClinicalTrials.gov Website.

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02329743>. Accessed November 3, 2020

140. The Forsyth Institute. Safety and preliminary efficacy of lipoxin analog BLXA4-ME oral rinse for the treatment of gingivitis (BLXA4). ClinicalTrials.gov Website. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02342691>. Accessed November 3, 2020