

オメガ3, オメガ6必須脂肪酸代謝物による免疫制御

長竹 貴広¹・國澤 純^{1,2,3,4*}

はじめに

ヒトをはじめとする哺乳動物は、脂肪酸の $\omega 3$ 位と $\omega 6$ 位に二重結合を導入する不飽和化酵素をもっていないため、 $\omega 3$ 脂肪酸と $\omega 6$ 脂肪酸を体内で合成することができない。そのため、これらは食事により摂取する必要がある必須脂肪酸であり、体内での存在量やバランスは食物に含まれる油の質に大きく依存している。

普段私たちが食事として摂取する代表的な油の一つが植物性食用油であり、その脂肪酸組成は原料となる植物の種類により異なっている。サラダ油原料の一つとして主に使用され、かつ多くの市販マウス飼料に使用されている大豆油は、 $\omega 6$ 脂肪酸のリノール酸を約50%、 $\omega 3$ 脂肪酸の α リノレン酸を約5%含んでいる。一方、亜麻仁油やエゴマ油には α リノレン酸が多く含まれ、その割合は大豆油の10倍以上の約60%にもなる。リノール酸は体内に吸収された後、脂肪酸鎖長伸長酵素や不飽和化酵素の作用を受けてアラキドン酸へと代謝される。 α リノレン酸も同じ代謝経路によりエイコサペンタエン酸(EPA)→n-3ドコサペンタエン酸(n-3 DPA)→ドコサヘキサエン酸(DHA)へと代謝される。これら脂肪酸はさらにシクロオキシゲナーゼ(COX)やリポキシゲナーゼ(LOX)、シトクロムP450(CYP)による代謝を受けて多様な生理活性を示すさまざまな脂質メディエーターへと変換されることが知られている。近年、液体クロマトグラフィーや質量分析計などの分析技術が発展し、これまで測定が困難であった体内の微量代謝物も次々と同定が進み、それら代謝物が有する生理活性について大きな注目が集まっている¹⁾。本稿では、免疫制御における必須脂肪酸代謝物の新たな生理活性について、筆者らの最近の研究成果を概説したい。

EPA代謝物17,18-エポキシエイコサテトラエン酸(17,18-EpETE)の抗アレルギー・抗炎症活性

筆者らは植物性食用油の脂肪酸組成の違いに着目した研究に取り組み、大豆油の代わりに亜麻仁油を用いた特殊飼料をマウスに与えた際のアレルギー・炎症疾患の発

症を評価した。その結果、卵アレルギーモデルにおけるアレルギー性の下痢の発症が抑制されることを見だし、食用油の脂肪酸組成が食物アレルギーの発症を規定する重要な因子であることを報告した²⁾。リピドミクス解析により脂質代謝物を一斉解析したところ、大豆油食マウスに比べて亜麻仁油食マウスの腸管ではEPAを前駆体として代謝産生される17,18-エポキシエイコサテトラエン酸(17,18-EpETE)が顕著に増加していることがわかった²⁾。そこで次に、17,18-EpETEの生理機能を調べるために、化学合成した17,18-EpETEを大豆油食マウスに投与し食物アレルギーの発症率を検討したところ、亜麻仁油食マウスの場合と同様に食物アレルギーの発症抑制効果があることがわかり、17,18-EpETEが実効成分として働いていることが判明した(図1)²⁾。

筆者らはさらに、17,18-EpETEが接触皮膚炎(かぶれ)の抑制にも有効であることをマウスやカンクイザルを用いた実験により明らかにしている³⁾。17,18-EpETEの皮膚炎抑制における作用機序について詳細に解析を行ったところ、好中球の浸潤を抑制することがわかった³⁾。そこで、接触皮膚炎モデルにおいて好中球の遊走を誘導するケモカインであるCXCL1やCXCL2の発現量を調べたが、17,18-EpETE投与による変動は認められなかった³⁾。次に、17,18-EpETEが好中球に直接影響を及ぼす可能性を検討するため、骨髄から調製した好中球に*in vitro*で17,18-EpETEを作用させたところ、走化性因子で刺激した際に認められるRacの活性化や仮足形成が阻害されることが判明した³⁾。さらに、TGF α -shedding assayにより、好中球に強く発現するGタンパク質共役型受容体GPR40を17,18-EpETEの受容体として同定した。具体的には、GPR40欠損状態では、17,18-EpETEの好中球に対する作用や皮膚炎抑制作用が消失することから、GPR40は機能的受容体であることが確認された³⁾。これら一連の結果から、17,18-EpETEは好中球に高発現するGPR40に作用し、Rac活性化を抑制することで仮足形成を抑制し、好中球の遊走を阻害することで接触皮膚炎を軽減していると言える(図1)³⁾。

17,18-EpETEのGPR40活性化能はその前駆体である

*著者紹介 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) E-mail: kunisawa@nibiohn.go.jp

¹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、²大阪大学大学院医学系研究科/薬学研究科/歯学研究科、

³神戸大学大学院医学研究科、⁴東京大学医科学研究所国際粘膜炎ワクチン開発研究センター

EPA や、17,18-EpETEの代謝物でエポキシ環構造が開裂した17,18-ジヒドロキシエイコサテトラエン酸(17,18-diHETE)よりも遥かに強いこともわかり、エポキシ環構造がGPR40を介した抗炎症作用の発現に重要な化学構造であることも示唆された³⁾。実際に、17,18-diHETEには食物アレルギーや接触皮膚炎を抑制する活性は認められないことも確認された^{2,3)}。

17,18-EpETEはEPAを基質としてCYPにより代謝産生され、水溶性エポキシ加水分解酵素により17,18-diHETEへと代謝される。そのため、17,18-EpETEの合成と分解に関与するこれらの酵素活性を制御することで食事により摂取する ω 3脂肪酸の抗アレルギー・抗炎症作用を高められる可能性があることが示唆された。

17,18-EpETEの立体異性体に着目した構造活性相関

17,18-EpETEにはエポキシ環構造の結合の向きにより、17(*S*),18(*R*)-EpETEと17(*R*),18(*S*)-EpETEの立体異性体が存在する。さまざまな立体異性体に異なる生理活性があることが知られているが、筆者らが上述の実験に用いた17,18-EpETEは17(*S*),18(*R*)-EpETEと17(*R*),18(*S*)-EpETEが1:1で含まれたラセミ体であるため、どちらの異性体に抗アレルギー・抗炎症活性があるのか不明であった^{2,3)}。そこで、キラルカラムを用いてそれぞれの立体異性体を分取し、接触皮膚炎モデルを用いて生理活性

を検討したところ、17(*S*),18(*R*)-EpETEにより強い活性があることが新たに判明した⁴⁾。

次に、17(*S*),18(*R*)-EpETEの選択的産生システムの確立を試みた。微生物の一種である*Bacillus megaterium*が17(*S*),18(*R*)-EpETEを選択的に産生できるP450 BM3を有しているという報告に着目し⁵⁾、本酵素の遺伝子をクローニングし大腸菌に発現することで、培地中に加えたEPAが17(*S*),18(*R*)-EpETEに立体選択的に変換されることを確認した⁴⁾。さらにこの方法で得た17(*S*),18(*R*)-EpETEに接触皮膚炎を抑制する強力な抗アレルギー・抗炎症活性があることを明らかにした⁴⁾。

一般に、化合物の化学合成においてはその反応過程で高温高压下での反応条件を要するものも多く、また得られる化合物の立体選択性に乏しいことや廃溶剤の問題もあるが、これらの点において微生物発酵による化合物の生産は温和な反応条件であり立体選択性に優れ、また環境負荷も小さいことから、機能性素材の生産法として優れた特徴を持っていると考えられる。

また最近、17,18-EpETEの合成に関与する哺乳類のCYPサブタイプについての包括的解析が行われ、100種類以上あるマウスCYPのうち、CYP1a2, 2c50, 4a12a, 4a12b, 4f18の5つに17,18-EpETEを産生する強い活性があることが報告された⁶⁾。それぞれの酵素反応によって得られる化合物の立体異性体についても明らかになっ

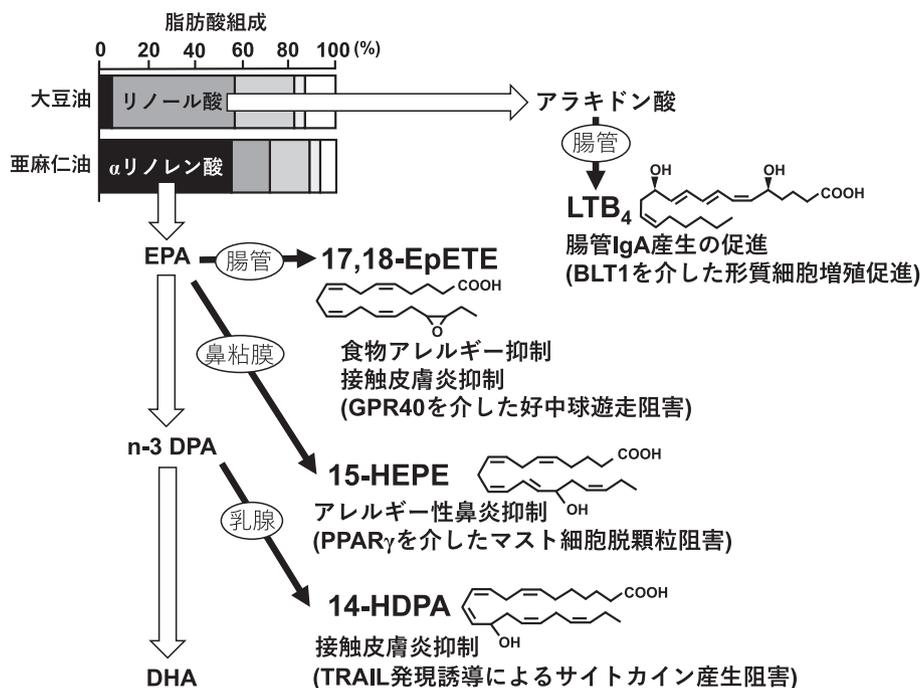


図1. 必須脂肪酸代謝物に見いだされた新たな免疫制御作用。亜麻仁油に多く含まれるオメガ3脂肪酸である α リノレン酸からは抗アレルギー・抗炎症活性を示す17,18-EpETEや15-HEPE, 14-HDPAが産生される。一方、大豆油に多く含まれるオメガ6脂肪酸であるリノール酸からはLTB₄が産生され、腸管IgAの産生を促進する。

ており、CYP2c50とCYP4f18は17(S),18(R)-EpETEを、一方、CYP1a2は17(R),18(S)-EpETEを選択的に産生し、CYP4a12aとCYP4a12bはどちらの異性体も産生することが示されている⁶⁾。接触皮膚炎の抑制という観点では17(S),18(R)-EpETEに強い活性が認められたが、一方、17(R),18(S)-EpETEには電位・カルシウム依存性カリウムチャンネル(BKチャンネル)を介して動脈弛緩作用を発揮するなど17(S),18(R)-EpETEとは異なった生理活性が報告されている⁷⁾。このように、17(S),18(R)-EpETEと17(R),18(S)-EpETEには異なった生理活性があることから、 ω 3脂肪酸含有食品を摂取した後に、17,18-EpETEの立体異性体の違いを含めて代謝物の体内分布がどうなっているのか、代謝酵素の発現臓器・細胞の解明とともに体内代謝マップが明らかになることが期待される。

母乳を介して子どもに伝わる

ω 3脂肪酸代謝物14-ヒドロキシDPA (14-HDPA)による乳幼児アレルギーの抑制

筆者らは最近、亜麻仁油餌で飼育したマウスから生まれた仔マウスは、大豆油餌で飼育したマウスから生まれたものに比べて接触皮膚炎モデルによる耳の腫れが軽減することを見いだしている⁸⁾。興味深いことに、大豆油食マウスから生まれた仔マウスを、亜麻仁油食の雌マウスに哺育させる里子実験を行ったところ、仔マウスの皮膚炎症状が軽減すること、すなわち亜麻仁油摂取による仔マウスの抗アレルギー・抗炎症効果に母乳を介した経路が存在することが判明した⁸⁾。

そこで次に、母体が ω 3脂肪酸を摂取することで母乳中に産生される抗アレルギー物質を同定するためにリピドミクス解析を行ったところ、母体が亜麻仁油を摂取することでEPAやn-3 DPAなどの ω 3脂肪酸が母乳だけでなく仔マウスの血中でも増加することがわかった⁸⁾。そこでこれら ω 3脂肪酸が実効分子となって仔マウスの皮膚炎を抑制した可能性を調べたが、大豆油食マウスで哺育した仔マウスにEPAやn-3 DPAを注射しても皮膚炎症状は抑制されなかった⁸⁾。その一方で、大豆油食の母マウスにn-3 DPAを注射すると仔マウスのアレルギー症状が軽減することが明らかになった⁸⁾。これらの事実から、n-3 DPAを由来に母マウスで産生される代謝物が重要であると考え、さらに詳細に脂肪酸代謝物を解析したところ、n-3 DPAの12-Lox代謝物である14-ヒドロキシDPA(14-HDPA)が母乳や仔マウスの血中で増加していることを突き止めた⁸⁾。さらに、大豆油食マウスで哺育した仔マウスに14-HDPAを注射することで接触皮膚炎が抑制されることを明らかにし、本代謝物が実効分子として

機能することで仔マウスの接触皮膚炎が抑制されることがわかった⁸⁾。

さらに、14-HDPAの作用機序を詳細に解析したところ、皮膚の形質細胞様樹状細胞に働きかけ、T細胞の活性化を抑制する分子として機能するTNF related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)の発現を増加させ、その結果、T細胞からのインターフェロン γ の産生量が低下することがわかった⁸⁾。TRAILに対する中和抗体を仔マウスに投与することで皮膚炎抑制作用が消失したことから、TRAILが免疫抑制のエフェクター分子として機能し、皮膚炎症状を軽減させていることが示された(図1)⁸⁾。

また、14-HDPAが母乳中に高産生されるという事実から、母乳産生の場合である乳腺は他の臓器とは異なる脂質代謝環境にあることが予想された。実際に解析を行ったところ、肝臓で高いレベルで認められる脂肪酸鎖長伸長酵素Elovl2の発現が乳腺においてはほとんど認められないという特徴が判明した⁸⁾。14-HDPAの前駆体であるn-3 DPAを仔マウスに注射しても皮膚炎が抑制されなかった要因として、肝臓のElovl2の働きによりn-3 DPAからテトラコサペンタエン酸に代謝されてしまうことが考えられた。このように、乳腺は肝臓とは異なったユニークな代謝環境にあることで、n-3 DPAから14-HDPAへの優先的な代謝が行われる脂質代謝環境になっていることが示唆された。

EPA代謝物15-ヒドロキシエイコサペンタエン酸(15-HEPE)によるアレルギー性鼻炎の抑制

筆者らは最近、 ω 3脂肪酸の摂取がアレルギー性鼻炎の発症に与える影響について検討を行ったところ、亜麻仁油餌で飼育したマウスは大豆油食マウスに比べて、くしゃみの回数が減少することを見だし、 ω 3脂肪酸の摂取によってアレルギー性鼻炎が軽減することを明らかにした⁹⁾。アレルギー性鼻炎を誘導した亜麻仁油食マウスの鼻粘膜を回収しリピドミクス解析を行うと、EPAの12/15-LOX(*Alox15*)代謝物である15-ヒドロキシエイコサペンタエン酸(15-HEPE)が特に増加していることがわかった⁹⁾。そこで化学合成した15-HEPEを大豆油食マウスに経鼻投与すると、亜麻仁油食マウスの場合と同様にくしゃみが抑制されることがわかり、その作用は核内受容体の一つであるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ)の機能に依存して発揮されることもわかった⁹⁾。

次に、鼻粘膜における15-HEPEの主な産生細胞の検討を行ったところ、責任酵素である*Alox15*が好酸球に高発現していることが判明した⁹⁾。実際に、*in vitro*で培

養した好酸球にEPAを加えると、15-HEPEが培地中に産生されることもわかり、さらに、アレルギー性鼻炎モデルのマウスにIL-5やCCL11に対する中和抗体を投与して好酸球の分化や遊走を阻害する処置を行うと、亜麻仁油による抗アレルギー効果が消失することから、亜麻仁油によるアレルギー性鼻炎の改善効果において、好酸球が15-HEPEを産生することで重要な役割を果たしていることが判明した⁹⁾。一般に、好酸球はアレルギー性炎症疾患における炎症性細胞と考えられているが、今回の研究結果から、 ω 3脂肪酸が十分にある環境中では抗アレルギー脂質メディエーター15-HEPEの産生細胞として働き、抗炎症作用を担うことが示唆された。さらに、15-HEPEの作用機序について解析を進めると、肥満細胞に働きかけて脱顆粒を阻害する作用があることが明らかになった(図1)⁹⁾。

ω 6脂肪酸代謝物ロイコトリエンB₄(LTB₄)-BLT1伝達による自然免疫シグナルと連動した腸管IgA抗体の産生促進作用

ω 6脂肪酸のアラキドン酸代謝物の一つであるロイコトリエンB₄(LTB₄)は、好中球や好酸球、エフェクターT細胞、樹状細胞などに発現するGタンパク質共役型受容体BLT1を介し、これら炎症性細胞の遊走を誘導することでアレルギー性炎症疾患の発症に関わることが知られている¹⁰⁾。一方で、B細胞におけるBLT1の発現の有無やLTB₄の抗体産生への影響は長らく不明であった。

そこで筆者らは最近、腸管免疫の要となる分泌型IgA抗体の産生におけるBLT1の役割について解析を行った。腸管免疫システムは、免疫誘導組織として機能するパイエル板にIgM型抗体を細胞表面に発現するナイーブB細胞が集積しており、そこで抗原刺激を受けたB細胞は抗体クラススイッチを起こしてIgA型抗体を細胞表面に発現するようになる。IgA抗体陽性となったB細胞は腸管免疫システムの実効組織にあたる絨毛の粘膜固有層に遊走し、形質細胞に最終分化することで大量の抗原特異的分泌型IgA抗体を産生する。

筆者らは、これら腸管B細胞の各分化段階におけるBLT1の発現について検討を行った結果、IgM抗体を発現するナイーブB細胞にはBLT1の発現がほとんど認められなかったものの、IgA抗体を発現するようにクラススイッチしたB細胞や形質細胞にはBLT1が発現していることを見いだした¹¹⁾。BLT1が腸管IgA抗体の産生において何らかの役割を果たしている可能性が示唆されたことから、BLT1欠損マウスにコレラ毒素を抗原として用いた経口ワクチンの投与を行ったところ、糞便中に分

泌される抗原特異的IgA抗体の産生量が野生型マウスに比べて著減し、コレラ毒素投与による下痢発症に対しても防御効果が減弱することが明らかになった¹¹⁾。したがって、BLT1は経口ワクチンの成立に必須の分子機構として働くことが明らかになった(図1)。

経口ワクチン抗原に対する抗原特異的分泌型IgA抗体の産生量がBLT1の欠損により減少する要因を調べたところ、パイエル板におけるIgM型抗体からIgA型抗体へのクラススイッチの過程に変動は認められなかったものの、小腸粘膜固有層の抗原特異的形質細胞の数が減少していることを突き止めた¹¹⁾。さらにこの要因を詳細に解析すると、パイエル板B細胞の遊走や形質細胞の生存・細胞死にBLT1はほとんど影響を与えていなかったが、BLT1欠損マウスでは形質細胞の増殖が抑制されていることが判明した¹¹⁾。さまざまな因子が形質細胞の増殖に関与すると考えられたが、その中で筆者らはToll-like受容体(TLRs)を介した自然免疫シグナルを伝えるMyD88の発現がBLT1欠損マウスの形質細胞で減弱していることを見いだした¹¹⁾。腸管粘膜では膨大な数の腸内細菌が存在するため、腸内細菌-TLRs-MyD88を介した細胞増殖シグナルが、LTB₄-BLT1-MyD88シグナルによって促進される可能性が考えられた。実際に、野生型マウスに抗生剤を飲ませることで腸内細菌を減少させた場合、あるいはMyD88欠損マウスを用いた場合には、経口免疫後の抗原特異的IgA抗体の産生レベルがBLT1欠損マウスと同等レベルにまで減弱することが確認され、経口ワクチンにおける腸管IgA抗体の産生にはBLT1を介する脂質シグナルと、MyD88を介する自然免疫シグナルが協調的に働くことが重要であることが示唆された¹¹⁾。

これらの結果から、効果的な経口ワクチンの実施・開発には抗原やデバイスといったワクチンマテリアルの選定・開発に加え、栄養状態や腸内細菌といった宿主の腸内環境を整えておくことも重要な要素になると考えられる。

おわりに

本稿では、必須脂肪酸代謝物に新たに見いだされた免疫制御活性について、アレルギー・炎症反応や経口ワクチンにおける作用機序を中心に概説した。必須脂肪酸の代謝は体内の酵素反応だけではなく、腸内細菌によっても行われることが知られ、その代謝物の機能性も次第に明らかになってきている。したがって、必須脂肪酸を摂取した際の効能は、個人の代謝酵素の発現レベルや腸内細菌叢によっても影響を受けることが考えられる。今後の展望として、実効代謝物を機能性素材として開発することが重要である。また、必須脂肪酸の摂取による健康

増進効果を考えた時には、代謝を制御する素材の探索や、プロバイオティクスに代表される腸内細菌叢への介入も重要な要素として研究開発が進むことが期待される。

文 献

- 1) Ishihara, T. *et al.*: *Int. Immunol.*, **31**, 559 (2019).
- 2) Kunisawa, J. *et al.*: *Sci. Rep.*, **5**, 9750 (2015).
- 3) Nagatake, T. *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **142**, 470 (2018).
- 4) Saika, A. *et al.*: *FASEB Bioadv.*, **2**, 59 (2019).
- 5) Capdevila, J. H. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **271**, 22663 (1996).
- 6) Isobe, Y. *et al.*: *Sci. Rep.*, **8**, 7954 (2018).
- 7) Lauterbach, B. *et al.*: *Hypertension*, **39**, 609 (2002).
- 8) Hirata, S. *et al.*: *Allergy*, **75**, 1935 (2020).
- 9) Sawane, K. *et al.*: *Nutrients*, **11**, E2868 (2019).
- 10) Sasaki, F. *et al.*: *Int. Immunol.*, **31**, 607 (2019).
- 11) Nagatake, T. *et al.*: *Mucosal Immunol.*, **12**, 1082 (2019).