







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第687号	氏名	尾崎貴士
審査委員会委員	主査氏名	秦 聡孝	
	副査氏名	松浦恵子	
	副査氏名	甲斐 恵	
論文題目 Comprehensive lipidomics of lupus-prone mice using LC-MS/MS identifies the reduction of palmitoylethanolamide that suppresses TLR9-mediated inflammation (ループモデルマウスの体内で低値を示すパルミトイルエタノールアミドは、Toll 様受容体 9 を介する炎症を抑制する -液体クロマトグラフ質量分析法による網羅的解析-)			
論文掲載雑誌名 Genes to Cells			
論文要旨 【緒言 (目的)】全身性エリテマトーデス (SLE) は、多臓器に慢性的な炎症や障害を及ぼす自己免疫疾患であり、一部に難治例が存在し新たな治療薬の開発が望まれる。本研究では、SLE に関連する炎症病態を抑制する脂質メディエーターを同定することを目的とした。 【研究対象及び方法】SLE モデルマウス (MRL/lpr マウス) と野生型マウス (MRL/MpJ マウス) の脾臓に含まれる脂質メディエーターを、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて測定した。両マウス群で有意な差を示す脂質メディエーターに着目し、SLE に関わる炎症の抑制作用について免疫担当細胞及び炎症性疾患モデルマウスを用いて検討した。 【結果】腎炎を発症した老齢 MRL/lpr マウスと老齢 MRL/MpJ マウスの脾臓を LC-MS/MS で解析し、計 24 種の脂質メディエーター関連物質を検出した。その中で、N-アシルエタノールアミドの一種であるパルミトイルエタノールアミド (PEA) 濃度が MRL/lpr マウスで有意に低く、多変量解析では両マウス群の差異に最も寄与する物質であった。そこで、SLE の病態機序に関与する Toll 様受容体 9 (TLR9) を介する炎症に対して、PEA が抑制作用を有するか検討した。In vitro では、マウスマクロファージ様細胞 (RAW 264.7 細胞)、マウス骨髄由来樹状細胞、マウス脾臓 B 細胞に TLR9 刺激 (CpG-ODN) を加えた際に分泌される炎症性サイトカインの産生を PEA は抑制することを見出した。また、TLR9 刺激による細胞表面マーカーの発現や、B 細胞増殖、IgM 抗体産生に対して、PEA は抑制作用を有することを明らかにした。さらに、野生型マウスに CpG-ODN を投与する敗血症モデルマウスに対して PEA を投与した結果、血中 IL-6 濃度が低下し、生存率が著明に改善することを明らかにした。 【考察】本研究では、腎炎未発症の若齢 MRL/lpr マウスと MRL/MpJ マウスに PEA 濃度の差は見られず、PEA と炎症に何らかの関連性が示唆されるが、同マウスにおける PEA の合成や分解といった代謝経路の変化をはじめ詳細な機序は不明である。また、TLR9 を介する炎症性サイトカイン産生を PEA は mRNA 及び蛋白レベルで抑制したが、PEA が作用する受容体を含めた分子メカニズムの解明には至っていない。 【結語(まとめ)】PEA は TLR9 刺激を介する炎症を in vitro 及び in vivo で抑制することから、TLR9 が関与する炎症性疾患の治療応用への発展が期待される。  本研究は、SLE モデルマウスなどを用いて、脂質メディエーター関連物質であるパルミトイルエタノールアミド (PEA) が TLR9 刺激を介する炎症を抑制することを明らかにした、意義のある成果である。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第687号	氏名	尾崎貴士
審査委員会委員	主査氏名	秦 聡寿	
	副査氏名	松浦 恵子	
	副査氏名	甲斐 恵	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 研究で使用したSLEモデルマウスの妥当性について。数あるモデルマウスの中からヒトSLEを最も模倣したモデルマウスと考えるか。</li> <li>2. SLE患者で血中PEAが低下しているという報告はあるか。</li> <li>3. PEAの生体内での局在および加齢による発現・濃度変化について、述べよ。</li> <li>4. SLEにおいて、IL-6、B細胞は病態にどう関係しているか。</li> <li>5. SLEの病態形成ならびに病態進展とTLR9の関連性についてどのように考えられているか。比較的確立された仮説なのか。保護的に働くという報告もあるが。</li> <li>6. CpG-ODNをリガンドとしてTLR9を刺激しているが、これはヒトSLEにおけるTLR9活性化機序を再現できているか（メチル化の程度の観点から）。</li> <li>7. 腎臓などではなく、脾臓・血清のみを研究対象とした理由を述べよ。</li> <li>8. マクロファージ様細胞ではPEAを12時間前に先行投与しているが、その理由を述べよ。</li> <li>9. LC-MSの多変量解析に用いた統計学的解析法(SIMCA)について、説明せよ。</li> <li>10. LC-MS/MS Table1 relative PEA peak intensityが物質毎に違うのはどういう意味か、またFig1(e)-(f) 縦軸の relative PEA peak intensity との関係は何か。</li> <li>11. PEA以外のメディエーターAEA, OEAではどうだったか。</li> <li>12. Fig1(e)について、個体数を増やすと有意差が出るのではないか、見解を述べよ。</li> <li>13. Fig2(b)について、TNF-αのmRNAレベルでの変化を検討したか説明せよ。</li> <li>14. Fig2(c)について、PEA10μMの前処理によってIL-6濃度は有意に低下しているが、既報と比較して低用量なのか。</li> <li>15. PEA添加後の細胞形態や増殖への影響について、知見を述べよ。</li> <li>16. Fig5(b)にて、PEA群の本研究の観察期間終了後の変化について述べよ。</li> <li>17. 敗血症モデルマウスの致死率を完全に抑制した理由は、IL-6の減少の他何が考えられるか、また事前投与でなく事後投与は検討したか、SLEでは敗血症になりやすいのか。</li> <li>18. PEAがIL-6のmRNA等を抑制するのは、どういう分子あるいはパスウェイに働きかけているからだと思えるか。</li> <li>19. in vivo実験でのPEAの抗炎症効果はPPARαを介したものであるという報告が散見されるが、特に本研究の敗血症マウスの実験で確認された抗炎症効果がPPARαを介した結果ではないといえる根拠を、PPARα阻害薬共存下でのPEA効果検証の実験結果をもとに説明してほしい。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 尾崎 貴士

論 文 題 目 Comprehensive lipidomics of lupus-prone mice using LC-MS/MS identifies the reduction of palmitoylethanolamide that suppresses TLR9-mediated inflammation (ループスモデルマウスの体内で低値を示すパルミトイルエタノールアミドは、Toll様受容体9を介する炎症を抑制する —液体クロマトグラフ質量分析法による網羅的解析—)

## 要 旨

【緒言 (目的)】全身性エリテマトーデス (SLE) は、多臓器に慢性的な炎症や障害を及ぼす自己免疫疾患であり、一部に難治例が存在し新たな治療薬の開発が望まれる。近年、オメガ3脂肪酸由来の抗炎症性脂質メディエーターが発見されるなど、脂質を用いた炎症性疾患の治療応用への期待が膨らんでいる。本研究では、SLEに関連する炎症病態を抑制する脂質メディエーターを同定することを目的とした。

【研究対象及び方法】SLEモデルマウス (MRL/lpr マウス) と野生型マウス (MRL/MpJ マウス) の脾臓に含まれる脂質メディエーターを、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて測定した。測定には、159種類の脂質メディエーター関連物質を測定対象とするメソッドパッケージを用いた。両マウス群で有意な差を示す脂質メディエーターに着目し、SLEに関わる炎症の抑制作用について免疫担当細胞及び炎症性疾患モデルマウスを用いて検討した。

**【結果】**

腎炎を発症した老齢 MRL/lpr マウスと老齢 MRL/MpJ マウスの脾臓を LC-MS/MS で解析し、計 24 種の脂質メディエーター関連物質を検出した。その中で、*N*-アシルエタノールアミドの一種であるパルミトイルエタノールアミド (PEA) 濃度が MRL/lpr マウスで有意に低く、多変量解析では両マウス群の差異に最も寄与する物質であった。そこで、SLE の病態機序に関与する Toll 様受容体 9 (TLR9) を介する炎症に対して、PEA が抑制作用を有するか検討した。*In vitro* では、マウスマクロファージ様細胞 (RAW 264.7 細胞)、マウス骨髄由来樹状細胞、マウス脾臓 B 細胞に TLR9 刺激 (CpG-ODN) を加えた際に分泌される炎症性サイトカインの産生を PEA は抑制することを見出した。また、TLR9 刺激による細胞表面マーカーの発現や、B 細胞増殖、IgM 抗体産生に対して、PEA は抑制作用を有することを明らかにした。さらに、野生型マウスに CpG-ODN を投与する敗血症モデルマウスに対して PEA を投与した結果、血中 IL-6 濃度が低下し、生存率が著明に改善することを明らかにした。

**【考察】** MRL/lpr マウスでは Fas の欠損変異が SLE 様病態の発症の主な原因とされているが、同じ遺伝子変異を有する他系統マウスは軽症であることなどから、他の因子の関与が疑われている。本研究では、腎炎未発症の若齢 MRL/lpr マウスと MRL/MpJ マウスに PEA 濃度の差は見られず、PEA と炎症に何らかの関連性が示唆されるが、同マウスにおける PEA の合成や分解といった代謝経路の変化をはじめ詳細な機序は不明である。また、TLR9 を介する炎症性サイトカイン産生を PEA は mRNA 及び蛋白レベルで抑制したが、PEA が作用する受容体を含めた分子メカニズムの解明には至っていない。

**【結語(まとめ)】** PEA は TLR 9 刺激を介する炎症を *in vitro* 及び *in vivo* で抑制することから、TLR9 が関与する炎症性疾患の治療応用への発展が期待される。