

との攻防は、ウイルスや原虫にまで及んでおり、オートファジーによる除去や、あるいは、オートファジーを利用した感染戦略が、次々と明らかになってきている¹⁰⁾。感染制御においてオートファジーは「諸刃の剣」とよく称されるが、宿主側と病原体側のどちらに効果的に働くかは平衡関係にある場合が多数ある。したがって、病原体感染に依存的な選択的オートファジー誘導の機構を解明することは、病原体感染を制御できる大きな可能性を秘めている。

矢野 環

(東北大学大学院薬学研究所)

Autophagy as a host defense against the intracellular microbe infection

Tamaki Yano (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3 Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan)

- 1) Brimingham, C.L., Canadien, V., Kaniuk, N.A., Steinberg, B. E., Higgins, D.E., & Brumell, J.H. (2008) *Nature*, 451, 350-354.
- 2) Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., & Yoshimori, T. (2004) *Science*, 306, 1037-1040.
- 3) Mizushima, N. & Komatsu, M. (2011) *Cell*, 147, 728-741.
- 4) Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., & Deretic, V. (2004) *Cell*, 119, 753-766.
- 5) Meyer-Morse, N., Robbins, J.R., Rae, C.S., Mochegova, S.N., Swanson, M.S., Zao, Z., Virgin, H.W., & Portnoy, D. (2010) *PLoS ONE*, 5, e8610.
- 6) Ogawa, M., Yoshimori, T., Siziki, H., Sagara, H., Mizushima, N., & Sasakawa, C. (2005) *Science*, 307, 727-731.
- 7) Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, T., Ishii, T., Kakizuka, A., Sztul, E., Chakraborty, T., & Sasakawa, C. (2009) *Nat. Cell Biol.*, 11, 1233-1240.
- 8) Yano, T., Mita, S., Omori, H., Oshima, Y., Fujimoto, Y., Ueda, R., Takada, H., Goldman, W.E., Fukase, K., Silverman, N., Yoshimori, T., & Kurata, S. (2008) *Nat. Immunol.*, 9, 908-916.
- 9) Kaneko, T., Yano, T., Aggarwal, K., Lim, J.H., Ueda, K., Oshima, Y., Peach, C., Erturk-Hasdemir, D., Goldman, W.E., Oh, B.H., Kurata, S., & Silverman, N. (2006) *Nat. Immunol.*, 7, 715-723.
- 10) Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.G., Magalhães, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I.G., Allaoui, A., Jones, N.L., Nuñez, G., Girardin, S.E., & Philpott, D.J. (2009) *Nat. Immunol.*, 11, 55-62.
- 11) Dupont, N., Lacas-Gervais, S., Bertout, J., Paz, I., Freche, B., Van Nhieu, G.T., van der Goot, F.G., Sansonetti, P.J., & Laffont, F. (2009) *Cell Host Microbe*, 6, 137-149.
- 12) Zheng, Y.T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., & Brumell, H. (2009) *J. Immunol.*, 183, 5909-5916.
- 13) Kageyama, S., Omori, H., Saitoh, T., Sone, T., Guan, J.L., Akira, S., Imamoto, F., Noda, T., & Yoshimori, T. (2011) *Mol. Biol. Cell*, 22, 2290-2300.
- 14) Levine, B., Mizushima, N., & Virgin, H.W. (2011) *Nature*, 469, 323-335.

炎症のメタボローム解析から明らかになった好酸球の新規機能

1. はじめに

代謝物の網羅的な測定を指向するメタボロミクスの大きな目的の一つは、表現型に最も近い低分子化合物の代謝動態を網羅的かつ定量的に解析し、生物機能との関連を明らかにすることである。近年、それぞれ分析対象となる化合物の物性の違い（水溶性、脂溶性など）に応じてそれぞれ最適化されたシステムが構築されている。本稿では、高速液体クロマトグラフィー・タンデムマスマスペクトロメトリ（LC-ESI-MS/MS）を用いた脂肪酸代謝物の包括的解析から明らかになってきた、炎症の収束に関わる脂質メディエーターと好酸球の新規機能について紹介する¹⁾。

2. 炎症を制御する脂質メディエーター

細胞が刺激を受けると、膜リン脂質からホスホリパーゼA₂の作用によりアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸が遊離し、シクロオキシゲナーゼ（COX）、リポキシゲナーゼ（LOX）、シトクロムP450（CYP）などの酵素反応によって一連の活性代謝物に変換される。COX系からはプロスタグランジンやトロンボキサン、LOX系からはロイコトリエンやリポキシン、CYP系からはヒドロキシ脂肪酸（HETE）やエポキシ脂肪酸（EET）などが生成し、これらは脂質メディエーターとして様々な生体調節機能を有している（図1）。例えばアラキドン酸（20:4 n-6）由来のプロスタグランジン（PG）やロイコトリエン（LT）は、炎症の初期症状である発熱、発赤、浮腫、痛みなどに関わっている。また、アラキドン酸からはリポキシン（LX）や15-deoxy-D^{12,14}-PGJ₂（15d-PGJ₂）など抗炎症性代謝物が産生されることも知られている。一方、魚油などに多く含まれるエイコサペンタエン酸（EPA；20:5 n-3）やドコサヘ

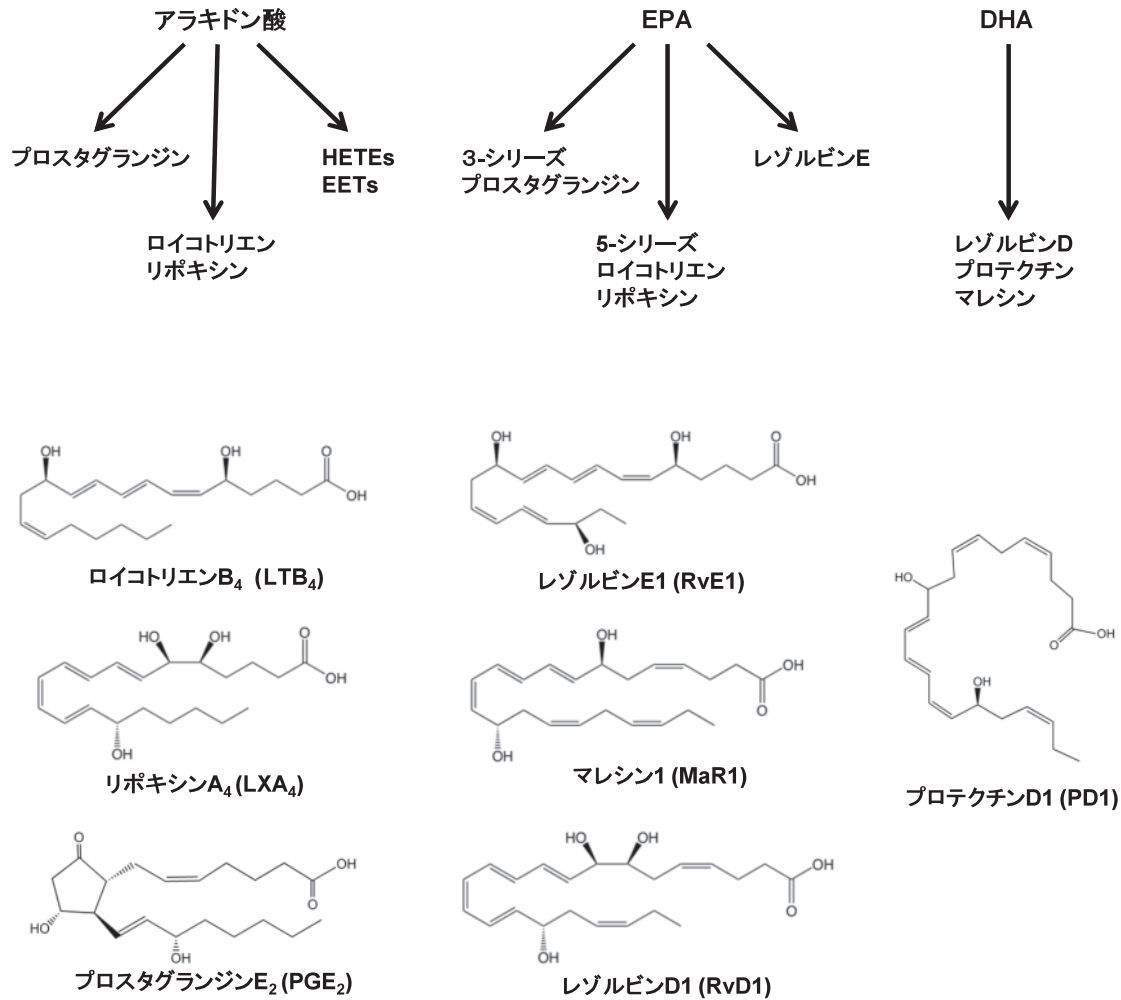


図1 多価不飽和脂肪酸（アラキドン酸，EPA，DHA）から生成する脂質メディエーター

キサエン酸（DHA；22：6 *n*-3）などの *n*-3 系脂肪酸は、古くから抗炎症作用や心血管保護作用があるとされている。また、*n*-3 系脂肪酸合成酵素 FAT-1 トランスジェニックマウスは、多くの疾患モデルにおいて顕著な炎症抵抗性を示すことが報告されている²⁾。*n*-3 系脂肪酸は主にアラキドン酸代謝系と競合することで炎症を抑制すると考えられてきたが、最近新たに *n*-3 系脂肪酸から生成する抗炎症性代謝物（レゾルビン，プロテクチン）が見いだされ、その生理機能が注目されている³⁾。

このような背景のもと、我々はアラキドン酸および *n*-3 系脂肪酸由来の代謝物を包括的に捉える目的で、LC-ESI-MS/MS を用いた脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析システムを確立した^{3,4)}。一般に脂肪酸およびその代謝物は、分子の疎水的性質から逆相 LC での分離に優れる。ま

た末端にカルボキシ基を持ち、負イオンになりやすいため、エレクトロスプレーイオン化（ESI）によるソフトイオン化が適している。さらに脂肪酸代謝物の場合、水酸基が付加した部位の近傍で特異的なフラグメントイオンを生成しやすいことから、測定にはプレカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせで分子構造特異的なシグナルを検出する multiple reaction monitoring（MRM）が適している。このような特性を有する三連四重極型の質量分析計を用いた MRM チャンネルを、保持時間の違いを加味しながら複数組み合わせることで、何百種類もの脂肪酸代謝物の一斉定量分析が可能となった⁴⁾。

3. 炎症の適切な収束について

生体にとって一度誘発された炎症反応を適切に収束する

必要があり、この機構が破綻すると慢性炎症や組織傷害を伴う病態（関節炎、動脈硬化、喘息、がんなど）へと進行してしまう。すなわち、炎症の遷延化および慢性化の分子機構の一つとして、炎症の収束機構の障害の可能性が示唆されている⁵⁾。また糖尿病や肥満などのメタボリックシンドロームが、脂肪組織を中心とした炎症の側面を有していることから、新しい治療戦略として炎症の収束に関わる分子メカニズムが注目されている^{6,7)}。

そもそも炎症反応は病原菌や傷害組織の効率的な除去のために必須の生体防御機構であり、好中球の浸潤と活性化により生体内の異物を排除する「初期過程」と、それに続いて死細胞や組織片を除去し、組織を修復へと導く「収束過程」からなる⁸⁾。初期過程においては、炎症局所で血管透過性亢進、それに続く好中球の浸潤が起これ、異物の迅速な除去が行われる。この過程ではサイトカイン、ケモカイン、PG、LTなどの起炎症性メディエーターが産生され、それぞれが重要な役割を果たしている。炎症部位で活性化された好中球は、これらのメディエーター存在下で、病原菌の貪食、殺菌、クリアランスを効率よく行う。その後収束過程では、アポトーシスした好中球や組織屑がマクロファージなどの貪食細胞に取り込まれ、速やかに炎症部位から除去される。この機構がうまく働かない状況では、免疫原性を有する分子が死細胞から拡散し、その結果炎症反応が必要以上に持続してしまう。すなわち、炎症が適切に収束することは、組織のホメオスタシスを保つ上で重要である。なお、脂質メディエーターの産生酵素であるCOXやLOXの活性を阻害すると、炎症の収束または創傷治癒の遅延が認められることから、収束期に産生される何らかの脂質メディエーターが、炎症が適切に収束する環境を与えていることが示唆されている⁹⁻¹¹⁾。

4. 炎症のメタボローム解析と好酸球の新規機能

我々は、急性炎症の進行に伴う脂質メディエーターの代謝変動について調べる目的で、LC-MS/MSによる脂肪酸代謝物の一斉定量分析システムを、マウス急性腹膜炎モデルに適用した。酵母ザイモザンで惹起したマウス急性腹膜炎から経時的に炎症浸出液を採取し、脂肪酸代謝物の画分を疎水性カラムの固相抽出で調製し、LC-MS/MSによるメタボローム解析を行った。その結果、COX、LOXなどの脂肪酸代謝酵素の産物が急性炎症の進行に伴いそれぞれ特徴的な挙動を示すことが明らかになった。PGやLTなどCOX、5-LOX系の代謝物は炎症の初期相に強く発現し、一方で、12/15-LOX系の代謝物は炎症の初期相で大幅に

減少し、その後収束期にかけて増加する傾向が認められた（図2）。

プロテクチンD1（PD1：10,17S-dihydroxy-DoHE）は、DHAから12/15-LOXによって17S-ヒドロペルオキシドコサヘキサエン酸（17S-HpDoHE）を経て生成する活性代謝物であり、好中球の浸潤を抑制し、マクロファージの貪食能およびリンパへの移行、消散を促進することによって、一度誘発された急性炎症を積極的に収束させる作用が報告されている⁹⁾。今回の解析により、このPD1の産生も他の12/15-LOX系代謝物と同様に炎症の収束期に誘導されることが明らかになった。そこで我々は、炎症の収束期からPD1の主要な産生細胞を探索し、これが収束期に特徴的に出現する好酸球であることを明らかにした¹⁾。すなわち、収束期に特徴的に出現する好酸球が抗炎症性メディエーターPD1の産生を介して炎症の収束に関わる可能性が浮上した。そこで、抗インターロイキン5（IL-5）モノクローナル抗体を用いて好酸球を除去すると、PD1をはじめ12/15-LOX系の代謝物の大幅な低下、および炎症収束の明らかな遅延が認められた。なお、炎症の収束は、(1)収束期の炎症部位に残存する好中球の数、(2)蛍光標識したザイモザンを含む貪食細胞の所属リンパ節への移行、を指標に評価した。さらにこの炎症収束の遅延は、外から好酸球を補うことで回復したが、この効果はPD1を産生できない好酸球（12/15-LOX欠損）では認められなかった。さらにPD1を腹腔内に直接投与することによっても炎症収束の回復が認められた。以上の結果から、炎症の収束期に現れる好酸球は、PD1など12/15-LOX系の抗炎症性メディエーターを必要なタイミングで産生し、炎症が収束する環境を整える役割を果たしていると考えられた（図2）¹⁾。

好酸球はIL-5依存的に分化成熟する顆粒球系の細胞である。顆粒内には細胞障害性タンパク質が含まれており、刺激に応じて細胞外に放出され、寄生虫の感染などに対して防御的に働くことから、好酸球は自然免疫系のエフェクター細胞と考えられてきた。また、好酸球は喘息やアトピー性皮膚炎などの組織に集積し、アレルギー病態を増悪させる因子であると考えられてきた¹²⁾。しかしながら、今回はじめて好酸球が急性炎症の収束に関わる機能を有していることが明らかになった。好酸球はIL-4、TGF- β 、IL-10などのサイトカインを発現しており、これらのサイトカインと12/15-LOX由来の脂質メディエーターが協調して周囲の細胞に作用し、炎症が適切に収束する環境を作り出している可能性が考えられる。最近、脂肪組織において好酸球が周囲のマクロファージの極性や活性化状態を調節

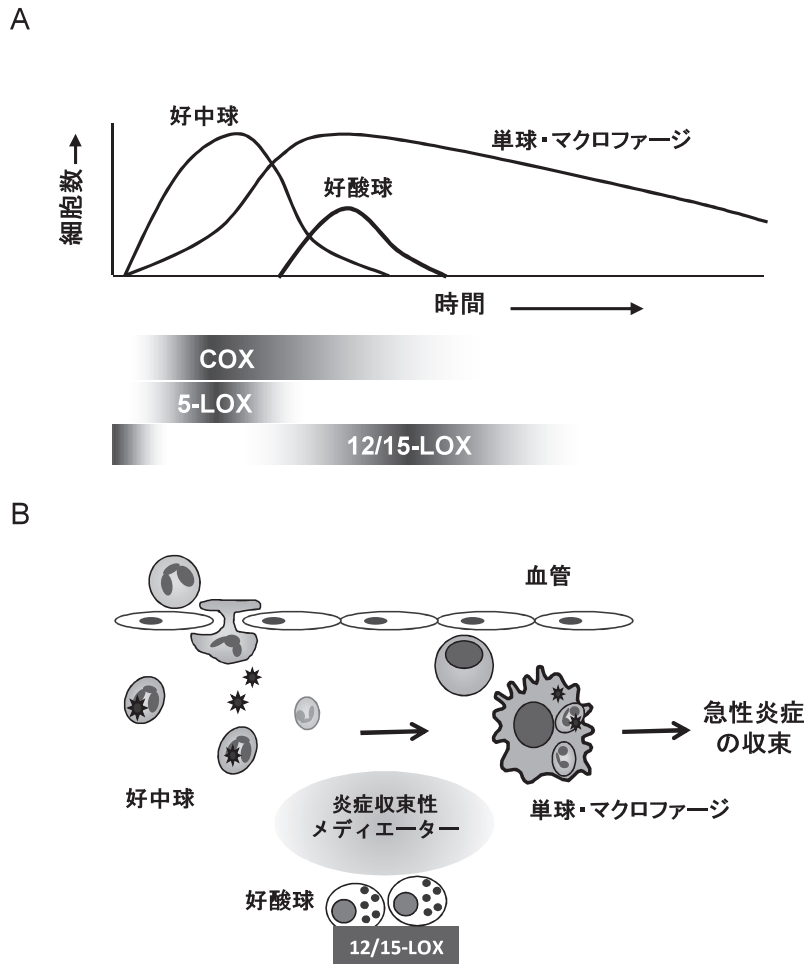


図2 急性腹膜炎の収束に関わる好酸球の新規機能

(A) 急性腹膜炎の進行に伴う好中球、好酸球、マクロファージ、および脂肪酸代謝物の特徴的な経時変化。プロスタグランジンやロイコトリエンなどCOX、5-LOX系の代謝物の多くは炎症の初期相に強く発現し、一方で12/15-LOX系の代謝物は炎症の初期相で減少し、その後収束期に増加する。

(B) 炎症の収束期に現れる好酸球は、プロテクチンD1など12/15-LOX由来の炎症収束性メディエーターを必要なタイミングで産生し、周囲の細胞に作用することで炎症が適切に収束する環境を作り出していると考えられる。

し、高脂肪食によるメタボリックシンドロームの病態形成を抑制することが報告された¹³⁾。この場合でも、好酸球から放出されるサイトカインや脂質メディエーターが、マクロファージなど周囲の細胞の状態を抗炎症性に制御している可能性が考えられる。炎症収束期で機能する好酸球が、アレルギー性好酸球と異なるサブセットである可能性や、収束期に好酸球を動員する分子機構など、今後明らかにすべき課題である。

5. 好酸球が生成する新しい活性代謝物の探索

筆者らのグループでは、DHA由来のPD1以外にも好酸球から生成する活性代謝物の包括的探索を行っている。その中で、最近EPA由来の新規抗炎症性代謝物を同定した。EPA由来の抗炎症性代謝物としてはこれまでにレゾルビンEシリーズ(RvE1, RvE2)が知られており、いずれも18-hydroxyeicosapentaenoic acid (18-HEPE)を前駆体として5-LOXによる酵素反応で生成し、その主要な産生細胞は好中球である¹⁴⁾。一方、18-HEPEを前駆体として好酸球

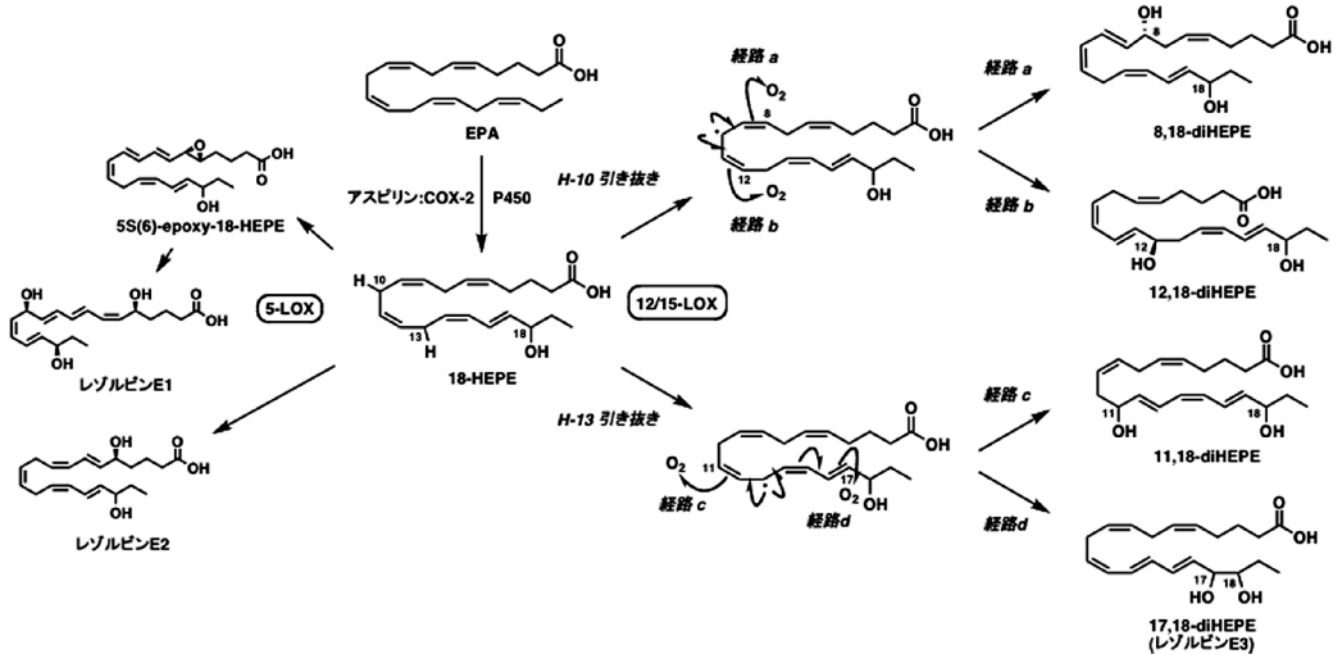


図3 好酸球が生成する新規メディエーター，レゾルビン E3 の生合成機構

レゾルビン E は，18-HEPE を前駆体として生成する EPA 由来の脂質メディエーターである．レゾルビン E1，E2 はともに 5-LOX による酵素反応で生成し，その主要な産生細胞は好中球である．一方，18-HEPE を前駆体として好酸球が生成する代謝物の解析から，12/15-LOX による酵素反応で生成する抗炎症性代謝物 17,18-diHEPE (レゾルビン E3) が見いだされた．この図は，12/15-LOX による位置特異的な水素引き抜きに始まる酸素添加反応により，18-HEPE からレゾルビン E3 および関連代謝物が生成する機構について示している (文献 15 より引用，一部改変)．

が生成する一連の代謝物を LC-MS/MS を用いて調べた結果，12/15-LOX 依存的に生成する活性代謝物 17,18-diHEPE を見だし，RvE3 と命名した (図 3)¹⁵⁾．RvE3 は好中球の遊走活性をわずかなノモルレベルの濃度で抑制し，マウス急性炎症モデルにおいても，初期の好中球浸潤を低用量で強力に抑制する活性を有していた．これらの活性代謝物は，好酸球や一部のマクロファージなど，炎症部位で 12/15-LOX を発現する細胞による炎症の制御に関わる可能性が考えられる．

6. おわりに

以上，メタボローム解析から明らかになった，炎症の収束に関わる脂質メディエーターと好酸球の新規機能について紹介した．炎症の収束機構については，これまで生物学および医学的な重要性が認識されていたものの，具体的な手がかりとなる特定の分子や細胞が明らかでないことから，長らく解析が進んでいなかった．今回，急性腹膜炎の収束期に特徴的に出現する細胞として好酸球を特定し，必要なタイミングで 12/15-LOX 活性依存的に PD1 などの収束性メディエーターが産生され，炎症が適切に収束する環

境が作り出されていることが示唆された．起炎反応が炎症性細胞の集積および活性化，またサイトカインやエイコサノイドなどの連鎖的反応によって増幅する過程であるのと同様に，炎症の収束過程も異物のクリアランスおよび組織の機能的再構築の過程であり，そこには収束性細胞およびメディエーターが関与していると考えられる．好酸球以外にも，腹膜炎の収束期に出現するマクロファージの中に 12/15-LOX を高発現するサブセットが存在し，アポトーシス細胞の貪食において主要な役割を果たしていることが明らかになってきた¹⁶⁾．これらマクロファージが好酸球と同様に PD1 や RvE3 など抗炎症性代謝物を局所的に生成し，炎症収束に寄与する可能性は想像に難くない．また，12/15-LOX 欠損マウスを長期間飼育すると自己免疫疾患を発症する¹⁶⁾ ことから，12/15-LOX の機能が長期的には慢性炎症の制御にも関わっていると考えられる．今後さらに炎症の収束に関わる細胞やメディエーターが網羅的に特定され，それぞれの作用機構が分子レベルで明らかになることが期待される．また，生体が本来兼ね備えた炎症を収束する能力を，収束性メディエーターとして物質レベルで同定し，これを必要なタイミングで補うことで，持続性の炎

症を効率的に収束させる新たな治療応用が期待される。

- 1) Yamada, T., Tani, Y., Nakanishi, H., Taguchi, R., Arita, M., & Arai, H. (2011) *FASEB J.*, **25**, 561–568.
- 2) Kang, J.X. (2007) *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **77**, 263–267.
- 3) Arita, M. (2012) *J. Biochem.*, **152**, 313–319.
- 4) Arita, M., Iwamoto, R., & Isobe, Y. (2012) in *Lipidomics, Technologies and Applications* (Ekroos, K. ed.), pp. 219–230, Wiley-VCH, Weinheim.
- 5) Nathan, C. & Ding, A. (2010) *Cell*, **140**, 871–882.
- 6) Serhan, C.N., Chiang, N., & Van Dyke, T.E. (2008) *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 349–361.
- 7) Gilroy, D.W., Lawrence, T., Perretti, M., & Rossi, A.G. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 401–416.
- 8) Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O’Neil, L.A., Perretti, M., Rossi, A.G., & Wallace, J.L. (2007) *FASEB J.*, **21**, 325–332.
- 9) Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M., & Serhan, C.N. (2007) *Nature*, **447**, 869–874.
- 10) Gronert, K., Maheshwari, N., Khan, N., Hassan, I.R., Dunn, M., & Laniado Schwartzman, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 15267–15278.
- 11) Gilroy, D.W., Colville-Nash, R.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., & Willoughby, D.A. (1999) *Nat. Med.*, **5**, 698–701.
- 12) Rothenberg, M.E. & Hogan, S.P. (2006) *Annu. Rev. Immunol.*, **24**, 147–174.
- 13) Wu, D., Molofsky, A.B., Liang, H., Ricardo-Gonzalez, R.R., Jouihan, H.A., Bando, J.K., Chawla, A., & Locksley, R.M. (2011) *Science*, **332**, 243–247.
- 14) Oh, S.F., Oillai, P.S., Recchiuti, A., Yang, R., & Serhan, C.N. (2011) *J. Clin. Invest.*, **121**, 569–581.
- 15) Isobe, Y., Arita, M., Matsueda, S., Iwamoto, R., Fujihara, T., Nakanishi, H., Taguchi, R., Masuda, K., Sasaki, K., Urabe, D., Inoue, M., & Arai, H. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 10525–10534.
- 16) Uderhardt, S., Herrmann, M., Oskolkova, O.V., Aschermann, S., Bicker, W., Ipseiz, N., Sarter, K., Frey, B., Rothe, T., Voll, R., Nimmerjahn, F., Bochkov, V.N., Schett, G., & Kronke, G. (2012) *Immunity*, **36**, 1–13.

有田 誠

(東京大学大学院薬学系研究科衛生化学,
JST さきがけ)

Mediator lipidomics revealed novel roles of eosinophils in the resolution of inflammation

Makoto Arita (Department of Health Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, and PRESTO, JST, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

収縮環はどのようなメカニズムで収縮するのか？ —未解明のミオシンⅡ機能の解明に挑戦する—

1. はじめに

動物細胞の細胞分裂時には、分裂細胞の赤道面に収縮環と呼ばれる構造が形成され、収縮環がくびれることにより細胞質分裂が完了する。収縮環には、アクチン繊維 (F-アクチン) やミオシンⅡを始めとする多数の細胞骨格関連タンパク質が集積していることが知られている。また、抗体を用いた細胞分裂の阻害実験等から、ミオシンⅡの機能が細胞質分裂の進行に必要であることも併せて明らかにされている^{1,2)}。これらの事実を基にして、収縮環はF-アクチン同士をミオシンⅡ繊維が滑らせる筋収縮と同様のメカニズムで収縮するものと一般に考えられてきた³⁾。

ところが、収縮環では、骨格筋のサルコメア構造で見られるような「繊維状のミオシンⅡ」がまだ観察されていない。Maupin ら⁴⁾は電子顕微鏡を用いて HeLa 細胞の収縮環を詳しく観察し myosin filament 様の構造体を見だしているが、それが実際の「ミオシンⅡ繊維」かどうか検証はされていない。またサルコメア構造も観察されていない。従って、収縮環にサルコメア構造が見られない現状で、「収縮環の収縮のメカニズムは筋収縮と同様である」と単純に結論づけてしまうことには無理がある。我々は、ミオシンⅡがどのように収縮環の収縮に貢献しているかまだ不明である現況を踏まえ、ミオシンⅡ調節軽鎖 (myosin II regulatory light chain : MRLC) に着目し、高等動物培養細胞における細胞質分裂のメカニズムの解明を進めている。

2. なぜ MRLC に着目するのか？

非筋型ミオシンⅡは二つのミオシンⅡ重鎖 (myosin II heavy chain : MHC)、二つの必須軽鎖 (myosin II essential light chain)、および二つの MRLC で構成される。ミオシンⅡの Mg^{2+} -ATPase 活性は、MRLC がリン酸化されることで上昇する。このリン酸化 MRLC には、Ser19 がリン酸化された一重リン酸化型 (1P-MRLC) と Thr18/Ser19 の両方がリン酸化された二重リン酸化型 (2P-MRLC) の2種類があり (図 1A)、後者がより一層ミオシンⅡ活性を上昇させるという *in vitro* の結果が既に報告されている⁵⁾。我々は、*in vitro* でミオシンⅡ活性の上昇や阻害効果を示