HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	オレオイルエタノールアミドのラットデキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルに対する抗炎症効果
Author(s)	小田切, 信介
Description	配架番号：2600
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14483号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14483
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81890
Type	doctoral thesis
File Information	Shinsuke_Odagiri.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

オレオイルエタノールアミドのラットデキストラン硫酸
ナトリウム誘発大腸炎モデルに対する抗炎症効果

(The anti-inflammatory effect of oleoylethanolamide on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats)

2021 年 3 月

北海道大学

小田切　信介

学位論文

オレオイルエタノールアミドのラットデキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルに対する抗炎症効果

(The anti-inflammatory effect of oleoylethanolamide on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats)

2021 年 3 月

北海道大学

小田切　信介

目　　次

発表論文目録および学会発表目録 …… 1頁
要旨 …… 2頁
略語表 …… 5頁
緒言 …… 6頁
研究方法 …… 9頁
研究結果 …… 18頁
考察 …… 30頁
総括および結論 …… 33頁
謝辞 …… 34頁
利益相反…… 35頁
引用文献 …… 36頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Shinsuke Otagiri, Shunsuke Ohnishi, Masatsugu Ohara, Qingjie Fu, Koji Yamamoto, Keiko Yamamoto, Takehiko Katsurada and Naoya Sakamoto. Oleoylethanolamide ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats

Frontiers in Pharmacology, 11, 1277, 2020

本研究の一部は以下の学会にて発表した。

1. 小田切　信介、大西　俊介、坂本　直哉
間葉系幹細胞から分泌される生理活性脂質の抗炎症・抗線維化効果
第105回日本消化器病学会総会、2018年5月9日～5月11日、金沢

2. Shinsuke Otagiri, Shunsuke Ohnishi, Masatsugu Ohara, Qingjie Fu, Koji Yamamoto, Takehiko Katsurada and Naoya Sakamoto.
Oleoylethanolamide ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats
Digestive Disease Week 2020、5月2日～5月5日、シカゴ

3. Shinsuke Otagiri, Shunsuke Ohnishi, Masatsugu Ohara, Qingjie Fu, Koji Yamamoto, Keiko Yamamoto, Takehiko Katsurada and Naoya Sakamoto.
Anti-fibrotic and anti-inflammatory effects of bioactive lipids secreted from amnion-derived mesenchymal stem cells
International Society for Stem Cell Research 2020、6月23日～6月27日、ボストン

要　旨

【背景と目的】　炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD)は、主としてクローン病 (Crohn’s disease, CD)と潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC)で構成される消化管の慢性炎症性疾患であり、本邦において患者数が急増している。近年は従来の治療法に加え生物学的製剤など新規治療薬の開発により、IBD の治療法の選択肢が増えている。しかしながら未だに根治治療はなく、内科的治療に抵抗性を示し手術が必要となる症例が少なくない。したがって、新規治療法の開発が求められている。当科では羊膜由来の間葉系幹細胞 (amnion-derived mesenchymal stem cell, AMSC)を用いて研究を行っており、消化器疾患モデルに AMSC 投与やその培養上清の投与を行って、その抗炎症・抗線維化効果を報告してきた。今回 AMSC の液性因子の解析として培養上清中の脂質の解析を行い、オレオイルエタノールアミド (oleoylethanolamide, OEA)という生理活性物質を同定したため、この物質に着目した。OEA は、内因性脂肪酸エタノールアミドの一つで、食事摂取量の低下、脂質代謝や胃腸運動の調節、神経炎、アテローム性動脈硬化症に対して、治療効果を有すると報告されている。また lipopolysaccharide (LPS)で刺激した単球系の培養細胞に対し、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-α受容体を介して、nuclear factor kappa B (NF-κB) pathway を抑制することにより、抗炎症効果を有すると報告されている。さらに、血漿中の OEA 濃度が IBD 患者で上昇し、OEA 濃度が CD 患者の重症度と相関すると報告されており、腸管恒常性の回復における OEA の役割が示唆されている。しかし、IBD における OEA 投与の効果と役割に関する報告はない。したがって本研究では、ラットの IBD モデルある dextran sulfate sodium (DSS)大腸炎に対する OEA 投与の影響と、そのメカニズムを調べることを目的とした。

【対象と方法】　*in vitro* : LPS-Toll like receptor 4 (TLR4) signal に対する OEA の効果について、TLR4 を強発現させた HEK293 細胞 (HEK293/hTLR4A-MD2-CD14) に LPS 刺激を行って検討した。また培養腸管上皮細胞に対する OEA の効果について、Caco-2 細胞に tumor necrosis factor (TNF)-αで刺激を行って検討した。炎症性サイトカインの発現は qRT-PCR を用いて、IκB-αや p65 のリン酸化は western blot を用いて検討した。*in vivo* : 8 週齢雄 Sprague-Dawley ラットに対して、8 %DSS を 5 日間自由飲水させてラット大腸炎モデルを作成した。ラットに OEA 20 mg/kg を day 0 から day 5 までの 6 日間、1 日 1 回腹腔内に投与した。大腸組織の病理組織学的評価および免疫染色でのマクロファージや好中球の浸潤の評価を行い、大腸組織の炎症関連因子の発現を qRT-PCR を用いて行った。

【結果】　HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 に LPS 刺激を行うと TNF-αの発現が増加したが、OEA は濃度依存的にその増加を抑制した。さらに、LPS 刺激により IκBαのリン酸化が亢進したが、OEA 投与によりそのリン酸化の亢進が抑制された。Caco-2 細胞に TNF-α刺激を行うとインターロイキン （interleukin, IL）-8 と IL-1β の発現が増加したが、OEA はその増加を有意に抑制した。更に、TNF-α刺激により、IκB-αと p65 のリン酸化が亢進したが、OEA 投与によりそのリン酸化が抑制された。IL-8 の発現を抑制する OEA の効果は、PPAR-αのアンタゴニストである MKK-866 によってブロックされた。*in vivo* において、DSS 投与によって体重増加抑制、疾患活動性スコアの上昇、腸管短縮が起きたが、これらは OEA 投与により有意に改善した。食餌摂取量は、OEA 群、DSS 群と DSS+OEA 群で有意に減少し、DSS 群と DSS+OEA 群に有意差はなかった。hematoxylin and eosin 染色では、DSS 投与によって粘膜障害・陰窩の消失・炎症細胞の浸潤を認めたが、OEA 投与によりこれらは減弱する傾向にあった。CD68 染色では、マクロファージの浸潤は DSS 投与により増加したが、OEA 投与によりその浸潤増加は有意に抑制され、MPO 染色でも同様に、OEA 投与により好中球の浸潤の有意な抑制を認めた。ラット大腸の炎症関連遺伝子発現の評価では、DSS 投与により IL-1β、TNF-αなどの発現が有意に増加したが、OEA 投与によりこれらの発現は低下する傾向にあり、IL-1β の発現は有意に低下した。PPAR-αの発現は、DSS 投与により有意に低下し、OEA 投与により改善せず、CD68 の発現は、DSS 投与で有意に増加し、OEA 投与で減少する傾向を認めた。

【考察】　NF-κB の発現と活性化は、活動性を有する IBD 患者の腸管で強く誘導され、活性化された NF-κB の量が腸管炎症の重症度と相関すると報告されている。本研究では LPS 刺激に対し、OEA は TNF-αの発現を低下させ、IκB-αのリン酸化を抑制し、さらに TNF-αで刺激された Caco-2 細胞に対して、OEA は炎症性サイトカインの発現を低下させ、IκB-αおよび p65 のリン酸化を抑制した。これらの結果より、OEA が抗炎症効果を有し、腸管上皮細胞の NF-κB 経路の活性化を抑制することによって効果を発揮することが示唆された。PPAR-αは、腸管上皮細胞とマクロファージに高度に発現していると報告されている。本研究では、PPAR-αアンタゴニストは、*in vitro* において IL-8 の発現を低下させる OEA の作用をブロックした。この結果より、腸管上皮細胞における OEA の抗炎症効果が PPAR-α依存的であることが示唆された。マクロファージは、IBD 患者で炎症性サイトカインを産生し、腸管組織損傷を誘発するとされている。本研究の *in vivo* 実験では、マクロファージの浸潤は OEA 投与によって抑制された。更に UC の患者では、好中球浸潤の程度は疾患の重症度と相関し、IL-8 は好中球走化性物質とされている。本研究では、OEA は Caco-2 細胞における IL-8 の発現と、ラット大腸における好中球浸潤を抑制した。これらの結果より、OEA が腸管上皮細

胞での IL-8 発現を抑制し、大腸への好中球浸潤を抑制することが示唆された。本研究では、OEA 投与、DSS 投与によって食餌摂取量の低下を認めたが、DSS 群と DSS+OEA 群との間で食餌摂取量に有意な差は認めなかった。この結果は、OEA の抗炎症効果が DSS 投与による食餌摂取量の低下を改善させることを示唆すると考えられる。

【結論】 本実験において OEA が抗炎症効果を有し、腸管上皮細胞の NF-κB シグナル伝達経路の活性化を抑制することによって、ラット腸炎モデルに対する治療効果を有することが示唆され、新たな治療法となる可能性が示唆された。

略　語　表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである

AMSC, amnion-derived MSC
CD, Crohn’s disease
CM, conditioned medium
DAI, disease activity index
DMEM, Dulbecco’s modified Eagle’s medium
DMSO, dimethyl sulfoxide
DSS, dextran sulfate sodium
GPR, G protein-coupled receptor
HE, hematoxylin and eosin
FBS, fetal bovine serum
IBD, inflammatory bowel disease
IL, interleukin
Iκ, inhibitor of kappa
LPS, lipopolysaccharide
MSC, mesenchymal stem cell
MPO, myeloperoxidase
NEAA, non-essential amino acid
NF-κB, nuclear factor kappa B
OEA, oleoylethanolamide
PBS, phosphate-buffered saline
PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor
qRT-PCR, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
SD, standard deviation
SDS, sodium dodecyl sulfate
TGF, transforming growth factor
TLR, toll-like receptor
TNF, tumor necrosis factor
TRPV, transient receptor potential vanilloid
UC, ulcerative colitis

緒　　言

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) は、主としてクローン病 (Crohn's disease, CD) と潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC) から構成される、消化管の慢性炎症性疾患である。本邦において、その患者数は急増しており (図 1)、日本国内で UC の患者数は少なくとも 18 万人、CD の患者数は 4 万人と報告されている (Okabayashi et al., 2020)。IBD の治療法については、 5-アミノサリチル酸製剤、ステロイド、免疫調節薬、生物学的製剤などがあり、重症度に応じてこれらを単剤、あるいは組み合わせて行う。さらに、生物学的製剤や低分子化合物など、ここ最近の新規治療薬の開発により、選択肢が増えてきている (Feagan et al., 2016; Sandborn et al., 2017)。

しかし、IBD に対する根治治療法が存在しないことによって、いまだに内科的治療に抵抗性を示し、手術が必要となる症例が少なくない。手術のリスクは、CD では 10 年間で約 50 % (Peyrin-Biroulet et al., 2010)、UC で約 15 % (Fumery et al., 2018) と報告されている。したがって、これらの症例の手術リスクを軽減するため、更なる IBD の新規治療法の開発が求められている。

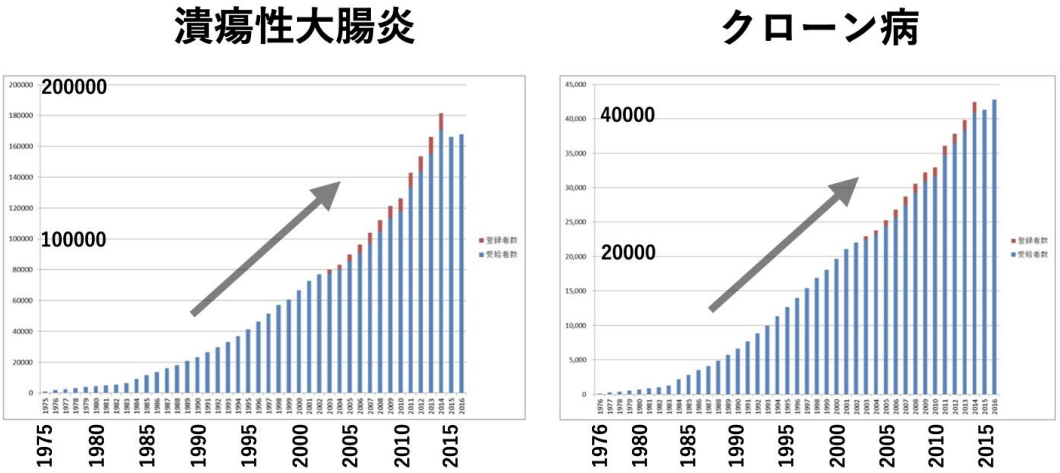

図 1. 潰瘍性大腸炎およびクローン病の医療受給者証交付件数の推移、厚生労働省難病情報センターホームメージ (https://www.nanbyou.or.jp) を引用して作成。

近年、臓器傷害の修復や難治性疾患に対する再生医療が世界中で注目されており、幹細胞を用いた細胞治療の研究開発が盛んに行われている。再生医療材料として、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) は組織幹細胞の一つ

であり、その定義はプラスチックディッシュに接着すること、CD73 や CD90、CD105 を発現していること、中胚葉系の骨芽細胞・軟骨細胞・脂肪細胞など複数の系譜への分化能力を有していることとされている (Samsonraj et al., 2017)。MSC の source としては、骨髄や脂肪組織、滑膜など多数あるが (Samsonraj et al., 2017)、骨髄由来 MSC は骨髄採取が必要となり、身体への侵襲をともなう上に、一度の採取で得られる細胞数は少量であることから、移植に必要な細胞数を確保するには一定の培養期間を要する。これらの問題点は脂肪細胞由来 MSC も同様である。一方、北海道大学消化器内科学教室では、羊膜 (amnion)から分離される MSC (amnion-derived MSC, AMSC)を用いた研究を行っている。ヒト羊膜には MSC が豊富に含まれていることが知られており、より若い細胞を大量に獲得できるという利点をもっている。また、羊膜は出産の際に破棄される医療廃棄物であり、非侵襲的に採取可能であることから倫理的問題を軽減できると考えられる。

北海道大学消化器内科学教室では、消化器疾患モデルである、ラット重症腸炎モデル (Onishi et al., 2015)やラット放射線性直腸炎モデル (Ono et al., 2015)に対して AMSC を投与することにより改善が得られることを報告している (図 2)。また MSC は、液性因子によるパラクライン効果を有し、免疫調整や抗アポトーシス効果、抗線維化効果、抗炎症効果を有すると報告されており、既報でも MSC は直接の分化を介した治療効果に加えて、分泌する液性因子を介したパラクライン効果を発揮することができると報告されている (Liang et al., 2014; Lou et al., 2017)。当科でも、ラット腸炎モデル (miyamoto et al., 2017)、ブタの食道・直腸に対する内視鏡的粘膜下層剥離術後の消化管狭窄モデル (Mizushima et al., 2017; Tsuda et al., 2018)に AMSC の培養上清 (conditioned medium, CM)の投与を行い、AMSC のパラクライン効果による抗炎症、抗線維化効果を報告してきた (図 2)。

Therapy	Animal	Model	Author	Year
AMSCs	Rat	DSS-induced colitis	Onishi R, et al.	2015
AMSCs	Rat	Radiation proctitis	Ono M, et al.	2015
AMSCs and CM gel	Rat	TNBS-induced colitis	Miyamoto S, et al.	2016
CM gel	Pig	Stricture after esophageal ESD	Mizushima T, et al.	2017
CM gel	Pig	Stricture after rectal ESD	Tsuda M, et al.	2018

図 2. AMSC および AMSC の培養上清 (CM)の抗炎症・抗線維化効果

今回、液性因子の解析として、CM 中の脂質を液体クロマトグラフ質量分析計にて解析を行い、オレオイルエタノールアミド (oleoylethanolamide, OEA)という生理活性物質を同定したため、今回この物質に着目した。

OEA は、N-アシルエタノールアミンファミリーに属する内因性脂肪酸エタノールアミドの一つである。OEA は主に小腸で産生され (Romano et al., 2015)、ナッツ、ココアパウダー、オートミールなどの食品にも含まれる (Payahoo et al., 2019)。OEA は、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-α、G protein-coupled receptor (GPR)119、および transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1 のアゴニストとして作用する (Brown et al., 2017)。これまでの報告で、OEA の投与は PPAR-αを介して食事摂取量の低下や脂質代謝の調節、および PPAR-α以外の受容体を介して、胃腸運動の調節に対する効果があることが示されている (Cluny et al., 2009; Decara et al., 2012; Fu et al., 2005)。さらに、OEA 投与は神経保護作用、および抗アテローム性動脈硬化症の機能を持っていることが示されている (Fan et al., 2014; Sayd et al., 2014)。

OEA は抗炎症物質としても注目されている。Yang らの報告によると、*in vitro* の実験で、lipopolysaccharide (LPS)で刺激した単球系の細胞株である THP-1 細胞に対して、OEA は PPAR-α受容体を介して nuclear factor kappa B (NF-κB) pathway を抑制することにより、抗炎症効果を有することが報告されている (Yang et al., 2016)。さらに、IBD 患者と OEA の関係についても注目されている。Grill らの報告によると、血漿中の OEA 濃度が IBD 患者で上昇しており、さらに OEA 濃度と CD 患者の重症度が相関していることが示されており、腸管恒常性の回復における OEA の役割が示唆されている (Grill et al., 2019)。

上述のように、OEA の抗炎症効果、さらに IBD 患者と血漿 OEA 濃度の関係についてはすでに報告がある。しかし、IBD における OEA 投与の効果と役割に関しては現時点で報告はない。したがって、本研究では、ラットの IBD モデルある、dextran sulfate sodium (DSS) 大腸炎に対する OEA 投与の影響と、その根底にあるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

研　究　方　法

1. 細胞培養

細胞

HEK293/h toll-like receptor 4A-MD2-CD14 (HEK293/hTLR4A-MD2-CD14, RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan)

Caco-2 (RIKEN BioResource Center)

試薬および材料

Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

fetal bovine serum (FBS, Moregate Biotech, Bulimba, Australia)

MEM non-essential amino acids solution (NEAA) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)

penicillin (Wako Pure Chemical Industries)

streptomycin (Wako Pure Chemical Industries)

HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 細胞は、10 %FBS、penicillin (100 U/mL) 、および streptomycin (100 μg/mL)を含む DMEM を用いて、15 cm uncoated plastic dish に播種し、室温 37 ℃・湿度 95 %・5 %二酸化炭素濃度下で培養した。培地は 1 日おきに交換した。Caco-2 細胞は、10 %FBS、penicillin (100 U/mL)、streptomycin (100 μg/mL)、および 1 % MEM NEAA を含む DMEM で培養した。

2. Western Blot Analysis (IκB-α、p65 のリン酸化)

細胞

HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 (RIKEN BioResource Center)

Caco-2 (RIKEN BioResource Center)

緩衝液の組成

TBST (TBS with 0.05 % Tween 20, Wako Pure Chemical Industries)

試薬および材料

DMEM (Thermo Fisher Scientific)

dimethyl sulfoxide (DMSO, Wako Pure Chemical Industries)

ECL Prime detection reagent (GE healthcare, Chicago, IL, USA)

FBS (Moregate Biotech)

human recombinant tumor necrosis factor (TNF)-α (Merck Millipore, Burlington, MA, USA)

Immobilon-P polyvinylidene difluoride membranes (Merck Millipore)
LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
OEA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)
phosphate-buffered saline (PBS, Life Technologies, Carlsbad, MD, USA)
Protease/phosphatase inhibitor cocktail (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
TBS (Wako Pure Chemical Industries)
4 x Laemmli sample buffer (Bio-Rad)
5 % PhosphoBLOCKER blocking reagent (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)

一次抗体

Actin (Abcam, Cambridge, United Kingdom)
Iκ (inhibitor of kappa)B-α (cell Signaling Technology)
phospho IκB-α (cell Signaling Technology)
p65 (cell Signaling Technology)
phospho p65 (cell Signaling Technology)

二次抗体

peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)
peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)

IκB-αおよびp65のリン酸化を調べる目的で、HEK293/hTLR4A-MD2-CD14細胞およびCaco-2細胞を6-well plateに2×10^5 cells/wellで播種し、培養した。細胞がほぼconfluentになった後、培地をOEA (40 μM) またはDMSOを含む培地に交換し、細胞をさらに30分間インキュベートした。次に、HEK293/hTLR4A-MD2-CD14細胞をLPS (10 ng/mL)を加えて2 時間、Caco-2細胞をhuman recombinant TNF-α (5.0 ng/mL) を加えて15 分間静置した。冷却したPBSで洗浄し、スクレイパーで細胞を回収し、5,000 rpm、5 分、4 ℃で遠心し上清を吸引除去した。その後、50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, 1.0% (w/v) NP-40 substituteを含むRadio-immunoprecipitation assay bufferと、protease/phosphatase inhibitor cocktail (100x)の混合液でピペッティングし、30 分氷上で静置し細胞を溶解させた。その後15,000 rpm, 20 分間, 4° Cで遠心しその上清をタンパク抽出液とした。BCA protein assay kitを用い

て、タンパク濃度を測定した。タンパク量を 10 μg、PBS、4 x Laemmli sample buffer を計 12 μL となるように調製し、95 ℃で 5 分間熱した。SDS-PAGE (200 V, 約 60 分)にて展開し、その後 PVDF membrane に転写させた (1.3 A, 25 V, 7 分間)。続いて、5 % PhosphoBLOCKER blocking reagent を用いてブロッキングを施行した。1 次抗体を加えて、室温振盪した後に、1xTBST で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。2 次抗体を TBST 中で 30 分間反応させた。その後 1xTBST で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、ECL Prime detection reagent を加え Fusion Solo S で解析した。
上記抗体は以下希釈濃度で使用した。
actin (1:5,000)
IκB-α (1:2,000)
phospho IκB-α (1:2,000)
p65 (1:2,000)
phospho p65 (1:2,000)
peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) (1:10,000)
peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:10,000)

3. 動物
以下の実験動物を購入した。
8 週齢雄 Sprague-Dawley ラット (Japan SLC, Hamamatsu, Japan)
動物実験プロトコールは「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に則り、北海道大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号; 16-0013)。
ラットを室温 24° C に維持された、12 時間明期-12 時間暗期の明暗サイクルの飼育環境の下で、1 ケージあたり 1 匹のラットを飼育した。すべてのラットは、標準的なペレットに自由にアクセスできるようにした。毎日、体重測定・便の性状・血便を評価し、表 1 (Pandurangan et al., 2015)に記載されているように、疾患活動性スコア (disease activity index, DAI) を算出した。また飲水量・食餌摂取量も毎日測定した。

表 1. DAI の評価法 (Pandurangan et al., 2015)

Score	Weight loss	Stool consistency	Bleeding
0	No loss	Normal	No blood
1	1-5%		
2	5-10%	Loose stool	Visual pellet bleeding
3	10-20%		
4	>20%	Diarrhea	Gross bleeding/Blood around anus

4. 動物実験プロトコール

試薬および材料

DMSO (Wako Pure Chemical Industries)
DSS (MW = 36,000-50,000; MP Biomedicals、Solon、OH、USA)
OEA (Cayman Chemical)
PBS (Life Technologies)
Tween 80 (Kanto Chemical, Tokyo, Japan)

ラットを以下 4 群に分けて検討を行った。
「Control 群 (n= 4)」、「OEA 投与群 (OEA 群) (n= 4)」、「DSS 誘発腸炎群 (DSS 群) (n= 10)」、「④DSS 誘発腸炎・OEA 投与群 (DSS+OEA 群) (n= 10)」。
DSS 群および DSS+OEA 群の大腸炎は、8 %DSS を 0 日目から 5 日目まで自由飲水させて誘発した (図 3) (Martin et al., 2016)。Control 群と OEA 群のラットは水を自由飲水させた。OEA は、Tween 80、DMSO、および PBS (1 : 0.5 : 18.5) に溶解し、OEA 群および DSS+OEA 群に OEA (20 mg/kg) を、day 0 から day 5 までの 6 日間、1 日 1 回腹腔内投与を行った。Control 群と DSS 群に対しては DMSO を腹腔内に投与した。OEA の投与量は、以前に報告された研究に基づいて決定した (Gaetani et al., 2003; Proulx et al., 2005)。Day 5 に全てのラットを安楽死させ、大腸を摘出した。

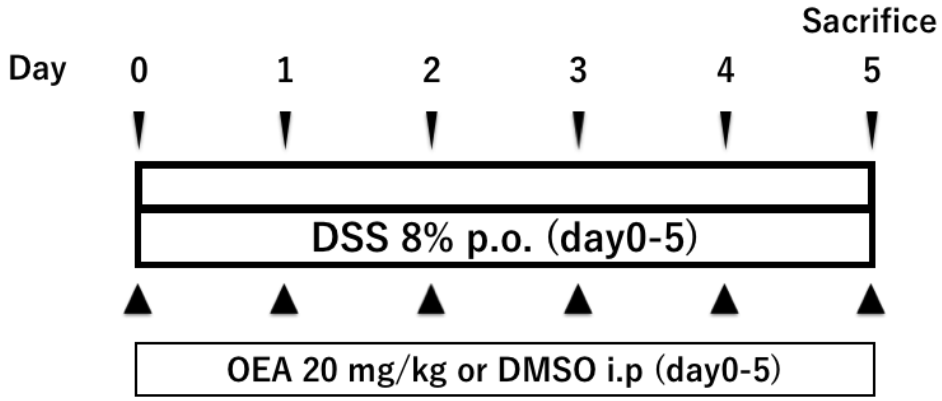

図 3. 動物実験プロトコール

5. ラット大腸の病理組織学的評価

試薬および材料

formaldehyde saline (Wako Pure Chemical Industries)
hematoxylin and eosin (HE, Wako Pure Chemical Industries)

Day 5 に全てのラットを安楽死させ、ラットの大腸を摘出し、腸管長を測定後、遠位側大腸を肛門から約 3 cm 切り取り、腸管を長軸方向に切り開いた。 次に、quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) に使用する目的で、3 cm のフラグメントを幅約 2 mm で長軸方向に切断した。フラグメントの残りは病理組織学的評価に用いた。フラグメントを 40 g/L の formaldehyde saline で固定し、パラフィンで包埋し、薄切し 5 μm の切片を作製し、組織切片を HE で染色した。Inflammation severity (炎症細胞浸潤の程度), Inflammation extent (炎症細胞浸潤の腸管の層における範囲)、Crypt damage (陰窩損傷の程度), および Percent involvement (フラグメント内での炎症範囲の割合)を、盲検的に測定した。次に、Inflammation severity, Inflammation extent, Crypt damage の 3 つのスコアの合計を、Percent involvement (0 %; ×0, 1-25 %; ×1, 26-50 %; ×2, 51-75 %; ×3, 75-100 %; ×4) によって乗算し、病理組織学的スコアを算出した (表 2) (Onishi et al., 2015; Singh et al., 2011)。

表 2. 大腸炎の病理組織学的スコア (Onishi et al., 2015; Singh et al., 2011)

Inflammation severity	0	None
	1	Mild
	2	Moderate
	3	Severe
Inflammation extent	0	None
	1	Mucosa
	2	Mucosa and submucosa
	3	Transmural
Crypt damage	0	None
	1	Basal 1/3 damaged
	2	Basal 2/3 damaged
	3	Crypts lost; surface epithelium present
	4	Crypts and surface epithelium lost
Percent involvement	0	0 %
	1	1-25 %
	2	26-50 %
	3	51-75 %
	4	75-100 %

6. 免疫染色

一次抗体

anti-rat CD68 monoclonal antibody (AbD Serotec, Kidlington, United Kingdom)

anti-rat myeloperoxidase (MPO) antibody (Thermo Fisher Scientific)

二次抗体

ヒストファインシンプルステインラット MAX-PO (MULTI) (Nichirei, Tokyo, Japan) (CD68)

ヒスファインシンプルステイン MAX-PO (R) (Nichirei) (MPO)

マクロファージの大腸への浸潤を評価するために CD68 免疫染色を行った。腸管の未染切片を上記一次抗体試薬で浸し、60 分間静置し、その後上記二次抗体試薬にて 30 分間静置して染色した。また好中球の大腸への浸潤を評価する

ために MPO 免疫染色を行った。腸管の未染切片を上記一次抗体の試薬で浸し、一晩静置し、その後上記二次抗体試薬にて 30 分間静置して染色した。光学顕微鏡を用いて、ラット 1 匹あたり、100 倍視野で無作為に 10 視野の撮影を行い、粘膜層における染色された領域の面積を、画像解析ソフト (WinROOF, Mitani Co., Fukui, Japan)を用いて測定した。
各試薬は以下希釈濃度で使用した。
CD68 (1:50), MPO (1:300)

7. RNA 抽出、逆転写、qRT-PCR

細胞

HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 (RIKEN BioResource Center)
Caco-2 (RIKEN BioResource Center)

試薬および材料

2-mercaptoethanol (Wako Pure Chemical Industries)
dimethyl sulfoxide (DMSO, Wako Pure Chemical Industries)
human recombinant tumor necrosis factor (TNF)-α (Merck Millipore)
LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
MK-866 (Cayman Chemical)
OEA (Cayman Chemical)
PBS (Life Technologies)
RNA later (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
Platinum SYBR Green PCR mix (Invitrogen)
QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
RNeasy Mini Kit (Qiagen)

HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 細胞および Caco-2 細胞を 6-well plate に 2×10^5 cells/well で播種し、培養した。細胞がほぼ confluent になった後、培地を OEA (40 μM)、MK-866 (10 μM)または DMSO を含む培地に交換し、細胞をさらに 30 分間インキュベートした。次に、HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 細胞を LPS (1 ng/mL)を加えて 3 時間、Caco-2 細胞を human recombinant TNF-α (5.0 ng/mL)を加えて 1 時間静置した。

培養細胞、およびラット大腸の RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit を用いて以下の方法で行った。ラット大腸の RNA 抽出時は、検体 RNA later に浸透させ -30 ℃で保存し、Buffer RLT 600 μL・2-mercaptoethanol 6 μL・5.0 mm ジルコニアビーズを加えた 2.0 mL 破砕用 tube に検体を入れ、ビーズクラッシャー (μT-01, TITEC, Koshigaya, Japan)を用いて 60 秒間大腸組織を破砕した。続

いて 15,000 rpm、3 分間、室温で遠心し、上清を microtube に移し、70 % ethanol 600 μL を加えピペッティングにより混和した。700 μL のサンプルを 2 mL collection tube 中にセットした RNeasy スピンカラムに入れ、8,000 g で 15 秒間、室温で遠心し、ろ液を廃棄した。700 μL の Buffer RPE を RNeasy スピンカラムに添加し 8,000 g で 15 秒間、室温で遠心し、ろ液を廃棄した。500 μL の Buffer RPE を RNeasy スピンカラムに添加し 8,000 g で 15 秒間、室温で遠心し、ろ液を廃棄した。同作業を 2 回行った。2 回目の際は 2 分間遠心した。RNeasy スピンカラムを新しい microtube にセットし、40 μL の RNeasy free water を直接スピンカラム・メンブレンに添加し、8,000 g で 1 分間、室温で遠心し、RNA を含む溶出液を回収した。RNA の濃度測定は、分光光度計 (Nano Drop 2000, Thermo Scientific)を用いて行った。

逆転写の過程は QuantiTect Reverse Transcriptional Ki を用いて以下の手法にて行った。

gDNA Wipeout Buffer 2 μL・RNA サンプル 1 μg・RNase free water が計 10 μL となるように調製し、42 ℃で 2 分間インキュベートし、氷上で冷却した。Quantiscript Reverse Transcriptase 1 μL・Quantiscript RT Buffer 4 μL・RT Primer Mix 1 μL・RNase free water 4 μL を加え、37 ℃で 15 分間インキュベートし、Quantiscript Reverse Transcriptase を不活性化するために 85 ℃で 5 秒間インキュベートした。

96-well plate に、Platinum SYBR Green qPCR SuperMIX-UDG with ROX 25 μL・Forward primer 0.5 μL・Reverse primer 0.5 μL・total RNA 1 μg を加え、計 25 μL になるように RNase free water で調製した。50 ℃ 2 分間、95 ℃ 2 分間の後、95 ℃ 15 秒間、60 ℃ 30 秒間を 40 サイクルの条件にて、7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて qRT-PCR を行った。遺伝子発現レベルはβ-actin を内在性コントロールとして用いて、comparative threshold cycle (ΔΔCt) method で計算した。使用した primer は全て、北海道システムサイエンス社より購入した (表 3)。

表 3. プライマー配列

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
human β-actin	ccaaccgcgagaagatga	ccagaggcgtacagggatag

human IL-8	agagtgattgagagtggacc	acttctccacaaccctctg
human IL-1β	aagctgatggccctaaacag	aggtgcatcgtgcacataag
human TNF-α	cagcctcttctccttcctga	gccagagggctgattagaga
rat β-actin	aagatgacccagatcatgtt	ttaatgtcacgcacgatttc
rat IL-1β	cctatgtcttgcccgtggag	cacacactagcaggtcgtca
rat TNF-α	accacgctcttctgtctactg	cttggtggtttgctacgac
rat TGF-β	ctgctgacccccactgatac	agccctgtattccgtctcct
rat IL-8	cattaatatttaacgatgtggatgcgtttca	gcctaccatctttaaactgcacaat
rat PPAR-α	aatccacgaagcctacctga	gtcttctcagccatgcacaa
rat CD68	tcacaaaaaggctgccactctt	tcgtagggcttgctgtgctt

8. 統計的解析

データは平均値と標準誤差 (standard deviation, SD)で表した。グループ間のパラメーターは、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance)で群間の有意差の有無を検討し、Holm-Sidak post hoc test によりそれぞれの群間の差を検定した。$P < 0.05$ を統計学的有意差があると判断した。全ての解析は GraphPad Prism version 7 (Graphpad, San Diego, CA, USA)を使用した。

研　究　結　果

1. OEA は培養単球細胞の LPS による炎症反応を抑制する（*in vitro*）

既報で単球系の細胞株を用いた *in vitro* の実験において LPS 刺激を行った場合に、OEA が抗炎症効果を有することが報告されており（Yang et al., 2016)、これの再現性を確認する目的で、まず TLR4 を過剰発現させた HEK293 (HEK293/hTLR4A-MD2-CD14)細胞に対して LPS 刺激（1.0 ng/mL、3 時間)を行い、OEA の効果を検討した。LPS で刺激を行うと、TNF-αの mRNA の発現が、Control（LPS-, OEA-)に比べて有意に増加したが、OEA（2, 5, 10, および 40 μM)の投与を行うと、濃度依存的にその増加が有意に抑制された（図 4A)。さらに、western blot において、LPS 刺激（10 mg/mL, 2 時間)によって、Control（LPS-, OEA-)に比べて IκBαのリン酸化が亢進したが、OEA（40 μM)の投与によってそのリン酸化の亢進が抑制された（図 4B)。

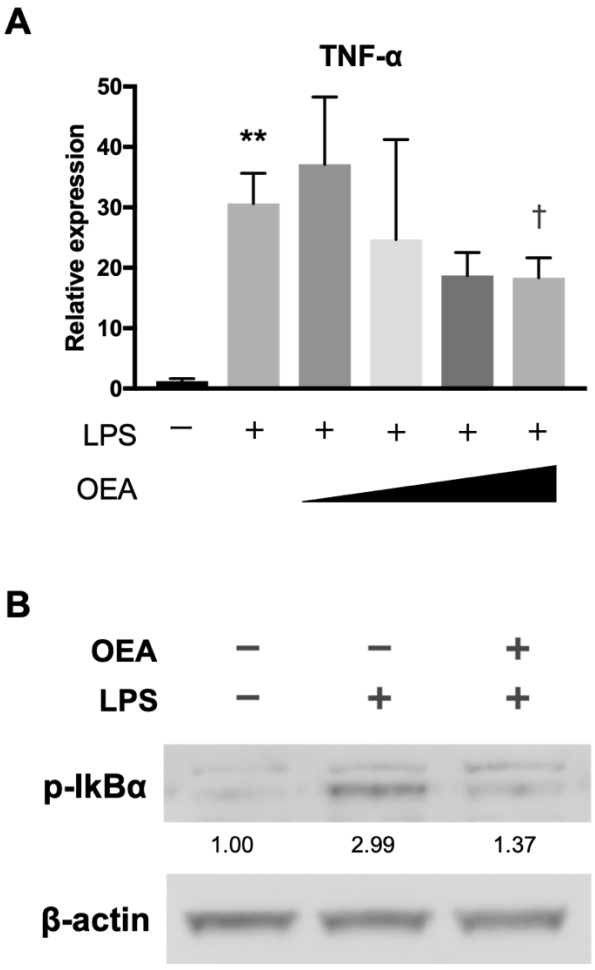

図 4. LPS 刺激による炎症反応に対する OEA の効果（*in vitro*）
HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 に対して、LPS で刺激を行った場合に、(A) TNF-αの mRNA の増加に対する OEA の効果を、qRT-PCR を用いて検討し、(B) IκB-αのリン酸化の亢進に対する OEA の効果を、western blot を用いて検討した。数値は western blot における、Control (LPS-, OEA-)を 1.00 とした場合の平均ピクセル濃度を示す。統計値は平均値±標準値で示した。
**；P <0.01 versus Control (LPS-, OEA-), †；P <0.01 versus LPS (LPS+, OEA-)。

2. OEA は培養腸管上皮細胞に対する TNF-α刺激の炎症反応を抑制する（*in vitro*）

次に、ヒト腸管上皮細胞 (Caco-2 細胞) に対する OEA の抗炎症効果を *in vitro* で検討した。TNF-α (5.0 ng/mL、 1 時間)による刺激によって、Control (TNF-α-, OEA-)と比較してインターロイキン (interleukin, IL) -8 および IL-1βの mRNA の発現が有意に増加したが、OEA 投与 (10 および 40 μM)は IL-8 および IL-1βの発現を有意に抑制した (図 5A)。 western blot において、TNF-α (5.0 ng/mL、 15 分)による刺激によって、Control (TNF-α-, OEA-)と比較して IκB-αおよび p65 のリン酸化が亢進し、OEA (40 μM)投与によって、Caco-2 細胞における TNF-α刺激による IκB-αおよび p65 のリン酸化が抑制された (図 5B)。これらの結果によって、OEA が腸管上皮細胞における NF-κB シグナル伝達経路の活性化を抑制することによって抗炎症効果を有することが示唆された。さらに、IL-8 の mRNA 発現を抑制する OEA の効果は、PPAR-αのアンタゴニストである MK-866 (10 μM)によってブロックされる結果となった (図 5C)。

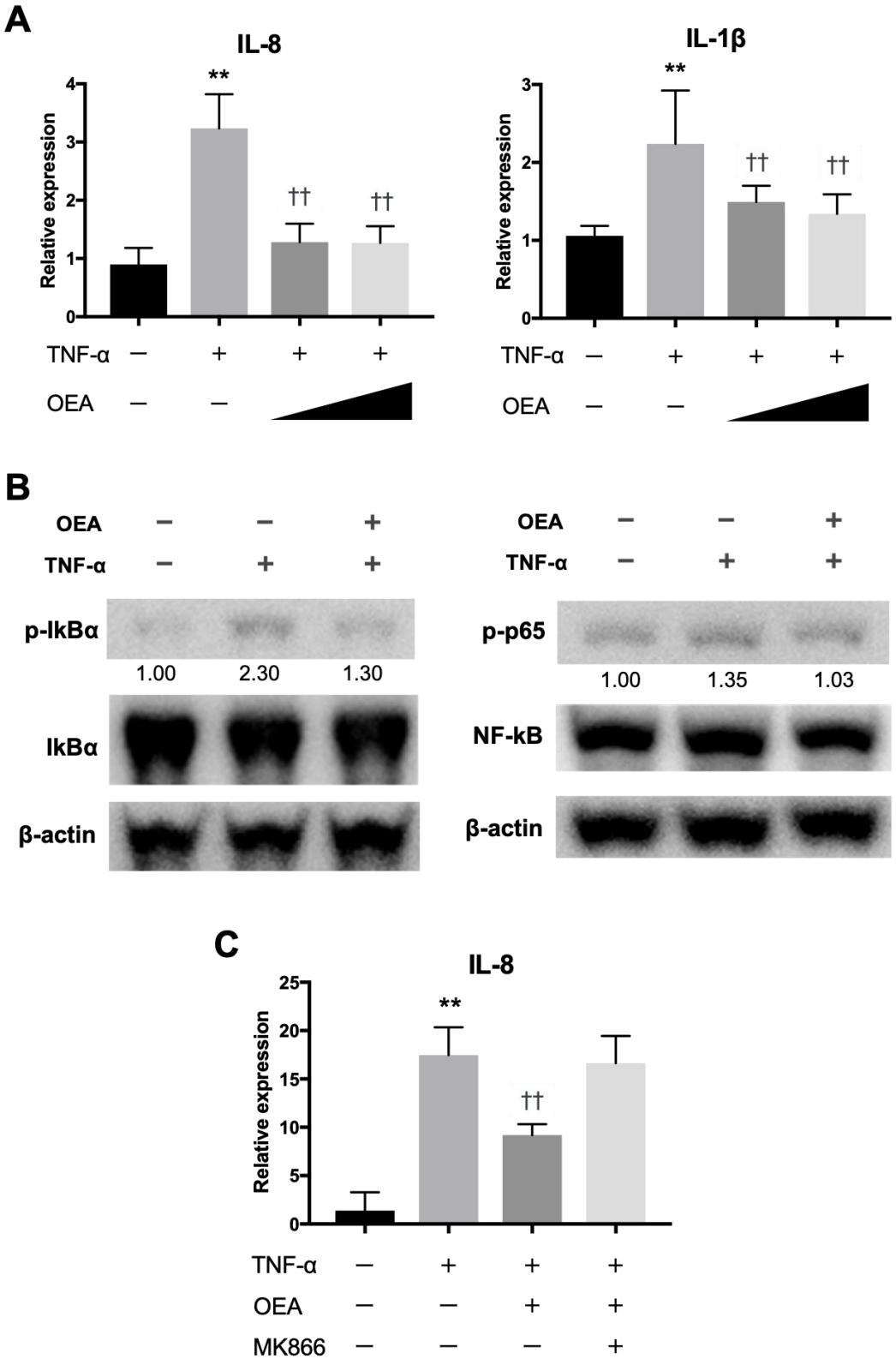

図 5. OEA の腸管細胞への TNF-α刺激による炎症反応に対する効果（*in vitro*）

Caco-2 細胞に対して、TNF-αで刺激を行った場合に、(A) IL-8 および IL-1βの mRNA の増加に対する OEA の効果を、qRT-PCR を用いて検討し、(B) IkB-αおよび p65 のリン酸化の亢進に対する OEA の効果を、western blot を用いて検討した。また、(C)OEA の IL-8 の mRNA の発現抑制効果に対する、PPAR-αのアンタゴニスト (MK-866)の効果について検討した。数値は western blot における、Control (TNF-α-, OEA-)を 1.00 とした場合の平均ピクセル濃度を示す。統計値は平均値±標準値で示した。

**；P <0.01 versus Control (TNF-α-, OEA-), ††；P <0.01 versus TNF-α (TNF-α+, OEA-)

3. OEA 投与のラット DSS 腸炎に対する効果（*in vivo*）

in vitro において OEA が腸管上皮細胞に対して抗炎症効果を有することを確認したため、続いてラット腸炎モデルを用いて OEA の効果についての検討を行った。まず相対的体重比 （day 0 を 100 %とした時の体重比）に関して、DSS 群の体重増加は明らかに抑制されており、day 2 以降で DSS 群の体重比は Control 群に比べて有意に低かった（図 6A)。しかし、この体重増加抑制は OEA 投与によって減弱する傾向にあり、day 5 において DSS 群と比較して、DSS+OEA 群で有意に体重比が高い結果となった。Control 群と OEA 群の間に、体重比の有意な差を認めなかった。DAI は DSS 群において徐々に上昇し、day 2 以降で Control 群に比べて DSS 群で有意な DAI の上昇を認めた （図 6B)。この DAI の上昇は OEA 投与によって抑制され、day 3 以降で、DSS 群に比べて DSS+OEA 群で有意な DAI の低下を認めた。食餌摂取量に関しては、Control 群に比べて、OEA 群、DSS 群、および DSS+OEA 群で有意な低下を認めた （図 6C)。OEA 群・DSS 群・DSS+OEA 群間で食餌摂取量に有意な差を認めなかった。飲水量に関しては、全ての群間で有意差を認めなかった （図 6D)。次に、腸管長に関して、DSS 群において Control 群に比べて有意な腸管の短縮を認めたが、DSS+OEA 群では DSS 群と比較して有意な腸管短縮の改善を認めた （図 6E, 6F)。

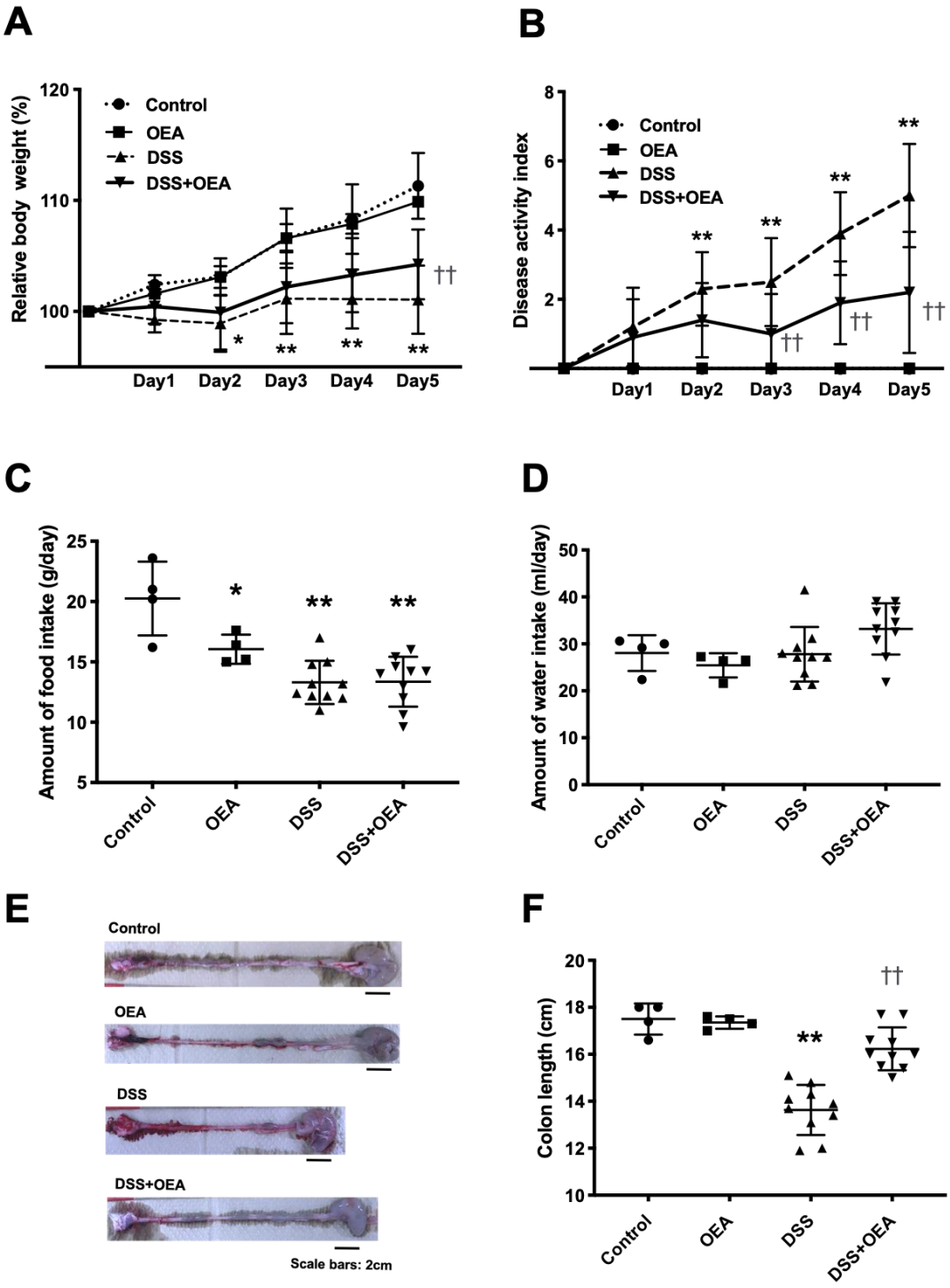
A
Relative body weight (%)
120
110
100
Control
OEA
DSS
DSS+OEA
Day1
Day2
Day3
Day4
Day5
*
**
**
**
††
B
Disease activity index
8
6
4
2
Control
OEA
DSS
DSS+OEA
**
**
**
**
††
††
††
Day1
Day2
Day3
Day4
Day5
C
Amount of food intake (g/day)
25
20
15
10
5
*
**
**
Control
OEA
DSS
DSS+OEA
D
Amount of water intake (ml/day)
50
40
30
20
10
0
Control
OEA
DSS
DSS+OEA
E
Control
OEA
DSS
DSS+OEA
Scale bars: 2cm
F
Colon length (cm)
20
18
16
14
12
10
**
††
Control
OEA
DSS
DSS+OEA

図 6. OEA 投与のラット DSS 腸炎に対する効果（*in vivo*）
Control 群（n= 4)、OEA 群（n= 4)、DSS 群（n= 10)、DSS+OEA 群（n= 10）の 4 群。(A) 相対的体重比、(B) DAI、(C) 食餌摂取量、(D) 飲水量、(E, F) 腸管長を示す。スケールバーは 2 cm を示す。統計値は平均値±標準値で示した。
*；P <0.05 versus Control 群, **；P <0.05 versus Control 群, ††； P <0.01 versus DSS 群.

4. 腸管の病理組織学的評価（*in vivo*）

続いて、ラット大腸の病理組織学的、免疫組織化学的評価を行った。HE 染色において、DSS 群では Control 群と比較して粘膜障害・陰窩の消失・炎症細胞の浸潤といった腸炎の所見を認めるが、これらの所見は DSS 群と比較して DSS+OEA 群では減弱傾向で、DSS 群の組織学的スコアは Control 群よりも有意に高く、DSS+OEA 群の組織学的スコアは DSS 群よりも低い傾向を認めた。 （図 7A)。CD68 免疫組織化学染色では、CD68 陽性マクロファージの腸管への浸潤は、Control 群と比較して DSS 群で有意に増加した。しかし、OEA 投与によってマクロファージ浸潤は抑制され、DSS 群と比較して DSS+OEA 群でマクロファージ浸潤の有意な抑制を認めた （図 7B)。MPO 免疫組織化学染色では、 MPO 陽性好中球の浸潤は、Control 群と比較して DSS 群で有意に増加し、DSS 群と比較して DSS+OEA 群で有意な好中球浸潤の抑制を認めた （図 7C)。

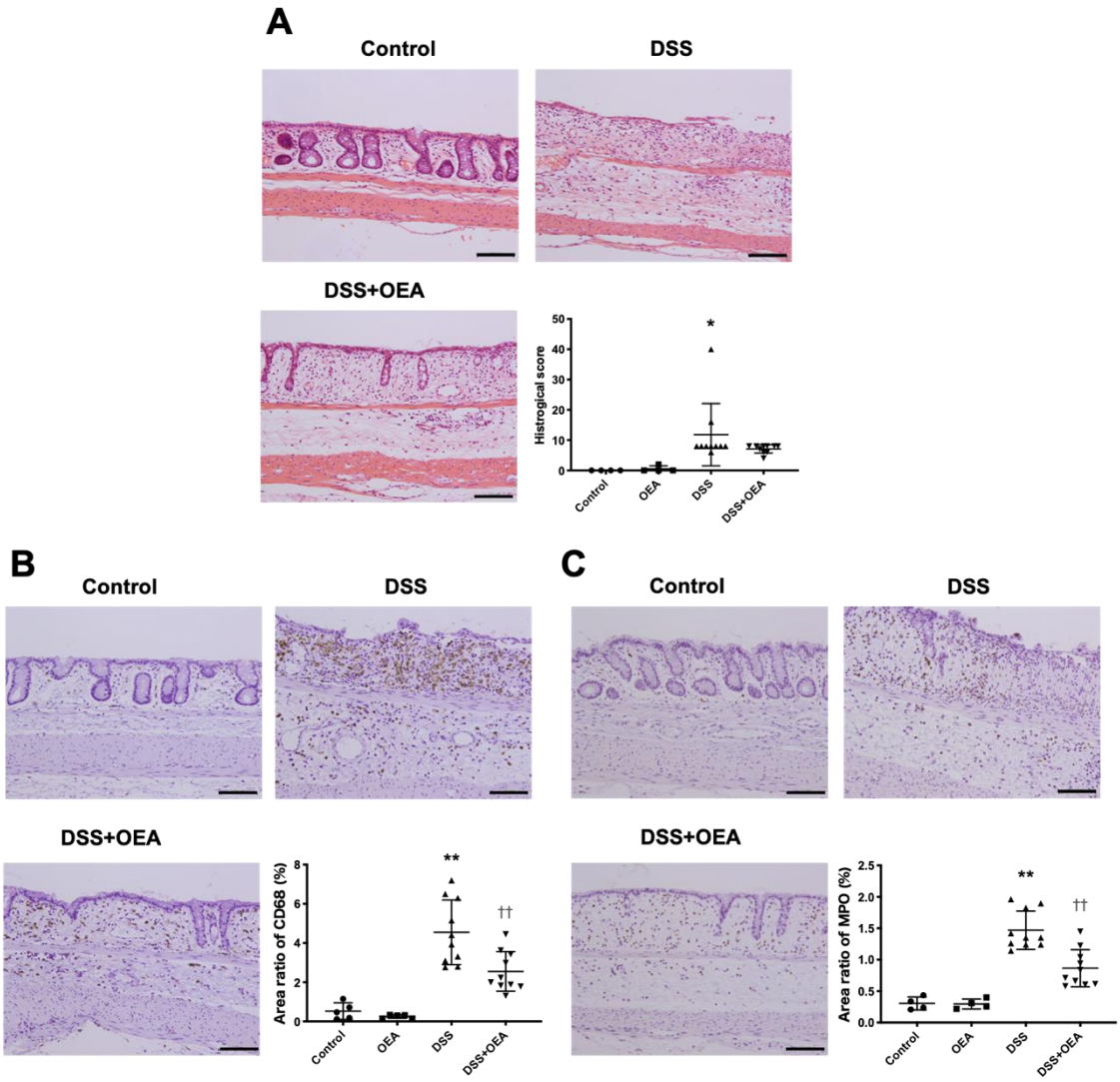

図 7. 腸管の病理組織学的評価（*in vivo*）

Control 群（n= 4）、OEA 群（n= 4）、DSS 群（n= 10）、DSS+OEA 群（n= 10）の 4 群。(A) HE 染色、(B) CD68 染色、(C) MPO 染色。Scale bar は、100 μm を示す。統計値は平均値±標準値で示した。

*；P <0.05 versus Control 群，　**；P <0.05 versus Control 群，††；P <0.01 versus DSS 群.

5. 大腸における遺伝子発現に対する OEA 投与の効果（*in vivo*）

更に、大腸における炎症関連遺伝子の mRNA 発現の評価を行った。DSS 群では、IL-1β、TNF-α、transforming growth factor （TGF）-βといった炎症性サイトカインの mRNA 発現レベルが、Control 群と比較して有意に増加した（図 8A, 8B, 8C)。DSS+OEA 群では、これらの炎症性サイトカインの発現レベルが低下する傾向にあり （図 8B, 8C)、IL-1βの発現は DSS 群と比較して有意に低下していた（図 8A)。IL-8 の発現レベルは、統計学的に有意ではないが、Control 群と比較して DSS 群で増加し、DSS 群と比較して DSS+OEA 群で低下する傾向を認めた（図 8D)。 PPAR-αの発現レベルは、Control 群と比較して DSS 群で有意に低下し、DSS 群と DSS+OEA 群の間で有意差は認めなかった （図 8E)。 CD68 の発現レベルは、Control と比較して DSS 群で有意に増加し、DSS 群と比較して DSS+OEA 群で低下する傾向を認めた （図 8F)。

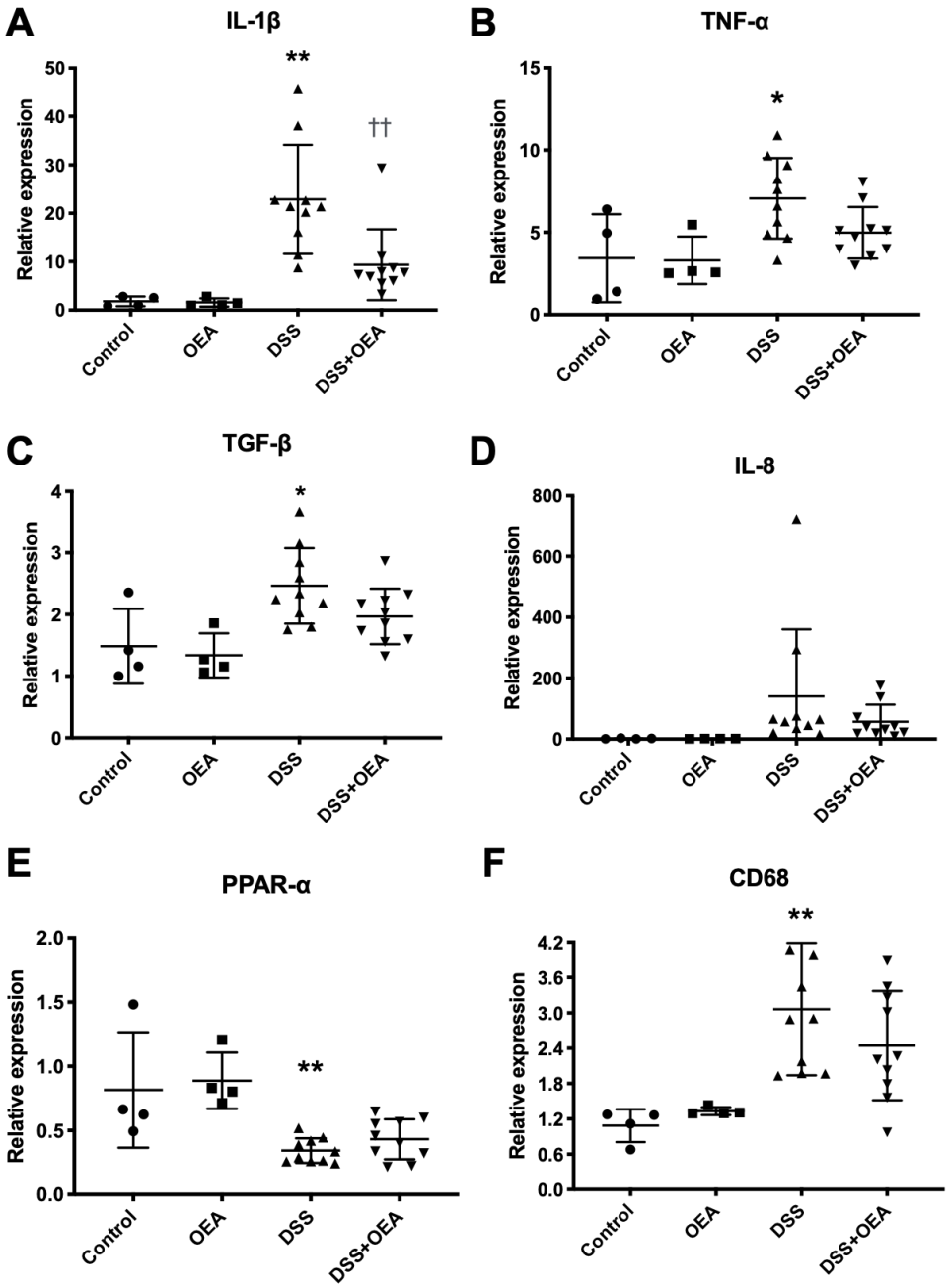

図 8. 大腸における遺伝子発現（*in vivo*）

Control 群 (n= 4)、OEA 群 (n= 4)、DSS 群 (n= 10)、DSS+OEA 群 (n= 10) の 4 群。(A) IL-1β、(B) TNF-α、(C) TGF-β、(D) IL-8、(E) PPAR-α、(F) CD68 の mRNA の発現を qRT-PCR にて評価した。統計値は平均値±標準値で示した。 *；P <0.05 versus Control 群, **；P <0.05 versus Control 群, ††； P <0.01 versus DSS 群.

考　察

本研究において、*in vitro* および *in vivo* で OEA の抗炎症効果を検討し、細胞培養実験を通じてその抗炎症効果の根本的なメカニズムを検討した。

その結果、(1) OEA は *in vitro* で LPS 誘発性炎症反応を抑制し、(2) OEA は培養腸管上皮細胞で TNF-α誘発性炎症反応を抑制し、(3) OEA 投与はラットの DSS 誘発大腸炎を改善することを確認した　(図 9)。

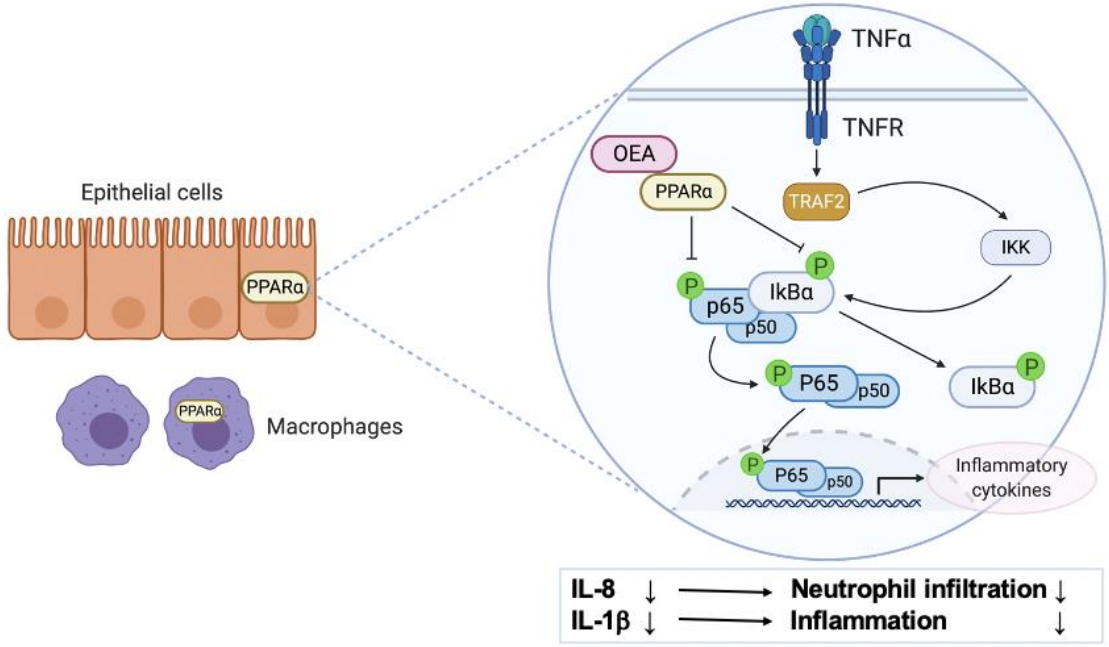

図 9. 本研究での大腸炎に対する OEA の抗炎症効果の考え得るメカニズム
PPAR-αは、腸上皮細胞およびマクロファージで高度に発現している。OEA は IκB-αと p65 のリン酸化を抑制し、NF-κB シグナル伝達経路の活性化を抑制し、上皮細胞における IL-8 と IL-1βなどの炎症性サイトカインの発現を低下させる。IL-8 の発現低下によって好中球浸潤が抑制され、IL-1βの発現低下によって大腸の炎症反応が抑制される。

NF-κB の発現と活性化は、活動性を有する IBD 患者の腸管において強く誘導され、活性化された NF-κB の量が腸管炎症の重症度と有意に相関すると報告されている (Atreya et al., 2008)。また OEA は、*in vitro* の実験で、NF-κB および ERK1/2/AP-1/STAT3 経路を阻害することにより、LPS で刺激された単球系の細胞株　(THP-1) に対して、抗炎症作用を有することが報告されている (Yang et al., 2016)。本実験では、LPS で刺激された 293/hTLR4A-MD2-CD14 細胞に対

して、OEA は濃度依存的に TNF-αの mRNA 発現を低下させ、IκB-αのリン酸化を抑制した。さらに、TNF-αで刺激された Caco-2 細胞に対して、OEA は炎症性サイトカインの発現を低下させ、IκB-αおよび p65 のリン酸化を抑制した。これらの実験結果によって、OEA が抗炎症効果を有し、さらに腸管においては、腸管上皮細胞の NF-κB シグナル伝達経路の活性化を抑制することによって、この炎症効果を発揮することが示唆された。

OEA は、PPAR-α (Fu et al., 2005)、TRPV1 (Ahern, 2003)、および GPR119 (Lauffer et al., 2009)のアゴニストとして機能することが報告されている。PPAR-αは、腸管上皮細胞 (Kimura et al., 2013)、およびマクロファージ (Manoharan et al., 2016)に高度に発現していると報告されている。PPAR-αアゴニストはマウス DSS 大腸炎を改善し (Azuma et al., 2010)、PPAR-α経路の欠損は、マウス大腸マクロファージの機能を変化させ、結果として腸管における炎症性サイトカインの発現が増加することが報告されている (Manoharan et al., 2016)。IBD モデルにおける TRPV1 の役割については controversial であり (Cseko et al., 2019)、現時点で IBD モデルに対する GPR119 アゴニストの効果に関する報告はない。本研究では、PPAR-αアンタゴニストは、*in vitro* において IL-8 の発現を低下させる OEA の作用をブロックした。この結果によって、腸管上皮細胞における OEA の抗炎症効果が PPAR-α依存的であることが示唆された。一方、*in vitro* では、単球系の細胞株 (THP-1) において、LPS 刺激によって PPAR-αの mRNA 発現レベルが低下し、OEA 投与によって PPAR-αの発現が増加することが報告されており (Yang et al., 2016)、 *in vivo* では、OEA の投与により、ラットの非アルコール性脂肪肝における PPAR-αの mRNA 発現レベルが有意に増加したと報告されている (Li et al., 2015)。しかしながら、本研究における動物実験では、ラット大腸の PPAR-αの発現は DSS 投与によって低下したが、OEA 投与はこの低下を改善しなかった。この結果は、OEA が大腸での PPAR-α発現の上昇を伴わずに、PPAR-αのアゴニストとして作用することを示唆していると考えられる。

マクロファージは、IBD の患者において炎症性サイトカインを産生し、腸管組織損傷を誘発するとされている (Steinbach and Plevy, 2014)。本研究の *in vivo* 実験では、マクロファージの浸潤は OEA 投与によって抑制された。さらに、UC の患者では、好中球浸潤の程度は疾患の重症度と相関し (Wera et al., 2016)、IL-8 は主として末梢血管から炎症組織へ好中球の移動を誘発する、好中球走化性物質であるとされている (Lee et al., 2018)。本研究において、OEA は Caco-2 細胞における IL-8 の発現と、ラット大腸における好中球浸潤を抑制した。これらの結果によって、OEA が腸管上皮細胞での IL-8 発現を抑制することによって、大腸への好中球浸潤を抑制することが示唆された。

OEA 投与により、食餌摂取量が低下することが報告されている（Fu et al., 2005)。また、複数の研究において、DSS の投与により食餌摂取量が有意に低下することが報告されている（Chaudhary et al., 2017; Ye et al., 2009)。本研究では、既報と同じように、OEA 群と DSS 群において、コントロール群と比べて、食餌摂取量が有意に低下していた。一方で、DSS 群と DSS+OEA 群の間で食餌摂取量に有意な差は認めなかった。この結果は、OEA の抗炎症効果が、DSS 投与によって引き起こされる食餌摂取量の低下を無効にすることを示唆していると考えられる。さらに、本研究では、OEA 群ではコントロール群と比較して食餌摂取量の有意な低下を認めたにも関わらず、相対体重比の両群間での有意な差は見られなかった。この結果は、以前に Proulx らが報告したように(Proulx et al., 2005)、OEA 投与により自発的活動が減少したことが影響した可能性が考えられる。

OEA の治療効果は、アテローム性動脈硬化症（Fan et al., 2014)、非アルコール性脂肪肝（Li et al., 2015)、および神経炎（Sayd et al., 2014)に対して、動物実験において報告されている。臨床研究においては、肥満の人に OEA を投与すると、炎症反応と酸化ストレスが改善されたと報告されている(Payahoo et al., 2018)。OEA は、将来的に様々な疾患で臨床応用される可能性がある薬剤であり、そのためには更なる臨床研究が必要であると考えられる。

この研究にはいくつかの limitation がある。(1) PPAR-αに関する実験は行っているが、TRPV1 や GPR119 などの他の OEA が作用する受容体に関する実験を行っていない。(2) OEA は *in vivo* において腹腔内投与のみ行い、経口投与での実験は行っていない。多くの報告では、OEA は腹腔内投与され、投与量は通常 5 – 20 mg/kg である。しかし、いくつかの研究では、OEA は経口投与され、投与量は 25 – 200 mg/kg である（Nielsen et al., 2004; Oveisi et al., 2004; Thabuis et al., 2011)。(3) 大腸炎が発症するより前の 0 日目にも OEA 投与を行っており、予防的投与の効果が含まれている可能性がある。(4) 今回の動物実験プロトコールは、慢性大腸炎モデルというより、急性大腸炎モデルである。

総括および結論

本研究において、以下の知見が得られた。

・OEA は *in vitro* で、LPS 誘発性炎症反応を抑制し、IκB-αのリン酸化を抑制した。

・OEA は培養腸管上皮細胞で、TNF-α誘発性炎症反応を抑制し、IκB-α・p65 のリン酸化を抑制した。また PPAR-αのアンタゴニストはこの抗炎症効果を抑制した。

・OEA 投与はラットの DSS 誘発大腸炎による体重増加抑制・疾患活動性スコアの上昇・腸管短縮を改善し、マクロファージ・好中球の腸管への浸潤を抑制し、炎症性サイトカインの発現を抑制した。

本研究において、OEA はラット腸炎モデルに対する治療効果が示され、新たな治療法である可能性が示唆された。

謝　　辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言を頂きました、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

同教室：大西俊介准教授には、基礎研究に対して、その心構え、信念、実験方法、データ解析、論文作成そして学会での発表方法など、あらゆる面において御指導・御支援頂きました、厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究に尊い生命を提供して頂きました実験動物諸霊に深く感謝いたします。

2021 年　3 月
小田切　信介

利　益　相　反

なし

引 用 文 献

Ahern, G.P. (2003). Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. J. Biol. Chem. *278*, 30429-30434.

Atreya, I., Atreya, R., and Neurath, M.F. (2008). NF-kappaB in inflammatory bowel disease. J. Intern. Med. *263*, 591-596.

Azuma, Y.T., Nishiyama, K., Matsuo, Y., Kuwamura, M., Morioka, A., Nakajima, H., and Takeuchi, T. (2010). PPARalpha contributes to colonic protection in mice with DSS-induced colitis. Int. Immunopharmacol. *10*, 1261-1267.

Brown, J.D., Karimian Azari, E., and Ayala, J.E. (2017). Oleoylethanolamide: A fat ally in the fight against obesity. Physiol. Behav. *176*, 50-58.

Chaudhary, G., Mahajan, U. B., Goyal, S. N., Ojha, S., Patil, C. R., and Subramanya, S. B. (2017). Protective effect of Lagerstroemia speciosa against dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in C57BL/6 mice. Am. J. Transl. Res. *9*, 1792-1800.

Cluny, N.L., Keenan, C.M., Lutz, B., Piomelli, D., and Sharkey, K.A. (2009). The identification of peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent effects of oleoylethanolamide on intestinal transit in mice. Neurogastroenterol. Motil. *21*, 420-429.

Cseko, K., Beckers, B., Keszthelyi, D., and Helyes, Z. (2019). Role of TRPV1 and TRPA1 ion channels in inflammatory bowel diseases: potential therapeutic targets? Pharmaceuticals (Basel) *12*, 48.

Decara, J.M., Romero-Cuevas, M., Rivera, P., Macias-Gonzalez, M., Vida, M., Pavon, F.J., Serrano, A., Cano, C., Fresno, N., Perez-Fernandez, R.*, et al.* (2012). Elaidyl-sulfamide, an oleoylethanolamide-modelled PPARalpha agonist, reduces body weight gain and plasma cholesterol in rats. Dis. Model. Mech. *5*, 660-670.

Fan, A., Wu, X., Wu, H., Li, L., Huang, R., Zhu, Y., Qiu, Y., Fu, J., Ren, J., and Zhu, C. (2014). Atheroprotective effect of oleoylethanolamide (OEA) targeting oxidized LDL. PLoS One. *9*, e85337.

Feagan, B.G., Sandborn, W.J., Gasink, C., Jacobstein, D., Lang, Y., Friedman, J.R., Blank, M.A., Johanns, J., Gao, L.L., Miao, Y., *et al.* (2016). Ustekinumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. N. Engl. J. Med. *375*, 1946-1960.

Fu, J., Oveisi, F., Gaetani, S., Lin, E., and Piomelli, D. (2005). Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. Neuropharmacology. *48*, 1147-1153.

Fumery, M., Singh, S., Dulai, P.S., Gower-Rousseau, C., Peyrin-Biroulet, L., and Sandborn, W.J. (2018). Natural history of adult ulcerative colitis in population-based cohorts: a systematic review. Clin. Gastroenterol. Hepatol. *16*, 343-356 e343.

Gaetani, S., Oveisi, F., and Piomelli, D. (2003). Modulation of meal pattern in the rat by the anorexic lipid mediator oleoylethanolamide. Neuropsychopharmacology. *28*, 1311-1316.

Grill, M., Hogenauer, C., Blesl, A., Haybaeck, J., Golob-Schwarzl, N., Ferreiros, N., Thomas, D., Gurke, R., Trotzmuller, M., Kofeler, H.C., *et al.* (2019). Members of the endocannabinoid system are distinctly regulated in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. Sci. Rep. *9*, 2358.

Kimura, R., Takahashi, N., Lin, S., Goto, T., Murota, K., Nakata, R., Inoue, H., and Kawada, T. (2013). DHA attenuates postprandial hyperlipidemia via activating PPARalpha in intestinal epithelial cells. J. Lipid. Res. *54*, 3258-3268.

Lauffer, L.M., Iakoubov, R., and Brubaker, P.L. (2009). GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. Diabetes. *58*, 1058-1066.

Lee, S.H., Kwon, J.E., and Cho, M.L. (2018). Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. Intest. Res. *16*, 26-42.

Li, L., Li, L., Chen, L., Lin, X., Xu, Y., Ren, J., Fu, J., and Qiu, Y. (2015). Effect

of oleoylethanolamide on diet-induced nonalcoholic fatty liver in rats. J. Pharmacol. Sci. *127*, 244-250.

Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H.F., and Lian, Q. (2014). Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. Cell Transplant. *23*, 1045-1059.

Lou, G., Chen, Z., Zheng, M., and Liu, Y. (2017). Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. Exp. Mol. Med. *49*, e346.

Manoharan, I., Suryawanshi, A., Hong, Y., Ranganathan, P., Shanmugam, A., Ahmad, S., Swafford, D., Manicassamy, B., Ramesh, G., Koni, P.A.*, et al.* (2016). Homeostatic PPARalpha signaling limits inflammatory responses to commensal microbiota in the intestine. J. Immunol. *196*, 4739-4749.

Martin, J.C., Beriou, G., and Josien, R. (2016). Dextran sulfate sodium (dss)-induced acute colitis in the rat. Methods Mol. Biol. *1371*, 197-203.

Miyamoto, S., Ohnishi, S., Onishi, R., Tsuchiya, I., Hosono, H., Katsurada, T., Yamahara, K., Takeda, H, Sakamoto, N. (2017). Therapeutic effects of human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation and conditioned medium enema in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. Am. J. Transl. Res. *9,* 940-952.

Mizushima, T., Ohnishi, S., Hosono, H., Yamahara, K., Tsuda, M., Shimizu, Y., Kato, M., Asaka, M., and Sakamoto, N. (2017). Oral administration of conditioned medium obtained from mesenchymal stem cell culture prevents subsequent stricture formation after esophageal submucosal dissection in pigs. Gastrointest. Endosc. *86*, 542-552.

Nielsen, M.J., Petersen, G., Astrup, A., and Hansen, H.S. (2004). Food intake is inhibited by oral oleoylethanolamide. J. Lipid Res. *45*, 1027-1029.

Okabayashi, S., Kobayashi, T., and Hibi, T. (2020). Inflammatory bowel disease in Japan-Is It similar to or different from Westerns? J. Anus Rectum Colon. *4*, 1-13.

Onishi, R., Ohnishi, S., Higashi, R., Watari, M., Yamahara, K., Okubo, N., Nakagawa, K., Katsurada, T., Suda, G., Natsuizaka, M.*, et al.* (2015). Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates dextran sulfate sodium-induced severe colitis in rats. Cell Transplant. *24*, 2601-2614.

Ono, M., Ohnishi, S., Honda, M., Ishikawa, M., Hosono, H., Onishi, R., Nakagawa, K., Takeda, H., and Sakamoto, N. (2015). Effects of human amnion-derived mesenchymal stromal cell transplantation in rats with radiation proctitis. Cytotherapy. *17*, 1545-1559.

Oveisi, F., Gaetani, S., Eng, K.T., and Piomelli, D. (2004). Oleoylethanolamide inhibits food intake in free-feeding rats after oral administration. Pharmacol. Res. *49*, 461-466.

Pandurangan, A.K., Mohebali, N., Norhaizan, M.E., and Looi, C.Y. (2015). Gallic acid attenuates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in BALB/c mice. Drug Des. Devel. Ther. *9*, 3923-3934.

Payahoo, L., Khajebishak, Y., Alivand, M.R., Soleimanzade, H., Alipour, S., Barzegari, A., and Ostadrahimi, A. (2019). Investigation the effect of oleoylethanolamide supplementation on the abundance of Akkermansia muciniphila bacterium and the dietary intakes in people with obesity: A randomized clinical trial. Appetite. *141*, 104301.

Payahoo, L., Khajebishak, Y., Asghari Jafarabadi, M., and Ostadrahimi, A. (2018). Oleoylethanolamide supplementation reduces inflammation and oxidative stress in obese people: A Clinical Trial. Adv. Pharm. Bull. *8*, 479-487.

Peyrin-Biroulet, L., Loftus, E.V., Jr., Colombel, J.F., and Sandborn, W.J. (2010). The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. Am. J. Gastroenterol. *105*, 289-297.

Proulx, K., Cota, D., Castaneda, T.R., Tschop, M.H., D'Alessio, D.A., Tso, P., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2005). Mechanisms of oleoylethanolamide-induced changes in feeding behavior and motor activity. Am. J. Physiol. Regul. Integr.

Comp. Physiol. *289*, R729-737.

Romano, A., Tempesta, B., Provensi, G., Passani, M.B., and Gaetani, S. (2015). Central mechanisms mediating the hypophagic effects of oleoylethanolamide and N-acylphosphatidylethanolamines: different lipid signals? Front. Pharmacol. *6*, 137.

Samsonraj, R.M., Raghunath, M., Nurcombe, V., Hui, J.H., van Wijnen, A.J., and Cool, S.M. (2017). Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. Stem Cells Transl. Med. *6*, 2173-2185.

Sandborn, W.J., Su, C., Sands, B.E., D'Haens, G.R., Vermeire, S., Schreiber, S., Danese, S., Feagan, B.G., Reinisch, W., Niezychowski, W.*, et al.* (2017). Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. N. Engl. J. Med. *376*, 1723-1736.

Sayd, A., Anton, M., Alen, F., Caso, J.R., Pavon, J., Leza, J.C., Rodriguez de

Fonseca, F., Garcia-Bueno, B., and Orio, L. (2014). Systemic administration of oleoylethanolamide protects from neuroinflammation and anhedonia induced by LPS in rats. Int. J. Neuropsychopharmacol. *18*, pyu111.

Singh, K., Chaturvedi, R., Barry, D.P., Coburn, L.A., Asim, M., Lewis, N.D., Piazuelo, M.B., Washington, M.K., Vitek, M.P., and Wilson, K.T. (2011). The apolipoprotein E-mimetic peptide COG112 inhibits NF-kappaB signaling, proinflammatory cytokine expression, and disease activity in murine models of colitis. J. Biol. Chem. *286*, 3839-3850.

Steinbach, E.C., and Plevy, S.E. (2014). The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. Inflamm. Bowel. Dis. *20*, 166-175.

Thabuis, C., Destaillats, F., Lambert, D.M., Muccioli, G.G., Maillot, M., Harach, T., Tissot-Favre, D., and Martin, J.C. (2011). Lipid transport function is the main target of oral oleoylethanolamide to reduce adiposity in high-fat-fed mice. J. Lipid. Res. *52*, 1373-1382.

Tsuda, M., Ohnishi, S., Mizushima, T., Hosono, H., Yamahara, K., Ishikawa, M., Abiko, S., Katsurada, T., Shimizu, Y., and Sakamoto, N. (2018). Preventive effect of mesenchymal stem cell culture supernatant on luminal stricture after endoscopic submucosal dissection in the rectum of pigs. Endoscopy. *50*, 1001-1016.

Wera, O., Lancellotti, P., and Oury, C. (2016). The Dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases. J. Clin. Med. *5*, 118.

Yang, L., Guo, H., Li, Y., Meng, X., Yan, L., Dan, Z., Wu, S., Zhou, H., Peng, L., Xie, Q.*, et al.* (2016). Oleoylethanolamide exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced THP-1 cells by enhancing PPARalpha signaling and inhibiting the NF-kappaB and ERK1/2/AP-1/STAT3 pathways. Sci. Rep. *6*, 34611.

Ye, Z., Liu, Z., Henderson, A., Lee, K., Hostetter, J., Wannemuehler, M., and Hendrich, S. (2009). Increased CYP4B1 mRNA is associated with the inhibition of dextran sulfate sodium-induced colitis by caffeic acid in mice. Exp. Biol. Med. (Maywood) *234*, 605-616.