

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00848

研究課題名(和文) 脳虚血モデルマウスにみられる摂食障害に対するn-3系脂肪酸の予防効果の評価

研究課題名(英文) Evaluation of protective effect of dietary supplementation with n-3 fatty acids against feeding disorder following cerebral ischemia in mice

研究代表者

道志 勝 (Doshi, Masaru)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：30392385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： γ -リノレン酸給餌は、一過性脳虚血によって生じる摂食障害(摂食量と体重の減少)に対して軽減効果を発揮することが判明した。しかしながら、このときの脳内では肝臓など末梢組織で顕著にみられるエイコサノイド前駆体脂肪酸含量の変動がほとんどなく、脳内でエイコサノイドの産生が抑制されているとは考えにくいことがわかった。また、 γ -リノレン酸は、LPS投与後の視床下部で起こる炎症性サイトカイン産生応答を抑制することが判明した。これらのことから、一過性脳虚血によって生じる摂食障害に対する γ -リノレン酸の軽減効果は、視床下部で起こる炎症性サイトカイン産生応答の抑制による可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transient forebrain ischemia causes brain inflammation such as edema and neuronal death. We found that decrease in food intake and body weight were induced by transient forebrain ischemia in mice. We also demonstrated that dietary supplementation with γ -linolenic acid attenuated the anorexic responses following transient forebrain ischemia in mice but did not reduce arachidonic acid, precursor of eicosanoids content in brain phospholipids. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces behavioral depression including feeding disorder, in which the central and peripheral inductions of proinflammatory cytokines are proposed to play an important role. We demonstrated that dietary supplementation with γ -linolenic acid suppressed the gene expression of proinflammatory cytokines in the hypothalamus. These results suggest that dietary γ -linolenic acid attenuates feeding disorders by the suppression of cytokines generation rather than eicosanoids generation in hypothalamus.

研究分野：脂質生化学

キーワード： γ -リノレン酸 炎症 脳虚血モデルマウス 摂食障害

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害(脳卒中)は、ガン、心臓病とともに三大疾病のひとつであり、高齢者の寝たきりの原因となる代表的な疾患である。また、糖尿病や肥満などの生活習慣病は脳血管障害のリスクファクターとして知られている。わが国では高齢化社会を迎え、生活習慣病の増加により、その患者数は増加しており、脳血管障害の病態解明および治療法の確立が急速に求められている。脳血管障害の中でも最も多いのが血管の閉塞や狭窄による虚血性脳血管障害である。実験的には、マウスやラットの脳血管を一時的に閉塞し、一定時間後に血流を再開させる一過性脳虚血モデルにおいて発生する脳梗塞、神経細胞死、脳浮腫などの病態解明およびその制御法の開発を目指した研究が中心である。最近、研究代表者は、マウス一過性脳虚血モデルにおける脳浮腫(血流再開1時間後に発生)、海馬神経細胞死(血流再開数日後から発生)に対する低体温療法の有効性を精力的に検討してきた。研究代表者は、このマウス脳虚血モデルでは、海馬神経細胞死の発生を評価するまでの1週間間に体重増加がみられず、むしろ減少傾向である(餌をあまり食べていない)という点について新たに着目した。このマウスの体重減少は、身体的、精神的なものを含めてなんらかの摂食障害によるものと考えられる。実際に、摂食障害は、脳血管障害患者のQOLの低下を招く重大な後遺症のひとつである。その一方で、治療法は経管栄養法などを行いながら摂食機能を回復させるといったリハビリテーションが中心であり、摂食障害に対する治療薬として確立されたものはない。したがって、脳血管障害患者のQOLの向上を目指した予防・治療法の確立は急務である。それには、脳血管障害に特化した病態および薬効解析を行うための実験的摂食障害モデルが必要となる。そこで、我々は、このマウス脳虚血モデルにおいて体重および摂食量を測定する評価系が虚血性脳血管障害を起因とした摂食障害のモデルとして有用であると考えた。

研究代表者および分担者は、以前よりn-3系脂肪酸(α-リノレン酸、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA))が、生体内アラキドン酸含量を低下させ、炎症性メディエーターであるアラキドン酸代謝物の産生を抑制することで発揮される抗炎症作用をマウス個体レベルで評価してきた。近年、マウスにLPSやザイモサン(炎症反応を誘発する物質)を投与した際に誘導される病的な症状のひとつである摂食行動の低下を、α-リノレン酸の給餌が選択的に抑制することを明らかにした。さらに、この摂食行動の低下には末梢のアラキドン酸代謝物のひとつであるプロスタグランジンが重要な役割を果たしていることが、明らかになった。一方、炎症反応は一過性脳虚血によっても誘導され、アラキドン酸代謝物を含む多

くの炎症性メディエーターが脳血管障害の進展に重要な役割を果たしている(Gaudet RJ et al., J. Neurochem., 1980, 35, 653-658, White BC et al., J. Neurol. Sci. 2000, 179, S1-S33)。つまり、一過性脳虚血モデルにおける摂食障害は、上記の炎症反応によって誘導される摂食行動低下と類似の現象が起きていると考えられる。そこで、研究代表者は、α-リノレン酸の摂取がマウス一過性脳虚血モデルにおけるアラキドン酸代謝物の産生を抑制し、摂食障害に対して予防効果を発揮するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

マウス一過性脳虚血モデルにおける体重・摂食量の変化、血液および組織(肝臓、脳)中のアラキドン酸代謝物濃度と脂質プロファイル(脂質成分とその構成脂肪酸の組成)に対するn-3系脂肪酸給餌の影響を評価し、摂食障害に対する有効性とその制御機構を明確にする。また、同時に本モデルにおいて発生する脳浮腫、海馬神経細胞死に及ぼす影響も評価し、摂食障害との関連性を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) α-リノレン酸の給餌がマウス一過性脳虚血モデルに及ぼす影響の評価

5週齢雄性C57BL/6系マウスにα-リノレン酸高含有エゴマ油(α-リノレン酸食)およびリノール酸高含有ベニバナ油(対照食)を10%添加した飼料を4週間与えた。1.5%イソフルラン吸入麻酔下にてマウスの両側総頸動脈(BCCA)を血管狭窄用クリップで閉塞して15分間の脳虚血後、クリップを外して血液を再灌流させた。脳虚血中は、体温コントローラーにて直腸温を37℃に維持した。Sham群はBCCA閉塞のみ行わず、同様に偽手術を行った。脳浮腫は、再灌流1時間後の脳水分量を乾燥重量法により測定することで評価した。また、再灌流3日後の海馬中のヌクレオソーム含量を測定し、海馬神経細胞死の発生を評価した。さらに、BCCA閉塞1週間前から各マウスの摂食量と体重を測定した。

(2) α-リノレン酸の給餌が脳リン脂質中エイコサノイド前駆体脂肪酸含量に及ぼす影響の評価

各実験飼料4週間給餌後、マウスの脳、肝臓を摘出した。Bligh and Dyer法により総脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーにて総リン脂質を分離精製したのち、メチルエステルに変換し、ガスクロマトグラフィーで分析した。また、各食餌を摂取したマウス5匹分の全脳から市販の脳血管単離キットを用いて脳血管濃縮画分を採取した。この画分の総リン脂質中脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにて分析した。脳血管濃縮画分中の血管内皮細胞マーカーであるCD31含量はウエスタンブロッティングによって評価した。

(3) -リノレン酸の給餌がマウス脳内炎症応答に及ぼす影響の評価

各実験飼料4週間給餌後、各マウスに LPS および生理食塩水(vehicle 群)を投与した。LPS 投与2時間後の視床下部を摘出して総 RNA を抽出し、RT-リアルタイム PCR 法により、炎症関連分子の mRNA の発現量を比較した。

4. 研究成果

(1) -リノレン酸の給餌がマウス一過性脳虚血モデルに及ぼす影響の評価

脳虚血再灌流1時間後の脳水分量は、両食餌群ともに Sham 群に比べて脳虚血手術群では増加したが、-リノレン酸食群の脳水分量は、対照食群に比べて有意に低かった。海馬神経細胞死の発生は、対照食群と-リノレン酸食群との間で差はなかった。一方、対照食群において、一過性脳虚血1日後(Day1)の摂食量および体重は、一過性脳虚血前(Day0)に比べて有意に減少したのに対して、-リノレン酸食群ではそれらの有意な減少は生じなかった。

以上の結果から、-リノレン酸は、虚血性脳浮腫の悪化は予防することができたが、海馬神経細胞死の発生には影響を及ぼさないことがわかった。また、-リノレン酸は、一過性脳虚血によって生じる摂食量と体重の減少に対しては軽減効果を発揮することが明らかになった。つまり、脳虚血モデルマウスにみられる摂食障害に対して、n-3系脂肪酸が予防効果を示すことを見出した。

(2) -リノレン酸の給餌が脳リン脂質中エイコサノイド前駆体脂肪酸含量に及ぼす影響の評価

各実験飼料4週間給餌後、全脳リン脂質中のアラキドン酸の割合が低下し、EPAの割合が増加していたが、これらの変化の程度は、末梢組織(肝臓)におけるものに比べるとごくわずかであった。このことから、-リノレン酸の給餌は脳内のエイコサノイド産生の変動を大きく変化させているとは考えにくい。ただし、脳全体でわずかながら一定量のEPAが蓄積しており、特定の部位のみで脂肪酸組成が変化した可能性が考えられた。脳血管は主に血管内皮細胞やアストロサイトで構成されており、とくに血管内皮細胞は血液脳関門を境界とした血液側と接している。したがって、それを含む脳血管付近では末梢組織と同様に-リノレン酸の給餌がアラキドン酸およびEPA含量をより顕著に変化させていた可能性を考え、全脳から脳血管を濃縮した画分を調製し、そのリン脂質中の脂肪酸組成を調べた。しかしながら、脳血管濃縮画分中の総リン脂質中のアラキドン酸の割合の低下とEPAの増加の程度は、全脳の総リン脂質中に見られたそれらの変化の程度とほとんど同じだった。以上のことから、-リノレン酸の給餌による脳内のエイコサノイ

ド前駆体脂肪酸含量の変化は、脳血管周辺に局在して起こっていることの証拠は得られなかった。したがって、LPS投与および一過性脳虚血により生じる摂食障害に対する-リノレン酸の軽減効果は、単純に脳内エイコサノイド産生抑制では説明できない可能性が高いと考えられた。当初の計画ではEPAの給餌実験も行う予定であったが、脳内エイコサノイド前駆体脂肪酸含量に対して-リノレン酸と同様の結果が予想されるため行わなかった。一方で、本研究結果により、-リノレン酸の脳内における抗炎症作用機序について検討していく必要性が考えられた。

(3) -リノレン酸の給餌がマウス脳内炎症応答に及ぼす影響の評価

まずは、脳内炎症応答の発現が顕著で、それに伴い生じる摂食障害に対して-リノレン酸の予防効果が明確なLPS誘発炎症モデルで検討した。視床下部におけるTNF- α 、IL-1、IL-6、COX-2、CCL2、CCL3のmRNA発現量を調べた。vehicleを投与したマウスの視床下部における各炎症関連分子のmRNA発現量は、対照食群と-リノレン酸食群間で差はなかった。一方、LPSを投与するとこれらのmRNA発現は顕著に増加していたが、TNF- α とIL-1のmRNA発現量は対照食群よりも-リノレン酸食群で小さかった。その他のmRNAの発現量は全体に対照食群よりも-リノレン酸食群において低い傾向を示した。したがって、-リノレン酸の給餌はLPS投与によって視床下部でおこる炎症性サイトカイン産生応答を抑制することによって、摂食障害を軽減している可能性が示唆された。ただしどのような機構で、視床下部における炎症性サイトカインの発現が抑制されるかは不明であり、その機構を明らかにするための研究を進める必要がある。また、一過性脳虚血後の視床下部においてもLPS投与ほどではないが明確な炎症応答の発現が確認できた。今後、一過性脳虚血後の脳内炎症応答に対する-リノレン酸給餌の影響も検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計5件)

道志 勝、渡辺志朗、藤田恭輔、富岡直子、細山田真、赤江 豊. -リノレン酸の給餌がマウス脳内炎症応答に及ぼす影響 日本薬学会第138年会、2018,3,25-28,金沢.

道志 勝、渡辺志朗、藤田恭輔、富岡直子、細山田真、赤江 豊. -リノレン酸の給餌が脳リン脂質中エイコサノイド前駆体脂肪酸含量に及ぼす影響 日本薬学会第137年会、

2017,3,24-27,仙台.

道志 勝、渡辺志朗、藤田恭輔、富岡直子、
細山田真、赤江 豊. 脳虚血モデルマウス
にみられる摂食障害に対する 3 系脂肪酸の
軽減効果 第 25 回日本脂質栄養学会、
2016,9,16-17,秋田.

道志 勝、渡辺志朗、藤田恭輔、富岡直子、
細山田真、赤江 豊. 脳虚血モデルマウス
にみられる摂食障害に対する 3 系脂肪酸の
軽減効果 日本薬学会第 136 年会、
2016,3,26-29,横浜.

道志 勝、齋藤実希、富岡直子、細山田真、
赤江 豊. マウス虚血性神経細胞死の定量
評価系を用いた低体温による抑制効果の評
価とその機構解析 第 27 回日本脳循環代謝
学会総会、2015,10,30-31,富山.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

道志 勝 (DOSHI, Masaru)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：3 0 3 9 2 3 8 5

(2) 研究分担者

渡辺 志朗 (WATANABE, Shiro)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号：0 0 2 2 2 4 0 6