

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06397

研究課題名(和文)短鎖および中鎖脂肪酸による神経炎症の制御

研究課題名(英文)Repression of neuroinflammation by short- and medium-chain fatty acids

研究代表者

森山 光章(Moriyama, Mitsuaki)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：20275283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経炎症とは種々の神経変性疾患に共通してみられるグリア細胞の活性化・炎症状態である。我々は腸内細菌由来の短鎖脂肪酸や食物由来の中鎖脂肪酸に着目し、神経炎症への関与を検討した。短鎖および中鎖脂肪酸はミクログリアの炎症性変化に対して抑制的に働くのに対し、アストロサイトにおいては酢酸のみ抑制的に働き、その他の脂肪酸は炎症反応を逆に増悪させることを明らかにした。得られた結果は神経炎症制御に対する食を介した短鎖および中鎖脂肪酸の新たな可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経炎症反応が進むことにより神経変性疾患の病態が増悪・進行することから、これを抑える方法の開発は喫緊の課題である。本課題では短鎖および中鎖脂肪酸が中枢グリア細胞の炎症反応を抑制し神経炎症を軽減可能なことを明らかにした。短鎖および中鎖脂肪酸は食を介して摂取可能であり、既存の治療薬と比較して副作用も少ないと考えられる。神経変性疾患の治療に対する短鎖および中鎖脂肪酸の新たな可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：Glial inflammation is a common characteristic in neuroinflammation in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. We investigated the role of short- and medium-chain fatty acids in glial inflammatory responses. We found that short- or medium-chain fatty acids inhibited microglial inflammatory responses such as NO, ROS production and phagocytotic activity. The results obtained potentiate the possibility that short- and medium-chain fatty acids are effective therapeutic drug for neurodegenerative diseases.

研究分野：農学

キーワード：神経炎症 グリア細胞 ミクログリア アストロサイト 神経化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢グリア細胞のうちミクログリアは脳マクロファージとも呼ばれ、従来は障害を受けたニューロンを処理するために活性化するとされてきたが、逆にミクログリアの活性化によりサイトカインやケモカインなどが産生され神経障害の原因や増悪要因となり得るという考えが現在では主流となっている。一方、脳内で最も数の多いアストロサイトは従来、ニューロンの単なる支持細胞とされてきたが、神経栄養因子の産生や抗酸化ストレス機能の発揮などニューロンの活動制御に積極的に関わることが近年の報告から明らかとなってきている。ミクログリアやアストロサイトは末梢の免疫細胞とは異なるものであるが、免疫細胞様の反応をする。髄膜炎などの稀有な病態以外では遭遇することがないにもかかわらず、リポポリサッカライド (LPS) に反応して、あたかも末梢における炎症反応と同様の活性化を受け、活性酸素種 (ROS) や一酸化窒素 (NO)、サイトカインを産生・放出する。多発性硬化症やアルツハイマー病、パーキンソン病をはじめとする各種神経変性疾患においては、髄膜炎のような細菌性の感染があったり、末梢における炎症のような白血球の浸潤がない状況下でも、これらグリア細胞の活性化すなわち神経炎症が起こり病態の増悪・進行に寄与すると考えられ、神経炎症は神経変性疾患の病態の共通基盤として捉えられている。

(2) 自然界に存在する脂肪酸は炭素数が 14 以上の長鎖脂肪酸が圧倒的に多く、これらは生体内で細胞膜の構成成分として様々な組織で利用されている。一方、量としては少ないが炭素数が 4 以下の短鎖脂肪酸と 6 から 12 までの中鎖脂肪酸については、その代謝されやすい性質から「血中コレステロール濃度を上げる」や「心疾患リスクを上昇させる」など歴史的に悪者扱いされ、その役割についてはこれまで詳しく検討されてこなかった。しかし近年のゲノム科学の進歩に伴い、腸内細菌叢がその宿主のエネルギー調節や免疫機能などに関与し、病態に直接的に関わる報告がなされるなど、その評価が変わってきている。すなわち、腸内細菌により産生される短鎖脂肪酸が糖尿病やメタボリックシンドロームに対して改善効果を有すること [1]、また、主成分が中鎖脂肪酸であるココナッツオイルを摂取することによりアルツハイマー病の諸症状が改善されること [2] など、従来とは正反対の「短鎖および中鎖脂肪酸は体にとって良い」とする報告が集積されてきており、その効果に注目が集まっている。短鎖および中鎖脂肪酸は血液脳関門を通過できることから、直接グリア細胞に作用しうると考えられるがその効果は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経変性疾患の病因をグリア細胞による神経炎症と捉え、その病態変化を短鎖および中鎖脂肪酸が予防・改善しうるかを明らかにすることである。そのため、*in vitro* と *in vivo* 両方の神経炎症モデルを用いた実験系により検討した。*In vitro* 実験系としてリポポリサッカライド (LPS) 誘発性モデルを設定し、培養ミクログリアおよびアストロサイトに対する短鎖および中鎖脂肪酸の効果を検討した。さらに *in vivo* 実験系としてチオアセトアミド (TAA) 誘発肝性脳症モデルラットを作成し、実験的に引き起こされた高アンモニア血症による細胞浮腫が短鎖および中鎖脂肪酸により抑制されうるか否かについて検証した。つまり、脳内の炎症を「食による脂肪酸摂取」によって改善することが可能か否かを検証することが本研究の最終目的である。つまり、中枢細胞に「良い」脂肪酸と「悪い」脂肪酸を分類し、食を介した神経変性疾患の症状改善および治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) アストロサイトとミクログリアの初代培養細胞はそれぞれ胎齢 20 日齢の胎仔と生後 1 日齢の Wistar ラットから調製した。また、一部の実験ではミクログリアの株化細胞である BV-2 細胞を用いた。初代培養細胞は CO₂ インキュベーター内で 3 週間培養後、また BV-2 細胞は 60% から 70% コンフルエントの状態を実験に用いた。

(2) 上記(1)で調製したミクログリアまたは BV-2 細胞にリポポリサッカライド (LPS; 10 ng/ml)、アストロサイトには LPS (1 μg/ml) を添加しグリア細胞を活性化させた。一定時間反応後、培養液中の一酸化窒素 (NO) 産生を測定し、炎症の指標とした。細胞を回収し、生細胞数、活性酸素種 (ROS) 濃度変化を測定した。さらに MAP kinase (MAPKs) タンパク発現変化を western blotting により解析した。ミクログリアおよび BV-2 細胞については食能も評価した。食能は蛍光ビーズ (直径 1 μm) の細胞内への取り込みにより評価した。

さらに、酢酸 (C2)、プロピオン酸 (C3)、酪酸 (C4)、カプロン酸 (C6)、オクタン酸 (C8)、カプリン酸 (C10)、およびラウリン酸 (C12) 存在下で上記項目に対する検討を加えた。

(3) 肝性脳症モデルラットは雄 Wistar ラット (adult) に TAA を 250 mg/kg 体重、3 日間腹腔内投与し、急性肝障害を誘発することにより作出した。ラットへの酢酸の投与はあらかじめ

リセリン三酢酸を経口投与（7.5 g/kg 体重）することにより行った。浮腫の程度の判定は gravity method を用いた。

4. 研究成果

(1) Primary microglia または BV-2 に LPS を添加すると細胞は活性化し、炎症の指標である NO 産生が増加する。この増加に対する短鎖および中鎖脂肪酸の影響を検討したところ、C2 から C12 の同時存在下において NO 産生は有意に抑制された (図 1)。LPS 刺激による ROS 産生においてもこれら脂肪酸による抑制効果は同様に認められた。さらに C4 と C12 においては LPS による MAPKs 活性化および貪食能の亢進も抑制した。この結果から、C2 から C12 の脂肪酸はミクログリアの炎症性変化を抑制すると考えられる。

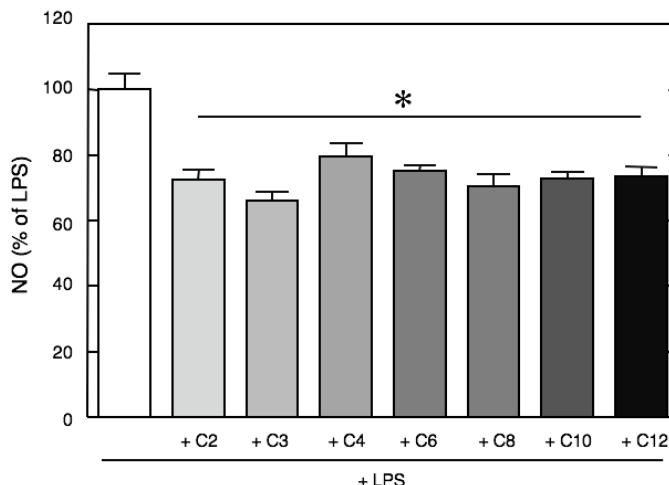


図 1 ミクログリアにおける LPS 誘導性 NO 産生に対する脂肪酸の効果

用いた濃度は以下の通り。LPS (10 ng/ml), C2 (10 mM), C3 (1 mM), C4 (0.5 mM), C6 (1 mM), C8 (1 mM), C10 (0.25 mM), C12 (0.1 mM)。*p < 0.01 vs LPS.

(2) Primary astrocytes を用いて (1) と同様の検討を加えた。LPS 誘導性 NO 産生に対し、C2 は抑制効果を示した。一方、C3 はほとんど影響がなかった。C4 から C12 の脂肪酸は逆に NO 産生を増強させた (図 2)。このようにミクログリアとは異なり、アストロサイトでは炎症性変化に対する脂肪酸の効果は様々であった。

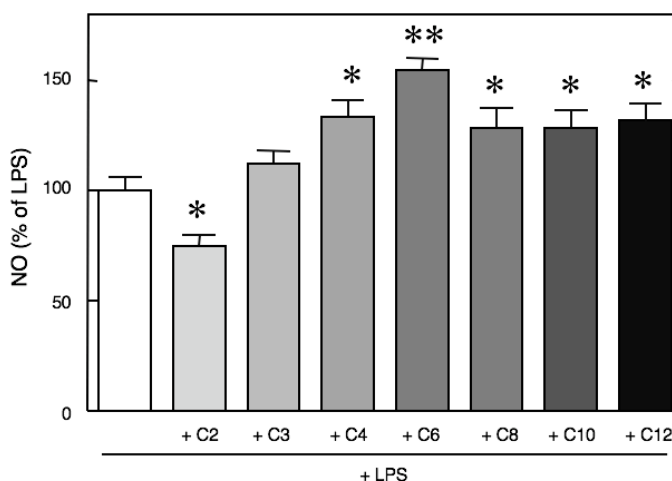


図 2 アストロサイトにおける LPS 誘導性 NO 産生に対する脂肪酸の効果

用いた濃度は以下の通り。LPS (1 mg/ml), C2 (10 mM), C3 (0.5 mM), C4 (0.5 mM), C6 (0.5 mM), C8 (0.5 mM), C10 (0.5 mM), C12 (0.5 mM)。*p < 0.05, **p < 0.01 vs LPS.

(3) TAA を用いて肝性脳症モデルラットを作成し、生じる脳浮腫に対して脂肪酸が抑制効果をもつか検討した。TAA ラット脳の浮腫の程度を gravity method を用いて調べたところ増大が認められた。ラットにあらかじめグリセリン三リン酸を経口投与することにより脳内の C2 濃度を増加させた後、ラットに TAA 投与を施したところ、脳浮腫の程度が軽減した (図 3)。

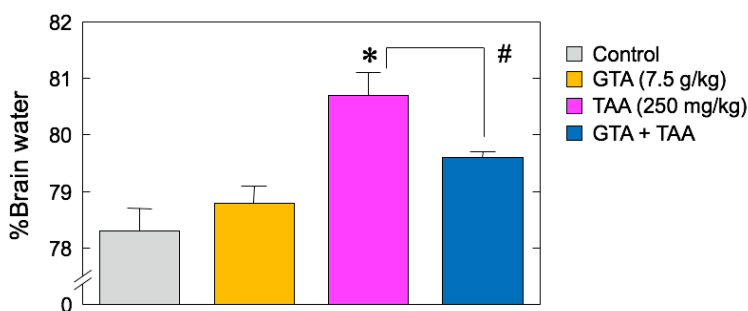


図 3 TAA による脳浮腫に対する酢酸の効果

*p < 0.05 vs control, #p < 0.05 vs TAA.

以上のようにグリア細胞間で炎症性変化に対する脂肪酸の効果が異なることが明らかとなった。どのようなメカニズムでこの差が生じるのかについてはさらなる検討が必要である。

引用文献

[1] den Besten G, Havinga R, Bleeker A, Rao S, Gerding A, van Eunen K, Groen AK, Reijngoud DJ, Bakker BM. The short-chain fatty acid uptake fluxes by mice on a guar gum supplemented diet associate with amelioration of major biomarkers of the metabolic syndrome. PLoS One. 2014 9(9):e107392.

[2] Chatterjee P, Fernando M, Fernando B, Dias CB, Shah T, Silva R, Williams S, Pedrini S, Hillebrandt H, Goozee K, Barin E, Sohrabi HR, Garg M, Cunnane S, Martins RN. Potential of coconut oil and medium chain triglycerides in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* 2020 186:111209.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Minamihata T, Takano K, Nakamura Y, Seto R, Moriyama M.	4. 巻 47
2. 論文標題 Increase in cellular lysophosphatidylserine content exacerbates inflammatory responses in LPS-activated microglia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2602-2616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-021-03425-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamihata T, Moriyama M, Takano K, Nakamura Y.	4. 巻 43
2. 論文標題 Lysophosphatidylinositol, an endogenous ligand for G protein-coupled receptor 55, has anti-inflammatory effects in cultured microglia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 1971-1987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-020-01271-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saheki T, Moriyama M, Funahashi A, Kuroda E.	4. 巻 10
2. 論文標題 AGC2 (Citrin) deficiency-From recognition of the disease till construction of therapeutic procedures.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 E1100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10081100.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Moriyama M, Nishimura Y, Kurebayashi R, Minamihata T, Kawabe K, Takano K Nakamura Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Acetate suppresses lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in primary rat microglia but not in BV-2 microglia cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 253-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1874467213666200420101048.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Minamihata T, Takano K, Moriyama M.
2. 発表標題 Sphingosine kinase 1 inhibition exacerbates neuronal damage in neuron/glia mixed culture via glial inflammatory responses and decreased amyloid beta uptake by microglia.
3. 学会等名 Neuro2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minamihata T, Takano K, Moriyama M, Nakamura Y.
2. 発表標題 Increase in intracellular lysophosphatidylserine content exacerbates inflammatory response by cultured microglia
3. 学会等名 第64回日本神経化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minamihata Tomoki, Moriyama Mitsuaki, Takano Katsura, Nakamura Yoichi
2. 発表標題 Lysophosphatidylinositol suppressed inflammatory responses by cultured microglia
3. 学会等名 第63回日本神経化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------