

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23791005
研究課題名（和文）	ω -3 多価不飽和脂肪酸による核内受容体を介した多発性硬化症の新たな病態制御
研究課題名（英文）	Immunoregulatory roles of omega-3 polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis
研究代表者	
	土居 芳充 (Doi Yoshimitsu)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	20597174

研究成果の概要（和文）：

ω -3 系多価不飽和脂肪酸の一つであるエイコサペンタエン酸（EPA）を、多発性硬化症（MS）の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）に投与することで EAE の発症が抑制される事を明らかにした。EPA は中枢神経への細胞浸潤を減少させて、CD4T 細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制した。さらに核内受容体の PPARs が誘導されている事を明らかにした。本研究は、本邦発の国産薬である超純度 EPA が、難治性自己免疫疾患である MS に対する新薬になる可能性がある事を示したものである。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the possible therapeutic effect of eicosapentaenoic acid (EPA), one of ω -3 polyunsaturated fatty acids, for multiple sclerosis (MS) by applying experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), as a model for MS. The clinical scores and the numbers of CNS-infiltrating cells in the EPA-fed mice were significantly lower than those of the non-EPA mice. Additionally, IFN- γ and IL-17 productions were remarkably inhibited and the expression levels of peroxisome proliferator-activated receptors were significantly enhanced in the CNS-infiltrating CD4T cells. Thus ultra-purified EPA shows promise as a potential new therapeutic agent against MS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

 キーワード：①多発性硬化症 ② ω -3 多価不飽和脂肪酸 ③エイコサペンタエン酸 ④実験的自己免疫性脳脊髄炎 ⑤サイトカイン ⑥核内受容体

1. 研究開始当初の背景

エイコサペンタエン酸（eicosapentaenoic acid 以下 EPA）は、 ω -3 系多価不飽和脂肪酸の一つで、近年本邦で行われた大規模臨床試験（JELIS 試験）において、高い心血管イベント再発抑制効果を示した事で注目を集めている。その作用は、動脈硬化病変の血管内皮細胞やマクロファージのシクロオキシゲナーゼを直接阻害し炎症性エイコサノイドの産生を抑える事や、核内受容体の PPARs を刺激して抗炎症性の M2 マクロファージを誘導する事で、プラークの破綻を防ぎ心血管イベントを抑制するという、抗炎症作用が考えられている。

一方、中枢神経脱髄性の自己免疫疾患である多発性硬化症（multiple sclerosis 以下 MS）は、再発・寛解を繰り返しながら経過する難治性疾患である。労働可能な成人が四肢麻痺になり後遺症を来たす疾患の一つであり、特定疾患の一つにも指定されている。近年、生物製剤の interferon beta-1a, -1b が導入され、再発予防が進められているが、副作用により使用不可能ケースもあり、予防効果も完全ではない。

MS に対する ω -3 系多価不飽和脂肪酸を用いた臨床試験の結果は様々である。その理由の一つとして、過去の ω -3 系多価不飽和脂肪酸を用いた製剤は、別の ω -3 系多価不飽和脂肪酸の DHA や ω -6 系脂肪酸がふんだんに含まれる合剤であった事が予測される。EPA は本邦発の国産薬で、純度は 99%以上にまで精製されている。また、臨床試験において EPA/DH 合剤での心筋梗塞再発抑制効果は示されているが、DHA 単剤による報告は今まで無く、DHA の脂質二重膜安定化作用と EPA の抗炎症作用との違いが最近注目されて来ている。さらに超純度 EPA を MS 患者

や動物モデルに使用し検討された報告もない。そこでこの安全かつ高い抗炎症作用のある超純度 EPA が、多発性硬化症に効果を認めるかどうかを調べる事は、注目に値する。

2. 研究の目的

多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（experimental autoimmune encephalomyelitis 以下 EAE）を用いて、純国産薬の超純度 EPA が、多発性硬化症の再発予防に働く可能性を検討する為に以下の実験を行った。

3. 研究の方法

他の多価不飽和脂肪酸の影響を防ぐために、魚粉抜き飼料、もしくは 5%(w/w) EPA 含有魚粉抜き飼料を与えた C57BL6/J マウス群 (n=4-6) を用いて比較した。EAE の誘導は、MOG35-55 peptide 100 μ g と M. Tuberculosis 1mg を加えた CFA emulsion をマウスに皮下注射し、さらに pertussis toxin 200pg i.p. (d0, d2)にて誘導した。

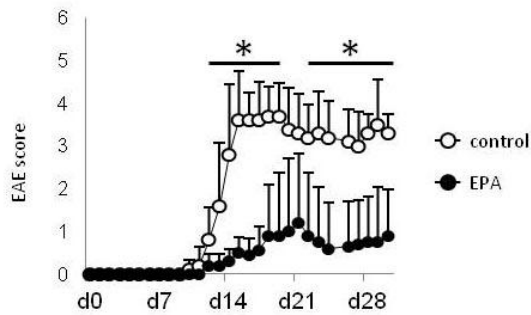
細胞の採取は、EAE が発症後、脾臓、リンパ節、中枢神経から単核球分画を分離し、さらに磁気ビーズ法により CD4T 細胞を分離した。

サイトカインの測定は、分離した細胞の培養上を用いて、ELIASA 法により測定した。さらに採取した細胞から RNA を抽出し、cDNA 合成後に Real Time PCR を用いて、様々なサイトカイン、マスター転写因子、核内受容体 PPARs の測定を行った。

4. 研究成果

(1) EPA による EAE の抑制効果

EAE に対する EPA の抑制効果は、予想以上に強かった (図)。

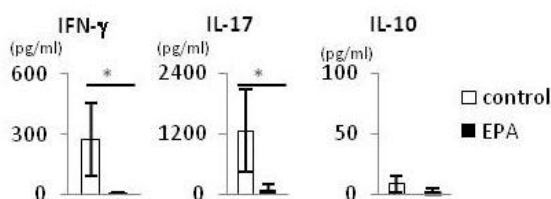


また、実験後の病理組織標本からは、中枢神経浸潤単核球の細胞数が減っている事が分かった。よって、EPAを投与することで病態形成に働く単核球の中枢神経への浸潤が抑制され、それによりEAEの発症が抑えられるという可能性が示唆された。

(2) 中枢神経浸潤 CD4T 細胞の炎症性サイトカイン産生抑制

EAE・MSは中枢神経浸潤 CD4T 細胞が炎症性サイトカインを産生することで惹起されると考えられている。そこで、EAEがピーク発症している17日目のマウスから、中枢神経浸潤 CD4T 細胞を分離し、再刺激を行い、その培養上清中のサイトカインの測定を行った(図)。

その結果、病態形成の中心的な役割を果たす、病原性の中枢神経浸潤 CD4T 細胞から、炎症性サイトカインの産生が抑制される事が分かった。

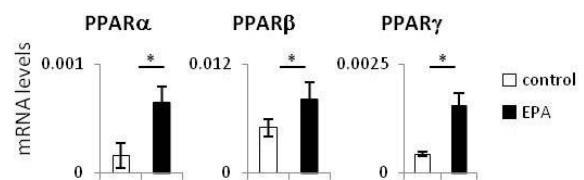


(3) 核内受容体 PPARs の誘導

以上の結果は、EPAを投与することで、EAEは改善し、その作用として、病態形成に関与する単核球(免疫担当細胞)の中枢神経への浸潤が減っている事、また中心的役割を果たす CD4T 細胞の炎症性サイトカインの産生が減っている事が示された。中枢神経浸潤単

核球の減少は、血管内皮・マクロファージなどの炎症性エイコサノイドの産生低下が理由として考えられたが、CD4T細胞の炎症性サイトカインの低下の理由は直接的なものか、間接的なものか不明であった。そこで、同様に CD4T 細胞を採取し、EPAの標的の一つである核内受容体 PPARs を測定した。その結果、PPAR α / β / γ の全てにおいて、EPA投与群で有意に発現が誘導されている事が分かった(図)。

(4) まとめ



以上の研究成果から、EPAをEAEに投与することで、EAEの発症が抑制される事が分かった。その作用機序としては、中枢神経浸潤細胞の数自体が減少する事、一部浸潤しても CD4T 細胞からの炎症性サイトカインの産生が抑えられている事、さらに抗炎症に働く核内受容体 PPARs が中枢神経浸潤 CD4T 細胞に誘導されている事などが明らかになった。

これまで超純度 EPA を使用した、多発性硬化症患者・動物モデルへの検討の報告は無かったが、動物モデルの EAE には強力な抑制効果がある事が分かった。よって、多発性硬化症患者への応用もまた考えるべき時にあるのかもしれない。

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3件)

1) Eicosapentaenoic acid (EPA) induces peroxisome proliferator-activated receptors and ameliorates experimental

autoimmune encephalomyelitis.

Unoda K, Doi Y, Nakajima H, Yamane K, Hosokawa T, Ishida S, Kimura F and Hanafusa T.

J Neuroimmunol. 256,7-12 (2013) (査読あり)

2) Resolution of cranial MRI and SPECT abnormalities in a patient with Wilson's disease following oral zinc monotherapy.

Ishida S, Doi Y, Yamane K, Sugino M, Kimura F, Hanafusa T, Fukui H and Tamai H.

Intern Med. 51,1759-63 (2012) (査読あり)

3) Increased serum matrix metalloproteinase-9 in neuromyelitis optica: implication of disruption of blood-brain barrier.

Hosokawa T, Nakajima H, Doi Y, Sugino M, Kimura F, Hanafusa T and Takahashi T.

J Neuroimmunol. 236, 81-6 (2011) (査読あり)

[学会発表] (計7件)

1) 土居芳充、宇野田喜一、谷裕基、廣瀬昂彦、山根一志、細隆史、石田 志門、中嶋秀人、木村文治、花房俊昭：甲状腺ホルモン受容体 $\beta 1$ を介した多発性硬化症の新規治療戦略 第54回日本神経学会学術大会 2013年6月1日 (東京都)

2) 土居芳充 EAE モデルを用いた新しい治療法の探索：第9回MS/NMOフォーラム 2012年12月9日 (東京都) 【招待講演】

3) Doi Yoshimitsu, Unoda Kiichi, Nakajima Hideto, Tani Hiroki, Hirose Takahiko, Yamane kazushi, Hosokawa takafumi, Ishida Shimon, Kimura Fumiharu, Hanafusa Toshiaki: Thyroid hormone receptor beta-1 (TR β 1) inhibits Foxp3 expression and mediates

experimental autoimmune encephalitis.

第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5日 (兵庫県)

4) 宇野田喜一、土居芳充、谷裕基、廣瀬昂彦、山根一志、細川隆史、石田志門、中嶋秀人、木村文治、花房俊昭：甲状腺ホルモン受容体を介した多発性硬化症の新規治療戦略 第24回日本神経免疫学会学術集会 2012年9月21日 (長野県)

5) 宇野田喜一、土居芳充、谷裕基、廣瀬昂彦、山根一志、細川隆史、石田志門、中嶋秀人、木村文治、花房俊昭： ω -3 多価不飽和脂肪酸による核内受容体を介した多発性硬化症の新たな病態制御 第53回日本神経学会学術大会 2012年5月25日 (東京都)

6) 細川隆史、石田志門、宇野田喜一、山根一志、土居芳充、中嶋秀人、杉野正一、木村文治、花房俊昭：抗 GAD 抗体陽性で亜急性に脳幹・小脳症状が進行した60歳女性例 第95回日本神経学会近畿地方会 2011年12月17日 (京都府)

7) 宇野田喜一、石田志門、山根一志、土居芳充、杉野正一、木村文治、花房俊昭：多発性骨髄炎を伴った Actinomyces 髄膜炎の1例 第16回日本神経感染症学会 2011年11月4-5日 (東京都)

[図書] (計1件)

1) Versatile Orphan Nuclear Receptor NR4A2 as a Promising Molecular Target for Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. Shinji Oki, Benjamin J.E. Raveney, Yoshimitsu Doi and Takashi Yamamura : Chembiomolecular Science: *At the Frontier of Chemistry and Biology.* pp193-200 (2013)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

- 雑誌論文の 1) の J Neuroimmunol. の論文は、当研究費が使用された事を、Acknowledgement に明記しました。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土居 芳充 (Doi Yoshimitsu)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：20597174