

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15452

研究課題名(和文)腸管ミトコンドリアストレス制御による多発性硬化症予防の試み

研究課題名(英文) Attempt to improve multiple sclerosis progression by the control of intestinal mitochondrial oxidative stress

研究代表者

清水 幹人(Shimizu, Mikito)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30817507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食品添加物に大量に含まれるコハク酸の経口投与により、免疫細胞のIL-1 誘導を介して、炎症を惹起し脱髄を進めるTH17細胞と炎症を抑制する制御性T細胞の比を増加することを示した。またこのIL-1 の放出にはミトコンドリアにおける活性酸素種(mitoROS)の増大が関わっていることを確認した。現在はこの免疫システムの変化が中枢神経系の炎症にどのように影響するかを検索するため、human astrocyteやmouse primary astrocyteを利用したin vitroの実験を開始している。また動物実験の結果をより明確にするため、免疫細胞の移入実験を計画している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、多発性硬化症の治療薬は目覚ましい進歩を遂げており、疾患コントロールはかなり改善されているが、重篤な副作用や、高額な医療費などまだまだ問題点も多い。またMRIの発達に症状が非常に軽微な時期から病変を検出することが可能となった一方、治療期間が延長する傾向にあることも、副作用や医療費の問題点を増大させている。今回提唱するような食事の工夫による免疫動態の制御が実現すれば、非常に安価で安全性の高い手段となるため、これらの現状を踏まえ必要性は増してくると思われる。

研究成果の概要(英文)： At first, we revealed that oral administration of succinic acid, which is contained as food additives, increases the ratio of TH17 cells, which induce inflammation and promote demyelination, to regulatory T cells, which suppress inflammation, through IL-1 release from immune cells. And also we demonstrated that the release of IL-1 is associated with an increase of mitochondrial reactive oxygen species (mitoROS) in immune cells.

Now, we are investigating the immune system alteration in the central nervous system through succinate acid administration, using human astrocytes and mouse primary astrocytes as in vitro experiments. And in vivo, we are also planning an immune cell transfer experiment in order to clarify succinate acid effects to immune system.

研究分野：神経免疫

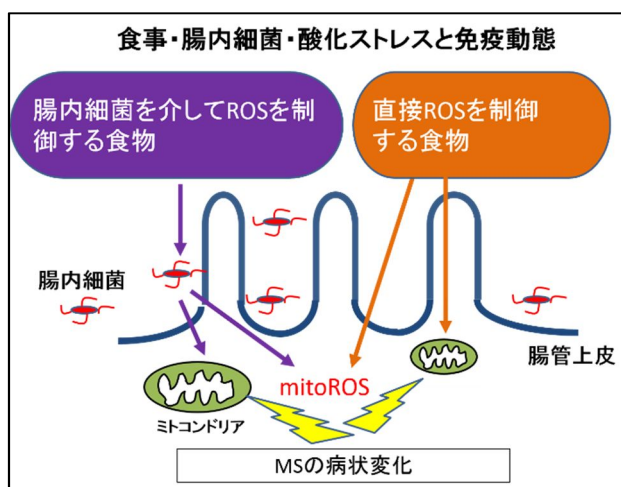
キーワード：多発性硬化症 活性酸素種 酸化ストレス ミトコンドリア 食事療法

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(MS)と食事は密接な関係にあり (N Engl J Med.2015)、従来 MS 発症率が低かった地中海地方や日本において患者数が増加していることも食生活の変化が関わっていると考えられている (Neurology.2004、Clin Neurol.2009)。近年では、食事や腸管細菌叢の乱れにより、中枢神経系の炎症を抑制する制御性 T 細胞(Treg)と炎症性脱髄を促進する TH17 細胞のバランスの破綻することにより MS の病勢が悪化すると考えられている。申請らの研究グループでもこれまでに MS モデル動物(EAE)を用いて腸管免疫の研究を行い、ペプトコッカスや、カンジダケフィールなどが EAE 改善作用を持つことを報告してきた (Ann Clin Transl Neurol.2015,高田ら)。

一方、近年様々な疾患や免疫細胞をはじめとした生態機能の調節に活性酸素種(ROS)がかかわっていることが、科学的にも証明されるようになってきた。例えば、抗酸化食品として有名なカロテンなどはレチノイン酸に腸管で変換されることで、制御性 T 細胞の分化を助けるとされる。また 3 脂肪酸やビタミン D、コーヒーといった多発性硬化症の疾患病勢と関係があるとされる飲食物にも抗酸化作用があり、腸管における酸化ストレスに関与している可能性がある。申請者らは ROS の阻害剤であるエダラボンやフェブキソスタットによる EAE に投与し、ROS の中でもミトコンドリア関連のもの(mitoROS)に注目してその治療効果を報告してきた (PLoS One.2013,Honorat ら、Neurosci Lett.2008,高田ら、PLoSOne.2017(in press),清水・Honorat ら)。これらのように食事と免疫システム、免疫システムと酸化ストレスに関しては今まで多くの先行研究がなされてきたが、これら三者を関連付けて免疫動態を記述する試みは今まであまりされてきていない(下図)

現在、多発性硬化症の治療薬は国内・海外とも現在目覚ましい進歩を遂げており、疾患コントロールもかなり良くなってきているが、進行性多巣性白質脳症(PML)など重篤な副作用を認めたり、医療費が高額となる傾向がある点が問題視されている。また MRI の発達に伴い、初回の脱髄発作である clinical isolated syndrome(CIS) や、画像異常だけで症状を伴わない radiological isolated syndrome(RIS)などと診断される例も増えているが、これら全てが多発性硬化症に進展するわけではなく、医療費や安全性の面でどの程度まで多発性硬化症の治療を導入すべきか定まっていない状況である。食事の工夫により免疫動態を改善し、多発性硬化症の進行抑制したり、CIS や RIS の段階で多発性硬化症の発症を予防することが可能になれば、非常に安価で安全性の高い手段となる可能性が高く、これらの現状を踏まえ今後必要性は増してくると思われる。



2. 研究の目的

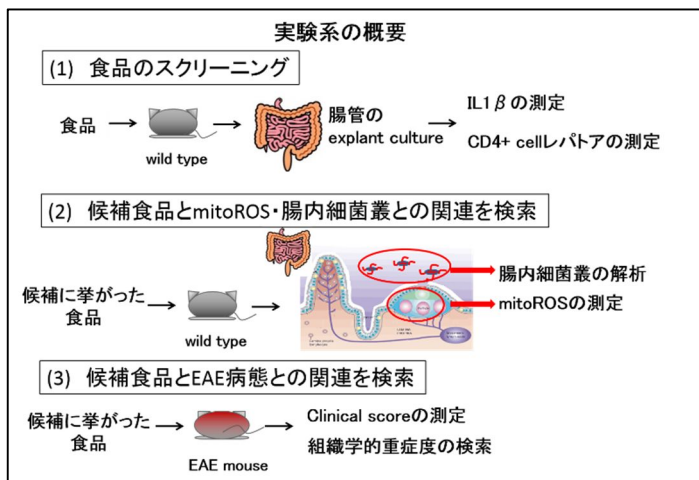
「研究開始当初の背景」で記載した通り、先行研究により、免疫システムと食事の関係、または免疫システムと酸化ストレスの関係が明らかになってきているが、食事と酸化ストレスと免疫系の三者をつなげて考える試みはこれまでほとんどされてこなかった。本研究の目的はこれら三者の関係性を明らかにすることである。当研究室では以前より酸化ストレスの免疫システムへの影響や、食事と腸管免疫の関係に関する研究を行っており、本研究で鍵となる腸管における酸化ストレス、特にに中核となるミトコンドリアにおける活性酸素種(mitoROS)の評価系は確立している。この実験系を主軸にマウスにおける腸管免疫の解析や、次世代シーケンサーを用いた MS 患者便の細菌叢解析や有機酸解析を駆使し、腸管の酸化ストレスと免疫状態の相関を解き明かしていく。また最終的には多発性硬化症の治療や CIS や RIS の多発性硬化症への進展抑制として利用可能な食品を同定し、食事による免疫システムの調節を実現させてゆきたいと考えている。

3. 研究の方法

本研究では食事による酸化ストレスと、T 細胞分化を中心に研究を進める予定である(次ページ上図)

(1) 食品のスクリーニング

様々な食事を与えたマウスの消化管関連リンパ組織中の T 細胞サブセットの変化と、腸管の explant culture による IL-1 を測定する。日本食や地中海食のような魚食や低脂肪食が MS の発症を抑えると考えられるため、高脂肪食の投与、また青魚に多いとされる 3 脂肪酸の投与を与える食品の候補として考えている。また申請者はパン酵母が Th17 を増加させることを見出しており、日本食に特徴的な米食と西欧食で多いパン食との比較も行う。さらに抗酸化作用のあるポリフェノール類も検討を要する。特にポリフェノールは日本食で多く摂取するカテキン（緑茶）、イソフラボン（大豆）、ルチン（ソバ）など、またすでに MS での効果が指摘されているクロロゲン酸（コーヒー）を検討したいと考える。その他ビタミン群も抗酸化作用をもつものが多く、投与を予定している。特にビタミン D はすでに多くの報告で多発性硬化症の制御に役立っている可能性が指摘されている。またビタミン A も腸管での制御性 T 細胞の分化に重要と考えられており、MS 病態との関連が想定される。また食事のほかに酸化ストレス軽減効果を認めるフェブキシostat やグルタチオン、N アセチルシステインなどの投与を行いたいと考えている。



(2) 候補食品と mitoROS・腸内細菌叢との関連を検索
候補食品を投与した際に、酸化ストレスマーカー、特に mitoROS に関連するマーカーの測定を行う。またその際腸内細菌叢の変化も測定する。その他、HIF1 阻害剤を使用することで、食事による酸化ストレスの変化が T 細胞分化へどのように影響するか検討する。

(3) 候補食品と EAE 病態との関連を検索

疾患モデルに対する影響を調べるため、候補食品の EAE モデルへの投与を行う。またその際のマウスの消化管関連リンパ組織中における酸化ストレスマーカーの動態もモニタリングすることで病態解明を目指す。その他、ヒトでの検討として健常人と MS の便検体を用いてコハク酸などの食事成分の測定と、T 細胞サブセットの比較を行い、食事と T 細胞分化の関連を明らかにしてゆきたい。

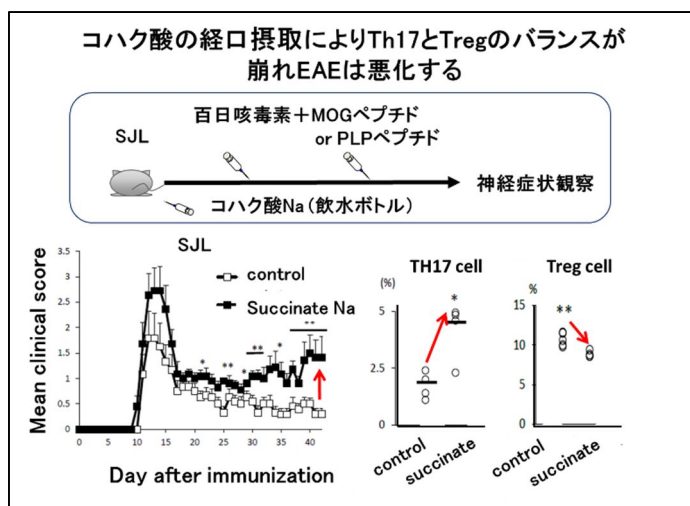
4. 研究成果

まず研究の初期段階で食品添加物に大量に含まれるコハク酸の経口投与により EAE が悪化することを見出した（下図）。コハク酸は免疫細胞の IL-1 誘導を介して TH17/Treg 比を増加させていることが示されており、MS 発症の鍵になっている可能性があること考えられる。またコハク酸投与により免疫細胞の mitoROS の増大が確認されており、酸化ストレスにより免疫細胞のバランス変化していることが示された。

4. 研究成果

現在はこの免疫システムの変化が中枢神経系の炎症にどのように影響するかを検索するため、human astrocyte を利用した、in vitro の実験を開始している。また動物実験の結果をより明確にするため、免疫細胞の移入実験を計画している。

対外的な情報開示としては下記のとおりであった。2018 年度は学会発表を国内において 2 講演、海外において 1 講演行った。2019 年度は学会発表を国内において 2 講演、海外において 1 講演行っており、海外学会である ECTRIMS においてポスターセッションにおける award を受賞した。2020 年度は学会発表を国内において 1 講演おこなった。また神経免疫に関する論文を 1 本 publish した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tada Satoru, Okuno Tatsusada, Shimizu Mikito, Sakai Yoshiki, Sumi-Akamaru Hisae, Kinoshita Makoto, Yamashita Kazuya, Sanda Eri, Choong Chi-Jing, Namba Akiko, Sasaki Tsutomu, Koda Toru, Takata Kazushiro, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki, Nakatsuji Yuji, Mochizuki Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Single injection of sustained-release prostacyclin analog ONO-1301-MS ameliorates hypoxic toxicity in the murine model of amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41771-4	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 Koda Toru, Namba Akiko, Kinoshita Makoto, Nakatsuji Yuji, Sugimoto Tomoyuki, Sakakibara Kaori, Tada Satoru, Shimizu Mikito, Yamashita Kazuya, Takata Kazushiro, Ishikura Teruyuki, Murata Syo, Beppu Shohei, Kumanogoh Atsushi, Mochizuki Hideki, Okuno Tatsusada	4. 巻 17
2. 論文標題 Sema4A is implicated in the acceleration of Th17 cell-mediated neuroinflammation in the effector phase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-020-01757-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tada S, Okuno T, Shimizu M, Sakai Y, Sumi-Akamaru H, Kinoshita M, Yamashita K, Sanda E, Choong CJ, Namba A, Sasaki T, Koda T, Takata K, Miyagawa S, Sawa Y, Nakatsuji Y, Mochizuki H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Single injection of sustained-release prostacyclin analog ONO-1301-MS ameliorates hypoxic toxicity in the murine model of amyotrophic lateral sclerosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41771-4.	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 Samura T, Yoshioka D, Toda K, Sakaniwa R, Shimizu M, Miyagawa S, Yoshikawa Y, Hata H, Saito S, Sakata Y, Sawa Y.	4. 巻 157
2. 論文標題 Risk of stroke early after implantation of a left ventricular assist device.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Cardiovasc Surg.	6. 最初と最後の頁 259-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtcvs.2018.06.031. Epub 2018 Jul 3.	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 Koda T, Namba A, Nakatsuji Y, Niino M, Miyazaki Y, Sugimoto T, Kinoshita M, Takata K, Yamashita K, Shimizu M, Fukazawa T, Kumanogoh A, Mochizuki H, Okuno T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Beneficial effects of fingolimod in MS patients with high serum Sema4A levels.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0193986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0193986.	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 Yamashita K, Kinoshita M, Miyamoto K, Namba A, Shimizu M, Koda T, Sugimoto T, Mori Y, Yoshioka Y, Nakatsuji Y, Kumanogoh A, Kusunoki S, Mochizuki H, Okuno T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA in neuromyelitis optica spectrum disorder.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-018-1162-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mikito Shimizu, Tatsusada Okuno, Makoto Kinoshita, Hisae Sumi, Harutoshi Fujimura, Kazuya Yamashita, Tomoyuki Sugimoto, Shuhei Sakakibara, Kaori Sakakibara, Toru Koda, Satoru Tada, Teruyuki Ishikura, Hisashi Murata, Shohei Beppu, Naoyuki Shiraiishi, Yasuko Sugiyama, Yuji Nakatsuji, Atsushi Kumanogoh & Hideki Mochizuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Mitochondrial DNA enhance innate immune responses in neuromyelitis optica by monocyte recruitment and activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70203-x	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 清水 幹人
2. 発表標題 The analysis of the monocyte role in NMO with patient-derived AQP4 recombinant antibody
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水 幹人
2. 発表標題 患者由来 recombinant 抗AQP4モノクローナル抗体を持ちいた NMO病態における自然免疫経路の解析
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水 幹人
2. 発表標題 Identification of innate immunity activation in the pathogenesis of NMO
3. 学会等名 ECTRIMS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikito Shimizu, Satoru Tada, Tatsusada Okuno, Yoshiki Sakai, Hisae Sumi, Makoto Kinoshita, Kazuya Yamashita, Eri Sanda, Choong Chi-Jing, Akiko Hosokawa-Namba, Tsutomu Sasaki, Toru Koda, Kazushiro Takata, Shigeru Miyagawa, Yoshiki Sawa, Yuji Nakatsuji, Hideki Mochizuki
2. 発表標題 Blood flow modulation therapy by prostacyclin agonist ameliorates ALS mice model
3. 学会等名 神経内科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水幹人, 木下允, 甲田亨, 南波明子, 山下和哉, 石倉照之, 中辻裕司, 熊ノ郷淳, 望月秀樹, 奥野龍禎
2. 発表標題 リコンビナント抗AQP4抗体を用いたNMOの病態解析
3. 学会等名 神経免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikito Shimizu, Kazushiro Takata, Makoto Kinoshita, Teruyuki Ishikura, Toru Koda, Tatsusada Okuno, Yuji Nakatsuji, Hideki Mochizuki
2. 発表標題 Intestinal succinic acid exacerbate experimental autoimmune encephalitis
3. 学会等名 ECTRIMS (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------