

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：37128

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09388

研究課題名(和文) 時系列的免疫細胞と脳血管内皮細胞連関による脳障害機序に 3系脂肪酸が及ぼす影響

研究課題名(英文) The effects of omega-3 fatty acids on the mechanism of brain injury mediated through the combination between temporal immune cells and brain microvascular cells

研究代表者

松井 智浩 (Matsui, Tomohiro)

純真学園大学・検査科学科・准教授

研究者番号：50314828

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)：脳虚血等による脳障害には、末梢性炎症細胞の脳内への浸潤が大きく関わる。その浸潤には、脳微小血管内皮細胞に発現するケモカインやタイトジャンクション蛋白が重要な役割を担う。よって、それらの発現を抑制することにより、脳障害を軽減できる可能性がある。エイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)等の3系脂肪酸には、抗炎症作用や血管保護作用がある。そこで本研究では、それらが脳微小血管内皮細胞のケモカインやタイトジャンクション蛋白発現に及ぼす影響を調べた。その結果、3系脂肪酸は、炎症刺激によるケモカイン発現の増加は抑制したが、タイトジャンクション蛋白発現の低下には影響しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、新生児低酸素性虚血性脳症に対しては脳低温療法が唯一、神経学的予後を改善する有効な治療法であるが、全ての患者に容易に適用されるわけではない。低温に曝すことによる副作用の問題もある。よって、本療法がより有効かつ応用の利く治療法へと確立される必要性や新たな治療法の開発が望まれる。報告者は栄養学的アプローチは安心かつ安全で多くの患者に適用され、新しい治療(介入)戦略として有効なものになると考え、今回3系脂肪酸に着目し研究を行った。得られた成果である3系脂肪酸による脳微小血管内皮細胞のケモカイン発現の抑制は低温による作用と同じであるため、本栄養素を用いた本課題に対する研究の展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：The upregulation of chemokines and the downregulation of tight junction proteins (TJPs) might facilitate the recruitment and infiltration of inflammatory cells into injured brain tissue, leading to enhanced post-ischemic brain inflammation and exacerbated brain injury. Here we examined the effects of omega-3 fatty acids on the expression of chemokines and claudin-5, a major TJP, in brain microvascular endothelial cells activated with proinflammatory cytokine. As a result, omega-3 fatty acids inhibited the increased expression of chemokines, but it did not affect the decreased expression of claudin-5.

研究分野：神経免疫学

キーワード：脳微小血管内皮細胞 ケモカイン ドコサヘキサエン酸 エイコサペンタエン酸 タイトジャンクション蛋白 血液脳関門(BBB) 脳低温療法 新生児低酸素性虚血性脳症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

脳低温療法は、脳障害時に脳温を 32~34 の軽度低温にすることで、二次的ニューロン障害を抑える治療法であり、新生児低酸素性虚血性脳症や心肺停止後蘇生後脳症などに有効である。しかし、その機序は多岐に渡るため、未だ不明な点が多い。報告者は、脳低温療法による脳保護作用の一機序を解明するため、先ずは、脳低酸素・虚血や脳外傷時の早期に活性化され、サイトカインや一酸化窒素(NO)等のニューロン傷害性因子放出を介し脳障害増悪に関与するマイクログリアに着目し、それらの産生に低温・高温が及ぼす影響を細胞培養系(in vitro)で調べた。その結果、本療法による脳保護作用には、マイクログリアの早期でのニューロン傷害的炎症性因子(TNF- α 、IL-6 等)抑制と後期でのニューロン傷害的炎症性因子(NO)およびニューロン傷害的炎症性因子(IL-10)抑制という時系列的(時間依存的)抑制機構が関与する可能性、また、脳損傷後の高温による脳障害増悪には、逆にそれらの増加が関与する可能性、を主に報告してきた。

報告者が提唱したその“脳障害の保護や増悪における温度および時間依存的機構”の存在は、最近の脳虚血障害の動物実験と臨床研究において支持された。そこで報告者自身も、脳低温療法の適応となる新生児低酸素性虚血性(Hypoxia-Ischemia: HI)脳症のモデル(HI 脳障害マウス)からマイクログリアを単離・培養し検討した結果、低温は脳障害由来マイクログリアの早期での TNF- α および後期での NO/IL-10 産生を低下させることを見出した。つまり、これまでの細胞培養系での結果が臨床的にも関連することを示した。

その後、“時系列的(時間依存的)”という概念を発展させるため、T 細胞の炎症的関与に着目した。つまり T 細胞は、脳損傷早期でのマイクログリア活性化から遅れて脳内に浸潤し、IL-17 やプロテアーゼのグランザイム B(GrB)等の放出を介し持続的な脳障害増悪に関与するため検討を行った。その結果、T 細胞のニューロン傷害的 IL-17 と GrB 産生は、低温下で低値、高温下で高値となる温度依存性変化を示し、脳低温療法はそれらの産生を低下させ、遅発性にもニューロン死抑制効果をもたらすと考えられた。

更に近年は、脳内への炎症細胞浸潤に重要な役割を担う脳微小血管内皮細胞の接着因子とケモカイン発現を“時系列的”免疫細胞との関連で調べ、低温は、マイクログリア由来 TNF- α 誘導や T 細胞由来 IL-17 誘導の接着因子(ICAM-1、VCAM-1)とケモカイン(MIP-2、IP-10、MCP-1)発現を低下させることを報告した。よって、脳低温療法はこれらの発現も低下させ、脳内への炎症細胞浸潤抑制効果をもたらすと考えられた。

報告者はこのように、脳低温療法の脳保護作用機構を、新しく、時系列的免疫細胞(マイクログリア-T 細胞)および脳微小血管内皮細胞連関から示し、HI 脳障害モデルも用いて、臨床的にも一定の関連付けを行ってきた。現在、新生児 HI 脳症に対しては、脳低温療法が唯一、神経学的予後を改善する有効な治療法であるが、全ての患者に容易に適用されるわけではない。低温に曝すことによる副作用の問題もある。よって、本療法がより有効かつ応用の利く治療法へと確立される必要性や、新たな治療法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、このような時系列的炎症反応と脳微小血管内皮細胞の役割をターゲットにした新しい治療(介入)戦略確立のための新知見提供を目指す。報告者は、栄養学的アプローチは、安心かつ安全で、多くの患者に適用され、新しい治療(介入)戦略として有効なものになるのではないかと考えた。中でも、エイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)等の 3 系多価不飽和脂肪酸(以下、3 系脂肪酸)には、抗炎症作用や血管保護作用があることが知られており着目する。研究期間内には以下のことを明らかにし、脳低温療法の改良や新規治療法への開発に向け、栄養学的観点から有益な情報を提供する。

(1)これまで示してきた時系列的免疫細胞および脳微小血管内皮細胞連関に基づいた脳低温療法の脳保護作用機序、つまり、時系列的免疫細胞由来因子により活性化された脳微小血管内皮細胞のケモカイン産生の抑制を、3 系脂肪酸も示すのか否かを明らかにする。

(2)更には、脳障害時の血液脳関門(BBB)では、脳微小血管内皮細胞同士を結び付けているタイトジャンクション(TJ)蛋白の消失や低下が問題となるため、その発現に 3 系脂肪酸がどのような影響を及ぼすのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)脳微小血管内皮細胞のケモカイン産生に 3 系脂肪酸が及ぼす影響

脳微小血管内皮細胞(bEnd.3 細胞)に、EPA または DHA、あるいは 6 系多価不飽和脂肪酸(以下、6 系脂肪酸)のリノール酸(LA)を添加し 24 時間培養した。その後、これらの脂肪酸存在下において、マイクログリア由来 TNF- α または T 細胞由来 IL-17 で刺激し、更に 24 時間培養した。培養液中のケモカイン(IP-10、MCP-1)濃度は ELISA により測定した。

(2)脳微小血管内皮細胞の TJ 蛋白発現に 3 系脂肪酸が及ぼす影響

コンフルエント状態の脳微小血管内皮細胞(bEnd.3 細胞)に、EPA または DHA を添加し 24 時間

培養した。その後、これらの脂肪酸存在下において、マイクログリア由来 TNF- または T 細胞由来 IL-17 で刺激し、更に 24 時間培養した。細胞膜上の TJ 蛋白(Claudin-5)発現は免疫染色により測定した。

4. 研究成果

(1) 脳微小血管内皮細胞のケモカイン産生に 3系脂肪酸が及ぼす影響

EPA と DHA は、TNF- 活性化脳微小血管内皮細胞の IP-10 産生および IL-17 活性化脳微小血管内皮細胞の MCP-1 産生どちらに対しても抑制作用を示した。一方、LA は TNF- 活性化脳微小血管内皮細胞の IP-10 産生のみ抑制作用を示した。ケモカインは白血球の遊走に重要な役割を担い、特に IP-10 は T 細胞の走化性に、MCP-1 は単球の走化性に関与している。DHA と EPA は IP-10 と MCP-1 の産生を抑制したため T 細胞と単球の遊走抑制に繋がること、一方、LA は IP-10 の産生を抑制したため T 細胞の遊走抑制のみに繋がることから考えられた。よって、3系脂肪酸は 6系脂肪酸に比べ白血球(炎症細胞)の脳内浸潤抑制作用が強く、脳障害をより防ぐ作用を示す可能性がある。

(2) 脳微小血管内皮細胞の TJ 蛋白発現に 3系脂肪酸が及ぼす影響

TNF- は脳微小血管内皮細胞の Claudin-5 発現を低下させたが、IL-17 はその発現に影響を与えなかった。EPA と DHA は、定常状態の Claudin-5 発現を増加させたが、TNF- 活性化脳微小血管内皮細胞の Claudin-5 発現低下には影響を与えなかった。Claudin-5 は TJ 蛋白の中で中心的役割を担い、その低下により BBB 透過性が増加する。よって、3系脂肪酸は定常状態の BBB 機能を強固にすることはできるが、脳障害時の Claudin-5 発現低下によるその透過性増加を軽減させることはできないと考えられた。

以上をまとめると、3系脂肪酸は、脳障害時、脳微小血管内皮細胞の TJ 蛋白の低下を軽減させることはできないが、そのケモカイン産生を低下させることで脳内への炎症細胞浸潤抑制効果をもたらす、脳障害増悪を軽減させる作用があると考えられた。

この 3系脂肪酸による脳微小血管内皮細胞のケモカイン産生の抑制は、これまで報告者が示してきた低温による作用と同じであるため、今後、脳低温療法の改良や新規治療法への開発に向け、本栄養素を用いた研究の展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsui Tomohiro, Yoshida Yusuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Reduced perforin release from T cells as a mechanism underlying hypothermia mediated neuroprotection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 57 ~ 64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cen3.12550	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 Matsui Tomohiro, Mochiduki Yuji, Yoshida Yusuke, Nitta Takenori	4. 巻 14
2. 論文標題 Concentration dependent effects of proinflammatory cytokines on barrier function and tight junction protein expression in brain microvascular endothelial cells and the hypothermic and hyperthermic effects on tight junction protein expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 52 ~ 60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cen3.12730	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------