

氏 名	宇 野 田 喜 一
(ふりがな)	(うのだ きいち)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成26年1月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Eicosapentaenoic acid (EPA) induces peroxisome proliferator-activated receptors and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis (エイコサペンタエン酸はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体を誘導し、実験的自己免疫性脳脊髄炎を寛解させる)
論文審査委員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 宮 武 伸 一 教授 廣 瀬 善 信

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《諸 言》

Fish oil に豊富に含まれるエイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid : EPA) は必須脂肪酸の一つで、心血管疾患や脳梗塞などの動脈硬化性疾患に対する臨床的有用性が確認されているが、従来の脂質低下作用に加えて抗炎症作用も有することが示されている。

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) は、中枢神経系 (central nervous system : CNS) に複数の炎症性脱髄病変を生じる慢性疾患であり、その病態として、ミエリンを抗原と認識する自己反応性CD4+T細胞がTh17に分化し、CNSに浸潤してオリゴデンドログリアを傷害する機序が想定されている。今回、申請者は、MSの動物モデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) を用い、MSにお

けるEPAのperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) を介した抗炎症作用とEPAによる治療の可能性を検討した。

《方 法》

雌の C57BL/6 (B6) マウスに myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35-55 ペプチド 100 μ g を皮下投与して感作し、感作当日と 2 日後に Pertussis toxin (PT) 200ng を腹腔内投与して EAE を誘導した。EAE 発症における EPA の投与効果を検討するため、fish oil free の餌に 5% (w/w) の EPA を混入した餌を与えた EPA 投与群と fish oil free の餌のみを与えた control 群とに分け、以下の内容について比較検討した。

(1) EAE 誘導 7 日前から 14 日間 EPA を混じた餌を与え、次項目について control 群と比較検討した。①臨床徴候として EAE スコア (1:尾の半弛緩、2:尾の完全弛緩、3:部分的な後肢麻痺、4:後肢麻痺、5:前肢と後肢の麻痺、6:死亡) を用いて毎日評価し、経過を比較した。②EAE 誘導後 30 日目の脊髄をパラフィン包埋し、HE (hematoxylin-eosin) および LFB (luxol fast blue) で染色し、組織学的に検討した。③EAE 誘導後 16 日目の B6 マウスのリンパ節と脾臓から各々リンパ球を分離し、48 時間培養した後の上清の IFN- γ 、IL-17 と IL-10 の濃度を ELISA で測定し比較した。さらに、これらのマウスの脳と脊髄から CNS 浸潤性 CD4+T 細胞を分離し、抗 CD3 抗体を添加し、48 時間刺激後、同様に上清の IFN- γ 、IL-17 と IL-10 の濃度を ELISA で測定し比較した。

(2) 次の検討として、EAE 誘導後 7 日目から 14 日間 EPA を混じた餌を与え、control 群と比較した。①EAE スコアの経過を比較した。②EAE 誘導後 17 日目に B6 マウスの脳と脊髄から CD4+T 細胞を分離し、CNS 浸潤性 CD4+T 細胞の PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ の発現量を RT-PCR で測定した。③さらに、MOG35-55 ペプチドの感作のみで PT の腹腔内投与を行なわなかったマウスを用いて、感作後 14 日目に脾臓 CD4+T 細胞を分離し、PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 、Foxp3、ROR γ t、T-bet、IL-17、IFN- γ の各々の発現量を RT-PCR で測定し、両群で比較検討した。

統計学的解析では各群の比較には Mann-Whitney U もしくは Student T 検定を用い、P

値<0.05を有意とみなした。

《結 果》

(1) EAE誘導7日前よりEPA投与を開始した検討では、①EPA投与群はcontrol群に比較してEAEスコアが有意に減少し、臨床徴候の軽減が示され、②脊髄の組織学的所見では、リンパ球浸潤が軽度で脱髄および炎症性病巣の軽減傾向が観察された。以上より、EPAの投与がCNS病巣の炎症を軽減させてEAEの発症と重症度を抑制する可能性が示された。③EAE誘導後16日目のB6マウスのリンパ節と脾臓由来のリンパ球のIFN- γ 、IL-17とIL-10の産生能はEPA投与群とcontrol群の間に有意差は認められなかったが、脳と脊髄から分離したCNS浸潤性CD4+T細胞のIFN- γ とIL-17の産生能はcontrol群に比べてEPA投与群で有意に抑制されていた。この結果は、EPAのCNSにおけるサイトカインレベルでの免疫応答が末梢組織のものと一致しないことを示しており、CNSへの浸潤する免疫細胞の選択性と特殊性が示された。

(2) EAE誘導後7日目からEPA投与を開始した検討では、①EAE誘導前からEPAを投与した前検討と同様に、control群と比較してEPA投与群でEAEスコアが有意に減少し、EPAをEAE誘導後から投与しても臨床徴候が軽減されることが示された。②EAE誘導後17日目に脳と脊髄から分離したCNS浸潤性CD4+T細胞におけるPPARsの発現は、control群に比べてEPA投与群で有意に上昇していた。この結果から、EPAが主にCNSに浸潤するCD4+T細胞に対して選択的にPPARsを誘導し、IFN- γ とIL-17の産生能を抑制する可能性が考えられた。③PTを腹腔内投与せずMOG35-55ペプチドで感作後14日目のB6マウスの脾臓から分離したCD4+T細胞ではPPAR α 、PPAR β 、T-bet、IFN- γ の発現に両群間で有意差を認めなかったが、PPAR γ 、Foxp3、ROR γ t、さらにIL-17の発現がcontrol群に比べEPA投与群で上昇が認められた。

《考 察》

本研究では、EPA投与によりEAEの重症度が有意に抑制されることが示され、このEPA

投与群マウスでは、CNS 浸潤 CD4+T 細胞の炎症性サイトカイン産生能が抑制されていた。一方、末梢リンパ組織（脾臓やリンパ節）の CD4+T 細胞のサイトカイン産生能には有意な変化が認められず、CNS 浸潤性 CD4+T 細胞と末梢リンパ組織ではリンパ球組成の差異や EPA の組織移行性の違いが存在すると思われる。

また、EPA 投与群マウスの CNS 浸潤性 CD4+T 細胞ではすべての PPARs 発現が有意に上昇し、脾臓由来 CD4+T 細胞では PPAR γ のみ発現が上昇した。EPA が PPAR γ に最も親和性が高いこと、さらに、EPA の組織移行性の違いを反映している可能性が考えられる。

以上より、EPA による EAE の重症度の抑制メカニズムとして、PPAR γ を介した Treg 細胞の誘導による免疫制御作用が考えられるが、末梢リンパ組織においては Treg 細胞の一部が IL-17 産生性 Foxp3Treg 細胞へ分化する可能性も考えられる。

《結 論》

EPA は CNS において CD4+T 細胞における PPARs を誘導して炎症性サイトカイン産生を抑制し、MS の発症と重症度を抑制する可能性が示された。

論文審査結果の要旨

エイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid : EPA) は、動脈硬化性疾患に対する臨床的有用性が示され、その機序の一つとして抗炎症作用が示唆されている。申請者は多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) を用い、MS における EPA の peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) を介した抗炎症作用および治療の可能性を検討している。

申請者は雌の C57BL/6 (B6) マウスに myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35-55 ペプチドの感作と Pertussis toxin (PT) で EAE を誘導し、臨床徴候、脊髄の組織学的分析、脳と脊髄および脾臓由来 CD4+T 細胞の PPAR 発現、脾臓の ROR γ t、T-bet、IL-17、IFN- γ の発現、培養した CNS (central nervous system) 浸潤性 CD4+ T 細胞の IFN- γ 、IL-17 と IL-10 産生能を測定し、EPA 投与の効果と機序について検討している。

その結果、EPA 投与群では対照群と比較して、臨床徴候は軽減し、脊髄切片では脱髄病変の縮小と浸潤する単核細胞減少を認め、EPA 投与が CNS への免疫細胞の浸潤を抑制することを示している。また、IFN- γ と IL-17 の産生能は、リンパ節と脾臓由来のリンパ球では両群に有意差を認めないが、CNS 浸潤性 CD4+ T 細胞では EPA 投与群で抑制され、CNS への選択的な浸潤制御が存在することが示されている。

さらに、EAE 誘導後から EPA を投与しても臨床徴候は同様に軽減したが、EPA 投与群マウスの CNS 浸潤 CD4+T 細胞では全ての PPARs が誘導されるのに対し、脾臓由来 CD4+T 細胞では PPAR γ のみ弱く誘導され、EPA は末梢リンパ組織の CD4+T 細胞よりも CNS 浸潤性 CD4+T 細胞において PPARs を誘導することが示されている。一方、B6 マウスに MOG35-55 ペプチドの感作のみ行った実験では、EPA 投与によって脾臓由来 CD4+T 細胞での PPAR γ 、IL-17、Foxp3、ROR γ t の発現が増加している。以上から、EPA の免疫制御メカニズムとして、PPAR γ を介した Treg 細胞の誘導が考えられるが、この EAE の系では、Treg 細胞が predominant に働いて EAE の臨床徴候を抑制する機序以外に、IL-17 産生性 Foxp3Treg 細胞への分化誘導も生じる可能性を考察している。

本研究の結果は、MS に対する EPA 治療の可能性を実験マウスによって示したものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Journal of Neuroimmunology 256(1-2): 7-13, 2013