

84. 代謝-感染性炎症モデル構築および EPA 病態抑制効果検討

石山 詩織

山梨大学 大学院総合研究部 生命環境学域 地域食物科学科 食品栄養学研究部門

Key words : MEM マウス, EPA, サイトカインストーム, 脂肪肝炎

緒言

COVID-19 感染時において、基礎疾患患者は重症化リスクや致死率が高いことが報告されており（厚生労働省、Petrilli M C., BMJ. 2020）、その大きな原因の一つは過剰な炎症反応であると考えられている。基礎疾患の中でも糖尿病に着目している我々の研究室では、2 型糖尿病患者は血中の炎症性サイトカインの発現が増大していることを明らかにしている [1]。ヒト単球細胞を用いた先行研究では、高血糖状態で培養すると単球の血管内皮細胞への接着や組織への遊走が促進されること [2] や、線維化を伴う肝疾患（脂肪肝炎）や腎疾患（糸球体硬化症）発症時には、臓器の好中球やマクロファージの浸潤が観察されている [3]。これらから、糖尿病などで観察される臓器障害は、① 高血糖による血中の好中球や単球などの自然免疫系の白血球の活性化及び IL-1B や TNF- α などの炎症性サイトカインを分泌 [4]、② 活性化単球は血管内皮内へ移行し、マクロファージへと分化、③ 分化したマクロファージは各臓器へ浸潤し、糖尿病合併症（脂肪肝炎、腎糸球体硬化症等）を促進、という経路で誘導されると考えられる。しかし、基礎疾患と感染による過剰な炎症反応のメカニズムやその予防・治療研究は、ヒトと同様の経路で 2 型糖尿病を発症する動物が開発されていないため、未だ不明である。

我々は、胚環境操作と生後の高脂肪食負荷により 2 型糖尿病を発症する新規モデル（以下 MEM マウス；岸上、望月、若山：特許第 7169509 号 [5]）は、生後の高脂肪食摂取により炎症性サイトカインを高発現し、2 型糖尿病および炎症性合併症（脂肪肝炎、腎症）を発症し、これらの病態は大麦によって改善可能であることを示してきた [6~8]。本研究は、上記の 2 型糖尿病モデルマウスを用いて、以下のように、2 型糖尿病発症時の感染症重症化メカニズム、および食品因子 EPA の投与が重症化を抑制しうるかを明らかにする。

1. 炎症性サイトカインのシグナル経路の遮断が糖尿病 - 感染性過剰炎症反応による合併症の重症化を抑制するか：臓器（肝臓、腎臓）への好中球浸潤や肝・腎線維化誘導の活性化マクロファージ（Ly6C/Ly6G マクロファージ）活性化好中球を中心に臓器障害の分子機構に迫る。

2. EPA の長期摂取が上記 1 の経路を遮断し、サイトカイン過剰分泌による感染症の重症化を抑制するか：本研究は、コロナ禍において、COVID-19 罹患時に、過剰に慢性的な炎症反応が生じ生活習慣病が重症化するメカニズムの解明を胚環境操作-新規糖尿病自然発症動物モデルである MEM マウス [5] を用いて、その分子機構の解明を行うものである。加えて、プロスタグランジン E2 やロイコトリエン経路等の抑制効果が期待される EPA の摂取により、炎症性サイトカインの過剰分泌や好中球・マクロファージの浸潤が抑制され病態悪化が抑制される機構を明らかにするものである。

方法

1. 糖尿病-感染性サイトカインストームモデルマウスの作製および評価

胚発生初期である 2 細胞期の ICR マウス胚を採卵し、 α MEM 培地（対照：KSOM 培地）へ 48 時間体外培養した後に仮親 ICR マウスの子宮に戻し産仔マウスに 3~4 ヶ月高脂肪食を与えて 2 型糖尿病の自然発症モデル MEM マウスを作成した。このモデルマウスに炎症惹起物質リポ多糖（LPS：グラム陰性菌の細胞外膜の菌体内

毒素)を腹腔内投与(1.25 mg/kg BW)し、投与後6、24、48時間にて尾静脈および断頭採血および、48時間後には臓器を採取した。

【評価項目】1. サイトカインストーム：LPS投与後6~48時間の末梢血白血球および肝臓、腎臓における炎症性サイトカイン(IL-1 β 、TNF- α 等)および炎症関連遺伝子発現をqRT-PCRにて測定。2. 臓器障害：LPS投与48時間後の臓器(肝臓、腎臓)の線維化を含めた病態の進行をAZAN、PAS等の染色で病理評価。3. 免疫応答：LPS投与48時間後の肝臓および末梢血における、マクロファージ/好中球マーカーLy6G/Cの浸潤をフローサイトメトリーで評価。

2. 糖尿病-感染性サイトカインストームモデルマウスへのEPA投与による臓器障害抑制効果の評価

上記方法1.のように胚操作により作製したMEMマウスに、EPA群には5%アラビアゴム溶液に1,000 mg/kg BWのEPAを加えた溶液、対照KSOMマウスおよびMEMマウス対照群には5%アラビアゴム溶液を毎日経口投与した。その後、LPSを1.と同濃度で腹腔内投与し、1.と同様にサンプルを採取した。また、1.と同様の評価項目で検証した。

結果および考察

1. 2型糖尿病の自然発症モデルMEMマウスへのLPS投与によるサイトカインストームモデルの検討

MEMマウスへLPSを投与すると、LPSを投与した対照KSOMマウスと比較して、眼球異常や下痢などの病変が劇症であり、死亡率が高く、致死性が高かった。また、MEMマウスへのLPS投与は、LPSを投与した対照KSOMマウスと比較して、血中IL1 β やMCP1などの炎症性サイトカインの遺伝子発現の増大が観察された(図1)。

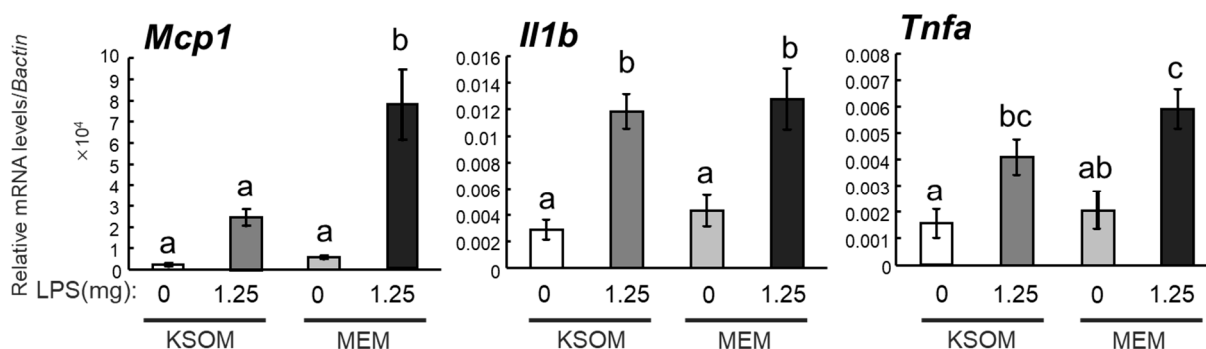


図1. MEMマウスへのLPS投与による末梢血における炎症関連遺伝子発現

胚環境操作により産まれた産仔に離乳後高脂肪食を与えて作製したモデルMEMマウスへ低濃度LPSを投与して作製したサイトカインストームモデルにおける末梢血白血球の炎症性サイトカイン遺伝子発現。データは平均値±標準誤差で示し、two-way ANOVA、Tukey-Kramer検定を用いた統計処理により比較した。異なる文字でグループ間の有意差を表す($P < 0.05$)。交互作用はMcp1: $P < 0.001$ 、Il1b: $P = 0.81$ 、Tnfa: $P = 0.27$ であった。KSOM: 対照培地であるKSOM培地にて体外培養し離乳後高脂肪食を与えて作製した対照マウス、LPS: リポ多糖、MEM: α MEM培地にて体外培養し離乳後高脂肪食を与えて作製した2型自然発症モデルマウス。

臓器障害においては、肝臓のAZAN染色および腎臓のPAS染色により、肝臓の線維化面積および腎臓細動脈硬化病変率を観察したところ、対照マウスと比較して、LPS非投与のMEMマウスで高まっていた肝線維化(図2)や硝子化様病変率は、LPS投与によってさらに増大することが確認され、肝障害や腎障害の悪化が観察された。したがって、臓器障害を伴ってサイトカインストームを発症する動物モデルになることを確認した。

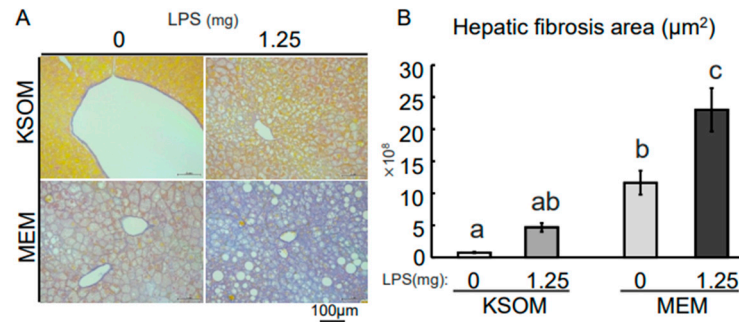


図 2. MEM マウスへの LPS 投与による肝臓における線維化

胚環境操作により産まれた産仔に離乳後高脂肪食を与えて作製したモデル MEM マウスへ低濃度 LPS を投与して作製したサイトカインストームモデルにおける肝臓の線維化面積を AZAN 染色によって評価した。

A) 肝臓切片を AZAN 染色した。青色が線維化部分を示す。スケールバー：100 µm。

B) データは平均値±標準誤差で示し、two-way ANOVA、Tukey-Kramer 検定を用いた統計処理により比較した。異なる文字でグループ間の有意差を表す ($P < 0.05$)。交互作用は $P = 0.03$ であった。KSOM：対照培地である KSOM 培地にて体外培養し離乳後高脂肪食を与えて作製した対照マウス、LPS：リポ多糖、MEM：αMEM 培地にて体外培養し離乳後高脂肪食を与えて作製した 2 型自然発症モデルマウス。

さらに、肝臓においては、線維化を誘導する Ly6C^{hi}/Ly6G^{hi} マクロファージの浸潤率が、LPS を投与していない対照 KSOM マウスおよび LPS を投与していない MEM マウスと比較して増大し、LPS を投与した対照 KSOM マウスよりも高い割合 (1.9 ± 0.5 vs. $1.5 \pm 0.2\%$) を示した (図 3)。脾臓においても、Ly6C^{hi}/Ly6G^{hi} マクロファージの浸潤率が、LPS を投与していない対照 KSOM マウスおよび LPS を投与していない MEM マウスと比較して増大し、LPS を投与した対照 KSOM マウスよりも高い割合 (11.2 ± 2.6 vs. $8.9 \pm 1.4\%$) を示した。

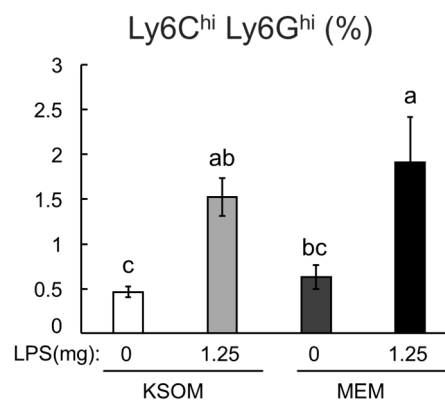


図 3. MEM マウスへの LPS 投与による肝臓における免疫応答

胚環境操作により産まれた産仔に離乳後高脂肪食を与えて作製したモデル MEM マウスへ低濃度 LPS を投与して作製したサイトカインストームモデルにおける肝臓の Ly6C^{hi}/Ly6G^{hi} の割合。データは平均値±標準誤差で示し、Tukey-Kramer 検定を用いた統計処理により比較した。交互作用は $P = 0.69$ であった。異なる文字でグループ間の有意差を表す ($P < 0.05$)。KSOM：対照培地である KSOM 培地にて体外培養し離乳後高脂肪食を与えて作製した対照マウス、LPS：リポ多糖、MEM：αMEM 培地にて体外培養し離乳後高脂肪食を与えて作製した 2 型自然発症モデルマウス。

これらの結果から、胚環境操作および出生後の高脂肪食投与により産出された 2 型糖尿病の自然発症モデル MEM マウスに低濃度 LPS を投与すると、血中炎症性サイトカイン発現が上昇するサイトカインストームモデルになることが示され、さらに、臓器障害につながる Ly6C^{hi}/Ly6G^{hi} マクロファージは供給源である脾臓における割合に比例して、肝臓への浸潤が高まっていたことが明らかとなった。病態として肝線維化が進展していたことから、サイトカインストームを介した肝臓の臓器障害には Ly6C^{hi}/Ly6G^{hi} マクロファージ浸潤が関連している可能性が示唆された。

2. サイトカインストームモデル MEM マウスへの EPA 前投与によるサイトカインストーム抑制効果の検討

LPS 投与後 48 時間において、EPA 投与の MEM マウスでは、眼球異常や下痢が回復していた。また、LPS 投与後 48 時間では、MEM マウスへの EPA 投与による末梢血での *s100a10* 遺伝子発現が低下していたことから、EPA を炎症惹起前 (LPS 投与前) に 7 日間投与すると、炎症が惹起された際における過剰な炎症反応が抑制されることが示された。さらに、MEM マウスへの EPA 投与により、肝臓での *Il1b*、*Il18*、*s100a10* の遺伝子発現の低下 (図 4)、*Caspase*、*s100a4*、*s100a8* 遺伝子発現の低下傾向が観察された。また、LPS 投与後 48 時間における病態と炎症関連遺伝子発現によるスコア化では、MEM マウスへの EPA 前投与は EPA 非投与群より約 1.9 倍少なく、KSOM 対照マウスの LPS 投与群とほぼ同等まで下がった。加えて、LPS 投与後 48 時間では、MEM マウスへの EPA 投与により肝臓での ROS 産生遺伝子 *Nox4*、*p22phox* 発現は低下し、ROS 除去遺伝子 *Mpo*、*Cat* 発現が増大することが観察されたことから、EPA の前投与は肝臓における炎症反応および酸化ストレス反応の軽減を介して病態を回復させている可能性が示唆された。

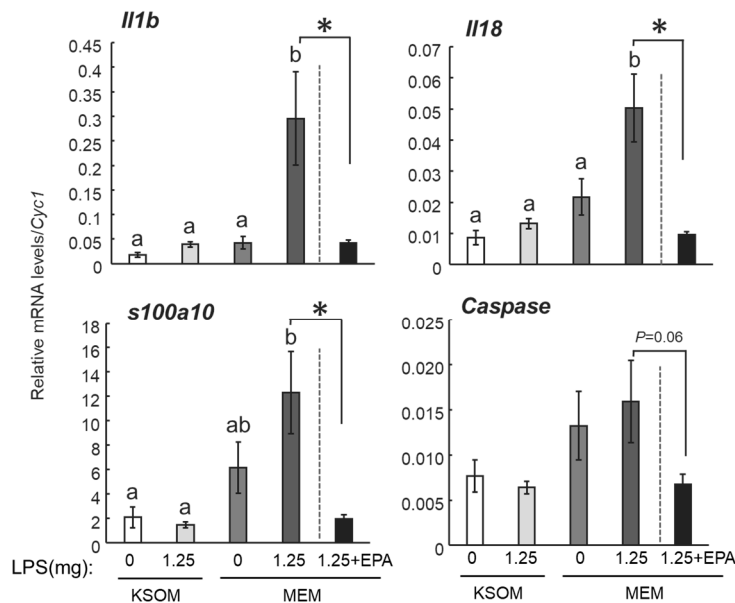


図 4. MEM マウスへの EPA 投与による肝臓における炎症関連遺伝子発現

胚環境操作により産まれた産仔に離乳後高脂肪食を与えて作製したモデル MEM マウスへ EPA を 1 週間経口投与した後に低濃度 LPS を投与したマウスの肝臓における炎症関連遺伝子発現。データは平均値±標準偏差で示し、Tukey-Kramer 検定および Student's *t*-test (LPS 投与 MEM マウスにおける EPA 非投与と EPA 投与群間) を用いた統計処理により比較した。交互作用は *Il1b*: $P=0.02$ 、*Il18*: $P=0.06$ 、*s100a10*: $P=0.10$ 、*Caspase*: $P=0.49$ であった。異なる文字でグループ間および*マークは有意差を表す ($P<0.05$)。KSOM: 対照培地である KSOM 培地にて体外培養し離乳後高脂肪食を与えて作製した対照マウス、LPS: リポ多糖、MEM: α MEM 培地にて体外培養し離乳後高脂肪食を与えて作製した 2 型自然発症モデルマウス。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、山梨大学大学院総合研究部食物栄養科学部門研究室の望月和樹先生、胚環境研究室の岸上哲士先生、医学部微生物講座の葛西宏威先生です。本研究を遂行するにあたり、多大なご支援・ご助言をいただきました共同研究者の皆様に深く御礼申し上げます。また、助成していただきました公益財団法人上原記念生命科学財団の皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Osonoi T, Saito M, Mochizuki K, Fukaya N, Muramatsu T, Inoue S, Fuchigami M, Goda T. The α -glucosidase inhibitor miglitol decreases glucose fluctuations and inflammatory cytokine gene expression in peripheral leukocytes of Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2010 Dec;59(12):1816-22. Epub 2010 Jul 29. PMID: 20667563 DOI: 10.1016/j.metabol.2010.06.006.
- 2) Nandy D, Janardhanan R, Mukhopadhyay D, Basu A. Effect of hyperglycemia on human monocyte activation. *J Investig Med*. 2011 Apr;59(4):661-7. PMID: 21307779 DOI: 10.2310/JIM.0b013e31820ee432.
- 3) de Lira Silva NS, Borges BC, da Silva AA, de Castilhos P, Teixeira TL, Teixeira SC, Dos Santos MA, Servato JPS, Justino AB, Caixeta DC, Tomiosso TC, Espindola FS, da Silva CV. The Deleterious Impact of Interleukin 9 to Hepatorenal Physiology. *Inflammation*. 2019 Aug;42(4):1360-1369. PMID: 30887397 DOI: 10.1007/s10753-019-00997-0.
- 4) Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):860-7. PMID: 17167474 DOI: 10.1038/nature05485.
- 5) University of Yamanashi, Kishigami S, Mochizuki K, Wakayama T. The Method for Producing Diabetic Animal Model and the Diabetic Animal Model., P2020-31551A. 2020-03-05. Patent(Japanese).
- 6) Ishiyama S, Kimura M, Umihira N, Matsumoto S, Takahashi A, Nakagawa T, Wakayama T, Kishigami S, Mochizuki K. Mice derived from in vitro α MEM-cultured preimplantation embryos exhibit postprandial hyperglycemia and higher inflammatory gene expression in peripheral leukocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2021 Apr 24;85(5):1215-1226. PMID: 33587104 DOI: 10.1093/bbb/zbab023.
- 7) Ishiyama S, Kimura M, Umihira N, Matsumoto S, Takahashi A, Nakagawa T, Wakayama T, Kishigami S, Mochizuki K. Consumption of barley ameliorates the diabetic steatohepatitis and reduces the high transforming growth factor β expression in mice grown in α -minimum essential medium in vitro as embryos. *Biochem Biophys Rep*. 2021 May 30;27:101029. eCollection 2021 Sep. PMID: 34136664 DOI: 10.1016/j.bbrep.2021.101029.
- 8) Ishiyama S, Kimura M, Nakagawa T, Fujimoto Y, Uchimura K, Kishigami S, Mochizuki K. Development of the Diabetic Kidney Disease Mouse Model Culturing Embryos in α -Minimum Essential Medium In Vitro, and Feeding Barley Diet Attenuated the Pathology. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Nov 2;12:746838. eCollection 2021. PMID: 34867790 DOI: 10.3389/fendo.2021.746838.