

学位論文（博士）

Dendritic Cells Mediate the Anti-inflammatory Action of
Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in
Experimental Autoimmune Uveitis

（樹状細胞による、実験的自己免疫性ぶどう膜炎におけるオメガ-3 長鎖多価不飽和脂肪酸の抗炎症作用についての研究）

氏名 内 翔平

所属 山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学系専攻 眼科学講座

令和3年12月

目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	5
4. 方法	5
1) 方法	5
2) 解析	8
5. 結果	8
6. 考察	14
7. 結語	16
8. 謝辞	16
9. 参考文献	16

1. 要旨

オメガ 3 長鎖多価不飽和脂肪酸(ω -3)は海産魚や魚油に含まれる必須脂肪酸で、抗炎症効果を有することから非感染性ぶどう膜炎の有効な治療になる可能性がある。多くのぶどう膜炎でみられる獲得免疫による炎症反応は、樹状細胞 (DC)、マクロファージ、および B リンパ球を含む抗原提示細胞(APC)による抗原提示から開始され、炎症のトリガーとして重要である。これまでに我々は ω -3 長鎖多価不飽和脂肪酸 (LCPUFA) が、実験的自己免疫性ぶどう膜炎モデル (EAU) の眼炎症を抑制することを示した。今回、 ω -3 による EAU の抗炎症効果に対する APC の関与を検討し、その作用機構について解析した。

C57BL/6 マウスに等カロリーに調整した ω -3 もしくは ω -6 を含有した餌で給餌し、安楽死後に回収した脾臓細胞をマイトマイシン C 処理して APC を調整した。これらを EAU 誘導したマウスから単離した CD4 陽性 T 細胞と共培養し、種々の炎症性サイトカインの発現量および 3H-チミジン取り込み量を指標とした増殖能を評価した。次に ω -3 群の APC を DC、マクロファージ、B 細胞を含む残りの細胞群 (B 細胞他) に分離し、 ω -3 の炎症作用を担当する細胞を探索した。続いて、 ω -3 で賦活化した DC による抗炎症効果を検討するため、 ω -3 群の DC を単離し、EAU を誘導したマウスに Adoptive transfer(養子細胞移植)し、臨床および組織学的スコアを評価した。最後に ω -3 が DC に直接作用して抗炎症効果を発揮するかどうかを検討した。C57BL/6 由来 DC と BALB/c 由来 CD4 陽性 T 細胞を混合培養して混合リンパ球反応 MLR(mixed lymphocyte reaction)を誘導した培養系に、代表的な ω -3 脂肪酸である DHA および EPA を投与し、T 細胞増殖能を評価した。

ω -3 群の APC は、 ω -6 群に比較して IFN- γ 、IL-17 の発現量および T 細胞増殖能を有意に低下した。その抗炎症効果は APC から単離したマクロファージや B 細胞他ではみられず、DC のみで保存された。さらに、 ω -3 群の DC を Adoptive transfer した EAU マウスでは、炎症スコアが有意に低下した。DHA・EPA で賦活化した DC は MLR による T 細胞増殖能を有意に抑制した。

以上より、 ω -3 の経口摂取による EAU の眼炎症抑制効果は、APC、特に DC を介在して発揮されることが示された。

2. 研究の背景

ぶどう膜炎は眼内炎症性疾患の総称であり、若年者から高齢者まで幅広く罹患し、疾患原因によっては生産年齢まで発症する。難治性ぶどう膜炎患者の炎症発作は、網膜と視神経に不可逆的障害をもたらし、視力予後不良につながる可能性がある。ぶどう膜炎の炎症発作には、腫瘍壊死因子(TNF)- α やインターロイキン(IL)-6などの炎症性サイトカインの過剰産生が関連していることがわかっている¹⁾。ぶどう膜炎は感染性ぶどう膜炎と非感染性ぶどう膜炎があり、統計上その多くが非感染性ぶどう膜炎である。非感染性ぶどう膜炎は自己の過剰免疫反応が病態に関与しており、全身性自己免疫性疾患であるサルコイドーシス、Vogt-小柳-原田病、ベーチェット病などが知られている^{2,3)}。

非感染性ぶどう膜炎の主な治療法は、コルチコステロイドの局所または全身投与である。しかし、長期コルチコステロイド治療は多数の副作用・合併症の原因となり、眼局所ではステロイド緑内障、ステロイド白内障、全身では糖尿病、感染症、精神障害、高血圧、中心性肥満、および骨粗鬆症など多岐にわたる。近年、ぶどう膜炎の治療として、免疫抑制剤やTNF遮断薬が適応取得し導入開始されているが、これらは必ずしもステロイドほど急性炎症に効果的ではなく、また高価であり、副作用もステロイドほど多数ではないが存在する。今後も非感染性ぶどう膜炎の患者のための新しい安全で効果的かつ、できれば安価な治療法が必要である。

獲得免疫は、感染や腫瘍に対する防御に不可欠だが、過剰な免疫反応は自己免疫疾患を引き起こす可能性も伴っている。樹状細胞(DC)、マクロファージ、およびBリンパ球を含む抗原提示細胞(APC)は、二次リンパ器官のナイーブヘルパーT細胞(Th0)およびキラーT細胞に外来抗原を提示し、それによって獲得免疫応答が開始される。実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)モデルにおいても、APCを介してTh0を刺激することでTh1細胞およびTh17細胞応答が主体となって炎症が惹起される⁴⁾。いっぽうでAPCは、共刺激分子の非存在下においてはT細胞アナジの誘導、または自己免疫疾患における制御性T細胞(Treg)への分化を誘導し免疫寛容を促進させ免疫抑制効果を持つこともできる。このためAPCへの作用は、ぶどう膜炎ならびに多発性硬化症、視神経脊髄炎、関節リウマチ、クローン病などの他の炎症性または自己免疫疾患の治療のための治療の可能性を持っている⁵⁾。

天然由来のサプリメントには、薬剤と類似の効果がありながら、副作用が少ないものが存在し、さまざまな病態の治療にアプローチできる可能性がある。ドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)などのオメガ3長鎖多価不飽和脂肪酸(以下 ω -3)は、膜リン脂質の成分であり、細胞内シグナル伝達、および細胞間相互作用に影響を与えることが知られている。主に海産魚や魚油に含まれる必須脂肪酸であり、栄養補助食品としても利用できすでに市場で広く販売されている。 ω -3には、抗炎症効果^{6,7)}及び血管新生抑制効果^{8,9,10)}があり、動物モデルや臨床でも関節リウマチ発症からの予防効果がある^{11,12)}。 ω -3が含まれる魚や魚油においても、関節リウマチの疾患活動性と疼痛抑制効果が示されており^{13,14)}、 ω -3が心臓病や癌などの慢性疾患の発症の危険を低下できる可能性があることも報告されている^{15,16,17)}。

ω -3の抗炎症作用は、APCに対しても存在することが示されており、DCおよびマクロファージへの影響を介して直接的・間接的にT細胞の機能を抑制することが報告されている^{18,19)}。我々はこれまでに ω -3の食事摂取が、EAUモデルにおいてもTh1およびTh17細胞の

機能を阻害して眼炎症を抑制することを報告した⁷⁾。これは、 ω -3 の投与がヒトぶどう膜炎患者においても炎症の改善に有効である可能性を示唆している。我々は今回、EAU における ω -3 の抗炎症作用において、特に APC に対する役割を調べたので報告する。

3. 目的

本研究では、 ω -3 の経口摂取による、EAU モデルにおける APC への眼炎症抑制効果を、magnetic activated cell sorting: MACS を用いたうえで、リンパ球共培養試験を用いて *in vitro* で検討した。また、 ω -3 を経口摂取したマウスから MACS で DC を単離し、EAU マウスに adoptive transfer することで、EAU の眼炎症スコアを *in vivo* で検討した。

4. 方法

1) 方法

動物と飼料

6~8 週齢、雌の C57BL/6 および Balb/c マウス(千代田開発、東京都)から購入し、ケージ内で最大 5 匹飼育した。温度は 22~24°C、相対湿度は 50%~70%で、8:00~20:00 までの 12 時間明期、20:00~8:00 までの 12 時間暗期のサイクルで飼育した。動物の状態は少なくとも 1 日 1 回監視され、処理時は頸椎脱臼により sacrifice を行った。マウスは、ARVO (眼科学研究協会) の眼科学研究における動物の使用に関する声明に従って管理され、この研究は山口大学の動物管理使用委員会によって承認された。 ω -3 飼料については、1%DHA と 1%EPA を含むロトリガ粒状カプセルを武田薬品工業(東京都)から入手し、ひまわり油から調整した ω -6 飼料と同数のカロリーに置き換えてオリエンタル酵母工業(東京都)に特注で作成した。

磁気細胞分離装置 Magnetic-activated cell sorting: MACS システム(Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を用いて、マクロファージ、樹状細胞、CD4 陽性 T 細胞を分離した。MACS およびフローサイトメトリー用の CD3、CD19、CD11c、および F4/80 に対する抗体は、Abcam (Cambridge, MA) から入手した。EAU のためのヒト網膜抗原(Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein: IRBP)はスクラム(東京都)から、結核菌 H37Ra 6 mg/ml を含む完全フロイントアジュバントは Difco (Detroit, MI) から入手した。APC の増殖能を失活させるマイトマイシン C は、協和発酵キリン株式会社(東京都)から入手した。EPA(シス-5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸、 \geq 99%) および DHA (シス-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸、 \geq 98%) は Sigma-Aldrich (St.Louis, MO) のものを使用した。細胞増殖能アッセイに用いるトリチウムチミジンは日本ラジオアイソトープ協会 (東京都、日本) から入手した。

リンパ球共培養アッセイに用いる APC の準備

C57BL/6 マウスには、 ω -3LCPUFA (ω -3 群) または ω -6LCPUFA (ω -6 群) へ食餌変更した固形飼料を 2 週間、脂肪酸の酸化を防ぐために毎日新鮮なものへ交換しながら給餌した。2 週間後にマウスを sacrifice し、撮子と剪刀を用いて脾臓を摘出した。リン酸緩衝生理食塩水 PBS 下にスライドグラスで粉碎し、得られた細胞懸濁液中の赤血球を溶解させた。残りの脾細胞をマイトマイシン C (50 μ g/ml) とともに 37°C で 20 分間インキュベートした後、2%ペニシリン-ストレプトマイシンと 10%ウシ胎児血清を添加した RPMI1640 培地で 3 回洗浄し、得られた APC 細胞をリンパ球培養に使用した。また実験によっては MACS キット

を使用して以下に記す通りに単離した。①最初にマクロファージを単離するために F4 / 80 に対する抗体結合マイクロビーズを用いたポジティブセレクションで回収、②次に DC を単離するために CD11c に対する抗体と mPDCA-1 に対する抗体結合マイクロビーズを用いたポジティブセレクションで回収した。③B 細胞を含む残りの細胞も収集し、それぞれを単離した APC としてリンパ球共培養アッセイに使用した。

EAU モデルと CD4 + T 細胞の分離

C57BL/6 マウスでの EAU の誘導は、既報を参考に実施した⁷⁾。マウスの足底と鼠径部にそれぞれ IRBP(1-20) 50 μ g を皮下注射し、結核死菌を含む完全フロイントアジュバントを 100 μ g 腹腔内注射することで EAU を惹起した。14 日後(アッセイによっては 21 日後)にマウスを sacrifice し、撮子および剪刀を用いて頸部リンパ節、腋窩リンパ節、上腕リンパ節、鼠径リンパ節を摘出した。抗体結合マイクロビーズを用いた MACS によるネガティブセレクションによって、CD4 + T 細胞を分離し、リンパ球共培養試験に使用した。

APC と CD4 + T 細胞とのリンパ球共培養アッセイ

上記によってそれぞれ回収した APC と CD4 + T 細胞を 96well プレート上に、50 μ l RPMI 1640 内にそれぞれ 3×10^5 の個数で散布した(DC、マクロファージ、B 細胞を含む残りの細胞に単離したアッセイについては APC を 3×10^4 の個数で散布した)。これに IRBP の再刺激として 10 μ g/ml の hIRBP (1-20) を加え、37 $^{\circ}$ C で 48 時間共培養した。培養後、細胞については下記のトリチウムチミジン増殖アッセイへ、培養上清については回収して-80 $^{\circ}$ C で保存し、サイトカインの ELISA に使用した。

In vitro での混合リンパ球反応試験

上記のリンパ球共培養アッセイは EAU を介した T リンパ球で行ったが、より普遍的なリンパ球アッセイとして混合リンパ球反応 (mixed lymphoid reaction: MLR) も施行した。EAU マウスで行ったアッセイ同様に、ナイーブ Balb/c マウスのリンパ節から CD4 + T 細胞を MACS で回収し、96well プレート上に 100 μ l RPMI 1640 内に 3×10^5 個散布した。いっぽうで、2 週間の ω -3 または ω -6 に食餌変更した C57BL/6 マウスの脾臓から、マイトマイシン C 処理し MACS で単離した DC、マクロファージ、B 細胞を含む残りの細胞を RPMI 1640 100 μ l 内に 3×10^4 個散布し 48 時間共培養した。培養後の細胞は T 細胞の増殖能測定のためにトリチウムチミジン増殖アッセイへ、培養上清はサイトカインのアッセイのために-80 $^{\circ}$ C で保存した。

また別アッセイとして、 ω -6 群 C57BL/6 マウスからマイトマイシン C 処理後に回収した DC (3×10^4 /well) を、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した 50 μ M の DHA または EPA と 48 時間インキュベートし ω -3 を作用させた。次に培養上清を廃棄し、付着した DC を、Balb/c マウスから分離された CD4 + T 細胞 (6×10^5 /well) を含む MLR でさらに 72 時間培養し、T 細胞増殖を再度測定した。

培養 T 細胞の増殖のアッセイ

T 細胞の増殖能はトリチウムチミジン取り込みアッセイで測定した。APC との共培養から回収した T 細胞を、96 ウェルプレートのウェル内で 1 μ Ci の 3 H-thymidine (5 Ci / mmol) とと

もに 12 時間インキュベートした。次いで、細胞をガラス繊維フィルターに移してシンチレーション分光法によってチミジン取り込みを測定し、増殖能を評価した。

培養上清の炎症性サイトカイン測定

培養上清中の炎症性サイトカインであるインターフェロン(IFN)- γ および IL-17 の濃度は、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) キット (R&D Systems、Minneapolis, MN) で測定した。

DC の養子細胞移植を伴う EAU モデル

ω -3 を食餌させたマウス脾臓から DC を単離し、EAU マウスに Adoptive transfer(養子細胞移植)することで、 ω -3 を作用させた DC による抗炎症効果について EAU の炎症スコアによって評価した。 ω -3 または ω -6 を添加した食餌を 14 日間与えた C57BL/6 マウスの脾細胞から MACS で DC を単離し、DC (2.5×10^6) を、EAU を惹起させて 7 日目の EAU マウスに腹腔内注射した。

EAU の臨床スコアリング

EAU の臨床スコア評価は、疾患誘発後 7、14、17、23、および 28 日目に行った。ケタミン (90mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) 混合物の腹腔内注射によりマウスを麻酔し、間接眼底検査による検査のために、0.5%トロピカミド・0.5%塩酸フェニレフリン配合点眼液の点眼により瞳孔を拡張させた。EAU の臨床スコアは、直接眼底検査および眼底写真から網膜専門医により、両群盲検のうえで 0 から 5 までの基準でスコアリングを行った (0: 炎症所見なし、1: 限局性血管炎または 5 か所未満の軟性白斑、2: 網膜 1/2 領域以下の線状血管炎もしくは軟性白斑、3: 網膜の 1/2 領域以上の線状血管炎もしくは軟性白斑、4: 網膜出血、重度の血管炎または軟性白斑)。得られた臨床スコアを ω -3 群と ω -6 群で比較した。

EAU の組織学的スコアリング

EAU の組織学的評価は既報の如く実施した⁷⁾。EAU の誘導から 17 日後 (DC の adoptive transfer から 10 日後) にマウスを sacrifice し、眼球を取り出して TB 固定液で固定し²⁰⁾、乳頭-視神経面にパラフィン包埋切片 (厚さ 5 μ m) を作製した。切片をヘマトキシリン-エオジンで染色し、顕微鏡で観察することで EAU を 0 から 3 までの基準でスコアリングを行った (0: 網膜構造正常で異常所見なし、1: ぶどう膜・硝子体・網膜への軽度の浸潤、ならびに網膜のひだ、血管炎、および 1 つの小さな肉芽腫の存在、2: ぶどう膜・硝子体・網膜への中程度の浸潤、ならびに網膜のひだ、血管炎、限局性の浅い網膜剥離、小さな肉芽腫、および限局性の光受容体細胞の損傷、3: ぶどう膜、硝子体、網膜への中等度から重度の浸潤、大きな剥離を伴う広範な網膜の折り畳み、網膜下血管新生、中程度以上の光受容体細胞損傷、および中型の肉芽腫性病変の存在)。得られた組織学的スコアを ω -3 群と ω -6 群で比較した。

DC の養子移入後の EAU マウスの T 細胞からのサイトカイン放出のアッセイ

EAU 免疫の 17 日後 (DC 移植の 10 日後) に、MACS によって EAU モデルマウスから単離された CD4 + T 細胞(96 ウェルプレートで 3×10^5 /well)をナイーブマウスの APC とともに 200 μ l の RPMI1640 で 24 時間培養した。次に、培養上清中のサイトカインの濃度を、Bio-Plex Pro

Mouse Cytokine 23-PlexPanel および Bio-Plex Manager (Bio-Rad、Hercules、CA) を使用して測定した。

DC 移植後 EAU マウスの T 細胞における免疫チェックポイント分子発現のアッセイ

EAU 免疫の 17 日後 (DC 移植の 10 日後) に、CD4 + T 細胞を MACS により 2×10^7 細胞単離し、緩衝液中で ELISA キット (Abcam) を使用して Programmed death receptor-1(PD-1)および細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (CTLA-4) の測定を行い、 ω -3 群と ω -6 群で比較した。

研究の承認

本研究における動物実験は山口大学大学院医学系研究科の動物倫理委員会の承認を得た。また、すべての動物実験は山口大学医学部動物実験指針を順守して施行した。

2) 解析

定量的データは、平均±SD または平均±SEM として表され、Windows 用の Prism バージョン 6 (GraphPad Software、CA, San Diego) を使用して分析した。EAU スコアは、ノンパラメトリックな Mann-Whitney U 検定を使用してグループ間で比較した。サイトカイン濃度と細胞増殖データは、Sidak の多重比較検定、または Tukey-Kramer 多重比較検定で統計処理した。P<0.05 の値が統計的に有意であると考察した。

5. 結果

ω -3 を食餌したマウス由来の APC は *in vitro* で Th1 および Th17 細胞の炎症を抑制した

EAU における ω -3 の食餌摂取による抗炎症作用メカニズムを調査するため、 ω -3 またはコントロールとして ω -6 の食餌を 14 日間与えたマウスの脾臓から APC を分離し、細胞をマイトマイシン C で処理して、DNA 合成と細胞分裂を阻害した(図 1A)。その後、EAU マウスから免疫 17 日後に単離した CD4 + T 細胞と共培養し、hIRBP (1-20) の存在下で再刺激した。 ω -6 を食餌したマウス由来の APC 存在下と比較して、 ω -3 を食餌したマウス由来の APC 存在下では、T 細胞の増殖能 (図 1B)、上清中の Th1 関連サイトカインである IFN- γ (図 1C)、および Th17 関連サイトカインである IL-17(図 1C)のいずれにおいても有意に抑制された。

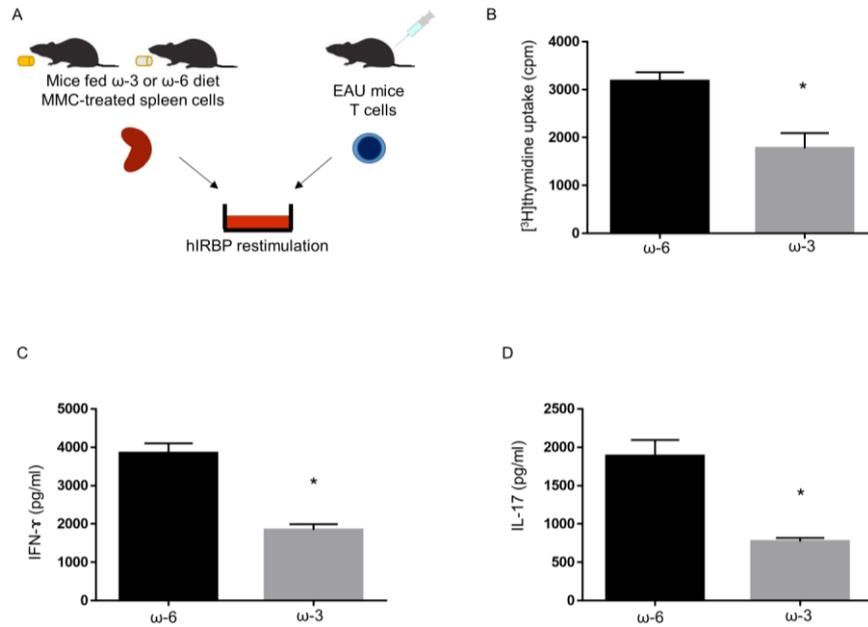


図 1.EAU マウスの CD4 + T 細胞と、 ω -3 または ω -6 を食餌したマウス由来の APC を共培養させたときの T 細胞増殖と IFN- γ および IL-17 産生。

(A) 実験シエマ。マイトマイシン C で処理した脾臓細胞 (3×10^5) を、 ω -3 ($n = 5$) または ω -6 ($n = 5$) の食餌を 14 日間を与えられたマウスから分離した。EAU 免疫 17 日目のマウス ($n = 5$) のリンパ節から単離した CD4+ T 細胞 (3×10^5) とともに、hIRBP(1-20) ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) の存在下で 48 時間共培養した。(B) 次に、T 細胞の増殖を 3H トリチウムチミジンの取り込みで測定した。(C、D) 共培養上清中の IFN- γ (C) および IL-17 (D) の濃度を ELISA で測定した。平均値 \pm 標準誤差 ($N = 3$)。* $P < 0.05$: ω -6 群と比較 (Man-Whitney U 検定)。

ω -3 を食餌したマウス由来の APC による Th1/Th17 関連の炎症抑制における DC の役割

次に、 ω -3 を食餌したマウスの APC のうち、どの細胞が EAU マウスの T 細胞増殖やサイトカイン産生抑制に関与しているかを調べた。 ω -3 または ω -6 を食餌したマウスのマイトマイシン C 処理した脾臓細胞を、MACS によって DC、マクロファージ、およびその他の細胞に分離した(図 2A)。 ω -3 食餌したマウスの DC は、T 細胞増殖(図 2B)、および IFN- γ (図 2C)と IL-17(図 2D)の産生を ω -6 食餌したマウスに比較して有意に阻害した。対照的に、これらのアッセイでは、マクロファージまたは B 細胞を含む他の脾臓細胞においては ω -3 と ω -6 群間に有意差は見られなかった。また、 ω -3 の食餌摂取が、脾臓の DC (CD11c+)、マクロファージ (F4/80+)、T 細胞 (CD3+)、および B 細胞 (CD19+) の細胞組成に影響を与えるかどうかを判断するために、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの発現を調べた。これらの細胞型の割合は、 ω -3 を食餌したマウスの脾臓と ω -6 を食餌したマウスの脾臓の間で有意差がみられなかった (S1 図)。これらの結果は、 ω -3 食餌摂取が特に DC に対して細胞数に影響を与えることなく、*in vitro* で Th1 および Th17 細胞によって媒介される炎症を機能的に抑制することが示唆された。

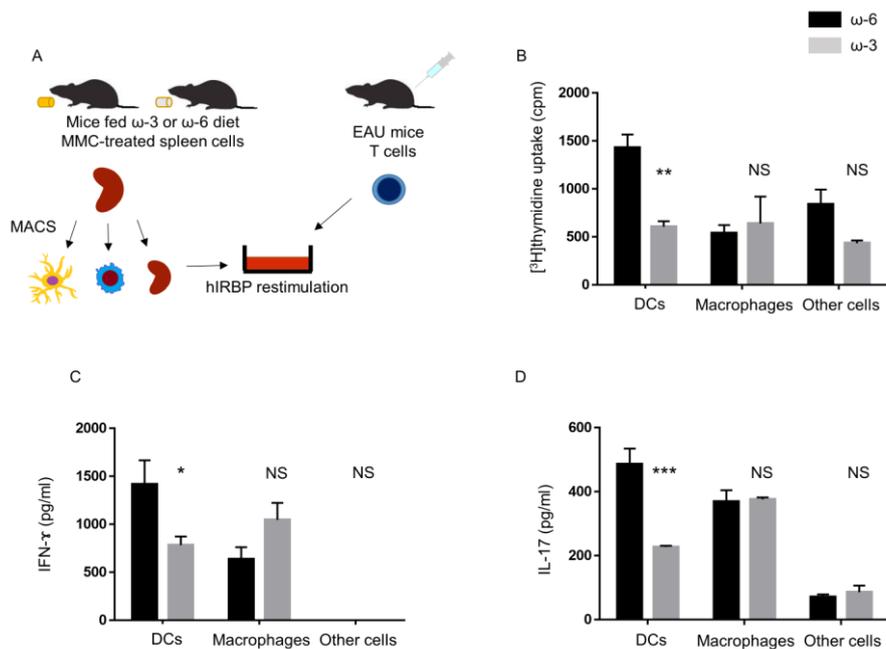


図 2.ω-3 または ω-6 を食餌したマウス由来の APC を分離し、EAU マウスの CD4 + T 細胞と共培養したときの T 細胞増殖と IFN-γ および IL-17 産生。

(A) 実験シエーマ。ω-3(n=5)またはω-6(n=5)を食餌したマウスより脾臓細胞を採取してマイトマイシン C 処理し、MACS によって DC、マクロファージ、および B 細胞を含むその他の脾臓細胞に分離した。各細胞画分 (3×10⁴ 細胞) を hIRBP (1-20) (10 μg/ml) の存在下で EAU マウス(n=5)から単離した CD4+ T 細胞 (3×10⁵) と 48 時間共培養した。

(B) (B) 次に、T 細胞の増殖を 3H トリチウムチミジンの取り込みで測定した。(C、D) 共培養上清中の IFN-γ (C) および IL-17 (D) の濃度を ELISA で測定した。平均値±標準誤差(N=3)。* P<0.05、** P<0.01、*** P<0.001、NS 有意差なし：ω-6 群と比較 (Sidak の多重比較検定)。

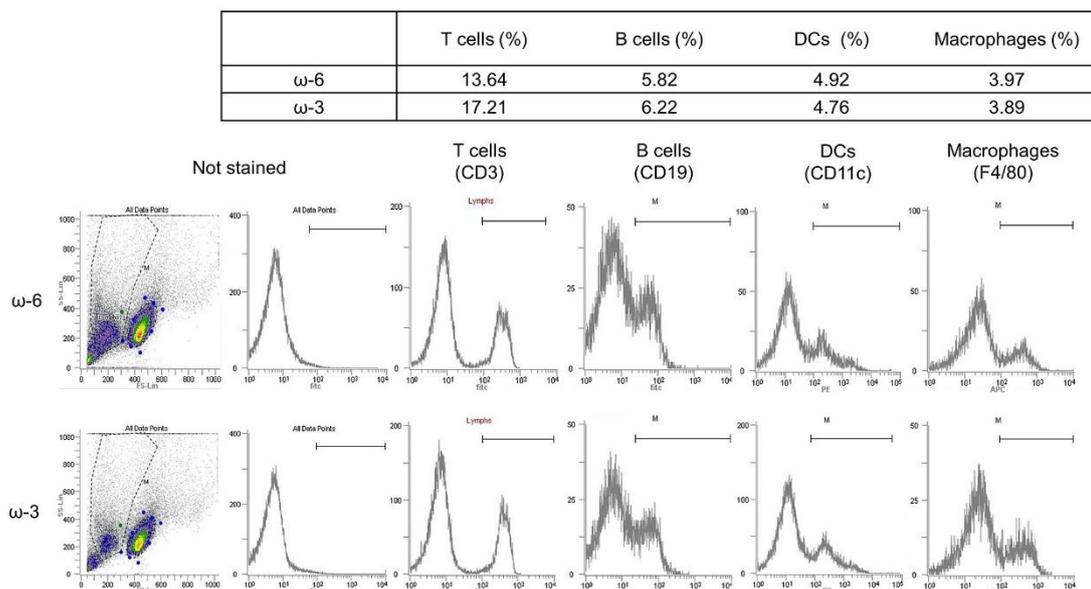


図 S1.脾臓の細胞組成に対する ω -3 食餌摂取は脾臓細胞の組成に影響を与えない。

ω -3 または ω -6LCPUFA を添加した食事を 14 日間与えたマウスの脾臓細胞を、CD3 (T 細胞)、CD19 (B 細胞)、CD11c (DC)、または F4/80 (マクロファージ) そしてフローサイトメトリーによって分析し割合を比較したが、APC の組成に大きな変化はみられなかった。

ω -3 を与えたマウス由来 DC の養子移入による EAU マウスの炎症の抑制

EAU 免疫の 7 日後に、 ω -3 または ω -6 を食餌したマウス由来の DC を adoptive transfer(養子移入)されたマウスにおいて、EAU の臨床的および組織学的スコアリングの両方を実行した (図 3A)。EAU 免疫後 14~28 日での眼内炎症における臨床スコアは、 ω -3 を食餌したマウス由来の DC を移植したマウス群において、 ω -6 群よりも有意に低かった (図 3B)。臨床スコアが最大となる EAU 免疫後 17 日で sacrifice して作成した切片を用いた組織学的スコアリングでは、 ω -6 食餌したマウス由来の DC を移植したマウス群の眼では網膜ひだや免疫細胞浸潤が散見されたが、 ω -3 群ではそれらの変化がみられず(図 3C)、 ω -3 群の組織学的スコアは有意に抑制された(図 3D)。

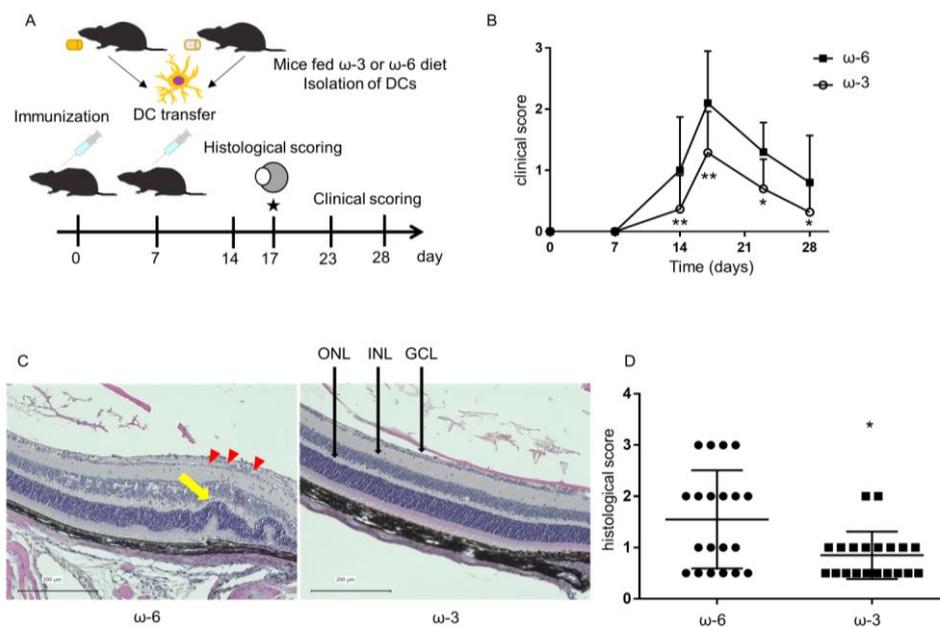


図 3. ω -3LCPUFA を与えられたマウスからの DC の養子移入後のモデルマウスにおける EAU の臨床的および組織学的スコアリング。

(A) 実験シエマ。 ω -3(n=5)または ω -6(n=5)を 2 週間食餌したマウスより MACS を用いて単離した DC (2.5×10^6) を、EAU 免疫後 7 日目のマウスに養子移植した。(B) EAU の臨床スコアは、EAU 免疫後 7、14、17、23、および 28 日目に評価した。(C) EAU 免疫後 17 日での EAU マウスの網膜切片のヘマトキシリン-エオジン染色。赤い矢印は網膜の炎症細胞を、黄色の矢印は炎症による網膜ひだを示す。GCL: 神経節細胞層、INL: 内顆粒層、ONL: 外顆粒層。スケールバー: $200 \mu\text{m}$ 。(D) (C) の切片より測定した EAU の組織学的スコア。* $P < 0.05$: 平均土標準偏差(n=10)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$: ω -6 群と比較 (Man-Whitney U 検定)。

ω-3 食餌マウス由来の DC を養子移入後の EAU マウスの T 細胞におけるサイトカインと免疫チェックポイント分子の発現

次に、ω-3 または ω-6 を食餌したマウス由来の DC を養子移入してから 10 日後に、EAU マウスから単離した CD4 + T 細胞を採取した。24 時間培養後、細胞上清にマルチプレックスアッセイにより、炎症性サイトカインの量を測定し ω-6 群と ω-3 群で比較した。IL-1β、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12 p70、IL-13、エオタキシン、顆粒球コロニー形成刺激因子(GM-CSF)、IFN-γ、Macrophage inflammatory protein (MIP)-1α、MIP-1β、RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)、および TNF-α は ω-3 群で有意に抑制された。ただ対照的に、NK 細胞刺激因子である炎症性サイトカイン IL-12 p40 の産生は、ω-3 群で増加がみられた(図 4)。同 CD4+T 細胞のライセートを用いた ELISA においては、T 細胞における免疫チェックポイント分子である PD-1 および CTLA-4 の発現は、ω-6 群と ω-3 群で有意差を認めなかった。

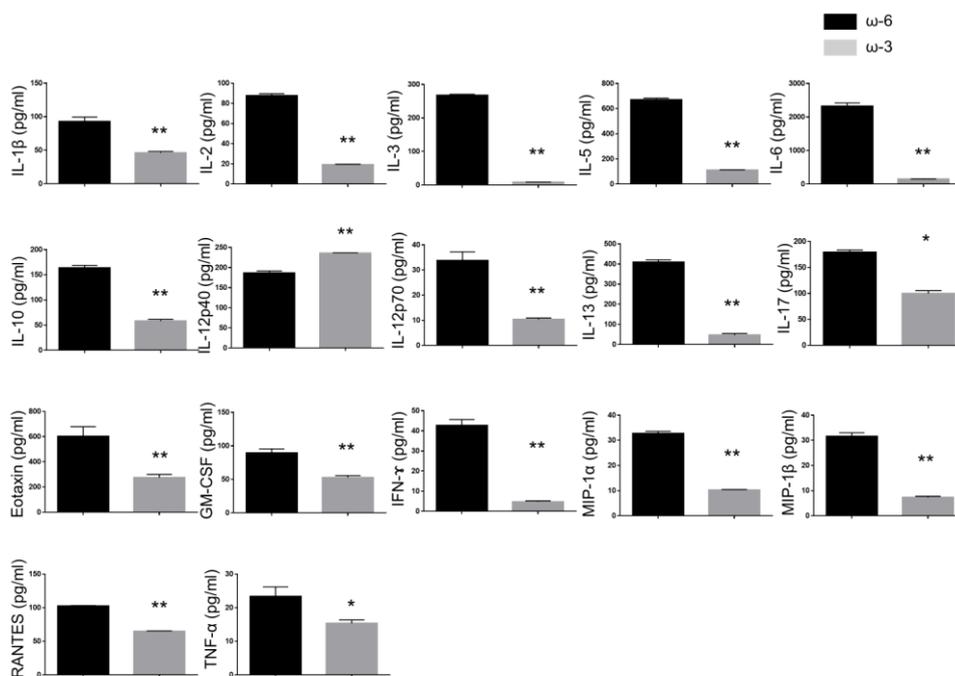
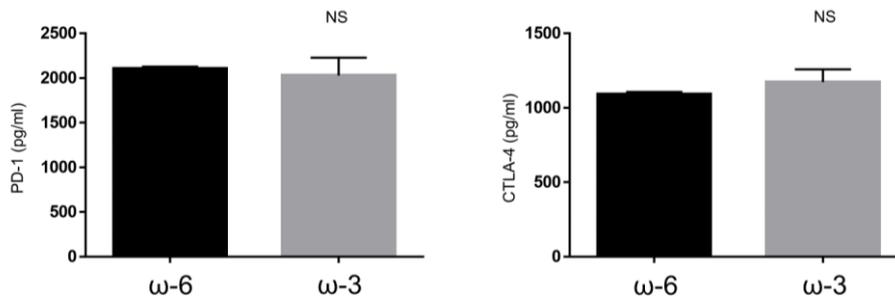


図 4. ω-3 または ω-6 を食餌したマウス由来の DC を養子移入した EAU マウスから分離された T 細胞によるサイトカイン産生。

ω-3 (n = 5) または ω-6 (n = 5) LCPUFA を含む食餌を与えられたマウスからの DC の養子移入の 10 日後に EAU マウスから単離された CD4 + T 細胞 (疾患誘発の 17 日後) を 24 時間培養後、培養上清中の示されたサイトカインの濃度をマルチプレックスアッセイで決定した。EAU マウスの平均±標準誤差(n=4)。* P < 0.05 : 平均±標準偏差(n=10)。* P < 0.05、** P < 0.01 : ω-6 群と比較 (Man-Whitney U 検定)。



S2 図。ω-3 を与えられたマウスからの DC の養子移入後の EAU マウスから分離された T 細胞における免疫チェックポイント分子の発現。

ω-3 または ω-6LCPUFA を含む食餌を与えられた C57BL / 6 マウスからの DC の養子移入の 10 日後（疾患誘発の 17 日後）に EAU マウスから単離された CD4 + T 細胞を溶解し、ライセートについて PD-1・CTLA-4 の発現について ELISA で測定した。平均値±標準誤差(N=5)。NS 有意差なし：ω-6 群と比較(Man-Whitney U 検定)。

MLR での T 細胞増殖とサイトカイン産生に対する ω-3LCPUFA 給餌マウスの DC の影響

ω-3 または ω-6 を 2 週間食餌した C57BL / 6 マウスから脾臓を摘出しマイトマイシン C 処理した。これを MACS を用いて DC、マクロファージ、B 細胞を含む残りの細胞に分離し、それぞれを Balb/c マウスの CD4 + T 細胞とともに培養することで MLR を行い、増殖とサイトカイン産生に及ぼす影響を調べた（図 5A）。T 細胞増殖能（図 5B）、IFN-γ（図 5C）および IL-17（図 5D）の産生は、DC を用いた MLR のみにおいて、ω-3 群が ω-6 群と比較して有意に抑制された。対照的に、T 細胞増殖能、IFN-γ、IL-17 いずれにおいても、マクロファージまたは B 細胞を含む脾臓細胞で実施された MLR では有意差はなかった。

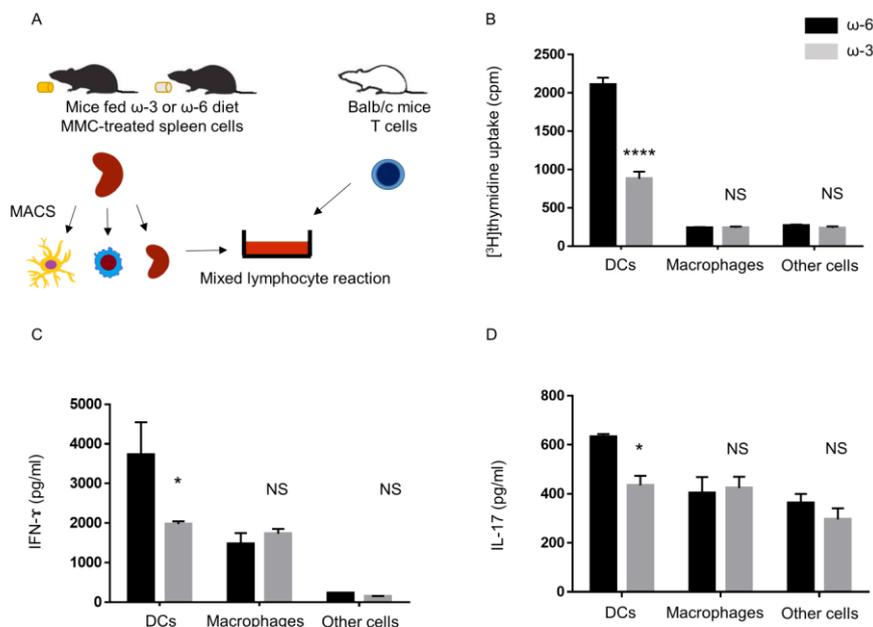


図 5.MLR での T 細胞増殖と炎症性サイトカイン産生に対する ω -3 を作用させた DC の影響。

(A) 実験シエーマ。 ω -3(n=5)または ω -6(n=5)を食餌したマウスより脾臓細胞を採取してマイトマイシン C 処理し、MACS によって DC、マクロファージ、および B 細胞を含むその他の脾臓細胞に分離した。次に、これらの細胞分画 (3×10^4 細胞) のそれぞれを、Balb/c マウス (n=5) から分離した CD4 + T 細胞(3×10^5)とともに 48 時間共培養した。(B) 次に、T 細胞の増殖を 3H トリチウムチミジンの取り込みで測定した。(C、D) 共培養上清中の IFN- γ (C) および IL-17 (D) の濃度を ELISA で測定した。平均値±標準誤差 (N=3)。* P<0.05、**** P<0.0001、NS 有意差なし： ω -6 群と比較 (Sidak の多重比較検定)。

MLR の T 細胞活性化における DC の ω -3LCPUFA による直接阻害

最後に、MLR により *in vitro* での DC に対する ω -3 の直接曝露の効果を調べた (図 6A)。 ω -3 を含まない通常食を与えた C57BL/6 マウスからマイトマイシン C 処理した DC を採取し、DMSO に溶解させた DHA または EPA ($50 \mu\text{M}$) を 48 時間曝露させたうえで Balb/c マウスの CD4 + T 細胞と共培養を行い、T 細胞増殖能を測定した。DHA、EPA ともに有意な増殖能の抑制を認めた(図 6B)。EPA の抑制効果は DHA の抑制効果よりも有意に大きかった。

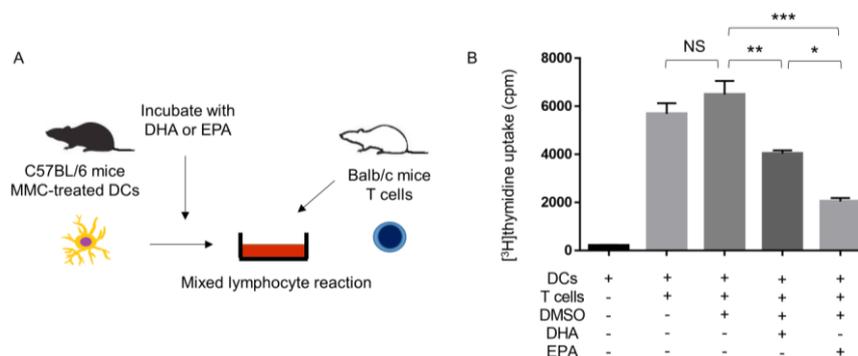


図 6.MLR の T 細胞活性化における DC の ω -3LCPUFA による直接阻害

(A) 実験シエーマ。 ω -3 を含まない食餌を与えた C57BL/6 マウス(n=5)から分離したマイトマイシン C 処理後の DC(3×10^4)を、DHA または EPA($50 \mu\text{M}$)、もしくは対照として DMSO のみの存在下で 48 時間曝露した。その後、細胞を CD4 + T 細胞(6×10^5)と 72 時間共培養し、MLR で Balb/c マウス(n=5)から分離した。(B) T 細胞の増殖を 3H トリチウムチミジンの取り込みで測定した。平均+標準誤差(N=2)。* P<0.05、** P<0.01、*** P<0.001、NS 有意差なし (Tukey-Kramer 多重比較検定)。

6. 考察

我々の結果は、 ω -3 を食餌したマウスの DC が、*in vitro* で EAU マウスの CD4 陽性 T 細胞の増殖能、Th1 関連サイトカイン、Th17 関連サイトカインを減少させたことを示した。さらに、 ω -3 を食餌したマウス由来の DC を養子移入することで、EAU マウスの眼内炎症は抑制

され、また EAU マウスから採取した T 細胞による炎症性サイトカインの産生も抑制された。 ω -3 のこれらの抗炎症効果は、 ω -3 を食餌したマウス由来の DC を利用した混合リンパ球反応、また *in vitro* で DHA・EPA に直接曝露させた DC で行った混合リンパ球反応でも示された。これらの結果は、 ω -3 がぶどう膜炎の炎症を軽減することから、 ω -3 を利用した新しい治療法の可能性を示すことができた。

炎症性疾患の予防または改善を目的とした補助療法としての食事療法の有用性については近年注目が集まっており、往來の薬剤療法と比較して薬剤費と副作用の両方を軽減する利点がある。いくつかの研究では、 α リノレン酸、DHA、EPA などの ω -3 が種々の疾患に抗炎症効果をもつことが示されている^{21, 22)}。我々は ω -3 の食事摂取で、Th1 および Th17 細胞の炎症性機能を阻害してマウスのぶどう膜炎を抑制することを以前に示した⁷⁾。今回の我々の実験結果は、DC が EAU における ω -3 の抗炎症作用のメディエーターであることを示している。

DC を含む免疫細胞の活性化は、炎症性疾患または自己免疫疾患において重要な役割を果たす。 ω -3 の摂取は、感染性の敗血症、歯周炎、腹膜炎、大腸炎などの疾患のモデルで保護作用があることが示されている⁽²³⁻²⁷⁾ため、 ω -3 の免疫細胞への影響を理解することはこれらの脂肪酸またはそれらの誘導体を利用した抗炎症治療薬の研究に重要である。機序として既報では、DHA が DC の成熟を防ぎ、それによって Th1 および Th17 エフェクター細胞の分化を阻害することが示されている⁶⁾。これはマウス脾臓由来の DC が EAU における ω -3 の抗炎症作用を媒介するという今回の研究の結果と一致している。今回 ω -3 は、T 細胞、B 細胞、DC、およびマクロファージの比率に関して、脾臓の細胞組成に影響を与えないことがわかっており、数ではなく機能面に影響を与えていると考えられた。

ヒト単球由来 DC を用いた *in vitro* 実験では、 ω -3 が主要組織適合遺伝子複合体(MHC) II 型および共刺激因子(CD80、CD86、CD40)分子の発現とサイトカイン分泌の活性化を防ぐことが報告されている²⁸⁾。免疫反応のトリガーとなる活性化した DC からはサイトカインが放出され、これらは T 細胞の分化に関与しており、IL-12 P70 は Th1 細胞の分化に、IL-6 とトランスフォーミング増殖因子(TGF- β)は Th17 細胞への分化に不可欠である^{29, 30)}。我々は、 ω -3 を食餌したマウス由来の DC を養子移入された EAU マウスで、T 細胞による IL-12p70 および IL-6 産生が有意に低下することを示した。これらの結果は、 ω -3 が DC を介して CD4⁺による Th1 および Th17 サイトカイン産生を抑制することで、眼内および全身の炎症性変化を抑制したことを示唆している。しかし今回の実験では、 ω -3 による DC を介した作用が、炎症性サイトカインだけでなく、抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生をも抑制することが示され、既報として ω -3 が *ex vivo* でマクロファージによる IL-10 の産生を抑制した報告と類似している³¹⁾。 ω -3 の抗炎症効果は単一の作用ではなく、少なくとも EAU では、炎症誘発効果を上回っているようであった。

In vitro の実験やこれまでの動物実験では、 ω -3 での T 細胞増殖および IL-2 産生を阻害することが報告されている³²⁻³⁶⁾。 ω -3 の抗炎症作用に関する細胞内シグナル伝達経路は全容が解明されているわけではないが、プロスタグランジン、ロイコトリエン、レゾルビン、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) - γ リガンド、およびシトクロム P450 代謝物などによる抗炎症作用が示されている^{8, 37, 38)}。本研究では、*in vivo*・*in vitro* ともに ω -3 を作用させた DC が T 細胞増殖を抑制しており、 ω -3 の DC への抗炎症作用の一端を示したが、

研究の限界として、 ω -3 と DC の直接のインタラクションを示すことはできなかった。EAU における ω -3LCPUFA の DC 依存性抗炎症作用の原因となる脂質メディエーターを特定するには、さらなる研究が必要と考えられる。

7. 結語

ω -3 の経口摂取は EAU モデルマウスにおいて、APC の中でも特に DC を介して抗炎症効果を示し、T 細胞の増殖や Th1/Th17 関連サイトカインを抑制することで炎症を抑制していることを示した。

8. 謝辞

本研究にあたって、指導教官としてご指導を頂いた山口大学大学院医学系研究科眼科学講座教授 木村和博先生、九州大学大学院医学系研究科眼科学講座教授 園田康平先生、山口県立大学看護栄養学部栄養学科教授 徳田和央先生、実験にご協力頂いた同講座技術補佐員 水野由香里氏、片岡彩加氏、元同講座技術補佐員 村田静香氏に対して、ここに深謝の意を表す。

9. 参考文献

1. Ooi KG, Galatowicz G, Calder VL, Lightman SL. Cytokines and chemokines in uveitis: Is there a correlation with clinical phenotype? *Clin Med Res.* 2006;4:294–309.
2. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond).* 1998;94:557–72.
3. Huscher D, Thiele K, Gromnica-Ihle E, Hein G, Demary W, Dreher R, et al. Dose-related patterns of glucocorticoid-induced side effects. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:1119–24. DOI: 10.1136/ard.2008.092163
4. Tang J, Zhu W, Silver PB, Su SB, Chan CC, Caspi RR. Autoimmune uveitis elicited with antigen-pulsed dendritic cells has a distinct clinical signature and is driven by unique effector mechanisms: initial encounter with autoantigen defines disease phenotype. *J Immunol.* 2007;178:5578–87. DOI: 10.4049/jimmunol.178.9.5578
5. Phillips BE, Garciafigueroa Y, Trucco M, Giannoukakis N. Clinical tolerogenic dendritic cells: exploring therapeutic impact on human autoimmune disease. *Front Immunol.* 2017;8:1279. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01279
6. Kong W, Yen JH, Ganea D. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation,

- inhibits antigen-specific Th1/Th17 differentiation and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun.* 2011;25:872–82. DOI: 10.1016/j.bbi.2010.09.012
7. Shoda H, Yanai R, Yoshimura T, Nagai T, Kimura K, Sobrin L, et al. Dietary omega-3 fatty acids suppress experimental autoimmune uveitis in association with inhibition of Th1 and Th17 cell function. *PLoS One.* 2015;10:e0138241. DOI: 10.1371/journal.pone.0138241
 8. Yanai R, Mulki L, Hasegawa E, Takeuchi K, Sweigard H, Suzuki J, et al. Cytochrome P450-generated metabolites derived from omega-3 fatty acids attenuate neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:9603–8. DOI: 10.1073/pnas.1401191111
 9. Yanai R, Chen S, Uchi SH, Nanri T, Connor KM, Kimura K. Attenuation of choroidal neovascularization by dietary intake of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and lutein in mice. *PLoS One.* 2018;13:e0196037. DOI: 10.1371/journal.pone.0196037
 10. Koto T, Nagai N, Mochimaru H, Kurihara T, Izumi-Nagai K, Satofuka S, et al. Eicosapentaenoic acid is anti-inflammatory in preventing choroidal neovascularization in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:4328–34. DOI: 10.1167/iovs.06-1148
 11. Gan RW, Young KA, Zerbe GO, Demoruelle MK, Weisman MH, Buckner JH, et al. Lower omega-3 fatty acids are associated with the presence of anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies in a population at risk for future rheumatoid arthritis: a nested case-control study. *Rheumatology (Oxford).* 2016;55:367–76. DOI: 10.1093/rheumatology/kev266
 12. Gan RW, Bemis EA, Demoruelle MK, Striebich CC, Brake S, Feser ML, et al. The association between omega-3 fatty acid biomarkers and inflammatory arthritis in an anti-citrullinated protein antibody positive population. *Rheumatology (Oxford).* 2017;56:2229–36. DOI: 10.1093/rheumatology/kex360
 13. Tedeschi SK, Bathon JM, Giles JT, Lin TC, Yoshida K, Solomon DH. Relationship between fish consumption and disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res*

- (Hoboken). 2018;70:327–32. DOI: 10.1002/acr.23295
14. Lourdudoss C, Di Giuseppe D, Wolk A, Westerlind H, Klareskog L, Alfredsson L, et al. Dietary intake of polyunsaturated fatty acids and pain in spite of inflammatory control among methotrexate-treated early rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2018;70:205–12. DOI: 10.1002/acr.23245
 15. Cockbain AJ, Toogood GJ, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut*. 2012;61:135–49. DOI: 10.1136/gut.2010.233718
 16. Kimmig LM, Karalis DG. Do omega-3 polyunsaturated fatty acids prevent cardiovascular disease? A review of the randomized clinical trials. *Lipid Insights*. 2013;6:13–20. DOI: 10.4137/LPI.S10846
 17. Jia X, Kohli P, Virani SS. Omega-3 fatty acid and cardiovascular outcomes: insights from recent clinical trials. *Curr Atheroscler Rep*. 2019;21:1. DOI: 10.1007/s11883-019-0763-0
 18. Shaikh SR, Edidin M. Immunosuppressive effects of polyunsaturated fatty acids on antigen presentation by human leukocyte antigen class I molecules. *J Lipid Res*. 2007;48:127–38. DOI: 10.1194/jlr.M600365-JLR200
 19. Hughes DA, Pinder AC. n-3 Polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:357S–60S. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1997.4351455.x
 20. Tokuda K, Baron B, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Tokuda N, Morishige N, et al. Optimization of fixative solution for retinal morphology: a comparison with Davidson’s fixative and other fixation solutions. *Jpn J Ophthalmol*. 2018;62:481–90. DOI: 10.1007/s10384-018-0592-7
 21. Yum HW, Na HK, Surh YJ. Anti-inflammatory effects of docosahexaenoic acid: implications for its cancer chemopreventive potential. *Semin Cancer Biol*. 2016;40–41:141–59. DOI: 10.1016/j.semcancer.2016.08.004

22. Chen X, Wu S, Chen C, Xie B, Fang Z, Hu W, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation attenuates microglial-induced inflammation by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF-kappaB pathway following experimental traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2017;14:143. DOI: 10.1186/s12974-017-0917-3
23. Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, et al. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:7671–6. DOI: 10.1073/pnas.0409271102
24. Camuesco D, Galvez J, Nieto A, Comalada M, Rodriguez-Cabezas ME, Concha A, et al. Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis. *J Nutr*. 2005;135:687–94. DOI: 10.1093/jn/135.4.687
25. Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan CN, et al. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *J Immunol*. 2007;179:7021–9. DOI: 10.4049/jimmunol.179.10.7021
26. Hudert CA, Weylandt KH, Lu Y, Wang J, Hong S, Dignass A, et al. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:11276–81. DOI: 10.1073/pnas.0601280103
27. Tsou SS, Chiu WC, Yeh CL, Hou YC, Yeh SL. Effects of omega-3 fatty acids on inflammatory mediators and splenocyte cytokine mRNA expressions in rats with polymicrobial sepsis. *Nutrition*. 2008;24:484–91. DOI: 10.1016/j.nut.2008.01.012
28. Teague H, Rockett BD, Harris M, Brown DA, Shaikh SR. Dendritic cell activation, phagocytosis and CD69 expression on cognate T cells are suppressed by n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Immunology*. 2013;139:386–94. DOI: 10.1111/imm.12088
29. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-

- gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol.* 1996;26(3):659-68.
30. Heink S, Yogev N, Garbers C, Herwerth M, Aly L, Gasperi C, et al. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic Th17 cells. *Nat Immunol.* 2017;18:74–85. DOI: 10.1038/ni.3632
31. Petursdottir DH, Olafsdottir I, Hardardottir I. Dietary fish oil increases tumor necrosis factor secretion but decreases interleukin-10 secretion by murine peritoneal macrophages. *J Nutr.* 2002;132:3740–3. DOI: 10.1093/jn/132.12.3740
32. Fan YY, Ly LH, Barhoumi R, McMurray DN, Chapkin RS. Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production. *J Immunol.* 2004;173:6151–60. DOI: 10.4049/jimmunol.173.10.6151
33. Jolly CA, Jiang YH, Chapkin RS, McMurray DN. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide. *J Nutr.* 1997;127:37–43. DOI: 10.1093/jn/127.1.37
34. Wallace FA, Miles EA, Evans C, Stock TE, Yaqoob P, Calder PC. Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines. *J Leukoc Biol.* 2001;69:449–57.
35. Calder PC, Newsholme EA. Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. *Clin Sci (Lond).* 1992;82:695–700.
36. Calder PC. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:1505S–19S. DOI: 10.1093/ajcn/83.6.1505S
37. Echeverria F, Ortiz M, Valenzuela R, Videla LA. Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: relationship to tissue development and aging. *Prostaglandin Leukotr Essent Fatty Acids.* 2016;114:28–34.
37. Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75:645–62.