

平成30年6月21日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08533

研究課題名(和文) 妊娠期の水溶性繊維食は生まれてくるこどものアレルギーや自己免疫疾患を減らせるか？

研究課題名(英文) Maternal high fiber diet during pregnancy and lactation influences regulatory T cell differentiation in offspring in mice

研究代表者

中島 章人 (NAKAJIMA, Akihito)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：30439294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年の研究より、腸内細菌は腸管のみならず、全身の免疫システムに影響を与えることが報告されている。本研究では妊娠期や授乳期の母親の腸管内で産生される短鎖脂肪酸(SCFAs)が子供に移行し、子供の制御性T細胞(Treg)の産生に影響するか検討した。その結果、妊娠期や授乳期の母親のSCFAsは、子供の胸腺上皮細胞に発現するGPR41レセプターを介してAire遺伝子の発現を上昇させて子供の胸腺Tregの産生に関与している可能性が示唆された。本研究では、母親の腸内細菌は子供の生後初期の胸腺Treg産生にリンクしているというメカニズムを初めて示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Short-chain fatty acids (SCFAs) influence the immune system. We investigated the molecular mechanisms underlying regulatory T cell (Treg) differentiation in offspring regulated by a maternal high fiber diet (HFD). Plasma levels of SCFAs in offspring from HFD-fed mice were higher than those from no fiber diet-fed mice. Consequently, the offspring from HFD-fed mice had higher frequencies of thymic Treg (tTreg). We found that the offspring of HFD-fed mice exhibited higher autoimmune regulator (Aire) expression, a transcription factor expressed in the thymic microenvironment, suggesting SCFAs promotes tTreg differentiation through increased Aire expression. Notably, the receptor for butyrate, G-protein-coupled-receptor 41 (GPR41), is highly expressed in the thymic microenvironment and Aire is not increased by stimulation with butyrate in GPR41-deficient mice. Our studies highlight the significance of SCFAs produced by a maternal HFD for Treg differentiation in the thymus of offspring.

研究分野：免疫学

キーワード：腸内細菌 食物繊維 短鎖脂肪酸 制御性T細胞 胸腺 Aire GPR41

## 1. 研究開始当初の背景

母親の妊娠期や授乳期の食事がこどもの将来にわたる健康や発達に影響を及ぼすことが示されている。例えば、母親が摂取したレチノイン酸(RA)が胎児の腸管 ILC3 の発育や二次リンパ組織の発育に重要であるという報告がある (van de Pavert et al., Nature, 2014)。近年こどものアレルギー疾患は増加しており、その原因究明と対策が求められていることから、母親の妊娠期や授乳期の食事によって生まれてくるこどもの将来的なアレルギー疾患や自己免疫疾患を予防し減らせないかと考えた。食物繊維、特に水溶性の食物繊維は腸内細菌によって短鎖脂肪酸(Short Chain Fatty Acids: SCFAs)に代謝されることが知られている。水溶性食物繊維は腸内細菌の一種であるバクテロイデス門によって SCFAs である酢酸、プロピオン酸、酪酸に代謝される。SCFAs は近年の研究成果から腸管内の制御性 T 細胞(Treg)を増やし、腸炎を抑制することや (Furusawa et al., Nature, 2013)、喘息を抑制することなどが示されている (Trompette et al., Nature Medicine, 2014)。腸内細菌は宿主の腸管や全身の免疫系に対して様々なメリットをもたらしていると考えられているが、近年の研究成果より腸内細菌が水溶性食物繊維から代謝する SCFAs は、腸管や全身の過剰な免疫反応を抑制する非常に重要な物質であることが示唆されている。

## 2. 研究の目的

申請者は自身のこれまでの研究から、腸内細菌は腸管内だけでなく、全身の免疫系に重要なメリットを与えるのではないかと予想

し、特に免疫の中核である胸腺にどのような影響を及ぼしているかについて明らかにしてきた。その結果、腸内細菌は、胸腺上皮細胞に発現し、T 細胞のネガティブセレクションの誘導に重要な働きをする autoimmune regulator (Aire) という遺伝子の発現の誘導に重要であることを明らかにした (Nakajima et al., PLoS ONE, 2014)。この研究結果は、腸内細菌の産物が胸腺に対して影響を与えていることを世界で初めて示した成果であり、腸内細菌が遠隔臓器である胸腺とリンクし、自己免疫疾患を抑制している可能性を示した。

申請者はこの自身の研究結果をふまえ、将来的なこどものアレルギーや自己免疫疾患を予防するために、妊娠期や授乳期の母親の腸内細菌が産生する SCFAs がこどもに移行し、こどもの胸腺にどのように作用するかに着目した。胸腺は胎児から乳幼児期を通して臓器として最も発達し、T 細胞の分化や選択を行う。胸腺の成熟や免疫系の形成には母体からの食事や腸内細菌の影響を大きく受けると考えられるが、そのような研究はまだない。本研究においては、母親の腸内細菌が産生する SCFAs がこどもの免疫系、特に胸腺に由来する Treg が免疫を抑制するかを解明する。

## 3. 研究の方法

### 1. 食物繊維

野生型マウス (C57BL/6) を交配させ、同時に以下の Research diet 社の精製飼料を交配期と妊娠期と授乳期を通して与える。

無繊維飼料 - 繊維質を全く含まない精製飼料 (AIN-93G ベース)

10%セルロース - 不溶性食物繊維であるセルロースを高配合(10%)した精製飼料。水

溶性食物繊維である 10%イヌリンのコントロールとなる。

10%イヌリン - 水溶性食物繊維であるイヌリンを高配合(10%)した精製飼料。水溶性食物繊維は腸内細菌によって腸管内で SCFAs に代謝される。

## 2. SCFAs を測定

水溶性食物繊維から代謝された SCFAs は糞便から検出できるため、上記3種類のエサを食べさせたあとの母親マウスの便から SCFAs である酢酸、プロピオン酸、酪酸を測定する (Furusawa et al., Nature, 2013)。SCFAs の測定は、本学の共同施設である生体分子研究室に設置されている gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) を使用し、GC-MS の測定に習熟した共同研究者とともに行う。SCFAs は血清中にも含まれており(便に比べ低濃度であるが)、同様に測定する。さらに、授乳中の母乳にも SCFAs が移行しているかを解明するため、母乳に含まれる SCFAs や仔マウスの胃に含まれる SCFAs を測定する。それに加え仔マウスの胃だけではなく、生まれた直後のこどもの小腸と大腸の内容物から GC-MS を使い SCFAs を測定する。血漿中の SCFAs の測定は実績がある理化学研究所の研究チームと共同研究で行うこととした。

## 3. Treg 細胞の測定

子供のマウスから胸腺を摘出し、細胞を調整して Treg 細胞のマーカーである CD4, Foxp3 で染色しフローサイトメータで細胞数を計測した。無線維食、10%セルロース、10%イヌリンの餌を食べた母親から生まれた子供の生後直後と生後 14 日後、生後 21 日後で比較した。また脾臓の細胞も同様に比較した。

## 4. 腸内細菌叢の解析

無線維食、10%セルロース、10%イヌリンの餌を食べさせた母親のマウスの糞便とそれぞれの母親から生まれた子供の糞便の腸内細菌叢について次世代シーケンサーを用いて解析する。

## 5. 胸腺上皮細胞における Aire の発現解析

胸腺上皮細胞(TEC)に発現する Aire 遺伝子は Treg 細胞の産生に関与しているという報告があるため、子供の胸腺の Aire の発現を解析する。TEC 細胞を調整し、Aire の発現をフローサイトメータで測定する。

## 6. 胎児胸腺臓器培養(FTOC)

SCFAs によって胸腺 Treg が誘導されるか、in vitro の実験として FTOC を行う。胎児胸腺を酪酸もしくはプロピオン酸の存在下で培養し、Treg 細胞が誘導されるかフローサイトメータで測定する。

## 7. GPR41 ノックアウトマウスを用いた解析

SCFAs による胸腺 Treg の誘導のメカニズムを明らかにするため、SCFAs のレセプターである GPR41 経路の解析を行う。GPR41 ノックアウトマウスの母親に高線維食と無線維食を食べさせ、生まれてきた子供の Treg 細胞数や Aire の発現を解析する。

## 4. 研究成果

本研究では妊娠期や授乳期の母親の腸管内で産生される短鎖脂肪酸(SCFAs)が子供に移行し、子供の制御性T細胞(Treg)の産生に影響するか検討した。その結果、水溶性食物繊維を食べた母親の腸管内では SCFAs が多く産生され、妊娠後期には特に酪酸が血漿中に増加すること、水溶性食物繊維を食べた母親から生まれた子供の血漿中の SCFAs 濃度を調べると、無繊維食を食べた母親の子供

よりも SCFAs が増加していること、 生後直後の胸腺と脾臓の Treg の数を検討すると、水溶性食物繊維を食べた母親から生まれた子供の方が無繊維食を食べた母親の子供よりも Treg の数が多いこと、 胎児胸腺を培養し酪酸で刺激実験(FTOC)を行うと、胸腺 Treg が増加すること、 酪酸は胸腺上皮細胞上に発現する GPR41 レセプターを介して、ネガティブセレクションや Treg 産生に關与する Aire という遺伝子を発現させ、Treg の産生に關与していることが明らかになった。

本研究の結果より、母親の腸管内において腸内細菌によって水溶性食物繊維から産生された SCFAs が妊娠期や授乳期に子供に移行し、子供の胸腺内での Treg の産生に關与していることが明らかになった。そのメカニズムとして酪酸のレセプターである GPR41 を介して Treg 産生に關与する Aire 遺伝子の発現を上昇させることを明らかにした。この研究成果は母親の SCFAs が子供の胸腺 Treg の産生に關与する新しいメカニズムを提示するもので、腸内細菌の新しい役割を示したものと云える。腸内細菌は腸管内だけでなく全身の免疫システムに影響を与えているとされているが、母親の腸管内で産生された SCFAs が胎児から新生児期の胸腺の細胞選択にも影響を与えている可能性を示唆する結果である。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件) 査読あり

1. Akihito Nakajima<sup>\*</sup>, Naoko Kaga, Yumiko Nakanishi, Hiroshi Ohno, Junki Miyamoto, Ikuo Kimura, Shohei Hori, Takashi Sasaki, Keiichi Hiramatsu, Ko

Okumura, Sachiko Miyake, Sonoko Habu, and Sumio Watanabe. 2017. Maternal high fiber diet during pregnancy and lactation influences regulatory T cell differentiation in offspring in mice. *J Immunol*. October 11, j11700248; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700248> \*corresponding author

[学会発表](計 3 件)

- 1) Akihito Nakajima, Naoko Negishi, Hiromichi Tsurui, Naomi Ohtsuji-Kadowaki, Masanobu Nanno, Ko Okumura and Sonoko Habu, Commensal bacteria regulate thymic Aire expression. 第38回 **日本免疫学会**, 京都, 日本, December, 2014.
- 2) Akihito Nakajima, Sachiko Miyake and Sonoko Habu, The effect of dietary fiber during pregnancy on Foxp3<sup>+</sup>Tregs of offspring. 第44回 **日本免疫学会**, 札幌, 日本, November, 2015.
- 3) Akihito Nakajima<sup>\*</sup>, Naoko Kaga, Yumiko Nakanishi, Hiroshi Ohno, Junki Miyamoto, Ikuo Kimura, Shohei Hori, Takashi Sasaki, Keiichi Hiramatsu, Ko Okumura, Sachiko Miyake, Sonoko Habu, and Sumio Watanabe. 2017. Maternal high fiber diet during pregnancy and lactation influences regulatory T cell differentiation in offspring in mice. The 16<sup>th</sup> international congress of immunology, Melbourne, Aug, 2016.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 章人 (NAKAJIMA, Akihito)  
順天堂大学・医学部・非常勤助教  
研究者番号：30439294

研究者番号：50233226

堀 昌平 (HORI, Shohei)  
東京大学・薬学部・教授  
研究者番号：50392113

### (2) 研究分担者

加賀 直子 (KAGA, Naoko)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号：80338342

佐々木 崇 (SASAKI, Takashi)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50723897

宮本 潤基 (MIYAMOTO, Junki)  
東京農工大学・農学研究科・助教  
研究者番号：20805668

木村 郁夫 (KIMURA, Ikuo)  
東京農工大学・農学研究科・准教授  
研究者番号：80433689

### (3) 連携研究者

奥村 康 (OKUMURA, Ko)  
順天堂大学・医学部・特任教授  
研究者番号：50009700

垣生 園子 (HABU, Sonoko)  
順天堂大学・医学部・客員教授  
研究者番号：30051618

三宅 幸子 (MIYAKE, Sachiko)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：50266045

平松 啓一 (HIRAMATSU, Keiichi)  
順天堂大学・医学部・特任教授  
研究者番号：10173262

渡辺 純夫 (WATANABE, Sumio)  
順天堂大学・医学部・特任教授  
研究者番号：20138225

### (4) 研究協力者

中西 裕美子 (NAKANISHI, Yumiko)  
理化学研究所・生命医科学研究センター・  
研究員  
研究者番号：10614274

大野 博司 (OHNO, Hiroshi)  
理化学研究所・生命医科学研究センター・  
チームリーダー