

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01850

研究課題名(和文) 食生活の偏りが脂肪組織による感染免疫応答に及ぼす影響と腸内細菌叢の関わりについて

研究課題名(英文) Effects of a deviated food habit on immune response of adipose tissues to bacterial infections, and their association with intestinal microflora

研究代表者

有持 秀喜 (ARIMOCHI, Hideki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：30311822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織の感染免疫応答に対する食生活の偏りの影響を検討するため、高脂肪食投与マウスに種々の細菌を皮下または腹腔内に感染させて菌数を測定したところ、黄色ブドウ球菌では減少したが、他の菌では増加していた。脂肪組織中の抗菌ペプチドの発現量は菌数の抑制効果と必ずしも相関しなかった。脂肪細胞の成熟異常が報告されているLMP7欠損マウスでは通常食の場合、抗菌ペプチド発現減少と菌数増加が見られたが、高脂肪食の場合、菌数と抗菌ペプチド発現の増加が見られた。これらの結果は肥満時に細菌が感染すると、多くの場合、菌の排除が悪くなること、脂肪組織由来の抗菌ペプチド以外の因子が影響する可能性があることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食生活の偏りは肥満の原因の一つであるが、肥満になると免疫系の質的变化が起こり、感染症を起こしやすくなると推測される一方、肥満の方が脂肪細胞由来の抗菌ペプチドの血中濃度が高いという報告もあり、肥満が細菌感染に及ぼす影響については議論されているところである。今回の研究成果から、肥満は一部の細菌による感染では菌の排除を促進するが、ほとんどの場合は抑制的に働くことが分かり、また脂肪細胞由来の抗菌ペプチドは感染制御にあまり寄与しなかったことから、肥満は細菌感染に悪影響を及ぼすということが示唆された。今回の成果は肥満が細菌感染に及ぼす影響の一端を明らかにしたという点で、意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify effects of a deviated food habit on adipose infection immunity, high fat diet (HFD) fed mice were infected with several kinds of bacteria at subcutaneous or abdominal cavity, then bacterial number was estimated. When *Staphylococcus aureus* was infected subcutaneously, bacterial number was low in HFD group compared with normal diet (ND) group. However, bacterial numbers in HFD group were high in other models. Expression of adipose bactericidal peptide didn't correlate with the bacterial number in some models. When LMP7 deficient mouse with immatured adipocyte was infected under ND condition, bacterial number and adipose bactericidal peptide expression were high and low, respectively, compared with wild type (WT) mouse, although more bacteria and peptide expression than WT were observed in HFD condition. These results suggest bacterial clearance in obese was decline in most cases, and the adipose bactericidal peptide might be a minor factor to prevent bacterial infections.

研究分野：細菌学

キーワード：皮下膿瘍 腹腔内感染 抗菌ペプチド 脂肪組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の日本では、食生活が西洋型に移行しつつあり、ファーストフードやジュースなどの過食による脂質、コレステロール、蔗糖の摂取過多、野菜不足による食物繊維の不足など、いわゆる食生活の偏り・乱れが起きている。この食生活の変化と運動不足などの生活習慣の変化が肥満や生活習慣病の原因となっている。白色脂肪細胞は食事によって過剰となった血液中の中性脂肪や糖などを取り込んでエネルギー貯蔵庫として機能する他、アディポサイトカインを分泌することで生体の恒常性の維持に寄与する。しかし、肥満によって白色脂肪細胞が肥大化し、数が多くなると、性質的に変化し、アディポネクチン分泌抑制や炎症性サイトカインの分泌促進が起こり、動脈硬化や高血圧症などの生活習慣病を誘発する。また、白色脂肪細胞は皮膚常在性の病原菌が、深部皮膚組織に感染して蜂窩織炎などの脂肪組織炎を起こした際、好中球やマクロファージ等の免疫細胞が感染部位に浸潤する前に、脂肪組織から抗菌物質を産生することで、菌の増殖、感染拡大を防ぐ機能を持つことが報告されている(引用文献)。内臓脂肪中の白色脂肪細胞も Toll 様受容体を発現しており、病原体関連分子パターンを認識して IL-6 を産生する。肥満になると免疫系の質的变化が起こり、感染症を起こしやすくなると考えられている一方で、肥満の人の方が血清中の抗菌ペプチド濃度が高いという報告もあり、肥満が細菌感染に及ぼす影響については議論の余地がある。食習慣の乱れは腸内細菌叢の変化を引き起こし、免疫系のバランスを崩していると推測されるものの、食生活の偏りがどのように脂肪組織による感染免疫応答に影響を与えているのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では食生活の乱れのうち、脂質の過剰摂取がどのように脂肪組織の感染防御能に影響を与えるのかを皮下膿瘍と腹腔内感染のモデルを用いて解明することを第一の目的とする。さらに、抗原提示に関わる免疫プロテアソームの一分子であり、欠損することで脂肪細胞の成熟が異常になることが報告されている LMP7 をコードする *Psm8* 遺伝子が欠損しているマウス (LMP7KO マウス) を用いて、この分子が脂肪組織による感染防御にどのように機能するか、高脂肪食の摂取がどのような影響を与えるのかを明らかにすることを第二の研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) 皮下膿瘍形成モデル

23週齢の雄B6マウスに高脂肪食もしくは普通食を4週間自由摂取させた。これらのマウスに GAM培地で1晩培養した黄色ブドウ球菌、緑膿菌、およびA群溶血性連鎖球菌のいずれかをそれぞれ 2.6×10^6 colony forming unit (CFU) / 匹、 1.2×10^6 CFU / 匹、 4.2×10^4 CFU / 匹ずつ背中皮下に接種し、4日後に皮下膿瘍中の菌数を測定した。抗菌ペプチドCathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) やマクロファージ遊走因子であるMCP-1の遺伝子発現量を調べるため、菌未接種の背部皮膚および膿瘍周辺部の皮膚を回収してRNAを抽出し、qPCRを行った。

(2) 大腸菌を用いた腹腔内感染モデル

野生型の普通食投与マウスおよび高脂肪食を4か月間与えて体重が普通食投与マウスの約1.5倍に増加した肥満マウスにLB培地で1晩培養した大腸菌 1.3×10^7 CFUを腹腔内投与し、2日後に腹腔内の菌数を測定した。腹腔内の脂肪組織および大網よりRNAを抽出し、*Camp*遺伝子に対するqPCRを行った。LMP7KOマウスにも普通食と高脂肪食を4か月間与え、同様の実験を行った。

(3) *Bacteroides fragilis*を用いた腹腔内感染モデル

普通食投与マウス、および高脂肪食を4か月間与えて体重が普通食投与マウスの約1.4倍に増加

した肥満マウスに*B. fragilis* 1.5×10^{10} CFU を腹腔内投与し、1日後に腹腔内の菌数を測定した。腹腔内の脂肪組織よりRNAを抽出し、各種遺伝子に対するqPCRを行った。腹腔内洗浄液中のマクロファージ、樹状細胞、T細胞、およびB細胞の数および種類をフローサイトメーターで調べた。

4. 研究成果

(1) 皮下膿瘍形成モデル

黄色ブドウ球菌、A群溶血性連鎖球菌、および緑膿菌のいずれかを皮下接種し、4日後に皮下膿瘍中の菌数を測定した結果、黄色ブドウ球菌を接種した高脂肪食投与マウスでは膿瘍中の菌数が減少する傾向が見られたが、連鎖球菌や緑膿菌を接種した高脂肪食投与マウスでは普通食群よりも菌数が増加する傾向が見られた。皮下脂肪が産生するCAMPの遺伝子発現について、菌未接種の高脂肪食投与マウスと普通食投与マウスの皮膚切片で調べたが、いずれも発現量は非常に少なく、高脂肪食投与で上昇する傾向は見られなかった。各菌の接種によって形成された膿瘍部の皮膚切片中の*Camp*の発現は、普通食を与えた菌未接種マウスと比較して5から10倍程度上昇したが、各菌とも高脂肪食群と普通食投与群との間に顕著な差は見られなかった。また、MCP-1の遺伝子発現も菌を接種した高脂肪食群と普通食投与群との間で差が見られなかった。

(2) 大腸菌を用いた腹腔内感染モデル

普通食もしくは高脂肪食を投与したマウスに大腸菌を腹腔内投与し、2日後に腹腔内の菌数を測定したところ、高脂肪食投与マウスからは 7.0×10^3 CFU、普通食投与マウスからは 7.3×10^2 CFUの菌が検出され、高脂肪食投与マウスの方が9.6倍高いことが分かった。これらのマウスの内臓脂肪組織中の*Camp*遺伝子発現を調べたところ、普通食投与マウスの方が10倍以上高かった。腹腔内で抗炎症性に働くと考えられている大網についても検討したところ、*Camp*遺伝子の発現は普通食投与マウスの方が約2.5倍高いことがわかった。さらにLMP7KOマウスを用いたところ、普通食投与の場合、KOマウスではコントロールマウスに比べて腹腔内の残存菌数が33.9倍多く、内臓脂肪および大網中の*Camp*遺伝子発現もKOマウスで半分程度に減少していた。高脂肪食を与えた場合、KOマウスではコントロールマウスに比べて菌数が18.9倍多かったが、脂肪組織の*Camp*遺伝子発現はKOマウスで増加する傾向を示した。

(3) *B. fragilis*を用いた腹腔内感染モデル

普通食もしくは高脂肪食を投与したマウスに*B. fragilis*を腹腔内投与し、1日後に腹腔内の菌数を測定したところ、高脂肪食投与マウスからは 2.1×10^6 CFU、普通食投与マウスからは 4.6×10^5 CFUの菌が検出され、肥満マウスでは菌の排除が劣っていると考えられた。これらのマウスの内臓脂肪組織中の*Camp*遺伝子の発現を調べたところ、高脂肪食投与マウスの方が8.4倍以上高いことが分かった。また、ケモカインのCCL2およびCXCL2の遺伝子発現も高脂肪食投与群で2.5~3.3倍高いことが分かった。これらのマウスの腹腔内細胞の数および種類をフローサイトメーターで調べたところ、細胞数は高脂肪食投与マウスで1.4~2.3倍高いことが分かった。腹腔内細胞に占めるマクロファージ、樹状細胞、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、およびB細胞の割合は群間で差が見られなかったが、好中球は高脂肪食投与群で増加する傾向が見られた。

<引用文献>

Ling-juan Zhang *et.al.*, Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science*. 2015 January 2; 347(6217): 67-71

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有持 秀喜, 安友 康二
2. 発表標題 FXR as a regulator of Psmb8 expression is associated with macrophage differentiation
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----