

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05882

研究課題名(和文)腸管マイクロバイオーームに注目した脂肪摂取による免疫制御応答の誘導分子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the immunoregulatory molecules induced by fat intake focusing on the intestinal microbiome

研究代表者

細野 朗 (HOSONO, Akira)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70328706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：卵アレルギーモデルである卵白オボアルブミン(OVA)特異的T細胞受容体トランスジェニックOVA23-3マウスを用い、卵白OVAを経口投与することによって腸管炎症を惹起して食物アレルギーの誘導を行い、OVA抗原特異的T細胞応答に注目した免疫応答の解析を、異なる脂肪酸摂取による腸内マイクロバイオーームへの関与とともに検討した。魚油(n-3系脂肪酸)・コーン油(n-6系脂肪酸)をそれぞれ配合した高脂肪食条件下で卵白食を経口投与して食物アレルギーを誘導したところ、魚油の摂取によりマスト細胞の脱顆粒抑制が誘導され、活性化T細胞の発現とIL-4産生応答が制御された。腸内有機酸濃度への影響も考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内マイクロバイオーームは腸内環境を介した健康の維持増進に関与しているだけでなく、炎症性疾患の制御にも関与していることが注目されている。本研究での研究成果は、食物アレルギーが誘導される抗原特異的T細胞応答において、経口摂取する脂肪酸の食事条件によって、腸内マイクロバイオーームを介した抗原特異的T細胞応答に影響を与えること、すなわち、n-3系脂肪酸の魚油はn-6系脂肪酸のコーン油に比べて抗原特異的T細胞応答を制御してアレルギー炎症を制御することが明らかになった。これにより、近年増加しているアレルギー炎症を食品によって調節することが期待され、さらなる応用研究への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Using the egg allergy model, egg white ovalbumin (OVA)-specific T cell receptor transgenic OVA23-3 mice, we induced food allergy by inducing intestinal inflammation through oral administration of egg white OVA, and analyzed immune responses focusing on OVA antigen-specific T cell responses and the gut microbiome, under the condition of the different fatty acids intake. When food allergy was induced by oral administration of an egg white diet under a high-fat diet containing fish oil (n-3 fatty acids) and corn oil (n-6 fatty acids), fish oil intake induced mast cell degranulation inhibition and regulated activated T cell expression and cytokine (IL-4) production. Effects on the concentration of organic acids in the intestine were also considered.

研究分野：食品機能学，食品免疫学

キーワード：腸内細菌 高脂肪 脂肪酸 T細胞応答

### 1. 研究開始当初の背景

近年、食生活や生活習慣の変化から世界的にも食物アレルギー患者が増加している。その背景には「衛生仮説とアレルギー疾患の発症」という考え方にもあるように、腸内マイクロバイオーームと宿主の免疫系を介した炎症性生体応答の関わりが注目を集めている。すなわち、アレルギーや生活習慣病などの炎症性疾患に腸内マイクロバイオーームが大きく関与していると考えられており、炎症性疾患のリスクファクターとして社会的にも関心が高い。これまでに、プロバイオティクスなどの腸内細菌因子がアレルギー反応を制御する報告や、食品機能性成分がアレルギー反応において中心的な役割を果たしているマスト細胞の脱顆粒反応などを制御するといった報告がある。さらに、食事性脂質に注目したアレルギー反応に関する研究についても、n-3 (ω3) 系と n-6 (ω6) 系脂肪酸の生体内代謝によって生成される炎症性脂質メディエーターに注目した腸管炎症がアレルギー炎症を制御または悪化させるといった報告がある。しかし、これらは炎症反応に起因するマスト細胞の脱顆粒反応などについての検討が多く、宿主の免疫応答を制御している T 細胞応答に関しては不明な点が多かった。

我々は、これまでに宿主の免疫応答、特に腸管免疫系は腸内マイクロバイオーームによって強く影響を受けること、特に獲得免疫系において中心的な役割を果たす T 細胞の分化や成熟、T 細胞応答を介した抗体産生応答が腸内細菌によって調節されていることを明らかにしてきた。そこで、本研究では経口摂取する食品抗原特異的 T 細胞応答の解析に適した卵白オボアルブミン (OVA) 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス (OVA23-3 マウス) を用いることによって、脂肪酸組成に注目した食事条件が腸内マイクロバイオーームを介して宿主の抗原特異的 T 細胞応答を介したアレルギー炎症にどのような影響を与えるのかを解明することをめざした。

### 2. 研究の目的

本研究では、免疫系炎症反応として食物アレルギーに注目し、OVA23-3 マウスに対して OVA を含む卵白を食餌摂取させて誘導する食物アレルギーモデルを用いて、さらに腸内細菌環境を制御できる条件下で、食物アレルギーの発症において重要な食餌性抗原に対する T 細胞応答を詳細に解析した。これにより、食物アレルギーの発症において摂取する食餌性脂肪の条件が抗原特異的 T 細胞応答を介した腸管免疫系への影響や、アレルギー性炎症反応に対してどのように作用するのかを細胞分子レベルで解析することを企画した。特に、近年の生活習慣病とも関係の深い高脂肪摂取条件下で発症すると考えられる炎症反応と食物アレルギーの免疫・炎症反応の関係を調べ、生体内の炎症反応の制御に対して有用な知見を得ることをめざした。さらに、食事摂取する栄養素に注目した場合、必須脂肪酸の経口摂取によって炎症性脂質メディエーターが産生され型アレルギーが誘導される。脂肪酸組成の違いによってアレルギー発症に影響があると考えられるが、その作用機序についての詳細は明らかにされていない。そこで、本研究では n-3 系脂肪酸を多含する魚油、および n-6 系脂肪酸を多含するコーン油を用いて、異なる脂肪酸組成の食餌条件が食物アレルギーモデルに及ぼす影響について、特に抗原特異的 T 細胞応答や炎症反応に注目した解析を行った。また、その際の腸内容物中の代謝産物を解析し、腸内マイクロバイオーームとの関わりについての検討を行った。

### 3. 研究の方法

解析には卵アレルギーモデルである OVA 特異的 T 細胞受容体トランスジェニック OVA23-3 マウスを用いた。このマウスは OVA 抗原に対して反応する T 細胞受容体を高発現した特徴をもち、OVA 抗原特異的 T 細胞応答の解析を行うことができることから、経口免疫寛容に関する T 細胞応答の解析も可能となるからである。まず、魚油・コーン油不含の対照食 (0%)、魚油配合食 (1.2, 2.4%)、コーン油配合食 (1.2, 2.4%) の実験群それぞれにおいて、食物アレルギーの誘導を行う卵白食群とカゼイン食群を設定した。異なる脂肪配合比率の高脂肪食 (カゼイン食) をそれぞれ 4 週間自由摂取させ、その後さらに、それぞれの脂肪配合比率にてカゼイン食または卵白食を 2~6 週間投与する実験系に分け、自由摂取させた。

#### (1) 異なる脂肪酸組成の摂取による免疫系応答に与える影響

卵白食による OVA 食餌抗原の感作の影響を解析するために、各実験群のマウスより小腸パイエル板 (PP)、腸間膜リンパ節 (MLN)、脾臓 (SPL) を採取・調製し、OVA (1 mg/mL) と 72 時間共培養した。さらに、その培養上清中のサイトカイン (IL-4) 量の測定 (ELISA 法) を行った。また、各実験群のマウスの PP、SPL、MLN 細胞の T 細胞フェノタイプ (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>lo</sup>CD69<sup>hi</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup>CD44<sup>hi</sup>) をフローサイトメトリーにより解析した。また、各実験群のマウスの血中 mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) を腸管マスト細胞の脱顆粒のマーカーとして測定した。また、血中抗体価 (総 IgE 量) についての検討も行った。

#### (2) 異なる脂肪酸組成の食餌摂取による盲腸内容物中脂肪酸に与える影響

上記の飼育条件でのマウスの盲腸内容物を採取し、有機酸濃度の定量を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 異なる脂肪酸組成の摂取による免疫系応答に与える影響

卵白食を 2 週間摂取したことによって誘導される腸管マスト細胞の脱顆粒について解析したところ, mMCP-1 量が対照食群に比べ魚油配合食群において有意に低値を示し, コーン油配合食群では対照食群に比べて有意に高かった (図 1). OVA と共培養した各組織の細胞培養上清中の IL-4 量については, SPL 細胞では魚油配合食群が対照食群に比べて有意な低値を示した. また, PP, MLN 細胞においても魚油配合食群の IL-4 産生量は検出限界値以下で対照群に比べて低値を示すことが明らかとなった. 活性化 T 細胞 (CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>lo</sup>CD69<sup>hi</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup>CD44<sup>hi</sup>) 発現については, PP, MLN, SPL 細胞いずれにおいてもコーン油配合食群, 魚油配合食群対照群の順に高値を示す傾向が見られた.

卵白食を 6 週間摂取したことによって誘導された血中抗体価では, 総 IgE 量はコーン油配合食群が最も高く, 魚油配合食群はコーン油群に比べて低値を示す傾向がみられた.

##### (2) 異なる脂肪酸組成の食餌摂取による盲腸内容物中脂肪酸に与える影響

卵白食を 2 週間摂取したことによって, 盲腸内容物中プロピオン酸濃度が上昇する傾向がみられ, 特に, コーン油配合食 (COE) 群が対照群 (ContE) に比べて高い傾向がみられた. 魚油配合食群とコーン油配合食群との間に有意な差は認められなかったが, さらなる再現性の検討が必要であると考えられる (図 2).

以上のことから, n-3 系脂肪酸の魚油の摂取により, OVA 抗原特異的 T 細胞応答である IL-4 産生量が対照食群に比べ抑制されたことから, 魚油の経口摂取は Th2 への T 細胞分化における抑制応答への免疫修飾が起こることが考えられた. この応答は, 異なる脂肪酸の摂取は腸管内での脂肪酸代謝にも影響を与えている可能性があり, n-3 系脂肪酸代謝が腸内環境因子を介して T 細胞応答を変化させること, T 細胞に依存した IgE 抗体産生, およびマスト細胞の脱顆粒抑制が誘導されることに関与していることが考えられ (図 3), 盲腸内容物中の因子が T 細胞分化に与える影響があるのかどうかについても今後は検討を進めていきたい.

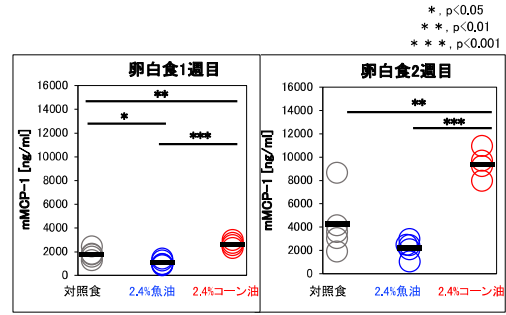


図1: 異なる脂肪酸組成の食餌条件での血清中mMCP-1量に与える影響

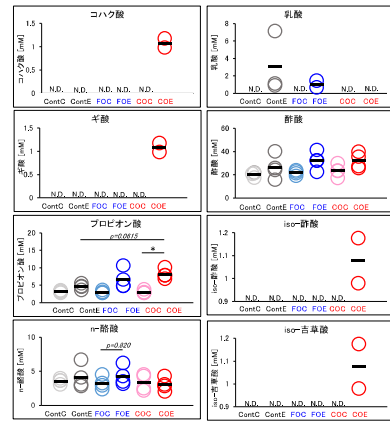


図2: 異なる脂肪酸組成の食餌摂取による盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度

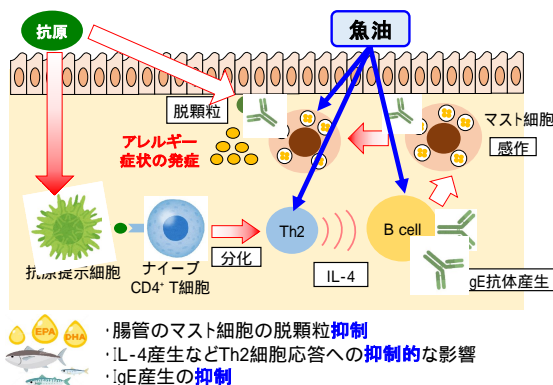


図3: 魚油(n-3系脂肪酸)の摂取が食物アレルギー誘導に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuda Masato, Okada Hiraku, Kojima Natsuki, Ishihama Fumiya, Muraki Yuhei, Oguma Toshiki, Hattori Nanako, Mizoguchi Takumi, Mori Kiyooki, Hachimura Satoshi, Takahashi Yoshimasa, Takahashi Kyoko, Kaminogawa Shuichi, Hosono Akira	4. 巻 2022
2. 論文標題 Cecal Patches Generate Abundant IgG2b-Bearing B Cells That Are Reactive to Commensal Microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Immunology Research	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/3974141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 岡田開, 津田真人, 細野朗	4. 巻 51 (2)
2. 論文標題 小腸と大腸の腸管関連リンパ組織の抗体産生能と抗体結合性の比較	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 無菌生物 Journal of Germfree Life and Gnotobiology	6. 最初と最後の頁 39-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi K, Sugi Y, Nakano K, Kobayakawa T, Nakanishi Y, Tsuda M, Hosono A, Kaminogawa S.	4. 巻 4
2. 論文標題 Regulation of gene expression through gut microbiota-dependent DNA methylation in colonic epithelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunohorizons	6. 最初と最後の頁 178-190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/immunohorizons.1900086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 津田真人, 細野朗.	4. 巻 50
2. 論文標題 小腸と大腸の腸管関連リンパ組織B細胞の抗体発現と血清中抗体量の相関における腸内細菌の関与.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 無菌生物 Journal of Germfree Life and Gnotobiology	6. 最初と最後の頁 88-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukatsu S, Horinouchi H, Nagata S, Kamei R, Tanaka D, Hong W, Kazami Y, Fujimori M, Itoh K, Momose Y, Kasakura K, Hosono A, Kaminogawa S, Hanazawa S, Nakanishi Y, Takahashi K.	4. 巻 226
2. 論文標題 Post-translational suppression of the high affinity IgE receptor expression on mast cells by an intestinal bacterium.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imbio.2021.152056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古川凱斗, 津田真人, 宇野直哉, 岡田開, 八村敏志, 細野朗.
2. 発表標題 フラクトオリゴ糖のIgA産生増強作用におけるCD4+ T細胞の関与.
3. 学会等名 第17回日本食品免疫学会学術大会 (JAFI 2021) (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田隆, 中田一彰, 津田真人, 細野朗, 高橋恭子.
2. 発表標題 大腸上皮で高発現するmiRNAの同定と機能解析.
3. 学会等名 第17回日本食品免疫学会学術大会 (JAFI 2021) (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細野朗, 津田真人, 岡田開, 大崎雄介, 白川仁, 駒井三千夫.
2. 発表標題 オチン欠乏が腸管免疫系を介した免疫修飾に關与する.
3. 学会等名 第55回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津田真人, 細野朗.
2. 発表標題 小腸と大腸の抗体産生機構における腸内細菌による調節作用.
3. 学会等名 第55回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会シンポジウム 「腸内細菌が宿主免疫系に与える影響-最近の話題」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川凱斗, 津田真人, 宇野直哉, 岡田開, 大川真由, 田代桃佳, 八村敏志, 細野朗.
2. 発表標題 フラクトオリゴ糖の経口摂取は盲腸リンパ節を介してIgA産生を誘導する.
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会(オンライン開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田開, 津田真人, 小島菜月, 石濱史也, 溝口拓海, 服部菜々子, 森清彰, 高橋宜聖, 八村敏志, 細野朗.
2. 発表標題 盲腸リンパ節B細胞の抗体発現における腸内細菌の影響.
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会(オンライン開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴崎涼太, 古川凱斗, 津田真人, 高野智弘, 戸塚護, 八村敏志, 細野朗.
2. 発表標題 食品成分, 腸内細菌および腸内細菌代謝産物の共刺激がIgA産生に与える影響.
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会学術集会(誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇野直哉, 津田真人, 岡田開, 細野朗.
2. 発表標題 フラクトオリゴ糖による腸管および血清中IgA産生亢進と盲腸リンパ節の濾胞性ヘルパーT細胞の調節.
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会学術集会 (誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田開, 津田真人, 細野朗.
2. 発表標題 小腸と大腸の腸管関連リンパ組織の抗体産生能と抗原結合性の比較.
3. 学会等名 第54回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細野朗
2. 発表標題 無菌動物を利用した食品機能性研究と同実験施設の管理.
3. 学会等名 第54回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会シンポジウム 「無菌生物の技術と応用」 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田大貴, 岡田開, 古川凱斗, 増山大雅, 竹ノ内優介, 川上里奈, 加藤仁美, 津田真人, 細野朗.
2. 発表標題 ピオチンが腸管免疫系の細胞応答に与える影響.
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴崎涼太, 古川凱斗, 津田真人, 高野智弘, 王イバイ, 戸塚護, 八村敏志, 細野朗.
2. 発表標題 クルクミンと腸内細菌および短鎖脂肪酸の共刺激がパイエル板細胞応答を修飾する.
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 細野朗	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 474
3. 書名 食品免疫学事典 (日本食品免疫学会 編集)	

1. 著者名 津田真人, 細野朗	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 325
3. 書名 落合邦康監修: ヒト常在細菌叢と生理機能・全身疾患	

〔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
研究分担者	津田 真人  (TSUDA Masato)  (50525681)	日本大学・生物資源科学部・講師   (32665)	



6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	高橋 恭子  (TAKAHASHI Kyoko)  (70366574)	日本大学・生物資源科学部・教授     (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関