

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500957

研究課題名(和文)食生活の偏りが自己免疫疾患やアレルギー疾患に及ぼす影響と腸内菌叢の関わりについて

研究課題名(英文)Effects of deviated food habit on autoimmune and allergic diseases, and their association with intestinal microflora

研究代表者

有持 秀喜 (ARIMOCHI, Hideki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：30311822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：免疫系が関与する疾病が食生活の乱れによってどのような影響を受けるのか、そして症状の悪化に腸内菌叢の変化が関与するのかどうかを明らかにする目的で、リウマチ様関節炎および1型糖尿病のモデルマウスに高脂肪高蔗糖食を与えた。しかし、今回の実験系ではこれらの疾患に対して促進する効果は見られなかった。また、自己炎症性疾患の原因遺伝子として同定された変異遺伝子X'を欠損するマウスに高脂肪食を与え、炎症状態に影響が見られるかどうかを検討したが、血清中の炎症性サイトカイン量は影響を受けなかった。以上の結果から、少なくとも今回の実験系では食事成分の変化が免疫関連疾患の発症に影響を与えないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：To determine the correlation between deviated food habit and autoimmune diseases, and whether the wrong effects of food change on the disease were associated with the intestinal microflora, DBA1/J and NOD mice, which are model mice for rheumatism arthritis and type1 diabetes, respectively, were fed with high fat glucose diet (HFGD). Both strains of mice treated with HFGD showed less incidence and degree of illness than the control diet group, suggesting that HFGD does not have the enhancing effect for the diseases in these experiment models. The genetically modified mice, which are deleted a specific gene related to an autoimmune disease, were fed with high fat diet (HFD), and monitored serum levels of inflammatory cytokines. The cytokine levels were higher in the knockout mice than WT mice, however, HFD did not show any effects on the cytokine levels in both group of mice. These results indicated the change of food could not affect the illness in the experimental models used here.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：自己免疫疾患 自己炎症性疾患 高脂肪高蔗糖食 コラーゲン誘発関節炎 自然発症型1型糖尿病 腸内菌叢

1. 研究開始当初の背景

現在の日本では、食生活が従来の日本型からアメリカ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肪、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、乱れが起きているのと同時に、アレルギー疾患や癌、炎症性腸疾患など、免疫系が重要な役割を果たしている病気が増加している。このような病気の発症には原因遺伝子などの内的要因と衛生環境やストレスなどの外的要因が複雑に絡み合っていると考えられ、食生活の乱れによる腸内環境の悪化が免疫系のバランスを崩すことはその原因の一つと考えられている。食事成分を消化、吸収する腸管は、腸管上皮細胞どうしを強固に結びつけ、粘液を分泌することで食物由来の異物や腸内菌の侵入を防ぐ仕組みを発達させている。腸内菌は、腸管内に常在菌として住み着き、優勢菌も少数菌も相互に抑制しあいつつ、一定の菌数を保っている。500種、10兆個存在している腸内菌はヒトに必要なビタミンや大腸粘膜の栄養源となる短鎖脂肪酸を合成し、ヒトとの間に共生関係を保っている。さらに、腸管は全身のリンパ球の60%以上が集中する最大の免疫器官であり、腸上皮細胞に囲まれた上皮間リンパ球、パイエル板、粘膜固有層などが相互に関連して機能している。そして、腸内菌が全く存在しない無菌動物では腸管免疫の重要な器官であるパイエル板が小さく、腸液中に分泌されるIgAの産生も著しく低い。腸管内に細菌が住み始めると正常な免疫系が作り上げられることが知られている。また、腸内菌によって代謝産物として産生されるATPが炎症性サイトカインの産生に関わるTh17を分化誘導することなどから、免疫系の正常な発達、維持には腸内菌が重要な役割を果たしていることが示唆されている。

ヒトの腸内菌叢は食事、加齢、運動、スト

レス、感染症、抗生物質の服用など様々な要因に影響を受ける。同じ遺伝的背景を持つ一卵性双生児であっても、食生活が異なる環境で暮らすと腸内菌叢の構成が違っていることが分かっている。そして外的要因による腸内菌叢の変化は免疫に関する疾病の病状を変化させる場合がある。免疫に重要な役割を果たすCD4陽性Tリンパ球は抗原刺激の種類によりTh1またはTh2という2種類の細胞に分化する。両細胞のバランスの偏りが自己免疫疾患やアレルギーの発症に寄与していると考えられている。ヨーグルトに含まれているラクトバチルス菌はTh1細胞を誘導することでアレルギーを抑制すると考えられており、非アレルギー児にはアレルギー児に比べてこの菌が多いことが報告されている。また、関節炎を起こすマウスに抗生物質を投与すると関節炎が抑えられることが知られている。つまり、食生活は腸内菌叢に変化を与える重要な要因であり、腸内菌と免疫の間には密接な関係があることが示唆される。しかし、食生活の偏りが腸内菌叢の乱れを引き起こし、免疫系のバランスを崩していると推測されるものの、食生活の偏りや腸内菌叢の変化がどのように免疫疾患の発症に寄与しているかの分子基盤は明らかではない。

申請者らのグループはこれまでの研究で、高サイトカイン血症を起こす自己炎症性疾患の患者からその原因遺伝子の同定に成功している。しかし、生体内におけるこの遺伝子産物の炎症誘導に対する役割や機序などは不明のままであり、今後の検討が必要である。

2. 研究の目的

本研究では食生活の乱れのうち、脂肪と蔗糖の過剰摂取がどのように腸内菌叢に影響を与え自己免疫疾患や自己炎症性疾患の発症に寄与するかを解明することを目的とする。そのため、1型糖尿病やコラーゲン誘発関節炎のモデルマウスに高脂肪食、高糖分食

を摂取させ、発症開始時期や症状の程度などに変化がみられるのかどうかを調べる。これらの病状を悪化させる現象が見られた場合、腸管内容物中や腸粘膜中の腸内菌叢の関連性を明らかにする。さらに、抗生物質処理などによって腸内菌叢を改変することで病状に変化がみられるのかどうかを検討する。血清や各臓器についてサイトカイン産生量、リンパ球の分布・活性化の程度が変化するかを明らかにする。また、ヒトの自己炎症性疾患の原因遺伝子として同定された変異遺伝子 X' のホモ欠損するマウスを作製して高脂肪食、高糖分食を摂取させ、上記した項目について検討する。これらの実験を行うことで、脂肪、糖分の過剰摂取が免疫疾患の発症、症状の程度に変化を与えるのかどうか、その変化に腸内菌叢の変化がどのように関与しているのかを生体、細胞、および分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) リューマチ様関節炎

7週齢の雄の DBA/1J マウスを6匹購入し、3匹ずつ2群に分けて普通食（オリエンタル酵母工業、MF diet）および高脂肪高蔗糖食（オリエンタル酵母工業、F2HFHSD diet、脂肪30%、ショ糖20%含有）を与えて飼育した。飼育開始から3日後および24日後に完全フロイントアジュバントで懸濁した牛由来の2型コラーゲンをマウス1匹あたり200 μ g皮下投与し、関節炎を誘発させた。関節炎のスコアは、変化なしを0点、四肢に指の腫れなどが見られたら1点、軽い腫れや2つ以上の指に腫れが見られたら2点、顕著な腫れが見られたら3点、最大の腫れが見られたら4点とし、最大16点で点数化した。観察は週に2回以上行った。

(2) 1型糖尿病

自己免疫疾患である1型糖尿病のモデルマウスを用いて実験を行った。4週齢のNODマウス（オス13匹、雌17匹）を2群に分け、

普通食（MF diet）または高脂肪高蔗糖食（F2HFHSD diet）を与えて飼育した。このマウスは1型糖尿病を自然発症する。尿糖は尿糖試験紙（テルモ、新ウリエース Ga）で定性的観測を行い、血糖値はグルコース・パイロット（テクニコンインターナショナル）を用いて定量的に測定を行った。観察は週に2回以上行った。

(3) 遺伝子 X 欠損マウス

ヒトの自己炎症性疾患の原因遺伝子として同定された変異遺伝子 X' をホモ欠損するマウスを作製し、5週齢になった時点で欠損マウスおよび野生型マウスに高脂肪食（オリエンタル酵母工業、HFD-60 diet、脂肪60%含有）もしくは普通食を与え、体重や炎症状態に影響が見られるかどうかを検討した。炎症状態は血清中のサイトカイン量をELISAで測定したり、内臓脂肪組織中のサイトカイン遺伝子発現量を調べたりすることで検討した。観察は週に2回以上行った。

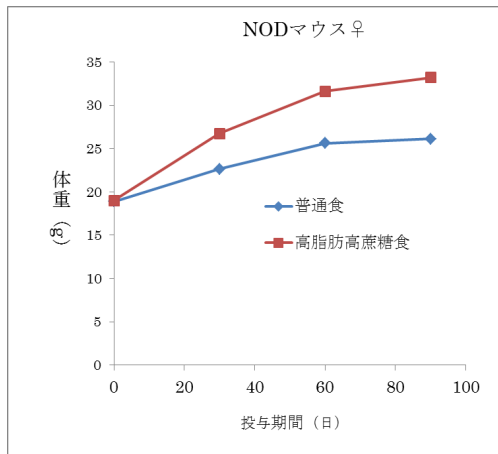
4. 研究成果

(1) リューマチ様関節炎

飼育開始から26日目に高脂肪高蔗糖食投与群の平均体重は29.8gとなつて普通食投与群の約1.3倍に増加し、その後も体重の差は継続して観察された。関節炎は普通食投与群では26日目から、高脂肪高蔗糖食投与群では32日目から発症が見られ、高脂肪高蔗糖食投与群の方が遅かった。最終的な関節炎発生率も普通食投与群では3匹中3匹が発症したのに対し、高脂肪高蔗糖食投与群では3匹中2匹しか発症しなかった。また、関節の腫れをスコア化した関節炎スコアでも普通食投与群では最大が平均値で2.83であったのに対し、高脂肪高蔗糖食投与群では1.50であった。これらの結果より高脂肪高蔗糖食は2型コラーゲン投与によるDBA/1Jマウスの関節炎に対し、少なくとも促進する効果はないと考えられた。

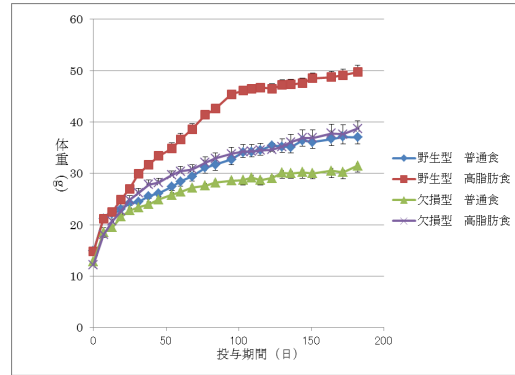
(2) 1型糖尿病

高脂肪高蔗糖食群ではオス、メスとも実験開始から1か月で体重増加が普通食群よりも高い傾向を示し、3か月後には統計学的にも有意な増加となった。普通食群において1型糖尿病の自然発症はメスでは生後16週齢から見られ始めたが、オスでは44週齢に初めて見られた。しかし、高脂肪高蔗糖食群では1型糖尿病の発症はメスでは32週齢から見られ始め、オスでは実験期間内に発症が見られなかった。70週齢の時点での発症率は、メスの普通食群が75%（8匹中6匹発症）であるのに対し、高脂肪高蔗糖食群では33.3%（9匹中3匹発症）であった。オスの場合、普通食群では発症率が28.6%（7匹中2匹発症）であったが、高脂肪高蔗糖食群では0%（6匹中0匹発症）であった。これらの結果より高脂肪高蔗糖食はNODマウスの自然発症型1型糖尿病に対し、少なくとも促進する効果はないと考えられた。

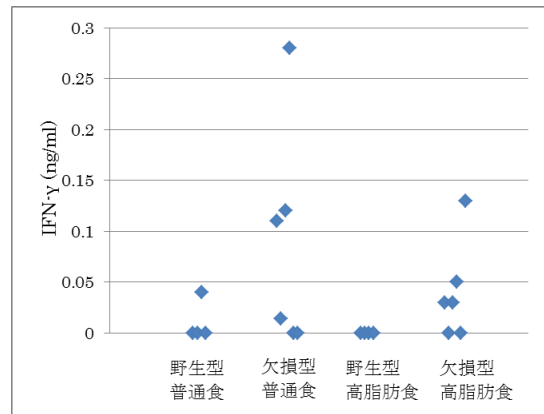


(3) 遺伝子 X 欠損マウス

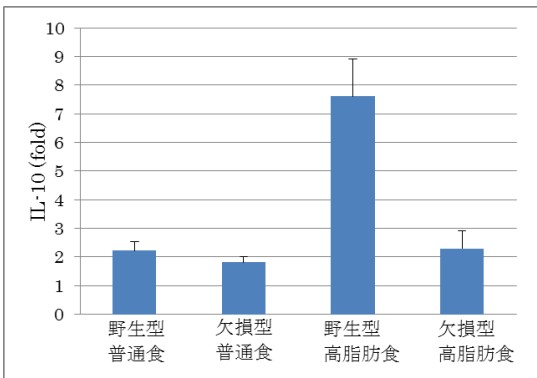
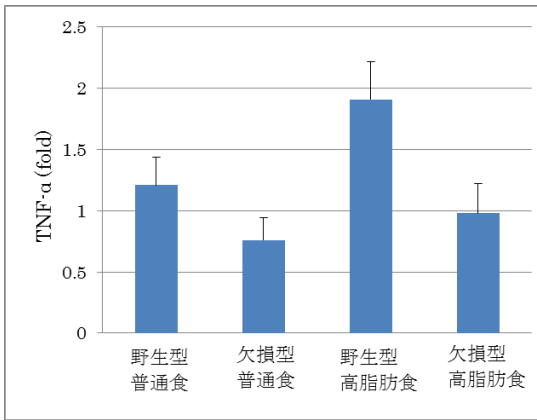
雄性の野生型および遺伝子欠損マウスに高脂肪食を与えると、どちらのマウスでも実験開始から1か月で体重増加が普通食群よりも高い傾向を示し、3か月後には統計学的にも有意な増加となった。



6か月後にマウスを屠殺し、血清中の炎症性サイトカインを定量したところ、普通食群では野生型マウスの4匹中1匹に、欠損マウスの6匹中4匹にサイトカインが確認できたのに対し、高脂肪食群では野生型マウスの4匹中0匹に、欠損マウスの6匹中4匹にサイトカインが確認された。



脂肪組織中で炎症性サイトカインであるTNF- α 、および抗炎症性サイトカインであるIL-10の発現量を調べたところ、どちらのサイトカインも高脂肪食を与えた野生型マウスで統計学的に有意な上昇が見られたが、他の群のマウスでは有意な差は見られなかった。



これらの結果より高脂肪食は今回用いた遺伝子欠損マウスの炎症状態誘導に対し、少なくとも促進する効果はないと考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有持 秀喜 (ARIMOCHI, Hideki)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号：30311822

(2) 研究分担者

片岡 佳子 (KATAOKA, Keiko)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号：40189303

(3) 連携研究者

()

研究者番号：