

令和元年6月12日現在

機関番号：32670

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16290

研究課題名(和文)母マウスの食事誘導性肥満が仔マウスのアレルギー病態に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of maternal diet-induced obesity on postnatal allergy

研究代表者

今井 敦子 (IMAI, Atsuko)

日本女子大学・家政学部・助教

研究者番号：00580086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：母マウスの高脂肪食(HF食)による食餌誘導性肥満(DIO)が出生子に及ぼす影響を検討した。仔マウス若齢期において、体重は有意に高値、老齢期では逆に有意に低値であった。さらに、加齢によると考えられる体重減少が早期に生じた。免疫機能は、脾臓細胞中の加齢関連T細胞比率が有意に増加、NKT細胞比率は低下した。一方で、抗原特異的抗体価(抗OVA-IgG, IgE)への影響は観察されなかった。また仔マウスにもHF食を摂取させることにより、脂肪肝炎(炎症細胞浸潤、線維化)が高度に生じた。以上の結果より、母マウスのDIOは仔マウス老齢期における免疫機能の加齢変化を促進し、仔の炎症病態に影響することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「将来の健康や特定の病気へのかかりやすさは、胎児期や生後早期の環境の影響を強く受けて決定される」というDOHaDの概念から、健康寿命の進展及び病気の予防のためには、胎生期や生後早期からの対策が求められる。しかしながら、母親の健康状態が出生子に及ぼす影響の理解は不十分である。本研究では妊娠中の食餌誘導性肥満が出生子マウスの加齢および炎症病態に影響を及ぼす可能性を示した。動物モデルを用いた本研究の結果はすぐにヒトに外挿できるものではないが、栄養状態と免疫機能の関りを追求することは超高齢社会で増加する疾患の理解、栄養療法の発展に有用である。

研究成果の概要(英文)：This study analyzed the effect of a maternal diet induced obesity (DIO) on aging process in offspring. The body weights in offspring from dam exposed to a high-fat (HF) diet were significantly higher in the early stage of life but then became lower in the later stage of life. The week the mice reached their maximum body weight was earlier in offspring from dam exposed to a HF diet. Regarding immunological parameters, senescence-associated T cells were increased, and natural killer T cells were decreased by the effect of both maternal and offspring HF diet. The effect of maternal HF diet on the OVA-specific IgG and IgE titers were not observed. Non-alcoholic fatty liver disease was much more severe in offspring from dam exposed to a HF diet. In particular, lobular inflammation and fibrosis were prominent by the effect of offspring HF diet. These results suggest that a maternal DIO may accelerate aging process and influence on inflammatory pathophysiology in offspring.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：母子栄養 高脂肪食 加齢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「将来の健康や特定の病気へのかかりやすさは、胎児期や生後早期の環境の影響を強く受けて決定される」という DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) の概念が提唱されている。言い換えれば、健康寿命の進展及び病気の予防のためには、胎生期や生後早期からの対策が必要であると言える。現在の日本では、若年女性での脂質エネルギー比率の増加、晩婚化や生殖医療技術の進歩による妊娠年齢の高年齢化が進んでいることが報告されている。加齢による肥満(内臓脂肪蓄積)は母体の糖代謝異常や動脈硬化を伴い慢性炎症の基盤を持つことで、妊娠高血圧症候群や妊娠糖尿病などの周産期合併症を増加させると考えられている。さらに世界的にみても妊娠年齢女性の3割以上が肥満もしくは過体重であるとの調査報告がある。現在のこの状況は、40~50年先の将来の疾病構造に大きく影響すると考えられるが、その影響は十分に明らかにされていない。一方、壮年期から高齢期にかけて増加する肥満、糖尿病、動脈硬化症、癌、さらには近年高齢者の健康障害として問題になっているサルコペニアなどの慢性疾患は、先進国のみならず発展途上国も含めて全世界的に急増しており、世界保健機関(WHO)は、生活習慣病や癌を総称して「非感染性疾患(non-communicable disease: NCD)」と定義し、新たな重要課題と位置づけている。多くのNCDは加齢とともに有病率が上昇するため、超高齢社会であるわが国においては、罹患者の生活の質(Quality of life: QOL)向上、健康寿命の延伸、医療経済的側面からも取り組まれるべき喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究では妊娠中の肥満が出生仔マウスの免疫・アレルギーの炎症病態に及ぼす影響について、高脂肪食による食餌誘導性肥満(diet induced obesity; DIO)モデルマウスを用いて解析を行った。特に仔マウスを老齢期まで飼育し、免疫機能および代謝機能の加齢変化に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物および実験飼料

母マウスとして C57BL6/J mice (CLEA Japan, Inc.)を用い、さらにこのマウスの交配から生まれた仔マウスを実験に用いた。母マウスには交配1週間前から AIN-93G 変形高脂肪食(high fat diet; HF食、脂肪エネルギー比率56%)または AIN-93G (control; CON食、17%)を摂取させた(Research Diets, Inc.)。

(2) 実験プロトコル

仔マウスは離乳まで出産した母マウスと同じケージで飼育して授乳させた。母マウスは9週齢から妊娠前、妊娠期間、授乳期を通じて同じ実験食を摂取した。仔マウス3週齢で離乳した。離乳に際し、母マウス HF食摂取群から生まれた仔マウスと、母マウス CON食群から生まれた仔マウスをそれぞれ2群に分け、HF食または CON食を摂取させ、計4群に分けた。仔マウスの群の名称は母マウス CON食摂取/仔マウス CON食摂取の群を CON/CON群とした。以下、CON/HF群、HF/CON群、HF/HF群とした。67および69週齢で OVA 免疫し、1週間後の70週齢で解剖した。70週齢で解剖した仔マウスを老齢マウスとした。若齢コントロールとして8週齢のマウスを実験に用いた。9および11週齢で OVA 免疫し、12週齢で解剖した(young群)。加齢による変化の検討には老齢マウスの CON/CON群と young群を比較した。本研究は日本女子大学実験動物委員会による承認を得て行った(承認番号:第II 15-6)。

(3) OVA 免疫方法

老齢マウス67週齢、若齢マウス9週齢において、OVA (200 µg ovalbumin, Sigma) を aluminum potassium sulfate (Alum; 4 mg/0.5 ml in phosphate-buffered saline; Sigma)と共に腹腔内投与して免疫した。老齢マウス69週齢、若齢マウス11週齢で初回と同様に追加免疫を行った。追加免疫1週間後の70週齢、または12週齢に解剖した。免疫方法および抗体価の測定は老齢マウスの OVA 特異的免疫機能を評価した先行研究の方法に基づいて行った[1]。

(4) フローサイトメトリーによる脾臓細胞表面抗原解析方法

脾臓細胞浮遊液と monoclonal antibodies[CD3e (145-2C11); CD4(GK1.5); CD44 (IM7); CD62 L (MEL-14); PD-1 (RMP1-30); NK1.1 (PK136)]を反応させた。Flow cytometer 測定は Gallios instrument (Beckman Coulter Co., Ltd.)を用い、測定データは Kaluza 1.2 software (Beckman Coulter Co.)により解析した。

(5) 肝臓の組織学的観察と非アルコール性脂肪肝疾患の評価

肝臓の組織学的観察のため、10%中性緩衝ホルマリンに浸漬して固定した。パラフィン包埋、HE染色、MT染色は札幌総合病理研究所(Sapporo, Japan)に委託した。NAFLDの病態について、脂肪蓄積、肝小葉の炎症、線維化を観察し、それぞれの項目を4段階または5段階のスケール(none =0, mild =1, moderate=2, severe=3 and very severe =4)で評価した。ヒト NAFLD の評価に用いられている steatosis, activity and fibrosis (SAF) score を一部改変して NAFLD severity を評価した[2]。

(6) 統計解析手法

本研究で得られたデータの解析には IBM SPSS 22 (日本 IBM(株))を用いた。加齢による影響(老齢マウスの CON/CON群と young群を2群間比較)について、正規性の検定には Kolmogorov-Smirnov test を用い、正規性が認められた指標は Student's t-test、非正規分布の

指標は Mann-Whitney U test を用いた。老齡マウスについて、母マウスの実験食と仔マウスの実験食の 2 要因の主効果は二元配置分散分析により解析した。交互作用が有意であった項目について、単純主効果の検定を行った。危険率 5 % 未満を統計学的有意とした。

4. 研究成果

(1) 体重推移

8 から 30 週齢において、母マウスの実験食の影響について、母 HF 食の影響により仔マウスの体重は有意に高値であった。しかしながら、中齡期から老齡期に相当する 54 ~ 66 週齢では母 HF 食摂取の影響によりむしろ有意に低値であった (Figure1)。

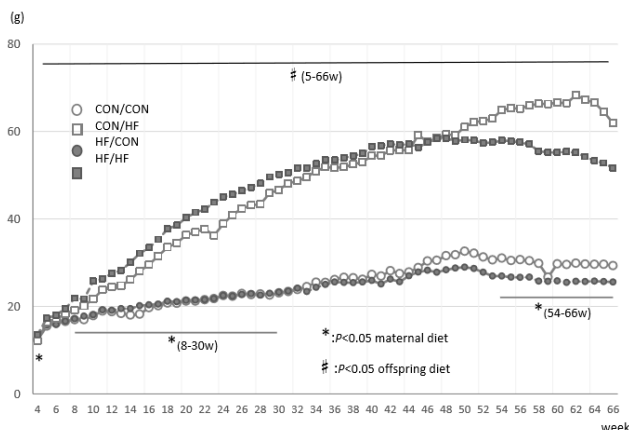


Figure1 Time course of body weight changes.

すなわち、母マウス HF 食が仔マウスの体重に及ぼす影響はライフステージの前半と後半で異なっていた。加齡マウスではすべての群で観察期間中に加齡に伴うと考えられる体重減少が生じたが、体重減少に転じる前の各マウスの最高体重に達した週齢は、母 HF 食の影響により有意に早まった (Figure2)。

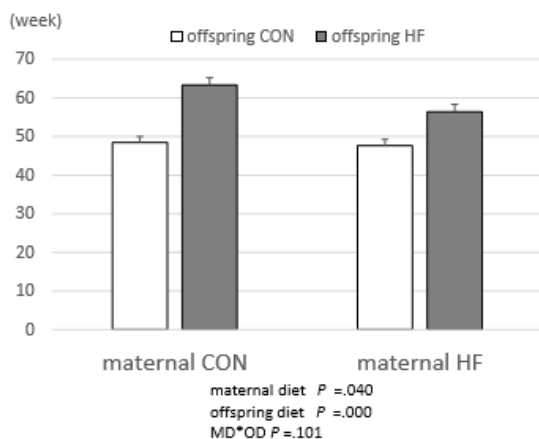


Figure2 Week of when maximum body weight was reached.

(2) 血清アディポカイン濃度

血清アディポカイン濃度について、加齡の影響により、レプチン、アディポネクチンともに老齡 CON/CON 群が young 群に対して有意に高値であった。老齡マウスにおいて、血清レプチン、アディポネクチン濃度は母マウス HF 食の影響により有意に低下した。

(3) 免疫学的指標

OVA 特異的 IgG 抗体価

加齡の影響について、IgG 抗体価は老齡 CON/CON 群は young 群に対して有意に低値、IgE 抗体価は有意に高値であった。

老齡マウス群間での検討において、IgG、IgE 共に仔マウス HF 食摂取により低下した。母マウス HF 食摂取の影響は認められなかった。

フローサイトメトリーによる T 細胞表面抗原解析

加齡の影響により、老齡 CON/CON 群は naïve/memory 比、NK 細胞比率が young 群に対して有意に低下した。一方で、PD-1+CD44^{high}CD62^{Low} (memory phenotype, MP)CD4+T 細胞と NKT 細胞の細胞比率は CON/CON 群において有意に増加した。

老齡マウスでの検討において、母マウスおよび仔マウス HF 食の影響により PD-1+ MP CD4+T 細胞比率は有意に増加、NKT 細胞比率は有意に低下した。

(4) 肝臓の組織学的観察と非アルコール性脂肪肝疾患の評価 (Table 2)

肝臓の組織学的観察

各群における肝臓の組織学的観察から得られた所見を解析した。加齢の影響により、CON/CON 群の肝組織は脂肪滴の蓄積や肝小葉への炎症性細胞浸潤は認められないものの、軽度の線維の増加が認められた。CON/HF 群では、重度の脂肪滴の蓄積が観察された。HF/CON 群では、脂肪滴蓄積は認めないものの、中程度の肝小葉への炎症細胞の浸潤と線維化が認められた。HF/HF 群は軽度の脂肪滴蓄積を認め、さらに高度の肝小葉への炎症細胞浸潤と線維化が生じていた。

NAFLD の評価

非アルコール性脂肪肝疾患の評価は SAF スコアを調整した方法で行った。

仔マウス CON 食群 (CON/CON 群、HF/CON 群) は脂肪肝を生じていなかった。しかし HF/CON 群はわずかに肝小葉への免疫細胞浸潤をみとめ、中等度の線維化が起っていた。

仔マウス HF 食群 (CON/HF 群、HF/HF 群) において、HF/HF 群は CON/HF 群より脂肪肝が軽度であった。一方で、肝小葉への炎症細胞浸潤と線維化は HF/HF 群が CON/HF 群に対して強く観察された。

以上の結果より、妊娠中の HF 食摂取による肥満は出生仔マウスの加齢変化を促進し、老齢期の免疫・アレルギー病態を変化させることが示された。老齢期の免疫・アレルギー病態の変化は高齢者に多い疾患を悪化させる可能性があり、更なる検討が必要である。

引用文献

- [1] Wakabayashi A, et al. Induction of immunological tolerance by oral, but not intravenous and intraportal, administration of ovalbumin and the difference between young and old mice. *J Nutr Health Aging* 2006;10(3):183-91.
- [2] P.Bedossa, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*, 2012;56(5):1751–1759.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Imai A, Fujimoto E, Tamura K, Utsuyama M, Sato K. A maternal high-fat diet may accelerate adipo-immunologic aging in offspring. *Life Sciences*, 219:100-108, 2019, doi: 10.1016/j.lfs.2019.01.008.

Imai A , Fujimoto E, Sato K. The influence of LPS-induced maternal inflammation on postnatal collagen-induced arthritis. *Inflammation*. 41(5):1842-1851, 2018, doi: 10.1007/s10753-018-0827-2.

田村佳歩、今井敦子、藤本絵香、宇津山正典、佐藤和人. 老齢マウスにおける高脂肪食摂取が代謝・免疫機能に与える影響 . *日本病態栄養学会誌* . 21(3), 397-409, 2018

Imai A , Sato K, Fujimoto E, Sato K. Induced maternal inflammation promotes leptin production in offspring but does not improve allergic symptoms in mouse model of allergic rhinitis. *Heliyon*. 3(6): e00327, 2017, doi: 10.1016/j.heliyon.2017.e00327.

〔学会発表〕(計 2 件)

今井敦子 他 , 母マウスの高脂肪食摂取による出生仔への影響 ~ 長期飼育による検討 , 第 72 回日本栄養・食糧学会大会 , 2019

今井敦子 他 , 母マウスの高脂肪食摂取が出生仔の脂肪組織・免疫機能に及ぼす影響 ~ 83 アドレナリン受容体刺激による検討 , 第 20 回日本病態栄養学会年次学術集会 , 2017

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。