

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07609

研究課題名(和文)長鎖脂肪酸による自然リンパ球3型の活性化を介したアトピー性皮膚炎発症機構の解明

研究課題名(英文) Long-chain fatty acids are associated with the pathogenesis of atopic dermatitis via induction of inflammatory ILC3s

研究代表者

菅野 雅元 (KANNO, Masamoto)

広島大学・医系科学研究科(医)・名誉教授

研究者番号：40161393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：今まで、アトピー性皮膚炎(AD)および、多くのアレルギー疾患は、2型免疫反応として教科書に記述されている。免疫系の入り口・自然免疫系の自然リンパ球(ILCs)細胞群の中でも、2型のILC2が重要と言われている。しかし、ヒトのコホート研究・母乳のメタボローム解析から始まった、本研究により、我々が確立したAD発症マウスモデルにおいて、その前段階としてILC3(3型自然リンパ球)の活性化が重要であることがわかった。さらに乳幼児期に摂取する母乳栄養(長鎖飽和脂肪酸)、消化管免疫細胞(ILC3)の活性化、消化管から皮膚への細胞移行が起きており、その結果としてAD発症が起きていることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まで、ADおよび多くのアレルギー疾患は、2型免疫反応(主にTh2細胞の関与)として教科書にも書かれている。免疫系の入り口である自然免疫系のILC細胞群の中でも、一般的には2型のILC2が重要と言われている。しかし、今回の我々のマウスAD発症マウスモデルにおいて、その前段階としてILC3(3型自然リンパ球)の活性化が起きていることがわかった。今後、ADを含むアレルギー疾患の解析・治療において、より自然免疫系に重きを置かれることが重要になると考えられる。また、乳幼児期に摂取する栄養が、成長した後の免疫反応(アレルギー疾患発症など)に大きな影響を及ぼしている点がさらに明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： Based on a cohort study of atopic dermatitis (AD), we find the presence of DAMPs activity in the mother's milk. By non-targeted metabolomic analysis, we identify the long-chain saturated fatty acids (LCSFA) as a biomarker DAMPs (+) breast milk samples. Similarly, a mouse model in which breastfed offspring are fed milk high in LCSFA show AD onset later in life. We prove that LCSFA are a type of DAMPs, which initiate a series of inflammatory events in the gut involving type 3 innate lymphoid cells (ILC3s). A remarkable increase in inflammatory ILC3s is observed in the gut, and the migration of these ILC3s to the skin may be potential triggers of AD. Gene expression analysis of ILC3s reveal upregulation of genes that increase ILC3s and chemokines/chemokine receptors. Even Rag1 knockout mice fed a high- LCSFA milk diet develop eczema, accompanied by increased gut ILC3s. We also present that gut microbiota of AD-prone PA milk-fed mice is different from non-AD OA/ND milk-fed mice.

研究分野：免疫学

キーワード：アトピー性皮膚炎 自然リンパ球 DAMPs 長鎖飽和脂肪酸 アレルギー 自然免疫系

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎 (AD) は、複雑な疾患で、臨床的にも、免疫学的にも、数種類のサブタイプに分類できるという報告がされている。また、母乳栄養は、乳幼児の発育に関しては、良い効果を示すことは、わかっているが、母乳栄養とアトピー性皮膚炎発症に関しては、賛成 (母乳栄養が AD 発症予防)、反対 (母乳栄養が AD 発症誘導・促進) の両方の論文が報告されている。1), 2) 今まで、免疫学的には、AD はアレルギー疾患という括りで考えられてきており、つまり 2 型免疫反応 (特に Th2 細胞による 2 型サイトカイン産生) が重要な役割を果たしており、その結果として IgE 抗体産生上昇、皮膚の湿疹病変などの AD 特有の症状を呈するようになると考えられてきた。3) しかし、現在の免疫学では、免疫系の入り口である自然免疫系が重要であることは論を待たない。しかし、「AD 発症に自然免疫系細胞がどのように関与しているのか?」、「AD 発症に栄養・母乳中のどのような成分が関与して、入り口の自然免疫系に影響を及ぼしているのか?」と言った質問には、十分に答えられていなかった。

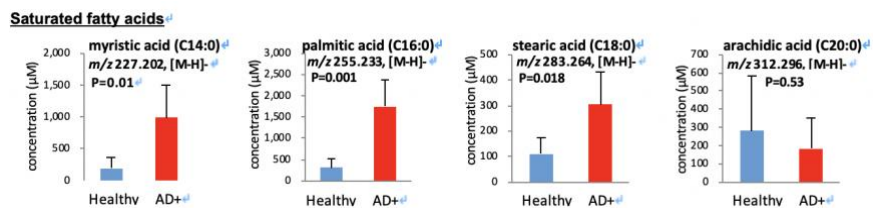
2. 研究の目的

以前の我々の研究で、自然免疫系を活性化する DAMPs 活性のアッセイ系 (THP-1 細胞を用いる) で、母乳中の DAMPs 活性を測定したところ、いくつかの AD 発症例の母乳中にその活性を検出した。そこで検出した DAMPs 活性の本体を突き止めるために、メタボローム解析を用いてその原因物質探索を行った。またその原因物質がどのような免疫担当細胞 (特に自然免疫系細胞) が関係しているのかを探索・同定し、AD 発症機序の解明につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

3.1: Non-targeted メタボローム解析:母乳中の DAMPs 活性分子として長鎖飽和脂肪酸群 (LCSEA: C12-18 程度) を同定。

母乳中の DAMPs 活性分子を検索・同定するために、質量分析器を用いた網羅的検討、non-targeted metabolomic 解析を行った。その結果、一般的な PCA 解析では 2 群間にほとんど差異が見出せなかったが、別の OPLS 解析では差の存在を検出できた。「non-AD 群」と、「DAMPs (+) AD (+) 群」の母乳中の物質の中で、遊離脂肪酸群、特に長鎖飽和脂肪酸群 (炭素長 C-14 から C-18 まで) が、2 群間で大きな差があることがわかった。それ以外の分子には、有意差は見られな



かった。(図 1) (図 1)長鎖飽和脂肪酸(C14:0 - C18:0 まで)が、2 群間で有意差あり

また、一部の一価長鎖不飽和脂肪酸 (C16:1, C18:1) にも差異が観察された。飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の比率を計算すると、「DAMPs (+) AD (+) 群」と「non-AD 群」では大きく異なっていた。

AD 発症モデルマウス実験系

皮膚を継時的に観察しやすいHR-1 マウス (Hair-less マウス、免疫系は正常) を用い、妊娠後期に、通常餌にパルミチン酸(C16:0)を添加した粉餌(パルミチン酸含量8%)を与え、出産させる(PA-milk 群・新生児)。同日に出産したコントロール群(正常餌)の新生児マウスと取り換え(Baby-swapping 実験)、出生から離乳までの期間(新生児期間)にパルミチン酸・餌を食べた母親からの母乳(PA-milk 群)を授乳させる。離乳後は、正常餌で飼育し、皮膚の状態を観察する実験系を作成した。つまり、母乳の影響だけが異なるマウス実験群のAD 発症実験系を確立した。PA-milk 群は、15週間経過後に、皮膚の湿疹病変が観察された。このPA-milk マウスの皮膚を検査すると、TEWL(経皮水分蒸散量)、皮膚水分量、が大きく変化していた、さらに、末梢血中 IgE 値が高値、抗原(OVA)-特異的 IgE が高値を示した。また皮膚の肥厚化、マスト細胞の集積・IgE の沈着などが観察され、ヒトのADによく似たマウスモデルが確立できた。(図2)

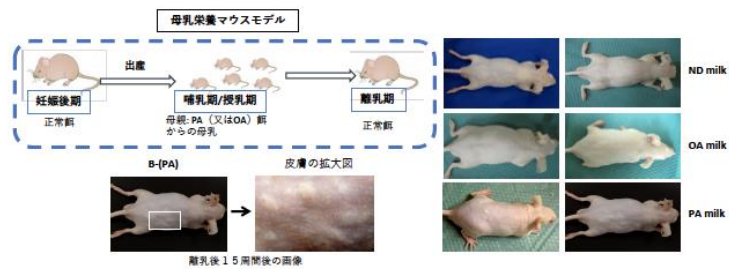


図2: HR-1マウスを用いたBaby-swapping実験系 (母乳栄養によるマウスAD発症モデル)

4. 研究成果

我々の母乳中の DAMPs 活性分子の検索結果は、最近発表されている論文の結論とも一致するので、我々のメタボローム解析結果が、同様の結論を示している。つまり、母乳中の LCSFA と AD 発症との強い相関を示している。4)

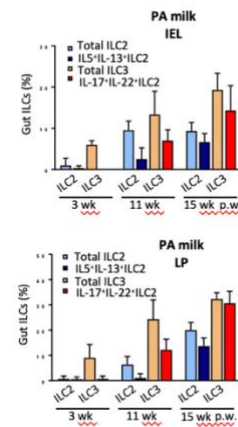
自然免疫系細胞、ILCs の関与 (特に ILC3)

我々は、HR-1 マウスを用いた実験系で、母乳と AD 発症のモデル系を確立し、その系を用いて、母親が摂取する LCSFA と子供の AD 発症を検討した。では、授乳期間中に PA-milk を摂取すると、なぜ15週間後に AD 様の皮膚湿疹病変を発症するのであろうか？ 獲得免疫系が欠損している RAG^{-/-}, HR-1 マウスを用いて、同様の PA-milk 投与群の実験を行うと、同様の症状が確認できるため(data not shown)、やはり、自然免疫系に焦点を絞ることが妥当であると考えた。摂取した母乳と最初に接する自然免疫系細胞群は、消化管粘膜に存在する細胞群である可能性が高いので、消化管の、lamina propria (LP: 腸管粘膜固有層) lymphocyte 群、および Intraepithelial lymphocyte (IEL: 腸管上皮内リンパ球) 群の中の自然免疫系細胞群に注目して解析を行なった。特に最近注目されている自然リンパ球群について解析を行った。

15週間後の AD 状態の結果であるが、ILC2 がサイトカイン IL-5, IL-13 の両方を産生する活性化 ILC2 細胞に、また、ILC3 も IL-17 と IL-22 の両方を産生する活性化 ILC3 細胞に変化していた。2型自然リンパ球が活性化し、2型サイトカインを産生する現象は、まさに教科書通りであるが、ILC3 自然リンパ球が全て IL-17/IL-22 サイトカイン産生細胞になっていることから、炎症が起きていることがわかる。

さらに、皮膚湿疹病変が発症する前の、11週目で、ILC2は活性化していないが、ILC3細胞は、すでに、約50%が常に活性化している現象を確認した。このことは、教科書的な2型自然リンパ球が活性化する前段階として、3型自然リンパ球の活性化現象が起きることを示していると考えられた。

図3: PA milk が消化管で ILC 細胞群の活性化を誘導する。
(LP および IEL の ILC2/ILC3 細胞のサイトカイン産生解析)



ILCs の消化管から皮膚への移動

では、母乳摂取により、消化管 ILC 細胞が活性化するイベントと (サイトカイン Double producer 細胞になる)、皮膚の湿疹病変とはどのような関係にあるのであろうか? 一般的に、自然リンパ球細胞は、Tissue-resident 細胞と考えられており、組織間を移動することに関しては、少々懐疑的ではあった。しかし、Adoptive-transfer 実験、さらに「光変換蛍光蛋白質 KiKG (UV 照射した部分の細胞だけ Green から Red へ変換する)」を発現するマウスを用いた実験で、消化管から皮膚へ移動することが確認された。5)、6) 現在までのところ、自然リンパ球 ILC が阻止期間を移動するという報告は無いと思われるので、初めての報告例になるかもしれないと考えている。

ILC3 の遺伝子発現プロファイル

この活性化する消化管 ILC3 細胞の遺伝子発言を網羅的に調べたところ、*Rorc*, *Id2*, *IL7r* などの発現が上昇しており、造血幹細胞、前駆細胞から ILC3 細胞が優位に分化・増殖し産生されるように遺伝子発現プログラムが変更している事が分かった。さらに細胞移動に必要なケモカイン受容体 *CXCR6*, *CCR6* の発現が上昇しており、皮膚で産生されるケモカイン *CXCL16*, *CCL20* に対して反応しやすい遺伝子プログラムになっていることなどが明らかとなった。これらの受容体やリガンドは、AD や乾癬で発現が上昇し、皮膚の炎症状態に寄与することがすでに報告されている。7)-9)

腸内細菌叢の解析

理研グループとの共同研究により、AD 発症モデルマウスの腸内細菌叢解析を行なった。(詳細は発表論文) 正常餌マウス (ND) とオレイン酸投与マウス (OA マウス) と比較して、AD 発症・パルミチン酸投与マウス (PA マウス) では、腸内細菌叢に変化が見られ、*Ruminococcus*, *Mucispirillum*, 未分類の *Desulfovibrionaceae* family、などが増加していることが観察された。

結論・作業仮説

LCSFA (パルミチン酸など) を含む餌を母親に摂取させ、その母乳で育った子供マウスは、皮膚の湿疹病変を含む典型的な AD 症状を呈した (乳幼児期の母乳中の LCSFA が影響する)。しかし、同じ餌をアダルトマウスに摂取させた場合には、少なくとも6ヶ月から1年程度、継続摂取しなければ、同様の AD 発症が起きないことから、いかに乳幼児期の摂取栄養が、その後の子供の AD 発症 (アレルギー疾患発症) に多大な影響がある事がわかる。

今回の研究から、主要なターゲットは消化管粘膜の自然免疫系細胞 ILCs であり、その中でも特に ILC3 が AD 発症のトリガーである可能性が高い。この ILC3 活性化および、消化管から皮膚への移動が、2型免疫反応を起こす細胞群 ILC2 の活性化を引き起こしていると思われる。

母乳中の栄養・LCSFAの摂取による、消化管のILC3細胞の活性化・変化には、遺伝子レベルで、幹細胞・前駆細胞からILC3への分化・増殖を促進するような変化が起きている事、さらに、腸内細菌叢も変化しており、摂取した母乳中のLCSFAと腸内細菌（および、その代謝産物）の関係が大いに注目される。

おわりに

・今まで、ADおよび多くのアレルギー疾患は、2型免疫反応（主にTh2細胞の関与）として教科書にも書かれている。免疫系の入り口である自然免疫系のILC細胞群の中でも、一般的には2型のILC2が重要と言われている。しかし、今回の我々のマウスAD発症マウスモデルにおいて、その前段階としてILC3（3型自然リンパ球）の活性化が起きていることがわかった。

・今後、ADを含むアレルギー疾患の解析・治療において、より自然免疫系に重きを置かれることが考えられる。

・また、乳幼児期に摂取する栄養が、成長した後の免疫反応（アレルギー疾患発症など）に大きな影響を及ぼしている点がさらに明らかとなった。

引用文献

- 1). Cushing AH, Samet JM, Lambert WE, et al. Breastfeeding reduces risk of respiratory illness in infants. *Am J Epidemiol.* 1998; 147: 863
- 2). Bergmann RL, Diepgen TL, Kuss O, et al. Breastfeeding duration is a risk factor for atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 205.
- 3). Akdis CA, Arkwright PD, Brügggen MC, et al. Type 2 immunity in the skin and lungs. *Allergy.* 2020; 75(7):1582
- 4). Hoppu U, Rinne M, Lampi AM, Isolauri E. Breast milk fatty acid composition is associated with development of atopic dermatitis in the infant. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41(3):335
- 5). Tomura M, Hata A, Matsuoka S, et al. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci Rep.* 2014; 12: 6030
- 6). Griswold SL, Sajja KC, Jang CW, Behringer RR. Generation and characterization of iUBC-KikGR photoconvertible transgenic mice for live time lapse imaging during development. *Genesis* 2011; 49: 591
- 7). Nowotschin S, Hadjantonakis AK. Use of KikGR a photoconvertible green-to-red fluorescent protein for cell labeling and lineage analysis in ES cells and mouse embryos. *BMC Dev Biol.* 2009; 9: 49.
- 8). Günther C, Carballido-Perrig N, Kaesler S, et al. CXCL16 and CXCR6 are upregulated in psoriasis and mediate cutaneous recruitment of human CD8+ T cells. *J Invest Dermatol.* 2012; 132: 626-34
- 9) Rafaels NM, Beck LA, Gao PS, et al. Variations in the CCL20 and CCR6 Genes are Associated with Atopic Dermatitis and Eczema Herpeticum in Populations of European and African descent. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2009; 123: S70.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 菅野雅元 Kong Weng-Sheng | 4. 巻 73 |
| 2. 論文標題 アトピー性皮膚炎と母乳中DAMPs（総説） | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科 (Clinical Immunology & Allergology) ISSN:1881-1930 | 6. 最初と最後の頁 186-194 |
| 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 無 |
| 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 Kong WS, Tsuyama N, Inoue H, Guo Y, Mokuda S, Nobukiyo A, Nakatani N, Yamaide F, Nakano T, Kohno Y, Ikeda K, Nakanishi Y, Ohno H, Arita M, Shimojo N, Kanno M. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Long-chain saturated fatty acids in breast milk are associated with the pathogenesis of atopic dermatitis via induction of inflammatory ILC3s. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 13109 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92282-0. | 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9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 5件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 KONG WengSheng and KANNO Masamoto et al. |
| 2. 発表標題 Long-chain saturated fatty acids in breast milk are associated with the pathogenesis of atopic dermatitis via inducing inflammatory ILC3s |
| 3. 学会等名 3rd International Sympojium of HiHA Project（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 KONG WengSheng and KANNO Masamoto et al. |
| 2. 発表標題 Long-chain saturated fatty acids in breast milk are associated with the pathogenesis of atopic dermatitis via inducing inflammatory ILC3s |
| 3. 学会等名 2nd International Conference on Lipoquality（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 KONG WengSheng and KANNO Masamoto et al. |
| 2. 発表標題 Long-chain saturated fatty acids in breast milk are associated with the pathogenesis of atopic dermatitis via inducing inflammatory ILC3s |
| 3. 学会等名 17th International Congress of Immunology 2019 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 KONG WengSheng and KANNO Masamoto et al. |
| 2. 発表標題 Long-chain saturated fatty acids in breast milk are associated with the pathogenesis of atopic dermatitis via inducing inflammatory ILC3s |
| 3. 学会等名 9th International DAMPs and Alarmins Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 菅野雅元 |
| 2. 発表標題 コホートからの免疫・アレルギー研究とNICUs (NeuroImmune Cell Units) |
| 3. 学会等名 第7回「神経と免疫を語る会」 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 菅野雅元 |
| 2. 発表標題 アトピー性皮膚炎と母乳：自然リンパ球と脂肪酸 |
| 3. 学会等名 第56回 日本小児アレルギー学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Y.Ohono, K.Suzuki, M.yamafuji, Y.Guo, M.Kanno, N.Shirasu, K.Naka, S.Yasunaga and Y.Takahara |
| 2. 発表標題 Molecular mechanisms of Low-dose radiation effects on Hematopoietic stem cell |
| 3. 学会等名 放射線災害・医科学研究拠点 第3回国際シンポジウム「For the Establishment of the Science of Resilience」(国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 KONG WengSheng and KANNO Masamoto et al. |
| 2. 発表標題 Long-chain saturated fatty acids in breast milk are associated with the pathogenesis of atopic dermatitis via inducing inflammatory ILC3s |
| 3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 KONG WengSheng and KANNO Masamoto et al. |
| 2. 発表標題 Long-chain saturated fatty acids in breast milk are associated with the pathogenesis of atopic dermatitis via inducing inflammatory ILC3s |
| 3. 学会等名 第48回 日本免疫学会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|