

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32707

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K14036

研究課題名（和文）母マウスの食餌誘導性肥満が仔マウスの「免疫老化」に及ぼす影響

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

研究代表者

今井 敦子 (Imai, Atsuko)

相模女子大学・栄養科学部・講師

研究者番号：00580086

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000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。仔マウスの体重推移は若齢期では高値、老齢期では逆に低値傾向であった。エンドトキシンショックに対する応答として、母マウスDIOにより炎症にかかわるサイトカイン産生を調節して炎症病態を調整する因子である熱ショックたんぱく質70（HSP70）発現量が有意に高値を示した。また、脾臓HSP70発現量とIL-10産生量（脾臓細胞T細胞マイトジェン刺激）に有意な正の相関を認めた。以上の結果より、母マウスのDIOは仔マウスの老齢期における炎症病態の調整機構に影響を及ぼすことが示唆された。

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、胎生期や生後早期の環境を強く受けて決定される」というDOHaDの概念から、次世代の健康寿命の伸展や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。しかしながら、母親の栄養環境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炎症病態の調節機構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わりを広く追及することは超高齢社会で増加する疾患の病態を理解し、栄養療法を発展させる上で必要不可欠である。

研究成果の概要（英文）：This study examined the effect of diet induced obesity (DIO) on aging process in offspring. The body weights in offspring from dam exposed to a high-fat (HF) diet was significantly higher in the early stage of life but then became lower in the later stage of life. The expression of splenocyte heat shock protein 70 (HSP70), a factor that regulates inflammation-related cytokine production and modulates inflammatory pathophysiology, was significantly higher in response to endotoxin shock in offspring from dam exposed to a HF diet. In addition, a significant positive correlation was observed between the HSP70 expression and the IL-10 production by T cell mitogen stimulation. These results suggest that a maternal DIO may influence on inflammatory pathophysiology in offspring.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：母子 高脂肪食 炎症 DOHaD 加齢

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠前から授乳期にかけての母親の食生活や健康状態は出生子の健康に影響する。「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おり、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される。

現在の日本では、若年女性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。過剰な脂質の摂取や加齢による肥満(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な影響を与えると予測されるが、その影響は十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

肥満、なかでも内臓脂肪肥満における脂肪組織の炎症は全身の炎症病態に影響し、感染症やがんのみならず、動脈硬化性疾患やサルコペニアなどの高齢社会における主要疾患の基盤病態となる。加えて、免疫機能は加齢により応答能の低下や炎症素因の増大によって特徴づけられる「免疫老化」を生じ、肥満による脂肪組織炎症と「免疫老化」は相互に関連する可能性が示唆される。一方、妊娠前から授乳期にかけての母親の食生活や健康状態は出生子の健康に影響するが、母体肥満による胎内環境の変化(特に脂肪組織の変化)が仔マウスの「免疫老化」に及ぼす影響は不明である。そこで本研究では、妊娠中の肥満が出生仔マウスの代謝・免疫機能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検討を行った。仔マウスは老齢期まで飼育し、加齢および免疫機能に及ぼす影響を検討するため、炎症病態を誘導し、母マウス DIO の影響を検討した。特にストレスからの細胞保護など、細胞内シャペロンとしての役割を果たし、さらに免疫と炎症を調節する細胞内シグナルとして機能することが知られている熱ショックタンパク質(Heat Shock Protein: HSP)に着目した。

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、脂質エネルギー比率 56%、主な脂質源はラード) または AIN-93G (control; CON 食「Research Diets, Inc.」, 17%) を摂取させた。

(2) 実験プロトコル

母マウスには7週齢から妊娠前(1週間)、妊娠期間(20日)、授乳期間(3週間)を通じて同じ実験食を摂取させた。仔マウスは3週齢で離乳する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。離乳後の仔マウスには CON 食を摂取させ、老齢期まで飼育した。母マウス CON 食摂取群から生まれた仔マウスを CON 群、母マウス HF 食摂取群から生まれた仔マウスを HF 群とした。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 17-5)。

(3) エンドトキシンショック誘導方法

22か月齢でグラム陰性桿菌である大腸菌由来(E.coli 0111:B4) Lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与し(1.0 µg/gBW)、エンドトキシンショックを誘導した。LPS はリン酸緩衝液(PBS)に0.1 µg/µLになるよう希釈し、マウス体重10gあたり100 µL投与した。LPS投与を行わないコントロール群はPBSのみをマウス体重10gあたり100 µL投与した。LPSを投与した群をLPS(+)、投与しない群をLPS(-)とした。

(4) 脾臓細胞培養上清中サイトカイン産生量の測定

脾臓細胞が産生したサイトカイン量を測定するため、各刺激下(ConA、LPS、CD3/CD28)で脾臓細胞(0.5x10⁷/well)を48時間培養した後に上清を回収した。培養上清中のサイトカイン(IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α)はR&D System DuoSet Kitを用いてELISA法により測定した。

(5) 胸腺および脾臓細胞のHSP70の測定方法

細胞中のタンパク質を抽出するため、細胞にプロテアーゼインヒビターとホスファターゼインヒビターを加えたT-PER(Tissue Protein Extraction Reagent)を加えて懸濁し、4、15,000rpm、5分遠心分離して上清を回収した。たんぱく質抽出液中のHSP70はR&D System DuoSet Kitを用いてELISA法により測定した。なお、サンプル中の総たんぱく質濃度を測定しHSP70濃度を補正した。

(6) 統計解析

統計解析はSPSS25 Base System (IBM)を用いて行った。測定値は群ごとに平均値±標準誤差で示した。母マウスの食餌とLPS投与の2要因の主効果は二元配置分散分析により解析した。LPS投与下における母マウスの食餌の違いは、正規性のあった項目は、Student's-t検定、正規

性のない項目は Mann-Whitney U 検定によって解析した。相関係数はスピアマンの相関係数の検定(Spearman's rank correlation coefficient test)により解析を行った。有意水準は危険率 5%とした。

4. 研究成果

(1) 体重推移 (図 1)

離乳直後の 4 週齢～10 週齢において、仔マウス HF 群の体重は CON 群に対して有意に高値であった。しかしながらその後 CON 群と HF 群の体重は同程度で推移し、56 週齢ごろからは逆に HF 群が CON 群に対して低値傾向を示した。

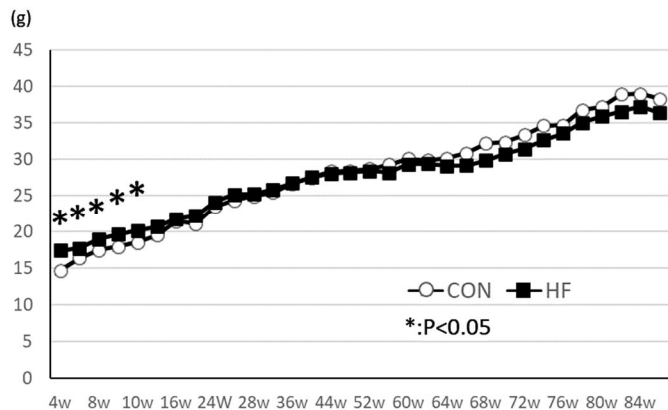


図 1 仔マウスの体重推移

この経過は先行研究[1]と同様の傾向であり、母マウスの 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り、ライフステージ後半では加齢により HF 群で体重が低値傾向になることが示された。高齢期における低体重はフレイルのリスクとなりうることから、日本人の食事摂取基準では 65 歳以上の年齢層では目標とする BMI の下限を高めを設定しており、本研究の結果から、胎生期の高脂肪食曝露は高齢期のフレイルのリスクになる可能性が示された。

(2) LPS 投与による変化 (図 2)

LPS 腹腔内投与の 12 時間後に解剖して母マウスの食餌の違いによる LPS に対する反応性の違いを検討した。

体重減少率

LPS 投与により有意な体重減少を認めしたが、体重減少率 (%) は両群で差を認めなかった。

血糖値

LPS 投与により有意な低下を認めしたが、母マウスの食餌による影響は認められなかった。

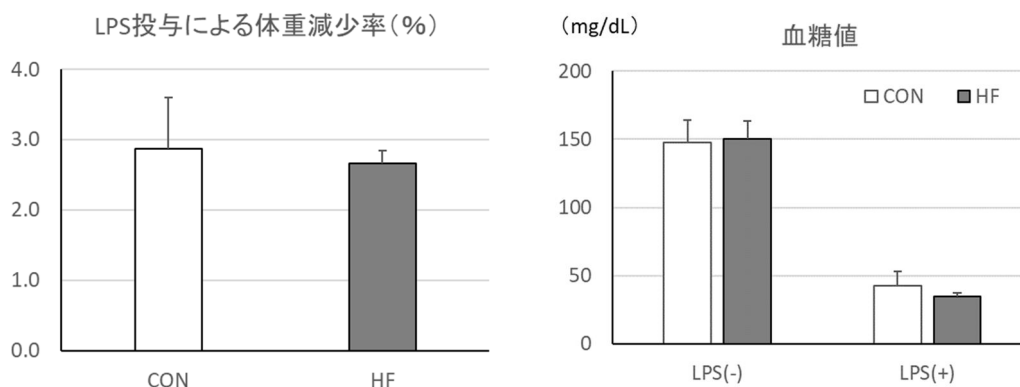


図 2 LPS 投与による体重減少率、血糖値

(3) 脾臓細胞の HSP70 量と脾臓細胞のサイトカイン産生 (図 3)

LPS 投与下における母マウスの食餌の影響を検討した。HF 群は CON 群に比し、脾臓 HSP70 (TP 補正) 量が有意に高値を示した。また、脾臓 HSP70 (TP 補正) 量と脾臓細胞の IL-10 産生量 (T 細胞刺激) に有意な正の相関を認めた。HSP70 はサイトカイン産生に参与していることが報告されており、樹状細胞の IL-10 産生に関わる伝達経路に参与して抗炎症作用を示す一方で、炎症中の単球からの炎症性サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ) 産生を弱めること、また、細胞内 HSP70 は LPS 刺激誘導性の NF- κ B 伝達経路を阻害することによって炎症メディエーター (TNF- α) の産生を阻害することも知られている。以上のことから、母の高脂肪食摂取は仔の老齢期のエンドトキシンによる炎症反応に影響し、機序として HSP70 の産生およびその影響によるサイトカイン産生の変化が関与している可能性が示唆された。

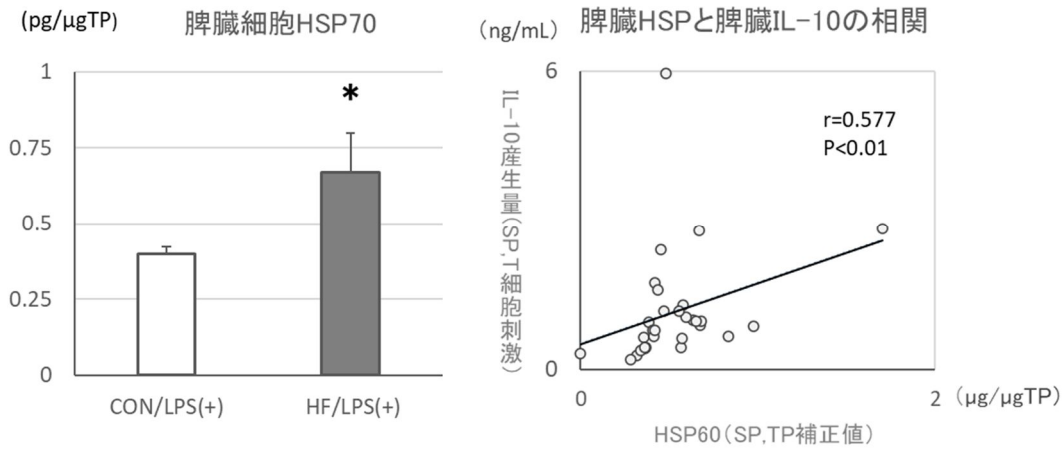


図3 脾臓細胞のHSP量とサイトカイン産生の関連

先行研究において、母の高脂肪食摂取が仔の老齢期において脾臓 T 細胞のサブセットを変化させ、加齢による炎症素因の増大等の免疫老化を促進する可能性を示している[1]。IL-10 は抗炎症に働くサイトカインの一種であり、過剰な免疫応答を抑制する働きを有する一方、エンドトキシンショックでは抗炎症性サイトカインの過剰産生はエンドトキシンショックからの回復を遅延させ、感染症や後期臓器障害を引き起こす場合がある。すなわち、マウス老齢期における「免疫老化」の機序については、脾臓 HSP の観点からも検討する必要がある。

以上の結果から、マウスの老齢期の免疫機能は胎生期における母マウスの高脂肪食摂取により影響を受けることが改めて示された。

なお、本研究では当初解析する計画であった母マウス食餌誘導性肥満による脂肪組織機能への影響と免疫・炎症との関連について解析するに至らなかった。今後、仔マウスの脂肪組織機能と免疫・炎症、加齢の観点から研究を進める。

引用文献

[1] 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.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Atsuko Imai, Atsuko Yamashita, Masato S. Ota	4. 巻 62
2. 論文標題 High-fat diet increases labial groove formation in maxillary incisors and is related to aging in C57BL/6 mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 58-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2019.12.003	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本食育学会（分担執筆：今井敦子）	4. 発行年 2023年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 432
3. 書名 食育の百科事典（分担執筆「胎生期（妊娠期）の食生活の現状と課題」）	

〔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
---------	---------