

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26500010

研究課題名(和文) 母乳中の飽和脂肪酸によるIgE産生、およびアトピー性皮膚炎発症機構の解析

研究課題名(英文) Onset mechanisms of atopic dermatitis induced by saturate fatty acid of breast milk

研究代表者

菅野 雅元 (Kanno, Masamoto)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：40161393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：小児のアトピー性皮膚炎(AD)発症に関して、母乳による育児は賛否両論あるが、科学的には確定していない。完全母乳栄養・育児(母乳のみで育児)の母子の出生コホート研究において、AD発症群と非AD群において、「母乳成分の何が違うのか?」という観点から母乳中の自己成分による炎症性サイトカイン産生誘導活性(DAMPs活性)の比較検討を行った。我々の結果から、その活性物質は飽和脂肪酸である事が同定できた。では、飽和脂肪酸がどのような機構で皮膚や消化管に存在する自然リンパ球で炎症性サイトカイン産生を誘導・増強し、それがどのようにアレルギー疾患発症(特にアトピー性皮膚炎発症)に繋がるのかを明らかにした。

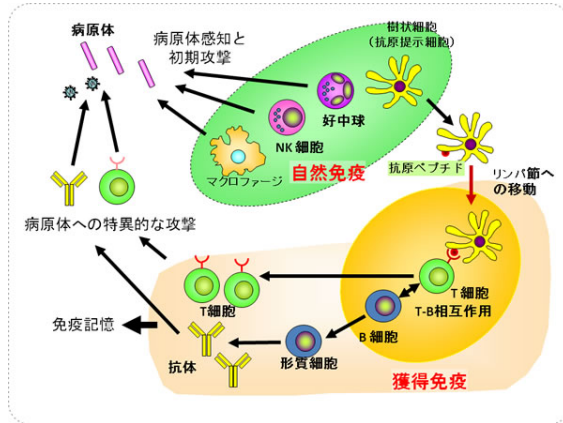
研究成果の概要(英文)：Breastfeeding is believed to influence the infants' immune system development and may even affect various immunological responses later in life. A cohort study was carried out to monitor atopic dermatitis(AD) development in breast-fed children. About 10% of the AD + mothers milk was positive (DAMPs+) when introduced to human cells in vitro. To identify the DAMP molecules, targeted metabolomics analysis was performed. This indicated presence of higher amount of several saturated fatty acids (SFA). In vivo study of HR-1 hairless mice breast-fed on lactating period with high SFA diet showed a higher incidence of skin eczema and AD-like skin symptoms. We are focusing on innate immunity and how SFA promote skin eczema and IgE increase. Among the changes observed in high SFA-milk diet mice include alterations in the intestinal and skin lymphocytes development. We concluded immunological mechanisms and aspect of nutrition based development mechanisms of atopic dermatitis.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー疾患 アトピー性皮膚炎 母乳 自然免疫系 自然リンパ球 メタボローム解析 マウス発症モデル

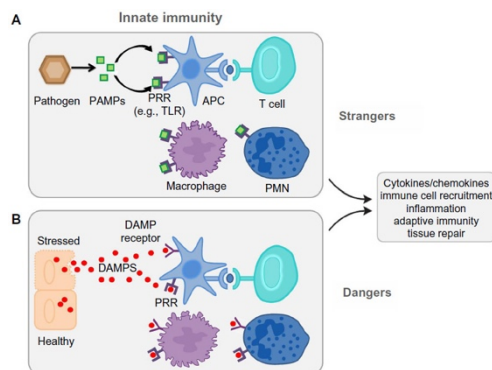
1. 研究開始当初の背景

「これまでの経緯/分かった事」:アトピー性皮膚炎などアレルギー疾患の理解は、今までは20世紀的な発想法で「免疫系は自己・非自己識別系であり、非自己にのみ反応する」という考えに基づき、「抗原・アレルゲン」「抗体・IgE」など獲得免疫系に重きを置いた考え



方のみで理解しようとされてきた。しかし、21世紀には、自然免疫系の重要性がクローズアップされ、また「Stranger & Danger 仮説」の提唱により、我々の身体の免疫系は、入口の自然免疫系において、病原体由来の成分 (PAMPs: Pathogen-associated molecular pattern; 病原体関連分子パターン) 以外に、障害を受けた組織由来の自己成分 (DAMPs: damage-associated molecular pattern; ダメージ関連分子パターン) に反応する事が分かってきた。本来、細胞内に存在していた自己成分が細胞障害などにより放出されると、それがシグナルとして自然免疫系細胞に作用し、細胞内インフラマソームを介して炎症性サイトカインを放出し、「自然炎症」を起こす事が明らかになってきた (文献1-3)。

また、臨床的には、「アレルギーマーチ」において、アトピー性皮膚炎は最も早く出現す



ることから、この発症機序解明、予防法の検討は、最終的に国民病であるアレルギー疾患全般の抑制につながると考えられる。

そこで、上記理論と、乳幼児アトピー性皮膚炎のコホート研究が合体する事で、母乳

中の自己成分中に存在する DAMPs 活性を検出できた。さらに質量分析機による Targeted-Metabolome 解析の結果、母乳中の飽和脂肪酸群である事が同定できた。

母乳 (乳製品) 中の飽和脂肪酸の含有量の検討 (または活性の検討) をする事で乳幼児のアトピー性皮膚炎発症を予防できると考えている。

今までの in vivo 実験では、飽和脂肪酸により NLRP3 インフラマソームが活性化し、IL-1beta が産生増強する事が判明した。では、センサーは何で、どのような機構インフラマソームが活性化するのであろうか?

さらに、in vivo 実験では、マウス個体に飽和脂肪酸を多く含む餌で飼育したところ、皮膚の湿疹病変と、血清中免疫グロブリン・クラスの中で IgE クラスのみが特異的に産生増強された。この表現型はまさにアトピー性皮膚炎の症状である。

では、なぜ飽和脂肪酸投与により、これらの症状が出るのであろうか?

自然免疫系に焦点を絞り、DAMPs 活性を指標に解析を行ったが、それでは、自然免疫系のような細胞群サブセットが、この発症に関与しているのであろうか?

これは、飽和脂肪酸投与により、抗原提示、自然免疫系細胞群、獲得免疫系細胞群 (T 細胞ヘルプ、B 細胞の IgE 産生) の、どのレベルが関与しているのであろうか? 上記 Q1 の事を合わせて考えると、最初の自然免疫系の関与は無視できないし、最も注目すべき点だと思う。

小児の「アレルギーマーチ」はまず、アトピー性皮膚炎から始まる事から、小児の AD の予防法の確立は、AD のみならず、その後の小児ぜんそく、などの予防法にも繋がる話だと考えており、臨床・社会へのフィードバックをはかる。

文献

1. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. Science. 296 :301-5 (2002)
2. Idzko M, Hammad H, et.al. Extracellular ATP triggers and

maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. Nat Med. 2007 13:913-9 (2007)

3. Liu L, Inoue H, Nakayama H, Kanno R, Kanno M. The endogenous danger signal uric Acid augments contact hypersensitivity responses in mice. Pathobiology. 74 :177-85 (2007)

2. 研究の目的

小児のアトピー性皮膚炎(AD)発症に関して、母乳による育児は賛否両論あるが、科学的には確定していない。完全母乳栄養・育児(母乳のみで育児)の母子の出生コホート研究において、AD発症群と非AD群において、「母乳成分の何が違うのか?」という観点から母乳中の自己成分による炎症性サイトカイン産生誘導活性(DAMPs 活性)の比較検討を行った。我々の結果から、その活性物質は飽和脂肪酸である事が同定できた。では、飽和脂肪酸がどのような機構で炎症性サイトカイン産生を誘導・増強し、それがどのようにアレルギー疾患発症(特にアトピー性皮膚炎発症)に繋がるのかは、全く不明であり、その点を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

アトピー性皮膚炎(AD)と母乳のコホート研究から、母乳中の飽和脂肪酸と「自然炎症」「IgE抗体産生」、「アトピー性皮膚炎発症」の分子機構解明を目指す。具体的には下記のクエスチョンに答えるための実験を計画している。

Q1: (細胞レベル) 飽和脂肪酸によるインフラマソーム活性化と「自然炎症」の調節機構の解明

Q2: (個体レベル) 脂肪酸投与による、アトピー様・皮膚湿疹病変・発症機構の解明

Q3: 飽和脂肪酸、天然型(cis-型)不飽和脂肪酸、人工的(加熱などによるtrans-型)不飽和脂肪酸、n-3(omega-3)型不飽和脂肪酸、な

ど、脂肪酸の化学構造の種類による上記の活性調節の解明。

そのため、平成26年度は主にQ1に関する実験計画を行い、平成27年度、28年度は、主にQ2, Q3に関する実験主体に行った。

Q1: 飽和脂肪酸によるインフラマソーム活性化の機構は?

(飽和脂肪酸投与により、細胞表面からインフラマソームまでの間の活性化経路は?)

細胞はヒト monocyte 細胞株をPMA添加によりマクロファージへと分化させた系を用いて行っている。

飽和脂肪酸添加により、インフラマソーム活性化が起きる事を確認する。

- caspase 活性化の生化学的検討
- NLRP3 インフラマソームの同定
- 構成成分 Asc のノックダウンによるインフラマソーム関与の確認を行った。

大きな疑問は、「飽和脂肪酸(input)からインフラマソーム活性化までの経路はどうなっているか?」である。

作業仮説として、下記の4つの可能性を検討した。

- 飽和脂肪酸の受容体・センサーとしてのTLR4の可能性の検討: TLR4-KO マウスのマクロファージを用いて検討する。

- Lipid Raft の関与の可能性

- ミトコンドリアの機能(下記)の関与: ミトコンドリアの fission/Fusion 系、ミトコンドリアの膜電位系

- 小胞体ストレス系の関与: 典型的なマーカー(BiP など)の発現を検討するところから始める。関与が確認されたら、小胞体センサー(PERK, IRE1, ATF6, OASIS)のノックアウトマウスのマクロファージを用いて確認を行う予定。

Q2: (個体レベル) 脂肪酸投与による、アトピー性皮膚炎様・皮膚湿疹病変の発症機序の検討。

個体レベルで、ヒトのコホート研究と同様の

条件にするため、Baby-swapping 実験をデザインした。飽和脂肪酸を多く含む餌で妊娠マウスを飼育した群と、正常餌で飼育した妊娠マウス群を準備し、new-born マウスを baby swapping を行い、授乳を行う。離乳後は正常餌で飼育し、皮膚状態を観察した。約 15 週間後に飽和脂肪酸・母乳群のみ皮膚湿疹病変を認めた。個体レベルで、母乳に関連するアトピー性皮膚炎モデルマウスの作成に成功した。また、飽和脂肪酸摂取群において、末梢血中の免疫グロブリンの各クラス、サブクラス別の濃度測定を行ったところ、IgE 特異的に濃度だけが上昇しており、皮膚マスト細胞も増加していた。しかし他の Ig クラス・サブクラスには変化は無かった。この結果は、アトピー性皮膚炎において良く観察される症状と一致している。では、飽和脂肪酸摂取と皮膚湿疹病変や、IgE 高値とはどのように繋がるのであろうか？可能性として、自然免疫系の DAMPs 活性に注目し、targeted-metabolomics から始まった話であるので、やはり自然免疫系細胞群に注目する。特に最近発見されたばかりの自然リンパ球群に特に注目して解析を行った。

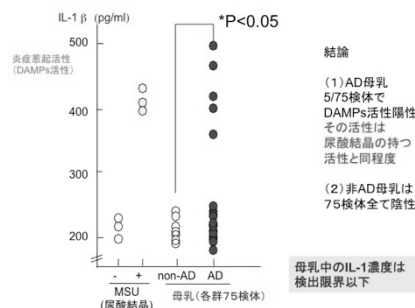
Q3: 飽和脂肪酸、天然型 (cis-型) 不飽和脂肪酸、人工的 (加熱などによる trans-型) 不飽和脂肪酸、n-3 (omega-3) 型不飽和脂肪酸、など、脂肪酸の種類による上記の活性調節の機構解明。

さらに、同じ炭素鎖長の脂肪酸でも、上記のような微細な差異がどのようにそのアウトプットに影響しているのでしょうか。このような構造活性相関を自然炎症、皮膚湿疹病変 というアウトプットから検討した。

4. 研究成果

コホートの初乳を用いて DAMPs 活性を測定したところ、図の様に、AD 軍の約 1 割の母乳で非常に強い DAMPs 活性を検出した。その強さは、痛風の原因物質である尿酸結晶と同程度であった。

母乳中の炎症惹起物質 (DAMPs) の測定



(1) 「in vitro 実験系において、脂肪酸とインフラマソーム活性化の分子機構」

特に、インフラマソーム活性化機構における、ミトコンドリア、小胞体 (小胞体ストレス) の関与を検討した。

飽和脂肪酸、天然型 (cis-型) 不飽和脂肪酸、人工的 (加熱などによる trans-型) 不飽和脂肪酸、n-3 (omega-3) 型不飽和脂肪酸、など、脂肪酸の種類による上記の活性調節の機構解明。ミトコンドリアの fission-fusion 変換、および ROS の産生が関与している事が分かった。さらに、小胞体ストレスのマーカーである活性型 XBP-1 が産生され、小胞体シャペロンである BiP が発現している事が確認できた。これらの事より、ミトコンドリア、および小胞体ストレス系が関与している事が分かった。しかし、これ以上は、研究の焦点を in vitro ではなく in vivo 実験系にシフトした

(2) 「マウスを用いた実験系において、飽和脂肪酸と皮膚疾患の関係を検討する」

特に、飽和脂肪酸投与と皮膚疾患との関連を検討した。皮膚疾患が出現した場合には、その免疫学的解析を行う。特に、皮膚に浸潤しているリンパ球解析、消化管免疫系のリンパ球解析を行った (現在進行中)。一般的に、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患発症には 2 型免疫反応が関与していると言われていた。しかし、我々のマウス実験系では皮膚や消化管の ILC において、特徴的なサイトカイン産生パターンを検出した。また、アトピ

一性皮膚炎に特徴的である血清中 IgE 値の上昇が再現した。このマウスモデルに関しては、日本アレルギー学会の発表において、特に優秀な演題として「Featured **Poster**」として会場に掲示され、シンポジウムでも発表を行った。

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 6 件)

1. KANNO, M., Kong, W.-S., Inoue, H., Shimojyo, N., Tsuyama, N., Arita, M., Guo, Y. **Identification of DAMPs molecules in mother's milk of a cohort study on atopic dermatitis in breastfed infants: Mouse model study and correlation with gut ILCs.** **EUROPEAN J. IMMUNOL.** 46, S1, : 1-1238, 2016 DOI: 10.1002/eji.201670200 (査読有)
2. Mokuda S, Miyazaki T, Ito Y, Yamasaki S, Inoue H, Guo Y, Kong WS, Kanno M, Takasugi K, Sugiyama E, Masumoto J. The proto-oncogene survivin splice variant 2B is induced by PDGF and leads to cell proliferation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Scientific Reports.** 2015 May 22;5:9795 (1-13). doi: 10.1038/srep09795. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

1. Yun Guo¹, Fuqiang Chen^{1,3}, Weng-Sheng Kong¹, Hiroaki Honda² and Masamoto Kanno^{1,4,5} A role of the Ubiquitin-modifying enzyme A20 in regulatory T cells.

International KTCC (Kyoto T Cell Conference) 13-17 Mar 2017 Shiran-kaikan Kyoto JAPAN

2. Masamoto Kanno¹⁶⁷, Weng-Sheng Kong¹, Yun Guo¹, Fuqiang Chen¹⁴, Zhichao Cao¹, Naoki Shimojyo²⁶, Tsutomu Masujima⁵⁷, Naohiro Tsuyama³⁵ and Hiroko Inoue¹ Identification of DAMPs molecules in mothers' milk of a cohort study on atopic dermatitis in breastfed infants: Mouse model and correlation with gut/skin ILCs. International KTCC (Kyoto T Cell Conference) 13-17 Mar 2017 Shiran-kaikan Kyoto JAPAN
3. KANNO, M., Kong, W.-S., Inoue, H., Shimojyo, N., Tsuyama, N., Arita, M., Guo, Y. Identification of DAMPs molecules in mother's milk of a cohort study on atopic dermatitis in breastfed infants: Mouse model study and correlation with gut ILCs. International Congress of Immunology (ICI2016) 20-27 Aug 2016, Melbourne Australia

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：自然免疫系炎症抑制剤、食品組成物、食品添加物、及び、自然免疫系抑制剤のスクリーニング方法

発明者：菅野雅元、下条直樹

権利者：国立大学法人広島大学、千葉大学

種類：特許

番号：特願 2015-102750

出願年月日：2015/05/20

国内外の別：国内

○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

菅野雅元 (KANNO, Masamoto)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(医)・教授
研究者番号：40161393

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

()