

ニッポンハム食の未来財団 平成 29 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	母親の腸内環境が胎児の出生後の食物アレルギー発症に及ぼす影響の解析
フリガナ	ウエバンソウ タカシ
代表者名	上番増 喬
所属機関（機関名） （役職名）	徳島大学 大学院医歯薬学研究部 予防環境栄養学分野 特任助教
本助成金による 発表論文，学会発表	なし

研究結果要約

ヒトの腸内には、たくさんの腸内細菌が生息している。腸内細菌は摂取した食物を分解・利用する過程で様々な代謝産物を産生する。産生された代謝産物は、近隣の腸内細菌に作用するだけでなく、宿主にも影響を及ぼし、実際に様々な疾患に腸内細菌が関与している事が明らかになってきている。本研究では、母親の腸内環境の違いが、産まれてくる仔の将来の疾病リスクやそれに関与する遺伝子のメチル化に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、近年、患者数が増加してきているアレルギー疾患を対象モデルとして検討した。母親に対して抗菌薬、またはビタミン B 群欠乏食を投与し、仔の遺伝子のグローバルなメチル化度合いを検討した結果、対象群と介入群には大きな違いは見られなかった。仔の遺伝子のグローバルなメチル化度合いは個体差が大きかったことから、仔だけでなく、孫やひ孫に及ぼす影響を検討することで、母親の腸内環境の違いが仔に及ぼす影響を評価することができると考えられる。一方で、腸管の免疫細胞における制御性 T 細胞の分化増殖に重要な FOXP3 遺伝子発現は、グローバルなメチル化度合いの高いマウスにおいて、メチル化度合いの低いマウスと比較して若干ではあるが高値を示した。このことは、グローバルなメチル化とローカルな遺伝子発現制御の関連性を示唆しており、今後、実際にアレルギー発症等に関与するかを含めて、詳細に検討する必要があると考えられる。

研究目的

近年、腸内細菌叢が、短鎖脂肪酸や GABA、ビタミンなど様々な生理活性物質を産生する臓器と

して認識されるようになってきた。中でも、葉酸、B12、B6、等のビタミン B 群の腸内細菌叢での産生量は、一日必要量の 30%以上と推定されている¹⁾。ビタミン B 群はメチル化に用いられるメチル基の供給源として重要である one carbon metabolism の多くのステップで補酵素として働くため、その量的、質的变化は宿主のエピゲノム修飾の変化を引き起こす。また、日本人女性の栄養摂取状況において、多くのビタミン B 群摂取量が必要量を満たしていないため (H27 年度国民健康栄養調査)、腸内細菌叢の持つ役割は相対的に増加している可能性が高い。しかしながら、腸内細菌叢により消費・産生・供給されるビタミン B 群を含む生理活性物質の量的、質的变化が胎児ゲノムのエピゲノム修飾、特に FOXP3 遺伝子発現を制御するエピゲノム修飾および食物アレルギー発症に及ぼす影響は不明である。我々は、これまでの研究において、母親の腸内環境の違いが子供の体脂肪や生活習慣病発症リスクを増加させるなど世代を超えた影響を持つことを明らかにしてきた²⁾。そこで、本研究では、母親の腸内細菌叢を含む腸内環境の変化が、胎児ゲノムのエピゲノム修飾、特に FOXP3 遺伝子発現を制御するエピゲノム修飾および食物アレルギー発症に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

研究計画及び研究手法

1) Avy マウスの腸内環境への介入による仔のグローバルな DNA メチル化への影響の解析

母親の腸内環境の違いが、仔の DNA のメチル化に及ぼす影響を解析するために Agouti viable yellow(Avy)マウスを使用した。毛色は灰色がかかった psude agouti から黄色の yellow までの間で影響を受け、中間に毛色の混ざったマウスが存在する(別紙図 1)。実験 1. 雌性の C57BL6J マウスに 4 種の抗菌薬 (ネオマイシン(1 g/L)、バンコマイシン (0.5 g/L)、アンピシリン(1 g/L)、メトロニダゾール (1 g/L)) の混合液を 2 週間自由飲水投与した後、雄性の Avy (psude agouti mouse) と交配した。交配開始前に抗菌薬混合液の投与は終了した。産まれてきた仔マウスの毛色を観察し、グローバルな DNA のメチル化を評価した。実験 2. 雌性の Avy マウスにビタミン B2,B6,B9,B12 欠乏食を 2 週間投与後、雄性の C57BL6 マウスと交配し、生まれてきた子供の毛色を観察し DNA のメチル化度合いを評価した。

2) 上皮間免疫細胞、リンパ濾胞免疫細胞におけるリンパ球分化関連遺伝子発現の解析

麻酔下でマウスの小腸と大腸を単離し、PBS で洗浄後、パイエル板を採取した。腸管は 2cm 程度に切断し、EDTA 入りの培地で攪拌することにより、上皮間免疫細胞を採取した。残った組織をコラゲナーゼで消化し、リンパ濾胞免疫細胞を採取した。採取した細胞は percoll により分離、濃縮し total RNA を抽出した後 cDNA を合成し、目的の遺伝子発現を検討した。

3) 食物アレルギー発症モデルの作成

動物における食物アレルギーモデルを確立するために、Alum または Complete Freund' s

Adjuvant (CFA)を利用したオボアルブミン(OVA)の感作による食物アレルギー発症モデルマウスの作成を行った。Alum (thermo #7716 Imuject Alum)を用いた OVA の感作には、Eric B. Brandt らの方法を用いた 3)。CFA (DIFCO #263810) を用いた OVA の感作には、Kweon らの報告を参考にした 4)。Alum 法では 2 週間間隔を空けて 2 度感作し、CFA 法では 1 度のみ感作した。感作終了後 1 週間から経口 OVA 負荷試験を行い、負荷試験終了後に解剖してサンプルを採取した。

4) 経口 OVA 負荷試験

OVA は PBS に溶解し 50 mg/100 μ l の濃度で溶液を作成した。マウスは経口負荷試験の前に 4 時間絶食した。マウスに 50mg の OVA をゾンデで経口投与し、その後 1 時間までの下痢の発生を観察した。下痢症の評価は、糞便の状態を、普通、やわらかい、粘度状、水様の 4 段階に分け、発生時間を 15 分以内、30 分以内、45 分以内 60 分以内の 4 段階に分けることで 0-8 のスコアで評価した。

5)OVA 特異的 IgE 濃度の測定

マウスの血漿中の OVA 特異的 IgE 濃度は、DS マウス IgE ELISA kit(DS ファーマバイオメディカル株式会社) を用いて測定した。測定方法は kit の方法に従った。

6) 消化管組織の病理学的評価、mast 細胞の染色

消化管をスライスロール法により固定し、脱水、包埋し、薄切した切片を、ヘマトキシリン、エオジン染色し、組織像を顕微鏡下で観察した。mast 細胞の染色にはトルイジンブルーを用い、メタクロマジーにより染色された顆粒を有する大型の細胞を mast 細胞として計測した。

結果と考察

<本研究の成果について>

1) Avy マウスの腸内環境への介入による仔のグローバルな DNA メチル化への影響の解析

実験 1. 雌性の C57BL6J マウスに 4 種の抗菌薬の混合液を 2 週間自由飲水投与した後、雄性の Avy (psude agouti mouse) と交配した。以前の研究において、4 種の抗菌薬を組み合わせ投与することで、腸内細菌叢の破綻が引き起こされることを確認してある 5)。生まれてきた仔マウスの毛色を観察した結果、コントロール群(n=18)ではメチル化度合いの高い psude agouti の割合は 38%、メチル化度合いの低い Motty の割合は 62%であったのに対して、抗菌薬群(n=14)の psude agouti の割合は 28%、Motty の割合は 72%であった。両群におけるグローバルな DNA のメチル化度合いの違いに比較して、同腹仔であっても個体差が大きい事が明らかとなった。このことは、グローバルなメチル化は 2 世代以上を超えて受け継がれることを示している。そこで、仔マウス同士を交配し、F2 世代を作出して、DNA のメチル化度合いを毛色で評価した。F2 世代のコントロール群(n=4)では psude agouti の割合は 0%、メチル化度合いの低い Motty の割合は 100%であっ

たのに対して、抗菌薬群(n=25)の *psude agouti* の割合は 20%、*Motty* の割合は 80%であった。本実験において、コントロール群のマウスが原因不明で死亡したために、十分なサンプル数を得ることができなかった。サンプル数を増やした解析は今後の検討課題である。さらに、後述する食物アレルギーも出るマウスの作出に *BALB/c* マウスを使用するため、*BALB/c* マウスの遺伝背景に *Avy* をバッククロスし、実験に使用できるマウスを作成中である。

実験 2. 雌性の *Avy* マウスにビタミン B2,B6,B9,B12 欠乏食を 2 週間投後、雄性の *C57BL6* マウスと交配し、生まれてきた子供の毛色を観察し DNA のメチル化度合いを評価した。予備実験により、2 週間のビタミン B 欠乏食の摂取によりビタミン B6 等の欠乏が生じている事を確認している。生まれてきた仔マウスの毛色を *Yellow*(1)から *Psude*(5)までの 5 段階で評価した結果、コントロールマウスの仔の毛色は平均で 2.25(n =10)、ビタミン B 欠乏食摂取マウスの毛色は平均で 2.73 (n = 11)であった。実験 1 と同じく、同腹仔間での個体差は大きかった。特に *psude* の母親マウスからは *psude* マウスが産まれてくるものの、*Yellow* マウスも産まれてくるため個体差が大きく見られた。一方 *psude* 以外の母親マウスからは *psude* マウスは産まれてこず、結果的に個体差が小さくなった。*Avy* マウスを用いた実験の報告によると、メチル基の供与体となるコリン、ベタイン、メチオニン、亜鉛、葉酸、ビタミン B12 を添加した食事を摂取することで、*psude* マウスが多く生まれることが報告されている⁶⁾。本研究において、母親の葉酸、ビタミン B12 を含む 4 種のビタミンの欠乏が仔の *Avy* 遺伝子領域のメチル化に及ぼす影響は高くないことが示唆された。今後、メチル基の供与体の添加食が持つ効果についての検討も必要である。また、現在、バイサルファイト処理とシーケンスを利用し、*Avy* 領域の遺伝子領域の DNA のメチル化度合いの定量的な測定法を確立している。現状では、*Yellow* マウスに比較して、*psude* マウスではより多くのシトシンがメチル化されていることを示す結果を得ている。今後は本法を用いて、サンプル数を増やして解析を行う予定である。

2) 上皮間免疫細胞、リンパ濾胞免疫細胞におけるリンパ球分化関連遺伝子発現の解析

グローバルな DNA メチル化度合いの異なる *psude agouti*(P)マウスと *Motty*(M)マウスにおけるリンパ球分化関連遺伝子の発現を検討した。Th17 系列の分化に重要な *Rorg*、Th2 分化のマスター遺伝子として働く転写因子である *Gata3* の遺伝子発現は、パイエル板、小腸、大腸の上皮間免疫細胞、リンパ濾胞免疫細胞において両群間で有意な違いは見られなかった。一方で、制御性 T 細胞の分化増殖に重要な *FOXP3* 遺伝子発現は、大腸の上皮間免疫細胞において、P 群 (1.26 ± 0.13)と比較して、M 群(0.92 ± 0.16)で若干低値を示した。制御性 T 細胞の分化増殖は大腸において、細菌が産生する短鎖脂肪酸により、ヒストンのアセチル化度合いが変化し、結果的に *FOXP3* の遺伝子発現が変動することが明らかになっている⁷⁾。今回の実験により見られた *FOXP3* 遺伝子発現の変化が遺伝子のメチル化によるものなのか、ヒストンのアセチル化度合いの変化によるもの

なのかは不明であるため、今後検討していく予定である。また、各組織中の免疫細胞を細胞種に特異的な抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて、リンパ球の組成について検討することも合わせて予定している。

3) 食物アレルギー発症モデルの作成

2種類の感作方法を用いて食物アレルギー発症モデルを作成した。Alumを用いた感作法で作成したマウスは、コントロール群と比べて早期から激しいOVAによるアレルギー性下痢症を引き起こした。下痢の発生率は5回目の投与以降100%であり、7回目の投与以降は下痢の発症が15分以内に起こった。実験終了時の血中OVA特異的IgE濃度の平均値は、コントロール群が 99 ± 154 ng/ml (平均値 \pm 標準偏差)であったのに対して、Alum群では 2079 ± 358 ng/mlと約20倍高値を示した。小腸組織切片当たりのmast細胞数はコントロール群で 24.3 ± 7.7 であったのに対して、Alum群では 54.7 ± 15.6 と2倍以上高値を示した。CFAを用いた感作法感作法で作成したマウスは、段階的にOVAによるアレルギー性下痢症を引き起こした。1匹のマウスを除いて、下痢の発生率は5回目の投与以降100%であり、OVAの投与量を半分に減らしてもアレルギー性下痢症を呈した。実験終了時の血中OVA特異的IgE濃度の平均値は、コントロール群が118 ng/mlであったのに対して、CFA群では447 ng/mlと約4倍高値を示した。小腸組織切片当たりのmast細胞数はコントロール群で10.0であったのに対して、CFA群では17.3であった。

<本研究で所期の結果は得られたか>

本研究では当初、①腸内環境への介入による仔のグローバルなおよびローカルな（制御性T細胞関連遺伝子）エピゲノム修飾への影響を解析すること、②エピゲノム修飾の変化と関連する腸管内の生理活性物質を探索すること、③エピゲノム修飾の変化と制御性T細胞の量・質の変化、食物アレルギー発症との関連性を検討することを目標としていた。実際には、目標①および③の基礎的検討を行うことができ、継続して検討を実施している。目標②に関しては、腸内環境への介入による仔のグローバルなメチル化度合いの変化が個体差の影響によってマスクされてしまい、実施できていない。この点に関しては、今後、母親への介入が仔や孫、ひ孫に及ぼす影響を解析し、有意な違いが見られたグループ間で比較することを予定している。

<助成期間後に残された課題はどのようなもの>

本研究の課題は、1. 仔の遺伝子のグローバルなメチル化度合いは個体差が大きい事、2. Avyマウスではアレルギー感受性試験ができないことが挙げられる。1.の個体差の影響に関しては、世代を超えた影響を解析すること、および、個体差とアレルギー発症の関連の強さと、母親への介入とアレルギー発症との関連の強さを比較することを検討している。2. については、AvyマウスをBALB/cマウスに戻し交配し検討する予定である。

<学会や論文発表等の予定>

現時点ですぐに発表する予定はない。今後解析を進めて、成果を発表する機会を設けたいと考えている。

今後の研究活動について

今後の検討においては、個体差を理解する必要があると考えられる。Avy マウスの個体差は、メチル基供与体の添加食の摂取により減少することが報告されているため、腸内環境への介入とともにメチル基供与体食を摂取させるなど、組み合わせた実験をおこなうことで解決できる可能性がある。今回の結果において、母親への介入の影響は仔のみでなく、孫やひ孫を検討しなければならないことが明らかとなった。このことは、実際に母親が受けた影響は世代を超えて表現型として現われる可能性を示唆しており、詳細に検討することにより将来起こりうる疾病リスクの変化を予測することが可能となるかもしれない。

参考文献

- 1) Magnúsdóttir S, Ravcheev D, de Crécy-Lagard V, Thiele I. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. *Frontiers in Genetics* 2015, 6: 148
- 2) Yoshimoto A, Uebanso T, Nakahashi M, Shimohata T, Mawatari K, Takahashi A. Effect of prenatal administration of low dose antibiotics on gut microbiota and body fat composition of newborn mice. *J Clin Biochem Nutr.* 2018 62(2):155-160
- 3) Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, et al. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J C I* 2003, 112: 1666-1677
- 4) Kweon MN, Yamamoto M, Kajiki M et al. Systemically derived large intestinal CD4(+) Th2 cells play a central role in STAT6-mediated allergic diarrhea. *JCI* 2000, 106: 199-206
- 5) Uebanso T, Kano S, et al . Effects of Consuming Xylitol on Gut Microbiota and Lipid Metabolism in Mice. *Nutrients.* 2017 Jul 14;9(7). pii: E756
- 6) Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DI. Germ-line epigenetic modification of the murine Avy allele by nutritional supplementation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 14;103(46):17308-12
- 7) Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 2013, 504, 446-450

以上