

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	食物アレルギーの新規予防法の開発に向けた母子栄養・腸内因子とアレルギー疾患との相関解析
フリガナ	クニサワ ジュン
代表者名	國澤 純
所属機関（機関名） （役職名）	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 プロジェクトリーダー
本助成金による 発表論文，学会発表	1. J Allergy Clin Immunol. 2017 Dec 27. [Epub ahead of print] 2. 食品薬学シンポジウム 3. 先進イメージング医学研究会 4. AMED-Leibniz Workshop in the Life Sciences

研究結果要約

現在、乳幼児の約半数は何らかのアレルギー疾患に罹患していると言われているが、現有のアレルギー疾患の治療法は対症療法のみで、根本的な予防・治療法は確立されておらず、また発症原因についてもほとんど明らかになっていない。最近の研究から、アレルギーの発症には腸内細菌や食事などの環境因子と宿主免疫系との相互作用が、重要な役割を担っていることが示されてきている。その中で、乳幼児アレルギーについては母乳の影響が一因として考えられている。本研究では食事や母乳とアレルギーについて脂質に着目した研究を行い、食事性脂質から産生される脂質メディエーターについて、母乳の観点も含めたアレルギーに関する研究を行った。その結果、 ω 3脂肪酸として知られる α リノレン酸を起点に形成される複数の脂肪酸代謝物が抗アレルギー活性を示すことが示され、皮膚炎についてはエイコサペンタエン酸の代謝物の一つが好中球に発現する GPR40 を介して遊走阻害することが作用点であることが示された。一方、母乳中にも ω 3脂肪酸代謝物が含まれ、乳幼児期のアレルギーと関連することが示された。これらの知見は近い将来、食物アレルギーに対する予防や発症予測診断法の開発につながるものと期待され、乳幼児アレルギー疾患の減少と家族を含めた QOL の向上、さらには患者数減少による医療経済の改善が期待され、社会的にも学術的にも多大な貢献ができると期待される。

研究目的

現在、日本国内の乳幼児の約半数は何らかのアレルギー疾患に罹患していると言われており、現有のアレルギー疾患の治療法は対症療法のみで、根本的な予防・治療法は確立されていない。特に食物アレルギーについては、原因物質の同定とそれを摂取しない、ということが唯一の対処法となっており、誤食によって引き起こされるアナフィラキシーの危険性や家族を含めた QOL の低下などが大きな社会問題となっており、新たなコンセプトに基づく診断、予防、改善、治療法の開発が待望されている。

最近の研究から、アレルギーの発症にはサイトカインなどの生体内因子だけではなく、腸内細菌や食事などの腸内環境因子と宿主免疫系との相互作用が、重要な役割を担っていることが示されてきている。その中で、乳幼児アレルギーについては母乳の影響が一因として考えられている。母乳に関しこれまでは主に「母乳 vs 人工乳」や「アレルギー因子の母乳を介した移行」といった観点から議論がなされてきたが、一定の見解が得られていないのが現状である。これらの背景のもと本課題においては、これまで申請者が独自に蓄積してきた粘膜アレルギー疾患に関する知的・技術基盤と現在収集を進めているヒトサンプルを活用し「母親の食生活・アレルギー歴→母乳中因子（母乳の質）→子供の腸内因子（腸内細菌・代謝物）→アレルギー発症」という母子の栄養・腸内環境の統合的な観点から食物アレルギーとの関連を明らかにすることを目的とする。

ここから得られる知見は近い将来、食物アレルギーに対する予防や発症予測診断法の開発につながるものと期待され、乳幼児アレルギー疾患の減少と家族を含めた QOL の向上、さらには患者数減少による医療経済の改善が期待され、社会的にも学術的にも多大な貢献ができるものと期待される。

研究計画及び研究手法

現在までに収集しているヒトサンプルを用い、家族のアレルギー歴と子供のアレルギー発症により以下の 4 グループに分類した。

グループ 1：家族アレルギー歴なし、子供アレルギー発症なし

グループ 2：家族アレルギー歴あり、子供アレルギー発症なし

グループ 3：家族アレルギー歴なし、子供食物アレルギー

グループ 4：家族アレルギー歴あり、子供食物アレルギー

（*家族アレルギー歴は、鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなど）

すでに収集を終えていた出産 0 ヶ月後の母乳と母親血漿サンプルと子どもの糞便サンプルを用い、腸内細菌叢 (16S クローンライブラリ法)、サイトカイン (Bio-plex システム)、抗体価 (ELISA 法)、

メタボローム（質量分析など）を対象に測定を行った。さらに親のアレルギー歴やBDHQによる食事調査の結果と照らし合わせ、親が持つ発症リスク因子（食事など）とそれに連動する母乳、乳幼児糞便中、血液中のマーカーあるいは実行分子との関連を解析した。

後述のように特に脂質（脂肪酸）とアレルギーの有無との相関を示唆する結果が得られたことから、動物モデルにおける解析を行った。上記の解析から、食物アレルギーのみならず皮膚炎との相関も認められたことから、マウスの接触皮膚炎モデルを適用し、成体マウスでの解析や乳幼児マウスにおける病態形成や免疫学機能変化を解析すると共に、質量分析を用いたりリポドミクス解析により母乳中や仔マウス血清中における脂質代謝物を測定した。

結果と考察

ヒト母乳や血漿、乳幼児糞便を対象にした多項目の解析を行った結果、乳幼児アレルギーと有無と相関のある複数の因子を同定することが出来た。その中でも特に研究グループがこれまでの研究からアレルギーとの関連を報告してきた脂質（脂肪酸）に着目したところ、抗アレルギー効果が示唆されている ω 3脂肪酸の違いが認められた。近年、脂肪酸の解析においては、液体クロマトグラフィーや質量分析器の技術が発達し、レゾルビン E1 やプロテクチン D1 に代表されるように、オメガ3脂肪酸代謝物の中には積極的にアレルギー・炎症反応を抑制するものがあることがわかってきている（参考論文1）。その中で申請グループは、エイコサペンタエン酸（EPA）を前駆体としシトクロム P450（CYP）によって代謝産生される17,18-エポキシエイコサテトラエン酸（17,18-EpETE）が食物アレルギーを抑制する活性を持つことを、動物モデルを用いて報告している（引用文献2）。そこで質量分析による脂肪酸代謝物の解析を行ったところ、17,18-EpETEが乳幼児アレルギー発症群で減少傾向にあることが判明した。興味深いことに、この結果は食物アレルギーの乳幼児のみならず、アトピー性皮膚炎など乳幼児皮膚アレルギーにおいても同様の傾向が認められた。

そこで次にマウスの接触皮膚炎モデルを導入し、17,18-EpETEの皮膚炎に対する効果を検証した。その結果、17,18-EpETEを投与することで皮膚炎に伴う耳の腫脹を軽減できることがわかった（引用文献3）。17,18-EpETEは水溶性エポキシ加水分解酵素の働きにより17,18-ジヒドロキシエイコサテトラエン酸（17,18-diHETE）に代謝されることが知られているが、17,18-diHETEには接触皮膚炎抑制作用は認められなかった。本研究のヒトサンプルを用いた解析において17,18-EpETEの前駆体であるEPAの量とアレルギーの発症の有無の相関がそれほど強くないという結果が得られているが、これは母体もしくは乳幼児中における17,18-EpETEの産生の効率に加え、17,18-diHETEへの代謝の活性の個人差に依るものかもしれないと考えられる。

さらに 17,18-EpETE の作用機序についての解析を行ったところ、17,18-EpETE は血管透過性や T 細胞の機能にほとんど影響を与えていなかったが、好中球の数が減少することが判明した（引用文献 3）。そのため、17,18-EpETE は好中球を標的とし皮膚炎を抑制すると考えられ、現行治療薬のステロイドが T 細胞の増殖やサイトカイン産生を抑制するのとは異なった作用点であると考えられた。

さらに詳細な解析を行った結果、17,18-EpETE は好中球に直接作用し、遊走を阻害することが判明した。好中球遊走の際には、低分子量 G タンパク質である Rac が活性化し、アクチンフィラメントが重合を伴う仮足形成により細胞が動くことが知られているが、17,18-EpETE により走化性因子の刺激によって誘導される Rac の活性化と仮足形成が阻害されることがわかった（引用文献 3）。

また脂質代謝物には様々な受容体が関与していることが示されているが、17,18-EpETE を認識する受容体を探索したところ、G タンパク質共役型受容体である GPR40 を強く活性化すること、GPR40 欠損マウスで 17,18-EpETE の皮膚炎抑制効果が認められなかったこと、GPR40 が好中球において高いレベルで発現すること、GPR40 欠損マウスから単離精製した好中球に対しては上述した 17,18-EpETE による Rac の活性化や仮足形成の抑制作用は認められなかったことから（引用文献 3）、17,18-EpETE は好中球に発現する GPR40 に作用し、Rac の活性化や仮足形成を阻害することで好中球の遊走を抑制し接触皮膚炎を軽減することが明らかになった。

上記の知見をもとに、 ω 3 脂肪酸である α リノレン酸を多く含む亜麻仁油からなる特殊餌餌を製作し、その餌で飼育したマウスを妊娠・出産した後、3 週間同一マウスで哺育した仔マウスに皮膚アレルギーモデルを適用したところ、皮膚アレルギーの抑制が認められた。そこで母乳中の脂質代謝物を質量分析により解析したところ、これまで注目していた 17,18-EpETE など EPA 由来代謝物も増加していたが、それ以外のユニークな代謝物の増加も認められた。

これらの結果から、妊娠・授乳時は通常状態とは異なる脂質代謝経路が存在し、母乳中に特殊な脂肪酸代謝物を産生し、そのうちの一部がアレルギーの制御に関わっている可能性が示された。現在、これら動物モデルで得られた知見を再度ヒトサンプルを対象に解析する系を立ち上げ、当初測定していなかったユニークな代謝物の測定を行っているところである。

今後の研究活動について

今回の検討から、母親が摂取している食事の脂質組成が母乳中の脂質組成に影響を与えることがヒトとマウスの各サンプルを用いた実験から明らかになった。一方、特にヒトにおいて各脂質から産生される脂肪酸代謝物はばらつきが大きかったことから、基質となる食事由来脂質に加えて、代謝に関わる酵素の個人差が関与していることが考えられた。さらに今回の検討から、妊娠・

授乳中は通常時とは異なる脂質代謝経路が動いている可能性が示唆され、摂取した油の脂質組成に加え、授乳期の代謝酵素の発現パターンの変化が、乳幼児アレルギーの発症に関わることが考えられる。

本研究においてヒトサンプルの解析から始まり、動物モデルでのメカニズム解明、さらにそこから得られた新知見をヒトサンプルでの再解析に展開する体制が構築できた。現在は本研究において動物モデルで新たに見いだしたユニークな代謝物をヒトサンプルで解析を開始したところである。今後これらの研究を進めていくことで、妊娠・授乳期に摂取した食事性脂質の組成→母体における代謝を介した代謝物の産生→乳幼児でのアレルギー制御というメカニズムが解明でき、乳幼児アレルギーを母子栄養という観点から予防・改善できるようになると期待される。

参考文献

- 1) Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 2014; 510 : 92.
- 2) Kunisawa J, Arita M, Hayasaka T, et al. Dietary ω 3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut. *Sci Rep* 2015; 5 : 9750.
- 3) Nagatake T, Shiogama Y, Inoue A, et al. The 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid-G protein-coupled receptor 40 axis ameliorates contact hypersensitivity by inhibiting neutrophil mobility in mice and cynomolgus macaques. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Dec 27. [Epub ahead of print]

以上