

ニッポンハム食の未来財団 平成 30 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

ヒトの腸管内には、多種多様な細菌が生息し個々に独自の腸内細菌叢を形成している。腸内細菌叢は摂取した食物を分解・利用する過程で独自の代謝産物を産生する。産生された代謝産物は近傍の細菌だけでなく宿主に吸収されて作用する。そのため、様々な疾患に腸内細菌叢が関与することが明らかとなってきた。本研究では、母親の腸内細菌叢の違いが、産まれてくる次世代、次々世代の将来の疾病リスクに及ぼす影響を明らかにすることを目的に、近年、患者数が増加している食物アレルギー疾患を対象モデルとして検討した。母親マウスに対して抗菌薬を投与すると、腸管内の代謝動態が変動し、特に遺伝子のメチル化に関与する代謝産物濃度が変化した。この母親マウスから産まれた仔において腸内細菌叢の α 多様性の低下が見られた。しかしながら、食物アレルギー試験において有意な違いは認められなかった。仔マウスを交配し、孫マウスを作出し、食物アレルギー試験を行った結果、抗菌薬群において、アレルギーの強度は対照群と差はないもののアレルギー発症頻度が高値を示した。仔マウス、孫マウスの食物アレルギー試験の過程で、新規環境下における糞便排出数を観察した結果、仔マウスにおいても孫マウスにおいても糞便排出数が高値を示した。糞便排出数は、腸管の運動性やストレスの強度と関係することが報告されており、今後血中コルチゾール等のストレスマーカーも検討していく予定である。

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、生まれてくる次世代、次々世代の将来の疾病リスク、特に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) マウスの腸内環境への介入による代謝産物濃度の測定

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、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 の代謝産物に注目し、キャピラリー電気泳動質量分析器 (CE/MS) を用いて解析を行った。雌性 C57BL6/J のマウスに 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 4 週間自由飲水投与した後、腸管内容物、盲腸、血液中の代謝産物を CE/MS で解析した。

2) Avy/BALB/c マウスにおける母親の腸内細菌叢の破綻モデルの作成と交配

Agouti viable yellow マウスを BALB/c マウスに 6 世代以上戻し交配したマウス (Avy/C マウス) を実験に使用した。12 匹の Avy/C 雌マウスを 2 群に分け、1 グループには抗菌薬を、もう一方のグループには溶媒を 2 週間投与した。投与終了後 1 日空けて、雄の BALB/c マウスと交配し、仔マウスを作出した。各親マウスから産まれた仔マウスのうち、2 匹ずつを食物アレルギー試験に用いた。別の雌雄の仔マウスを交配し、孫マウスを作出した。母親マウスの糞便を、抗菌薬投与終了時、出産 7 日前、出産 1 日前に採取し解析に用いた。仔マウス、孫マウスの糞便は 8 週齢時に採取し、解析に用いた。

3) 食物アレルギー発症モデルによる検討と経口 OVA 負荷試験

マウスの食物アレルギーモデルには 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を使用した。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。

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。OVA 投与は隔日で 10 回実施し、累積下痢発症率および下痢症の重症度を評価した。下痢症の重症度の評価は、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。

4) 新規環境下における糞便排出数の測定

OVA 負荷試験を行う 10 分前に、マウスを個別の空ケージに移した。10 分後、ケージ内の糞便数を計測した。また OVA 負荷試験を行った 60 分間の糞便排出数も計測した。

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) 糞便中細菌叢の解析

採取した糞便から、市販のキット (FAVORPEP, stool DNA isolation kit) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) で、腸内細菌叢をスクリーニングし、次世代シーケンス解析により詳細に解析を行った。の大まかな違いを調べた。DGGE は 糞便中 DNA を鋳型に GC-clamp のついた primer set を用いて Ex-Taq (TAKARA) で PCR を行い (GC-Eubacteria)、PCR 産物はアクリルアミド 8%、変性剤の濃度勾配 20-80%、200 V で 4 時間泳動した。泳動終了後のゲルを 0.5 \times TAE で 1 万倍希釈した Gelstar (Lonza) で 30 分間染色し、Chemi-DocMP で画像撮映した。撮映した画像は、Image Lab (Bio-Red) で定量解析した。次世代シーケンス解析は株式会社生物技研に委託した。2step-PCR を用いてライブラリーを作製し、MiSeq を用いて 2 \times 300bp の条件でシーケンスを行った。シーケンスデータは配列を確認した後 Qiime および Qiime2 を用いて解析を行った。 α 多様性の解析は shannon index を用いた。

結果と考察

1) マウスの腸内環境への介入による代謝産物濃度の測定

雌性の C57BL6J マウスに 4 種の抗菌薬の混合液を 4 週間自由飲水投与した後、腸管内容物、盲腸、血液中の代謝産物を CE/MS で解析した。盲腸内容物。盲腸中においてメチル基の供与体として重要なメチオニンと s-Adenosylmethionine 濃度が、対照群に比較し、6.9 倍及び 1.7 倍（盲腸内容物）、2.1 倍および 3.3 倍（盲腸）高値であった。これらのことから、盲腸内で産生された代謝産物は、盲腸へ吸収されることが示唆された。反対に、抗菌薬群の血中では、メチオニン濃度は 0.4 倍と s-Adenosylmethionine 濃度は 0.6 倍と対照群に比較して低値を示した。また、血中ベタイン濃度は 0.4 倍、N,N-dimethylglycine 濃度は 0.3 倍と対照群と比較して低値であった。これらの代謝産物は、ホモシステインからメチオニンへの変換経路に関与するため、抗菌薬群ではメチオニンへの変換が低下することでメチオニン濃度も低下し、メチオニンから合成される S-adenosylmethionine の濃度も低下したと考えることができる。盲腸内容物や盲腸内の代謝産物濃度と血中の代謝産物濃度の相違については、今後の検討が必要である。

2) Avy/BALB/c マウスにおける母親の腸内細菌叢の破綻モデルの作成と交配

現在までに 40 匹の仔マウスと 36 匹の孫マウスを解析のためにサンプリングした。飼育期間中の体重変化や、解剖時の体重当たりの肝臓重量、脾臓重量に両群間で有意な違いは見られなかった。解剖時に回収した上皮間免疫細胞とリンパ濾胞免疫細胞（採取方法は H29 年度の報告書と同じ）から DNA を抽出し、avy 領域を含む遺伝子のメチル化度合いを検討する予定である（現在、解析中）。

3.5) 食物アレルギー発症モデルによる検討

仔マウス（コントロール群 12 匹、抗菌薬群 11 匹）の食物アレルギー累積発症数には両群間で有意な変化はなかった ($p=0.23$)。アレルギーの重症度も両群間で差異はなかった。しかしながら、新規環境下における糞便排出数は、コントロール群で 4.8 ± 2.1 個/日(平均値 \pm 標準偏差)、抗菌薬群で 7.6 ± 2.7 個/日であり、抗菌薬群で有意に高値であった。OVA 特異的 IgE 濃度は、コントロール群で 192 ± 224 ng/ml(平均値 \pm 標準偏差)、抗菌薬群で 199 ± 97 ng/ml であり、両群間に有意な差異は認められなかった。

孫マウス（コントロール群 9 匹、抗菌薬群 10 匹）の食物アレルギー累積発症数には、抗菌薬群で有意に高値を示した(コントロール群 vs. 抗菌薬群、36 vs. 54, $p=0.042$)。一方でアレルギーの重症度は両群間で差異はなかった。これらの違いはアレルギーの重症度の個体差が大きい事に起因すると考えられる。新規環境下における糞便排出数は、コントロール群で 3.9 ± 1.8 個/日(平均値 \pm 標準偏差)、抗菌薬群で 4.8 ± 2.3 個/日であり、その差は仔と比較すると小さいものの抗菌薬群で有意に高値であった。OVA 特異的 IgE 濃度は、コントロール群で 286 ± 260 ng/ml(平均値 \pm 標準偏差)、抗菌薬群で 295 ± 261 ng/ml であり、両群間に有意な差異は認められなかった。

新規環境下における糞便排出数は、グレリンなどのホルモンの作用や過度のストレスによる腸管運動の亢進によって見られるため、今後は仔や孫の血中コルチゾール濃度を測定することでストレス強度を評価する予定である。また、孫のグループでは、食物アレルギー累積発症数がコントロール群と比較して有意に高値を示したため、血中IL-4濃度やMCP-1濃度等の測定を行う予定である。また、血中OVA濃度は個体差が大きく、今後の検討に際して考慮する必要がある。

6) 糞便中細菌叢の解析

コントロール群の母親と抗菌薬群の母親の抗菌薬投与直後、出産7日前、出産1日前の糞便の菌叢をDGGE法で比較すると、コントロール群では期間を通して大きな変動がなかった。一方で抗菌薬群では、抗菌薬投与後では、ほとんど菌のバンドが見られず、抗菌薬がしっかりと作用している事が確認できた。抗菌薬投与を終了し、交配した後、出産7日前および1日前の菌叢は、コントロール群と比較して大きく異なり、抗菌薬投与後の菌叢の回復過程で、もともと存在していた菌とは異なる細菌叢が形成されたことがわかった。そこで、出産7日前と1日前の菌叢を次世代シーケンサーにより詳細に解析した。shannonの α 多様性を解析した結果、出産7日前の菌叢では、コントロール群で 4.0 ± 0.3 (平均値 \pm 標準偏差)、抗菌薬群で 3.9 ± 0.4 であり、両群間に有意な違いは認められなかった。同様に出産7日前の菌叢では、コントロール群で 3.7 ± 0.5 (平均値 \pm 標準偏差)、抗菌薬群で 3.7 ± 0.4 であり、両群間に有意な違いは認められなかったものの出産7日前と比較して多様性の減少が認められた。これは、妊娠を3期に分割した場合、第3期において多様性が低下するという先行研究と同一のものであった。また、抗菌薬群でコントロール群と比較して有意に変化した菌のグループを調べると、*Bifidobacterium* 属、*Adlercreutzia* 属などの *Actinobacteria* 門、*Lactococcus* 属などの *Firmicutes* 門が抗菌薬群で増加し、近年新たに存在が認められつつある TM7-TM7-3-CW040-F16 グループが有意に低下していた。

仔の細菌叢をDGGE解析でスクリーニングした結果、コントロール群とは有意な違いがあることがわかったので、次世代シーケンス解析を行った。

抗菌薬群で有意に高値であった。shannonの α 多様性を解析した結果、コントロール群で 3.8 ± 0.4 (平均値 \pm 標準偏差)、抗菌薬群で 3.3 ± 0.4 であり、抗菌薬群では多様性が有意に低値であることが明らかとなった。また、抗菌薬群でコントロール群と比較して有意に変化した菌のグループを調べると、*Bifidobacterium* 属、*Adlercreutzia* 属などの *Actinobacteria* 門、*Lactococcus* 属などの *Firmicutes* 門が抗菌薬群で増加し、TM7-TM7-3-CW040-F16 グループが有意に低下するといった母親マウスの菌叢と類似した結果が得られた。以上のことから、子供の腸内細菌叢は、母親の腸内細菌由来の菌をベースに構成されることに加えて、それらの変化とともに多様性の低下が引き起こされることが明らかとなった。腸内細菌叢の多様性の低下は、食物アレルギー発症と関連するという報告があるが、本研究の仔マウスにおいては、そのような違いは認められなかった。一方で、新規

環境下での糞便排出数の増加で示されるように、新規環境での腸管運動性の亢進が認められ、これらの変化は腸内細菌叢の変化と関連する可能性が示された。

<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②および③の検討を主体に、母親の腸内環境の変化が子供のアレルギー発症に及ぼす影響を明らかにすることができた。特に孫マウスにおいて、食物アレルギーの累積発症数に抗菌薬群で有意な違いが認められた。この解析手法は、個体間のばらつきの影響を測定回数を増やすことで抑制することができるため、今後の評価項目として利用可能である可能性も示された。目標①に関しては、個体数が多いため、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の検討は十分に実施できていない。この点に関しては、今後、継続して解析していく予定である。

<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、およびアレルギー発症に関するローカルなメチル化度合いの検討が充分になされていないこと、2. 孫世代の腸内細菌叢の解析が充分に実施できていないことが挙げられる。これらについては引き続き検討を進めていく予定である。

本検討において、母親の腸内細菌叢の違いが、新規環境下における糞便排出数の増加という、当初想定していなかった結果が得られた。今後は、この糞便排出数の増加が、どのような機構により引き起こされているのかを検討していく予定である。

<学会や論文発表等の予定>

遺伝子のメチル化および孫世代の腸内細菌叢解析、ストレス関連物質の評価を行い、学会発表および論文作成につなげる予定である

今後の研究活動について

本研究において、母親への抗菌薬投与による腸内細菌叢の異常は、子供に引き継がれることが明らかとなった。一方で、食物アレルギー発症に及ぼす影響は、大きくなかった。先行研究では、腸内細菌叢の多様性の低下が、食物アレルギー発症と関連することが報告されている。すなわち、腸内細菌叢の多様性そのものは、アレルギー発症に影響せず、多様性の低下とともに引き起こされた

菌叢の特異的な変化が食物アレルギー発症に重要であることが示唆された⁶⁾。このことは、食物アレルギー発症を予防し得る腸内細菌叢の存在を支持している。実際に、本研究で使用した抗菌薬投与マウスの腸内細菌叢には、善玉菌と考えられている *Bifidobacterium* 属や *Lactococcus* 属が多く存在した。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、孫世代へも影響を及ぼす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) 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
- 4) 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
- 5) Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DI. Germ-line epigenetic modification of the murine A_{vy} allele by nutritional supplementation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 14;103(46):17308-12
- 6) 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