

ニッポンハム食の未来財団 2021 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	高度不飽和脂肪酸欠乏による食物アレルギー応答の制御変化と機序の解明
フリガナ	イチ イクヨ
代表者名	市 育代
所属機関 (機関名) (役職名)	お茶の水女子大学基幹研究院 准教授
本助成金による 発表論文, 学会発表	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 第 68 回脂質生化学会 シンポジウム「脂質生化学とビタミン学の接点」 多価不飽和脂肪酸欠乏による代償的な脂質代謝の制御 市 育代</li> <li>・ 第 76 回日本栄養・食糧学会大会 FADS2 欠損による高度不飽和脂肪酸欠乏が食物アレルギーの病態に及ぼす影響 神野有紀、藤原葉子、市 育代</li> </ul>

研究結果要約

多価不飽和脂肪酸 (PUFA) のうち炭素数 20 以上のアラキドン酸や EPA、DHA などの高度不飽和脂肪酸は、免疫応答など生体の恒常性維持に必要な脂質である。高度不飽和脂肪酸に関して食物アレルギーの病態について検討した報告は多くあるが、欠乏が食物アレルギーの病態に及ぼす影響は不明である。高度不飽和脂肪酸は食事だけでなく、生体内で炭素数 18 の PUFA から生合成され、その産生酵素に FADS2 (Fatty acid desaturase 2) がある。我々はこれまで、FADS2 の欠損マウスに PUFA 欠乏食を与えると、高度不飽和脂肪酸の減少が顕著であることを明らかにしている (FEBS letter, 2021)。そこで本研究では、FADS2 欠損による高度不飽和脂肪酸の欠乏が卵白アルブミン (OVA) による食物アレルギーの病態に及ぼす影響を調べた。

OVA 感作の PUFA 欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスは、OVA 感作の野生型マウスに比べて、血漿や小腸の高度不飽和脂肪酸が著しく減少した。そして、OVA 感作の FADS2 欠損マウスでは脾臓重量が有意に増加した。また、このマウスでは OVA 特異的 IgE と脱顆粒の指標である MCPT-1 の血中濃度が増加し、トルイジンブルー染色の結果から小腸においてマスト細胞の浸潤が確認できた。以上の結果より、高度不飽和脂肪酸の欠乏は OVA による食物アレルギーの病態を悪化させる可

能性が示唆された。

## 研究目的

食物アレルギー患者の増加は重要な社会問題であり、予防及び治療の基本は原因食物を食べない「除去食療法」である。食物アレルギーの原因食品はヒトにおいて重要なタンパク質源であることから、不必要に複数の食品を除去することは小児の成長障害を誘導し、病態悪化を促すことが指摘されている。一方で、食物アレルギーの原因食品である牛乳や卵、ピーナッツ、魚などは食事から摂取しなければならない必須の多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が多く含まれる食品でもある。したがって、複数の食品除去を行っているアレルギー患者では食事由来の PUFA が欠乏している可能性が危惧される<sup>1)</sup>。

PUFA は構成している炭素数や二重結合の数・位置によってその作用が異なる。哺乳動物は n-3 系及び n-6 系 PUFA は合成できないが、これらの PUFA に対する不飽和酵素や鎖長伸長酵素が存在することから、炭素数 18 の PUFA を炭素数 20 以上の PUFA に変換することができる。PUFA の中でも、炭素数が 20 以上で二重結合が 3 個以上の PUFA は高度不飽和脂肪酸といわれ、膜の流動性に影響を及ぼし、その代謝物も含めて生理活性を有する脂質として生理機能が着目されている<sup>2)</sup>。例えば、n-6 系 PUFA のアラキドン酸 (20:4n-6) は炎症性の脂質メディエーターの前駆物質として<sup>3)</sup>、n-3 系 PUFA の EPA (20:5n-3) や DHA (22:6n-3) は抗炎症性の脂質メディエーターとして作用することが知られている<sup>4)</sup>。一方、PUFA の欠乏に関して、食物アレルギーの病態に及ぼす影響を検討した報告は殆どない。そこで我々は、PUFA 欠乏食を与えた通常のマウスに対してオボアルブミン (OVA) による食物アレルギーを誘導させ、病態に対する影響を検討した。しかしながら、PUFA 欠乏マウスにおける OVA 特異的 IgE 濃度の上昇を確認することができなかった<sup>5)</sup>。一方で、OVA を投与したマウスでは PUFA 欠乏食を与えているにも関わらず、小腸において高度不飽和脂肪酸が増加するという興味深い現象がみられた。したがって、高度不飽和脂肪酸の減少を誘導した際にはアレルギーに対する影響が異なる可能性を考えた。本研究では、生体内において炭素数 18 の PUFA から高度不飽和脂肪酸の変換の律速酵素である FADS2 の欠損マウスに PUFA 欠乏食を与え、高度

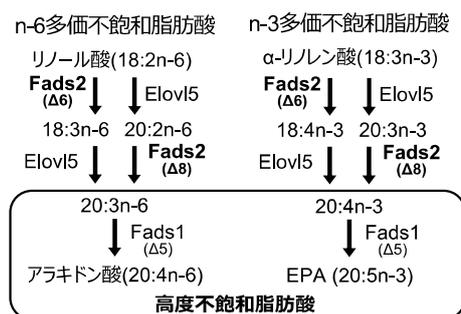
不飽和脂肪酸欠乏にすることで、OVAによるアレルギーの病態や免疫応答に及ぼす影響を評価した。本研究において、高度不飽和脂肪酸の欠乏がアレルギー病態の悪化を誘導するかを明らかにし、食物アレルギーの治療における新たな見解を提示することを目指す。

本研究は、これまで食物アレルギーの研究において着目されていなかった脂質の欠乏という観点から、食事からの摂取が必要である PUFA の欠乏が食物アレルギーの病態悪化を誘導するかを検討し、その制御機構を明らかにする。本研究の成果は、食物アレルギーの除去食療法において、PUFA が欠乏しないための食事療法を提案し、食物アレルギーにおいてこれまで軽視されていた脂質の栄養の重要性を提示することに繋がる。

## 研究計画及び研究手法

### 1. 高度不飽和脂肪酸欠乏がオボアルブミンによる食物アレルギーの病態と免疫応答に及ぼす影響

本研究では、PUFA の中でも炭素数 20 以上二重結合 3 つ以上の高度不飽和脂肪酸の欠乏によって OVA による食物アレルギーの病態悪化が誘導されるかを検討し、その制御機構を明らかにする。これまで、高度不飽和脂肪酸の欠乏がアレルギーの病態に及ぼす影響を検討した報告がない



理由として、通常のマウスに PUFA 欠乏食を与えても生体内で C18PUFA から変換される高度不飽和脂肪酸が存在するためである。我々はこれまで、C18PUFA から C20PUFA の産生経路の律速酵素である Fatty acid desaturase 2 (FADS2) の欠損マウス

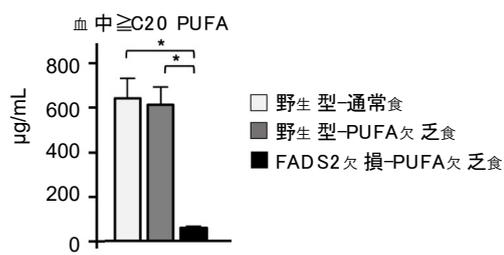


図1 FADS2欠損マウスにおける高度不飽和脂肪酸減少

スに PUFA 欠乏食を与え、高度不飽和脂肪酸が著しく減少することを明らかにしている<sup>6)</sup>(図1)。

そこで本研究では、FADS2 を介した高度不飽和脂肪酸欠乏マウスを用いて、OVA による食物アレルギーの病態が悪化するかを評価し、その要因について検討を行う。

実験動物には 12-13 週齢の雌性 C57BL/6J マウス (WT) と FADS2 欠損マウス (KO) を用いた。食餌は AIN93G に準じており、通常食の油脂源は PUFA が含まれる大豆油を、PUFA 欠乏食の油脂源は飽和脂肪酸であるパルミチン酸が結合したトリパルミチンを用いた。野生型マウスには通常食または PUFA 欠

乏食を、FADS2 欠損マウスには PUFA 欠乏食を与えた (図 2)。OVA による感作には、14 日目と 28 日目に 50  $\mu$ g の OVA と 100  $\mu$ l の免疫賦活剤 (Complete Freund's Adjuvant) を腹腔内投与し、アレルギー反応の誘導には、42 日目から OVA の経口投与を 5 回行った。

解析項目として、各マウスの小腸において詳細な脂質解析を行なった。そして、OVA 特異的 IgE 濃度、マスト細胞の脱顆粒の指標である MCPT-1 濃度を ELISA 法により測定した。小腸の組織学的免疫染色を行い、アレルギーの病態を確認した。また、小腸や大腸において炎症やタイトジャンクションに関わるタンパク質の発現変化を調べた。本研究の申請書ではマウスの脾臓に存在するマスト細胞の表現型を解析し、マスト細胞が高度不飽和脂肪酸欠乏による免疫応答の悪化に関与しているかを明らかにする予定であったが、脾臓からマスト細胞を回収する実験系が確立できず、今回この実験に関しては結果を出すことができなかった。

## 2. 多価不飽和脂肪酸欠乏が IgE を介したマスト細胞の活性化に及ぼす影響

食物アレルギーによる IgE 依存的な免疫応答では、アレルゲンが侵入することでアレルゲン特異的な IgE 抗体の産生が亢進し、再びアレルゲンが侵入することでマスト細胞の活性化が誘導され、アレルギー症状がみられる。本研究の申請書では、マスト細胞のモデルであるラット好塩基球性白血球細胞株 RBL-2H3 を lipid free の無血清培地で培養し、FADS2 の siRNA による遺伝子発現抑制を行うことで、高度不飽和脂肪酸欠乏のマスト細胞を作成する予定であった。しかしながら、上

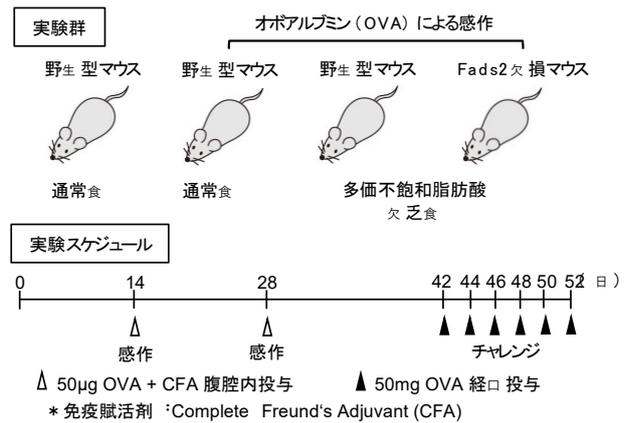


図2 OVAによるアレルギー感作の条件

記の条件で培養を行なっても、高度不飽和脂肪酸の減少はわずかで、欠乏状態を作成することはできなかつたため、培養細胞での解析ができなかつた。

## 結果と考察

OVA 感作マウスの血漿及び小腸の脂肪酸組成を解析すると、血漿では C20 以上の PUFA である高度不飽和脂肪酸は PUFA 欠乏食を与えた 2 群で減少し、FADS2 欠損マウスではさらに減少した (図 2)。一方、小腸では OVA 感作の野生型マウスで C20 以上の PUFA が増加傾向にあり、PUFA 欠乏食を与えた野生型マウスでも減少はみられなかつた。そして、PUFA 欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスの小腸では、C20 以上の PUFA の高度不飽和脂肪酸が著しく減少した。その内訳を見ると、n-6 系 PUFA のアラキドン酸の減少が顕著であつた。そこで、OVA 感作の野生型マウスにおける小腸の C20 以上の PUFA の増加に関して、C18PUFA から C20PUFA の変換に関わる FADS1 と FADS2、ELOVL5 の遺伝子発現を調べた。しかし、小腸においてこれらの酵素の遺伝子発現の変化は確認できなかつた。本研究で、OVA 感作の野生型マウスにおいて高度不飽和脂肪酸が増加する要因を明らかにすることができなかつたが、今後小腸において高度不飽和脂肪酸が増加する生理的意義について明らかにする必要がある。

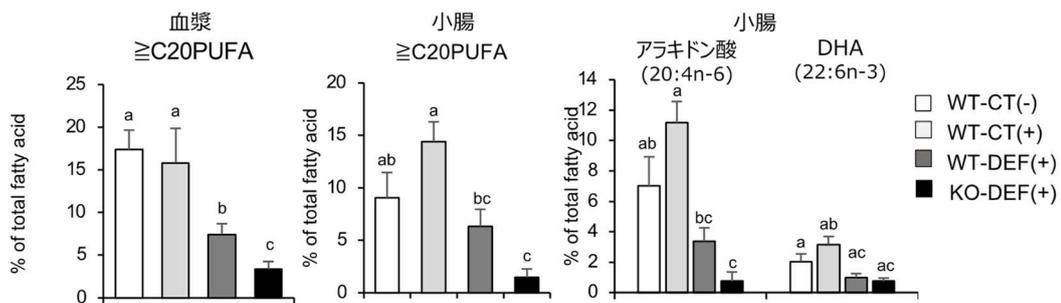


図2 高度不飽和脂肪酸欠乏マウスの小腸の脂肪酸組成

また、OVA 感作後のマウスで体重変化は見られなかつたが、脾臓重量は増加傾向にあり、PUFA 欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでさらに増加した (図 3)。OVA 特異的 IgE とマスト細胞の脱顆粒の指標である MCPT-1 の血中濃度を調べたところ、OVA 感作マウスでこれらの血中濃度が増加しており、PUFA 欠乏の FADS2 欠損マウスではさらに増加した (図 3)。また、小腸のトルイジンブルー染色の結果、OVA 感作を行なつた群ではリンパ球の粘膜への浸潤が増加していた。さらに、

FADS2 欠損マウスではリンパ球浸潤に加え、マスト細胞の浸潤も確認できた。したがって、高度不飽和脂肪酸欠乏が欠乏した FADS2 欠損マウスでは、OVA 感作後のアレルギーの病態が悪化していることがわかった。脂肪酸組成の解析結果より、本研究の FADS2 を介した高度不飽和脂肪酸欠乏マウスではアラキドン酸の減少が

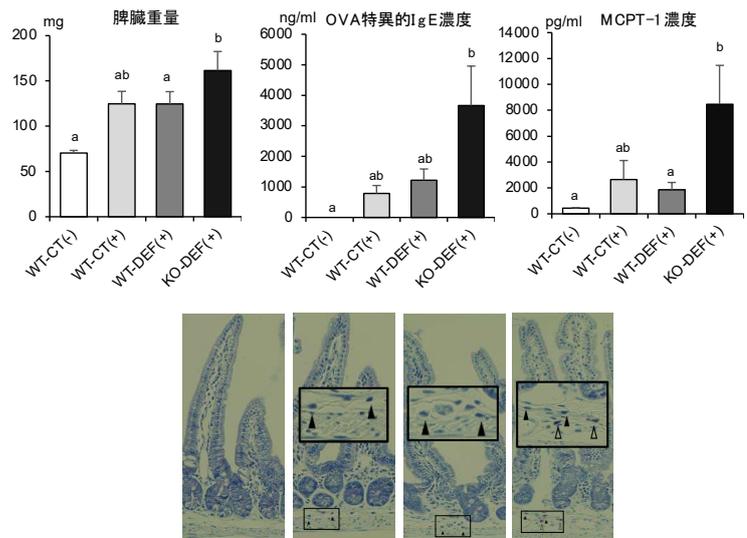


図3 高度不飽和脂肪酸欠乏マウスのアレルギーの病態

顕著であった。これまで体内のアラキドン酸が非常に少ない FADS1 欠損マウスでは、結腸の陰窩細胞の増殖能が著しく減少することが報告されている<sup>7)</sup>。また、アラキドン酸由来の代謝物 PGD<sub>2</sub> の産生酵素の欠損マウスではマスト細胞の腸管浸潤が増加したことも報告されており<sup>8)</sup>、これらの知見は、アラキドン酸を含む PUFA が減少すると、腸における炎症反応をより促進するという本研究の結果を支持するものであることが示唆される。

PUFA の多くは細胞膜のリン脂質に局在し、膜の物性に影響を与えるが、その制御によってどのような生命現象が影響を受けるかは明確ではない。LPCAT3 (Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3) という酵素はアラキドン酸をリン脂質膜に取り込むことが報告されており<sup>7)</sup>、腸と肝臓に高レベルで存在することが知られている。LPCAT3 を欠損したマウスは、腸に深刻な障害が現れ、生後数日で死亡することが報告されている<sup>8)</sup>。また、腸管バリアの破綻が生じている潰瘍性大腸炎の患者の大腸では、主要なリン脂質であるホスファチジルコリン (PC) の減少が見られたという報告があり<sup>11)</sup>、腸におけるリン脂質の PUFA の重要性が示唆される。そこで、本研究のマウスのリン脂質を TLC にて分画したところ、PUFA 欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスで PC の減少はみられなかった。一方で、FADS2 欠損マウスの PC の脂肪酸組成を調べると炭素数 20 以上 PUFA

が著しく減少し、その前駆物質である C18PUFA が増加していた。したがって、FADS2 欠損マウス

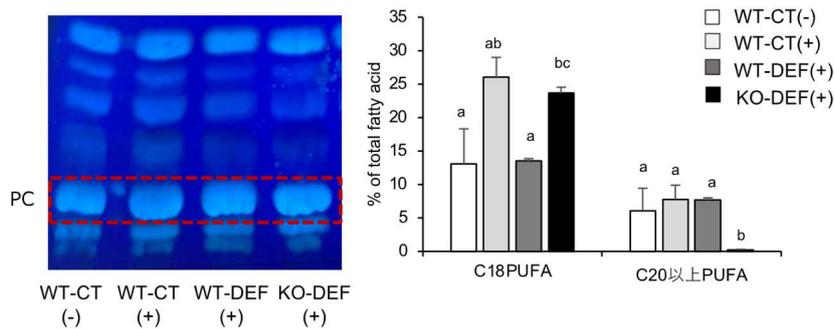


図4 ホスファチジルコリン(PC)のTLCによる分画とPCの脂肪酸組成

の小腸のリン脂質では高度不飽和脂肪酸が著しく減少していることがわかった。

そこで、小腸のリン脂質の高度不飽和脂肪酸が減少している FADS2 欠損マウスでタイトジャンクション関連タンパク質の遺伝子発現が変化しているかを調べた。PUFA 欠乏食を与えた野生型マウスと FADS2 欠損マウスでは通常食を与えた野生型マウスに比べて、Occludin と Claudin2 の遺伝子発現は減少したが、FADS2 欠損マウスでさらなる減少は確認できなかった。今後タイトジャンクション関連遺伝子のタンパク質発現や免疫組織染色などを調べることで、小腸のリン脂質における高度不飽和脂肪酸の欠乏がタイトジャンクションに及ぼす影響について明らかにする必要がある。

本研究の成果は、国内学会及び国際学会で発表する予定である。また、FADS2 を介した高度不飽和脂肪酸欠乏マウスにおけるアレルギーの病態悪化とその制御機構に関しては、いくつか追加データを出し、国際誌に投稿する予定である。

#### 今後の研究活動について

本研究では、高度不飽和脂肪酸の欠乏が OVA による食物アレルギーを悪化させることを明らかにしたが、その要因を明確にすることはできなかった。本研究の OVA 感作の高度不飽和脂肪酸欠乏マウスでは脾臓重量の増加がみられたことから、今後脾臓の表現型の解析を行いたいと考えている。

また、高度不飽和脂肪酸欠乏マウスの腸内細菌叢の変化を調べ、欠乏による腸内細菌叢の異常が代謝性疾患や炎症性腸疾患の病態増悪因子となりうるかを明らかにする。哺乳動物において生体内の高度不飽和脂肪酸の変換を担う FADS2 は一塩基多型 (SNP) に関する報告が多数あり、このようなヒトでは血中の高度不飽和脂肪酸が低く、肥満や心疾患、アレルギーの発症率が高いことが報告

されている<sup>9,10</sup>。栄養問題は多様化・個別化しており、今後栄養欠乏への対応は重要視される可能性が高い。腸内細菌叢は様々な機序で全身の代謝を制御していることから、高度不飽和脂肪酸の欠乏が腸内細菌叢を介して代謝性疾患や炎症性腸疾患の病態悪化に関与するかを明らかにすることで、低栄養の食事療法において脂質栄養が重要であるという新たな見解を提示したい。

## 参考文献

- 1) Paassilta M, Kuusela E, Korppi M, Lemponen R, M. Kaila, S.T. Nikkari. Food allergy in small children carries a risk of essential fatty acid deficiency, as detected by elevated serum mead acid proportion of total fatty acids. *Lipids Health Dis.* 2014 13 180.
- 2) Yetiv JZ, Clinical applications of fish oils. *J Am Med Assoc.* 1988 260 665-670.
- 3) Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity, *Eur J Clin Nutr.* 2002 56 S14-S19.
- 4) Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta* 2015 1851 469-484.
- 5) Hayashi Y, Yokomizo Y, Fujiwara Y, Ichi I. The effect of polyunsaturated fatty acid deficiency on allergic response in ovalbumin-immunized mice. *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids.* 2021 164 102231.
- 6) Hayashi Y, Lee-Okada HC, Nakamura E, Tada N, Yokomizo T, Fujiwara Y, Ichi I. Ablation of fatty acid desaturase 2 (FADS2) exacerbates hepatic triacylglycerol and cholesterol accumulation in polyunsaturated fatty acid-depleted mice. *FEBS letters.* 2021 595 1920-1932.
- 7) Fan YY, Monk JM, Hou TY, Callway E, Vincent L, Weeks B, Yang P, Chapkin RS. Characterization of an arachidonic acid-deficient (Fads1 knockout) mouse model. *J Lipid Res.* 2012 2012 53 1287-1295.
- 8) Nakamura T, Maeda S, Horiguchi K, Maehara T, Aritake K, Choi B, Iwakura Y, Urade Y, Murata T. PGD2 deficiency exacerbates food antigen-induced mast cell hyperplasia. *Nature Commun.* 2015 6 7514.
- 9) Gijón MA, Riekhof WR, Zarini S, Murphy RC, Voelker DR. Lysophospholipid acyltransferases and arachidonate recycling in human neutrophils. *J Biol Chem.* 2008 283 30235-30245.
- 10) Hashidate-Yoshida T, Harayama T, Hishikawa D, Morimoto R, Hamano F, Tokuoka SM,

Shimizu T. Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport eLife 2015 4.

11) Braun A, Treede I, Gotthardt D, Tietje A, Zahn A, Ruhwald R, Schoenfeld U, Welsch T, Kienle P, Erben G, Lehmann WD, Fuellekrug J, Stremmel W, Eehalt R. Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: a clue to pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 15 1705-1720

12) Cormier H, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Julien P, Vohl M. Effects of FADS and ELOVL polymorphisms on indexes of desaturase and elongase activities: Results from a pre-post fish oil supplementation. *Genes Nutr.* 2014 9 437.

13) Schaeffer L, Gohlke H, Müller M, Heid IM, Palmer LJ, Kompauer I. Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum Mol Genet.* 2006 15 1745-1756.

以上