

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	魚油由来脂肪酸による食物アレルギー予防効果の実証と、そのメカニズムの解明
フリガナ	ニシ コウスケ
代表者名	西 甲介
所属機関 (機関名) (役職名)	愛媛大学 大学院農学研究科 生命機能学専攻 准教授
本助成金による 発表論文、学会発表	本助成金による研究成果について、2022 年度中に学会発表をする予定である。また、実験結果の解析がまとまり、必要な追加実験を行った後に、速やかに学術論文として発表する予定である。

研究結果要約

複数の先行研究において、青魚に豊富に含まれるドコサヘキサエン酸（DHA）にアレルギー症状を緩和する効果があることが報告されている。また、DHA がアレルギー疾患の発症に対して予防的に機能する可能性についても示唆されている。しかし、食物アレルギー発症に対する DHA の予防効果を実証した報告はない。本研究では、DHA を継続的に摂取させたマウスに食物アレルギーの発症を誘導し、食物アレルギーの一次予防に対する DHA 摂取の有効性について検証した。実験を実施した結果、DHA の摂取量を 200 mg/kg/day とした場合、食物アレルギーの一次予防に対する DHA 摂取の有効性は認められなかった。一方、DHA の摂取量を 800 mg/kg/day とした場合、DHA 摂取の有効性が認められた。食物アレルギーを発症したマウスにアレルゲンを経口投与すると、直腸温度が低下し続け、下痢の症状が認められた。一方、DHA を継続的に摂取し、食物アレルギーの発症を誘導したマウスでは、アレルゲンの経口投与直後に直腸温度が一時的に低下したが、間もなく回復した。血液分析の結果、DHA 摂取マウスではアレルゲンに対する IgE 抗体の産生量が非摂取のマウスと比べて統計学的に有意に低下していた。したがって、アレルゲンに対する IgE 抗体の産生を DHA が阻害することによって食物アレルギーの一次予防効果を発揮する可能性が示唆された。

研究目的

食物アレルギーを含むアレルギー疾患の多くは IgE 抗体依存性であり、アレルゲン特異的 IgE 抗体を介してマスト細胞や好塩基球などの免疫細胞が活性化し、ヒスタミンや種々のケミカルメディエーター、サイトカインの放出によってアレルギー症状が惹起される。様々な先行研究において、魚油に豊富に含まれる多価不飽和脂肪酸の一つであるドコサヘキサエン酸（DHA）が抗アレルギー効果を示すことが報告されている。申請者は先行研究においてスギ花粉症モデルマウスを作製し、DHA を一定期間経口投与して、花粉症の症状への影響を評価した。その結果、DHA に花粉症の症状を緩和する効果があることを実証した^{1,2)}。

IgE 抗体依存性の即時型アレルギーの発症には液性免疫が大きく関わるため、DHA を経口投与したスギ花粉症モデルマウスの脾臓中のリンパ球の細胞数やその性質を解析した結果、DHA 投与群のマウスの脾臓では、活性化した 1 型ヘルパー T 細胞（Th1）の割合が増加し、活性化 2 型ヘルパー T 細胞（Th2）の割合が減少していた。Th1 細胞は細胞性免疫の活性化を、Th2 細胞は液性免疫の活性化をそれぞれ調節することから、DHA はアレルギー反応に関わる液性免疫の活性化を下方制御することによって、花粉症の症状を緩和すると考えられる。

一方、DHA の「活性型 Th1 細胞の割合を増加させ、活性型 Th2 細胞の割合を減少させる」作用はアレルギー症状の緩和だけでなく、アレルギー疾患の一次予防にも効果的である可能性を示唆する。すなわち、DHA を継続的に摂取すると液性免疫の活性化が抑制され、アレルギー疾患を発症しにくく（感作されにくく）なると期待できる。本研究の目的は、継続的な DHA の摂取による食物アレルギーの一次予防における有効性を検証することである。

本研究では、DHA を経口投与したマウスに食物アレルギーの発症（感作）を誘導し、症状の程度を比較する。また、生化学的・分子生物学的解析によって、DHA がどのようにして食物アレルギーの一次予防効果を発揮するのか解析する。本研究で得られるデータから、継続的な DHA の摂取による食物アレルギーの一次予防への有効性を明らかにするとともに、日常の食事（特にハイリスクの乳幼児の食事）を通じた食物アレルギーの一次予防への新たな知見が得られると期待される。

研究計画及び研究手法

食物アレルギーモデルマウスの作製と DHA の経口投与による影響評価

メスの BALB/c マウスを 1 週間馴化させた後、無作為に 3 群（非感作処理・水投与群、感作処理・水投与群、感作処理・DHA 投与群）に分けた。その後、安楽死の前日まで（1 日目～50 日目）、感作処理・DHA 投与群のマウスに DHA を毎日経口投与した。一方、非感作処理・水投与群および感作処理・水投与群のマウスには、DHA の代わりに水を経口投与した。8 日目に感作処理群のマウスの背部を剃毛した後、4%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液を塗布した。続いて 50 mg の卵白アルブミンを水に溶解してパッチテスターに塗布し、マウス背部に 4 週間（36 日目まで）貼布した。36 日目から 48 日目までは、一日おきに 50 mg の卵白アルブミンを水に溶解して経口投与した。50 日目に全群のマウスに 100 mg の卵白アルブミンを水に溶解して経口投与し、食物アレルギー反応を誘導した。経口投与直後から 60 分間、直腸温度を計測した。51 日目に全群のマウスを深麻酔下で全採血して安楽死させた後、脾臓と空腸を摘出した。

血中 IgE レベルに及ぼす DHA の影響の評価

マウスから血液を採取した後、血清を調製し、血清中の総 IgE レベルを ELISA 法（BioLegend 社製）で測定した。また、血清中の抗卵白アルブミン IgE レベルを ELISA 法（富士フイルムワコーシバヤギ社製）で測定した。

脾細胞のサイトカイン産生に及ぼす DHA の影響の評価

マウスから摘出した脾臓から脾細胞を調製し、赤血球を溶血させた後、RPMI1640 培地で細胞を懸濁した。100 µg/mL の卵白アルブミンを含む培地で 72 時間培養した後、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法（BioLegend 社製）で測定した。

空腸の遺伝子発現に及ぼす DHA の影響の評価

マウスの空腸の一部を採取し、速やかに RNAlater 液中に浸漬して保存した。空腸を破碎した後、常法により RNA を回収し、cDNA を合成した。GeneAce SYBR qPCR Mix α（ニッポンジ

ーン) を用いてリアルタイム PCR を実施した。本研究で用いたプライマーの塩基配列は下記のとおりである。AHR forward : 5'-AGCTTCACTGGGCTCTAAACC-3'、AHR reverse : 5'-CATGAAAGAAGCGTTCTCTGG-3'、Bcl-6 forward : 5'-CCGGCTCAATAATCTCGTGAA-3'、Bcl-6 reverse : 5'-GGTGCATGTAGAGTGGTGAGTGA-3'、Foxp3 forward : 5'-CCTGGTTGTGAGAAGGTCTTCG-3'、Foxp3 reverse : 5'-TGCTCCAGAGACTGCACCACTT-3'、GATA3 forward : 5'-ACCACCCCATACCACCTATC-3'、GATA3 reverse : 5'-ACTTACATCCGAACCCGGTAG-3'、T-bet forward : 5'-GGGAAGCTAAAGCTCACCAAC-3'、T-bet reverse : 5'-CTCTGGCTCTCCATCATTCAC-3'、TNF- α forward : 5'-CTACTCCCAGGTTCTCTTCAA-3'、TNF- α reverse : 5'-GCAGAGAGGAGGTTGACTTTC-3'、IL-6 forward : 5'-AAGCCAGAGTCCTTCAGAGAGAT-3'、IL-6 reverse : 5'-TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGC-3'。

有意差検定

有意差検定は GraphPad Prism version 7.02 (GraphPad Software) を用いて解析した。多重比較には Dunnett 検定を用いた。

結果と考察

食物アレルギーモデルマウスの作製

食物アレルギーモデルマウスの作製方法について、これまでに様々な報告がなされているが、近年、アレルゲンの経皮的な感作が食物アレルギーの発症に重要であることが報告されている。そのため、本研究でもアレルゲン (卵白アルブミン) の経皮的な感作を行った後に卵白アルブミンを経口投与して食物アレルギーの症状を評価する方法について複数の条件を検討し (data not shown)、食物アレルギーモデルマウスの作製方法を下記のとおりに確立した。

DHA の経口投与による食物アレルギー症状への影響評価

はじめに DHA の経口投与量を 200 mg/kg/day として実験を行った結果、IgE の産生や食物アレ

ルギーの発症に対して、DHA の摂取による影響は認められなかった (data not shown)。そこで、DHA の経口投与量を 800 mg/kg/day に増量して再実験を行った。マウスに卵白アルブミンを経口投与して食物アレルギー反応を誘導した結果、非感作処理群のマウスでは経口投与直後に直腸温度が一時的に下がったが、すぐに回復した (Fig. 1)。それに対して感作処理・水投与群のマウスでは卵白アルブミンを経口投与した後、60 分間にわたって直腸温度の回復が認められなかった。また、ほとんどのマウスに下痢の症状が認められた。以上の結果から、本研究で実施したモデルマウスの作製方法により、感作マウスが食物アレルギー症状を示すことを確認した。一方、感作処理・DHA 投与群のマウスに卵白アルブミンを経口投与した結果、非感作処理群のマウスと同様に、経口投与直後に直腸温度が一時的に下がったが、すぐに回復した。直腸温度の変化において感作処理・水投与群と感作処理・DHA 投与群の間に有意差が見られたことから、DHA の経口摂取は食物アレルギーの発症を予防する、あるいは食物アレルギーの症状を緩和する効果があることが明らかとなった。

DHA の経口投与による食物アレルギーモデルマウスの IgE 産生に与える影響の評価

食物アレルギー症状を評価した翌日にマウスを安楽死させ、詳細な解析を行った。まず、血清中の総 IgE レベルを測定した結果、非感作処理・水投与群のマウスの値と比較して、感作処理・水投与群のマウスでは有意に高値であった (Fig. 1)。この結果から、本研究で実施した感作方法によってマウスが十分に感作され、IgE 抗体を大量に産生することが明らかとなった。一方、感作処理・水投与群マウスの血清中の総 IgE レベルと比べて、感作処理・DHA 投与群マウスの値に有意な低下は認められなかった。そのため、DHA に経皮的な感作を予防する効果はないと考えられる。

続いて、卵白アルブミンに特異的な血清 IgE レベルを測定すると、血清中の総 IgE レベルの結果と同様に、非感作処理・水投与群マウスの値は検出限界未満であった。非感作処理・水投与群のマウスの値と比較して、感作処理・水投与群のマウスでは有意に高値であった (Fig. 1)。この結果から、本研究で実施した感作方法によってマウスが卵白アルブミンに感作され、抗卵白アルブミン IgE 抗体を大量に産生することが明らかとなった。一方、感作処理・DHA 投与群マウスの血清中の抗卵白アルブミン IgE レベルは、感作処理・水投与群マウスのそれと比べて有意に低下していた。そのた

め、DHA には卵白アルブミンに対する IgE 産生を抑制する効果があると考えられる。また、DHA の摂取により直腸温度の低下が回復した原因として、抗卵白アルブミン IgE 抗体の産生の抑制が関係した可能性がある。血清中の総 IgE レベルには影響しないが、抗卵白アルブミン IgE レベルを有意に低下させる原因や、その生理学的意義は現時点で不明であり、今後更なる検討が必要である。

DHA の経口投与による食物アレルギーモデルマウスの脾細胞のサイトカイン産生に与える影響の評価

マウスから脾臓を採取し、卵白アルブミン存在下で脾細胞を 72 時間培養した。培養上清を回収した後、各種サイトカインの濃度を ELISA 法により測定した。その結果、アレルギーの発症に関与する Th2 細胞が産生するサイトカインである IL-5、IL-4、IL-13 の産生量は、非感作処理・水投与群のマウスに比べて感作処理・水投与群のマウスで著しく増加した (Fig. 2)。一方、感作処理・DHA 投与群のマウスでは、感作処理・水投与群のマウスと比べて Th2 サイトカインの産生が減少する傾向が観察された。個体差が大きかったため有意差は認められなかったが、DHA の経口投与により、Th2 細胞の活性化が抑制されたと考えられる。その結果、食物アレルギー反応が有意に減弱されたと考えられる。

また、Th1 細胞が産生するサイトカインである IFN- γ の産生量は、非感作処理・水投与群のマウスに比べて感作処理・水投与群のマウスで有意に増加した (Fig. 2)。これは卵白アルブミンの感作により Th2 細胞の活性化 (アレルギー応答) が強く促進されたため、生体が Th1/Th2 バランスの均衡を保つために Th1 細胞が活性化されたと考えられる。同様に、制御性 T 細胞 (Treg) が産生するサイトカインである IL-10 の産生量は、非感作処理・水投与群のマウスに比べて感作処理・水投与群のマウスで有意に増加した。これは卵白アルブミンの感作により Th2 細胞の活性化が強く促進されたため、生体が Th2 細胞の過剰な活性化を抑制するために Treg 細胞が活性化されたと考えられる。一方、個体差が大きいため有意差は認められなかったが、感作処理・DHA 投与群のマウスでは、感作処理・水投与群のマウスと比べて IFN- γ と IL-10 の産生が減少する傾向が観察された。DHA の経口投与により Th2 細胞の活性化が抑制されたため、感作処理・水投与群のマウスよりも

アレルギー応答が強力ではなかったため、それに相関して Th1 細胞および Treg 細胞の活性化の程度が高くならなかったことが原因と考えられる。以上の結果から、DHA の経口投与により食物アレルギー反応が有意に減弱された原因として、DHA が Th2 細胞の活性化を抑制して食物アレルギー疾患の発症を予防した、あるいは食物アレルギー症状の程度を緩和したと考えられる。

また、炎症性サイトカインである TNF- α の産生量は非感作処理・水投与群のマウスに比べて、感作処理・水投与群のマウスで有意に増加したが、感作処理・DHA 投与群のマウスでは減少する傾向が観察された (Fig. 2)。これは DHA の経口投与によるアレルギー性炎症の緩和を示している。

DHA の経口投与による食物アレルギーモデルマウスの空腸の遺伝子発現に与える影響の評価

マウスから空腸の一部を採取し、RNA を抽出後、cDNA に逆転写してリアルタイム PCR に供した。その結果、非感作処理・水投与群と感作処理・水投与群のマウスの空腸では、AHR と Bcl-6 の遺伝子発現に差は無かったが、感作処理・DHA 投与群のマウスの空腸では、両者の遺伝子発現が促進する傾向にあった (Fig. 3)。AHR は炎症の抑制や免疫細胞の分化に重要な役割を果たすことから³⁾、DHA が空腸細胞に作用してアレルギー性炎症応答に関連する細胞の活性化を抑制する、またはアレルギー応答に関連する免疫細胞の分化を阻害するなどの作用を発揮して、食物アレルギー症状を緩和した、あるいは TNF- α の産生を抑制したと考えられる。一方、Bcl-6 は B 細胞で主に発現し、IgE 抗体の産生に関与することから⁴⁾、DHA が B 細胞に作用して IgE 抗体へのクラススイッチを阻害し、卵白アルブミンに対する IgE 産生を抑制したと考えられる。

Foxp3 と Tbet は非感作処理・水投与群のマウスと比べて、感作処理・水投与群のマウスの空腸で発現が上昇する傾向にあった (Fig. 3)。感作処理・DHA 投与群では感作処理・水投与群と比べて、さらに発現が上昇する傾向にあった。Foxp3 は Treg 細胞のマスターレギュレーターであることから⁵⁾、DHA の経口投与は Treg 細胞への分化を空腸で促進する可能性がある。一方、Tbet は IFN- γ 産生を促進することから⁶⁾、DHA の経口投与は IFN- γ 産生を空腸で促進すると考えられる。

GATA3 は非感作処理・水投与群と比べて、感作処理・水投与群のマウスの空腸で発現が上昇する傾向にあった (Fig. 3)。GATA3 は Th2 細胞分化へのマスターレギュレーターであることから⁷⁾、

感作処理によって Th2 細胞への分化が進行して食物アレルギー疾患を発症したと考えられる。一方、感作処理・DHA 投与群のマウス空腸では GATA3 の遺伝子発現が抑制される傾向にあったことから、DHA の経口投与は Th2 細胞への分化を抑制して、Th1/Th2 バランスの均衡を保つ機能を有すると考えられる。

また、炎症性サイトカインである TNF- α と IL-6 の遺伝子発現が非感作処理・水投与群と比べて、感作処理・水投与群のマウスの空腸で上昇する傾向にあった (Fig. 3)。これは感作処理によってマウス空腸でアレルギー性炎症が惹起されたことを示唆する。一方、感作処理・DHA 投与群のマウスでは、感作処理・水投与群のマウスと比べて TNF- α と IL-6 の遺伝子発現が抑制される傾向が観察された。これは DHA の経口投与によりアレルギー性炎症が緩和されたことを示唆する。

以上の結果をまとめると、DHA の継続的な経口摂取が食物アレルギー疾患の発症を予防する可能性が本研究の結果から認められ、所期の結果を得ることができた。本研究で得られた成果については、2022 年度中に学会発表をする予定である。また、実験結果の解析がまとまり、必要な追加実験を行った後に、速やかに学術論文として発表する予定である。

今後の研究活動について

本研究の結果から DHA の継続的な経口摂取が食物アレルギー疾患の発症を予防する可能性が認められた。しかし、食物アレルギー疾患の予防効果であるのか、あるいは食物アレルギー症状の緩和効果であるのかを厳密に区別できない。そのため、DHA の摂取による食物アレルギーの予防効果を厳密に実証できる実験を今後実施する必要がある。また、DHA が食物アレルギーの発症を予防する可能性が認められたが、その作用機序については十分に明らかにできていない。さらに、脾細胞を用いた実験と空腸を用いた実験で一貫しない結果が得られた。したがって、今後は DHA の摂取による食物アレルギーの予防効果の作用機序について更なる解析を行う。

参考文献

- 1) Nishi K, Kanayama Y, Kim IH, Nakata A, Nishiwaki H, Sugahara T. Docosahexaenoyl

- ethanolamide mitigates IgE-mediated allergic reactions by inhibiting mast cell degranulation and regulating allergy-related immune cells. *Sci Rep*. 2019 Nov;9:16213.
- 2) Kim IH, Kanayama Y, Nishiwaki H, Sugahara T, Nishi K. Structure-activity relationships of fish oil derivatives with anti-allergic activity in vitro and in vivo. *J Med Chem*. 2019 Nov;62(21):9576-92.
- 3) 川尻要. AhR-「宿主-環境」相互作用を担う化学物質センサー. 廃棄物資源循環学会誌. 2019;30(3):168-78.
- 4) 有馬雅史. 転写抑制因子 BCL6 によるアレルギー性炎症の網羅的制御機序. アレルギー. 2011;60(5):566-74.
- 5) 中島啓, 榎本志樹, 堀昌平. 制御性 T 細胞と免疫寛容—アレルギー疾患における制御性 T 細胞の役割—. アレルギー. 2020;69(5):310-7.
- 6) Iwata S, Mikami Y, Sun HW, Brooks SR, Jankovic D, Hirahara K, Onodera A, Shih HY, Kawabe T, Jiang K, Nakayama T, Sher A, O'Shea JJ, Davis FP, Kanno Y. The transcription factor Tbet limits amplification of type I IFN transcriptome and circuitry in T helper 1 cells. *Immunity*. 2017;46:983-91.
- 7) 久保允. アレルギー疾患に関わるサイトカインシグナル伝達制御と IL-4 転写調節機構. 化学と生物. 2011;49(3):170-6.

以上