

201426030A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

短鎖および中鎖脂肪酸の腸管免疫修飾作用と安全性評価に関する研究

平成26年度 総括分担研究報告書

研究代表者 長谷 耕二

平成27(2015)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- 短鎖および中鎖脂肪酸の腸管免疫修飾作用と安全性評価に関する研究 --- 1
長谷 耕二
(資料) 図1-図5

II. 分担研究報

1. 食物アレルギーにおける短鎖および中鎖脂肪酸の安全性評価に関する研究 -7
國澤 純
(資料) 資料名：図 1-3
2. 炎症性腸疾患患者における短鎖脂肪酸の解析に関する研究 ----- 13
飯島 英樹

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 16

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 18

短鎖および中鎖脂肪酸の腸管免疫修飾作用と安全性評価に関する研究

研究代表者 長谷 耕二 慶應義塾大学薬学部

研究要旨

腸内発酵の推進を目的としたプレバイオティクスと各種免疫疾患との関連については、これまで安全性評価の観点から十分に検証されていない。本研究では、炎症アレルギー性疾患との関連から、短鎖・中鎖脂肪酸の安全性について、基礎的・臨床的研究を遂行した。H25年度に実施した研究の結果より、短鎖脂肪酸は大腸炎モデルに対する炎症抑制効果を示す一方で、食物アレルギーモデルにおける下痢を悪化させることが示唆された。本事業の2年度にあたるH26年度は、炎症アレルギー症状に影響を与えた脂肪酸成分に関して免疫病理学的な解析を実施し、さらにヒト疾患への外挿を試みた。その結果、短鎖脂肪酸は制御性T細胞を誘導することで大腸炎を抑制することが示唆された。ヒト炎症性腸疾患患者においても有意な短鎖脂肪酸の減少が観察されたことから、短鎖脂肪酸の減少が炎症病態形成に関与する可能性が示唆された。これより食物繊維含量が低く、短鎖脂肪酸の減少につながる可能性の高い西洋型の食事は腸管の炎症に繋がる可能性が示唆された。さらに短鎖脂肪酸による食物アレルギー病態悪化のメカニズムを解析したところ、腸上皮細胞への直接的な作用が示唆された。一方で、中鎖脂肪酸の一つであるココナツ油は飽和脂肪酸が多く、かつ ω 3不飽和脂肪酸が少ないにも関わらず、アレルギー性下痢を悪化させないことを明らかにした。

分担研究者:

國澤純（独立行政法人医薬基盤研究所・プロジェクトリーダー）
飯島英樹（大阪大学医学部・講師）

A. 研究目的

近年、「お腹の調子を整える」効果を謳った特定保健用食品が数多く普及しているが、これらは腸内細菌の発酵能を利用して短鎖脂肪酸など代謝物の産生を促すプレバイオティクスが主体である。短鎖脂肪酸はこれまで生体への有効性が強調されてきた。一方、腸管には多くの免疫担当細胞が存在しており、食品との不適切な免疫学的相互作用は、アレルギーや炎症などの発症を引き起こすことが判明している。つまり、食事性成分や発酵代謝産物には、腸管免疫応答の方向性を左右する

ことで、各種免疫疾患の発症につながる潜在的な危険性が予想される。しかしながら、腸内発酵の推進を目的としたプレバイオティクスと各種免疫疾患との関連については、これまで安全性評価の観点から十分に検証されていない。同様に、体に脂肪がつきにくいことで食用油としての消費が高まっている中鎖脂肪酸についても、そのほとんどが健康への影響が懸念されている飽和脂肪酸であることから、免疫学的安全性を検証する必要がある。

そこで本研究では、申請者らがこれまで培った食品による腸管免疫制御機構に関する学術基盤をもとに、炎症アレルギー性疾患との関連から、短鎖・中鎖脂肪酸の安全性について、基礎的・臨床的研究を遂行する。平成25年度は食物アレルギーおよび大腸炎モデルにおける短鎖・中鎖脂肪酸の安全性に関する評価試験を遂行すると共に、食物アレルギー

患者および炎症性腸疾患患者の糞便サンプルに含まれる短鎖・中鎖脂肪酸濃度の測定を目的とした研究倫理を行い、各機関における承認を得た。平成26年度には病態が悪化した脂肪酸成分に関して免疫病理学的な解析を実施し、ヒト疾患への外挿を試みる。具体的には平成25年度の成果を踏まえ、短鎖脂肪酸による食物アレルギー病態悪化および中鎖脂肪酸による病態改善のメカニズムを解析する。さらに、短鎖脂肪酸による大腸炎抑制メカニズムを検討すると共に、炎症性腸疾患患者の糞便に含まれる短鎖脂肪酸の量を検討した。本研究は、今まで漠然と考えられていた“機能性健康食品の安全”という国民の健康維持に直結する問題について、“脂肪酸マシナリーを介した免疫修飾作用による生体恒常性の維持”との新機軸から食品安全行政に直結する有益な情報を提供するものである。

B. 研究方法

難消化性でんぷんやフラクトオリゴ糖などのプレバイオティクスは、腸内発酵を促進し、短鎖脂肪酸産生を増加させる。本実験では、短鎖脂肪酸を含む特殊飼料を用いて、各種短鎖脂肪酸の免疫学的安全性を評価した。短鎖脂肪酸の管腔内濃度を高めた状態で、食物アレルギーモデル、ならびに、炎症性腸疾患モデルにおいて安全性評価を行った。

マウス大腸炎モデルとして、CD45RBhi 細胞移入誘発性大腸炎モデルを用いた。大腸炎モデルでは、野生型マウスの脾臓よりCD3+CD4+CD45RBhi 細胞をフローサイトメーターにより単離し、これを Rag1 欠損マウスに尾静脈注射した。その直後より短鎖脂肪酸脂肪酸を餌に混ぜて投与を行った。細胞移入後6週間に亘り、体重を測定した。6週目に病理組織学的解析を行った。大腸の免疫担当細胞を取得し、フローサイトメトリーによる性状解析を実施した。

食物アレルギーモデルでは、ニワトリ卵白アルブミン (OVA) で全身感作後、OVA を頻回経口投与することで、アレルギー性下痢を誘導した。実験方法の詳細は研究分担者である國澤の研究報告書に記載した。

ヒト試料のうち炎症性腸疾患患者 (クロー

ン病、潰瘍性大腸炎) および健常者 (各々30例) 由来の糞便サンプルは、研究分担者である飯島が採取し、HPLC 法により各種有機酸の定量を行った (飯島分担研究書参照)。

(倫理面への対応)

実験動物使用にあたっては、独立行政法人国立大学実験動物施設協議会指針に基づき、慶應義塾大学動物実験委員会の管理下で実験を行う (機関承認番号 14015)。ヒトサンプルを用いた解析については、サンプルの収集を行う大阪大学医学系研究科、NTT 東日本関東病院、解析を行う東京大学医科学研究所、いずれにおいても倫理申請を終え承認を得ている [承認番号: 13165 (大阪大学)、東総人医病企第 11-549 号 (NTT 東日本関東病院)、25-42-1122、および 21-36-1221 (東大医科研)]

C. 研究結果

1) 炎症性腸疾患モデルにおける各種脂肪酸の影響

炎症性腸疾患モデルにおける短鎖脂肪酸の影響を調べるために、炎症性腸疾患モデルマウスに短鎖脂肪酸を配合した飼料または対照飼料を与え、6週間飼育を行った。酢酸化スターチ摂取群では病態に変化は認められなかった。プロピオン酸摂取群では大腸炎に伴う体重減少の改善がわずかに認められた。一方、酪酸摂取群では大腸炎に伴う体重減少が有意に観察された。さらに、酪酸摂取群では炎症性細胞の大腸組織への浸潤も減少しており、大腸粘膜組織の肥厚も抑制されていた。以上の結果より、短鎖脂肪酸のうち酪酸は大腸炎に改善に有効であるとの興味深い結果が得られた。酪酸による炎症抑制のメカニズムを検討するために、大腸組織に存在する免疫担当細胞をフローサイトメトリーにより解析したところ、酪酸摂取群では制御性 T 細胞 (regulatory T cells; 以下 Treg 細胞と略) の増加が観察された。ナイーブ T 細胞を用いた in vitro 実験系においても酪酸による Treg 誘導作用が観察された。Treg 細胞はエフェクター T 細胞の活性化を抑制することで炎症反応を抑制する作用があることから、酪酸は Treg 細胞を誘導することで腸管の炎症を抑制していると考えられた。

動物実験から得られた知見を実際のヒト疾患において確認するため、健常人および炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎またはクローン病) 患

者との間で糞便および血液中の短鎖脂肪酸濃度を測定した。興味深いことに、酪酸の濃度は潰瘍性大腸炎およびクローン病患者において、健常人に比べて有意に低下していた(飯島分担研究書参照)。

2) 食物アレルギーモデルにおける各種脂肪酸の影響

短鎖脂肪酸(酢酸、プロピオン酸および酪酸)の食物アレルギーに対する安全性評価を実施した結果、一部の短鎖脂肪酸摂取群では下痢症状の悪化が観察された。酪酸摂取群は対照群に比べて下痢症状に変化は認められなかった。さらに通常食を摂取させたマウスにおいても、下痢症状を示すマウスにおいて短鎖脂肪酸の増加が観察された。本結果より短鎖脂肪酸は食物アレルギーの増悪因子であることが示唆された。プロピオン酸の摂取はアレルギー特異的なIgE産生量や肥満細胞の脱顆粒には影響しないことから、上皮細胞または神経系への作用が想定される(論文投稿準備中)。

脂肪がつきにくいことから健康食品として広く流通している中鎖脂肪酸含有食用油の代表であるヤシ油の免疫学的安全性を、長鎖脂肪酸を多く含むパーム油(ω 3脂肪酸を含まない)および大豆油(ω 3脂肪酸を含む)と比較した。既報の結果と同様に、ヤシ油の摂取は長鎖脂肪酸の摂取に比べて体重の増加を抑制することが判明した。卵白アルブミンに対する食物アレルギーを誘導したところ、ヤシ油摂取群では、パーム油摂取群に比べて有意にアレルギー性下痢発症が抑制されることが判明した。そのメカニズムを検討したところ、中鎖脂肪酸を多く含む油で飼育した際には、 ω 3長鎖脂肪酸に代わるアレルギー抑制物質としてミード酸が産生されることで免疫学的安全性が担保されていることが判明した(論文印刷中)。

本結果の詳細については分担研究報告書(国澤)を参照

D. 考察

本研究の結果より、酪酸の低下が炎症性腸疾患における病態悪化の要因となっていることが示唆された。炎症性腸疾患は本邦において、年々増加しており、食生活の欧米化がその一因と考えられている。本研究結果より、腸内の酪酸濃度を低下させるような欧米

型の食生活(食物繊維をあまり含まないため腸内発酵が起こらない)は炎症性腸疾患のリスクを高めると予想できる。

現在、健康食品としておなかの調子を整えることを謳った各種オリゴ糖、食物せんい、難消化性でんぷんが流通しているが、これらはプレバイオティクスとして腸内細菌によって資化され短鎖脂肪酸の産生につながる。これまで短鎖脂肪酸のアレルギーへの影響はほとんど知られていなかったが、本研究により食物アレルギーを悪化させるリスクがあることが判明した。

中鎖脂肪酸に関しては、ミード酸の産生を介してアレルギー抑制効果が認められた。本観察結果は、従来提唱されてきた「飽和」/「不飽和」脂肪酸、あるいは、「 ω 3」/「 ω 6」脂肪酸の含有量でのみ食用油の安全性を規定してきた従来の概念に加えて、ミード酸含有量が新たな安全性の基準として考慮する必要を示すものである。

E. 結論

以上の結果から、中鎖・短鎖脂肪酸は腸管における炎症・アレルギー病態に影響を与えることが明らかとなった。食品の免疫学的安全性を考慮した場合には、食品に含有される脂肪酸の質に加えて、腸内発酵を初めとする腸内環境への食品の影響を十分に考慮する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Lee WJ and Hase K, Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. **Nat. Chem. Biol.** 10:416-24, 2014.
2. Furusawa Y, Obata Y, Hase K. Commensal microbiota regulates T cell fate decision in the gut. **Semin Immunopathol.** 37:17-25, 2015.
3. Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y,

Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H and Hase K. Epigenetic regulator Uhrf1 is critical for functional expansion of colonic regulatory T cells. **Nat. Immunol.** 15: 571-579, 2014.

4. 長谷耕二, 尾畑佑樹, 古澤之裕. 共生菌によるエピゲノム修飾変化を介した免疫調節機構. 感染・炎症・免疫 44: 26-35, 2014
5. 古澤之裕, 尾畑佑樹, 長谷耕二. 腸内細菌由来代謝物による免疫エピゲノム制御. 細胞 47: 53-56, 2015.

2. 学会発表

1. Hase K., Furusawa Y. and Obata Y. Commensal bacteria shape the intestinal immune system through epigenetic modifications. International Conference of KSMCB. Oct 23, 2014. Seoul, Korea. (招待講演)
2. Hase K., Furusawa Y. and Obata Y. Intestinal microbiota regulates the mucosal immune system through epigenetic modifications. MBSJ Symposium: At the Molecular Crossroad of metabolism & epigenetics. Nov 26, 2014, Yokohama (招待講演)
3. Hase K., Commensal microbiota shapes the gut immune system through epigenetic modifications. Digestive Disease Week 2014. AGA-JSGE Joint Symposium. May 4-6, 2014. Chicago. (招待講演)
4. 長谷耕二, 腸内細菌による免疫エピゲノム修飾機構の解明. 第 38 回阿蘇シンポジウム. 2014 年 7 月 25-26 日, 阿蘇 (招待講演)
5. 長谷耕二. 腸内細菌によるエピジェネティクス制御を介した Treg 分化誘導機構の解明. 感染症研究 2014 グローバルネットワークフォーラム. 2104 年 11 月 15 日. 千葉 (招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

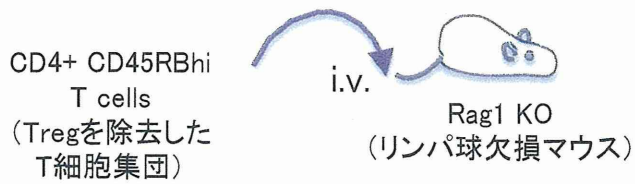


図1 大腸炎モデルマウスの作成

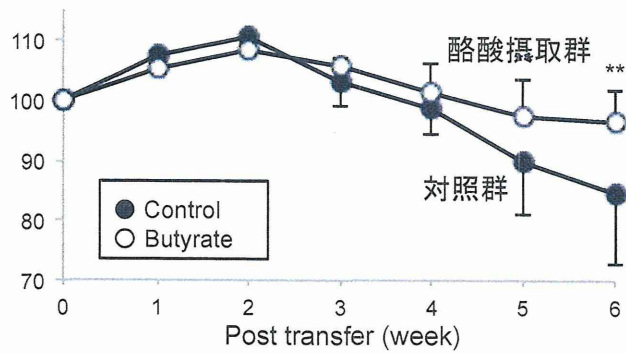


図2 大腸炎モデルにおける体重変化(%)

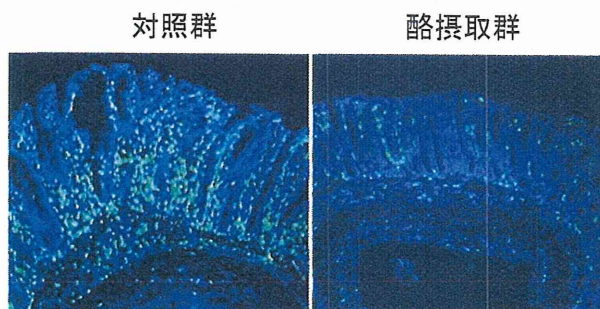


図3 大腸の病理組織像。酪酸摂取群では炎症性細胞浸潤の低下が観察される

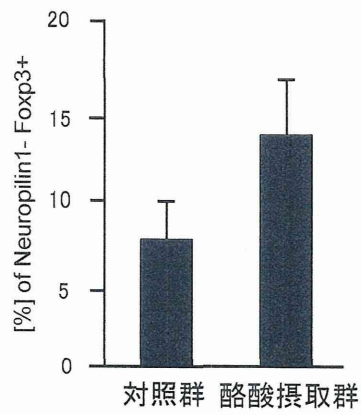


図4 大腸における制御性T細胞の割合 (%)

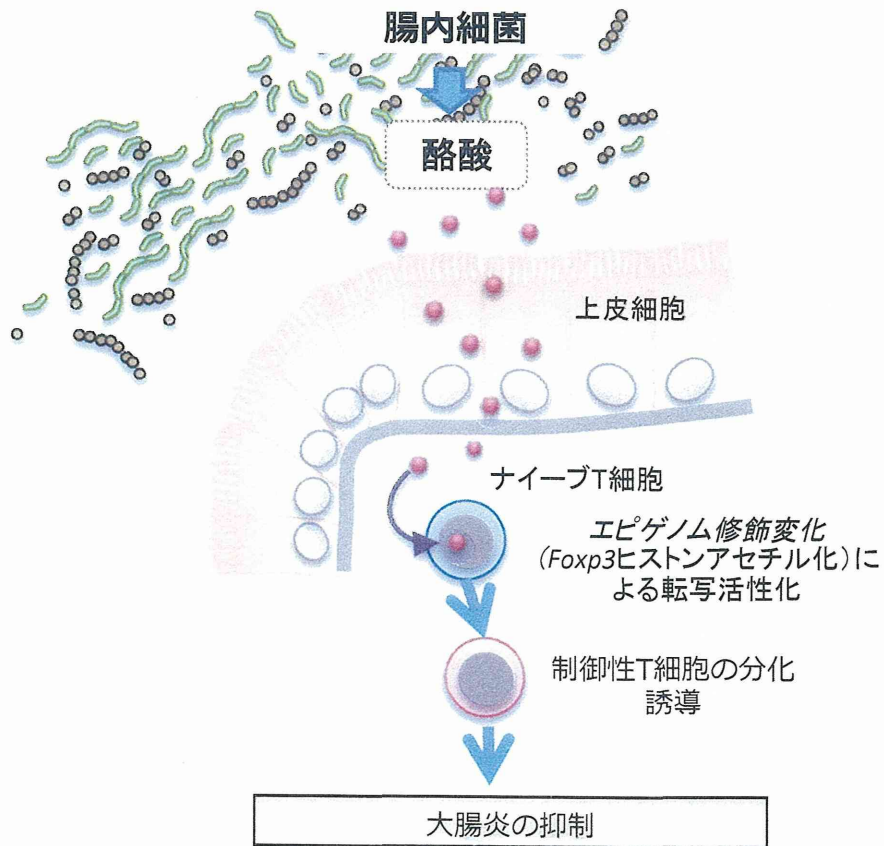


図5 今回の発見を模式的に示す。腸内細菌によって産生された酪酸の一部は腸管組織に取り込まれ、ナイーブT細胞から制御性T細胞への分化を促進し、腸管の炎症を抑制する。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進 研究事業）
「短鎖および中鎖脂肪酸の腸管免疫修飾作用と安全性評価」
研究報告書

食物アレルギーにおける短鎖および中鎖脂肪酸の安全性評価に関する

研究

研究分担者 國澤 純 (独) 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー
研究協力者 長竹貴広 同上 研究員

研究要旨

近年、「お腹の調子を整える」「体に脂肪がつきにくい」などの効果を謳った特定保健用食品が数多く普及しているが、これらには腸内細菌の発酵能を利用して産生される短鎖脂肪酸やエネルギー変換効率の高い中鎖脂肪酸が主体となっているものが含まれる。一方でこれら機能性食品の作用を最も強くうけると考えられる腸管には多くの免疫担当細胞が存在しており、食品との不適切な免疫学的相互作用はアレルギーや炎症などの発症を引き起こすことが判明している。つまりこれまで有効性が強調されてきた機能性食品においても腸管免疫応答の方向性を左右することで、各種免疫疾患の発症につながる潜在的な危険性が考えられる。そこで本研究ではこれまであまり研究のすすんでいない短鎖および中鎖脂肪酸に着目し、食物アレルギーへの影響を解析している。本事業の2年度にあたるH26年度は卵タンパク質を摂取することで下痢を呈する食物アレルギーモデルを用い、中鎖脂肪酸に焦点を当てた解析を行った。その結果、中鎖脂肪酸の一つであるココナッツ油は「飽和脂肪酸が多く、かつ ω 3不飽和脂肪酸が少ない」というこれまでの概念ではアレルギーを増悪化させる性質を有しているのにも関わらず、アレルギー性下痢を悪化させないことを明らかにした。さらにこの機能の一端をミード酸が担っている可能性を見いだした。

A. 研究目的

近年、「お腹の調子を整える」「体に脂肪がつきにくい」などの効果を謳った特定保健用食品が普及しているが、これらには腸内細菌の発酵能を利用して産生される短鎖脂肪酸やエネルギー変換効率の高い中鎖脂肪酸が主体となっているものが含まれる。こういった機能性食品は生体応答の一側面から有効性が強調されているが、腸管に多く存在し、生体の免疫応答や代謝などを制御している免疫担当細胞との相互作用については十分に解析されているとは言えないのが現状である。特に食品との不適切な免疫学的相互作用は、アレルギーや炎症などの発症を引き起こすことが判明していることを考えると、これら機能性食品により腸管免疫応答の方向性が

規定されることで、各種免疫疾患の発症につながる潜在的な危険性が予想される。そこで本研究では、これまであまり研究のすすんでいない短鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸に着目し、食物アレルギーへの影響を解析した。本事業の2年度にあたるH26年度は中鎖脂肪酸に焦点を当てた解析を行った。

中鎖脂肪酸とは通常の食用油に含まれているオレイン酸などの長鎖脂肪酸に比べて炭素鎖の長さが短いため、水になじみやすい性質を示す。そのため、水に溶けやすい糖などと同様、小腸から門脈を介して直接肝臓に入り、4~5倍早く分解されてエネルギーに変換されることが知られている。これらのことからココナッツ油などの中鎖脂肪酸を多く含む油は「体に脂肪がつき

にくい」といったキャッチフレーズで市販されている。

一方、これまでの長鎖脂肪酸を対象とした研究から、アレルギーや炎症性疾患に対しては、不飽和脂肪酸より飽和脂肪酸が、不飽和脂肪酸の中では ω 3脂肪酸より ω 6脂肪酸が炎症を誘導する活性が高いということが言われている。すなわち「飽和脂肪酸が多く、かつ ω 3不飽和脂肪酸が少ない」ことが炎症を増悪化すると考えられている。

このような観点でみた場合、中鎖脂肪酸を70%以上含むココナッツ油は長鎖脂肪酸を含めそのほとんどが飽和脂肪酸であり、かつ ω 3脂肪酸である α リノレン酸をほとんど含まない。上記の概念で考えると、ココナッツ油はアレルギー炎症応答に対して危険因子となりうる可能性が考えられる。そこで本事業においては、ココナッツ油の食物アレルギーに対する病態形成について解析を行った。

B. 研究方法

ココナッツ油もしくはコントロールである大豆油を重量比で4%含む特殊餌を作製し、その餌で2ヶ月間飼育したマウスを用いた。

1. 食物アレルギーモデル

フロイント完全アジュバントと混合したニワトリ卵白アルブミン (OVA) 1 mg を背部皮下に免疫することで全身感作を行った。全身感作の1週間後から週3回の頻度で50 mg のOVAを経口投与し、経口投与30分から1時間後に観察されるアレルギー性下痢の発症を指標に病態を評価した。

2. 脂肪酸の定量

特殊餌で飼育したマウスの血清を回収し、クロロフォルムとメタノールにより脂質を抽出した。抽出した脂質分画をガスクロマトグラフィーにかけ、脂質成分を定量した。

3. ミード酸の食物アレルギーに対する効果

上記の食物アレルギーモデルにおいて、OVAによる全身感作ならびに経口投与30分前に1 μ gの

ミード酸を腹腔内投与した。

(倫理面への配慮)

動物実験は(独)医薬基盤研究所のガイドラインに則り行った(承認番号DS25-2R4)。

C. 研究結果

中鎖脂肪酸を多く含むココナッツ油を含有する特殊餌で2ヶ月間飼育したマウスに食物アレルギーを適用したところ、統計的有意差はないものコントロール油である大豆油とよりも減少傾向のアレルギー性下痢の発症率が認められ、少なくとも大豆油よりも増悪化することはなかった(図1)。

次にココナッツ油を含有する特殊餌で2ヶ月間飼育したマウスの血清を回収し、脂肪酸組成を生化学的手法により検討したところ、ミード酸の増加が認められた(図2)。

そこで大豆油を含む通常餌で飼育したマウスに食物アレルギーを適用する際、アレルギーによる全身感作と経口投与の前にミード酸を投与することでアレルギー性下痢の発症抑制が認められた(図3)。

D. 考察

従来の概念であれば、大部分が飽和脂肪酸であり、かつ ω 3脂肪酸である α リノレン酸をほとんど含まないココナッツ油は、アレルギー炎症応答に対して増悪化因子となりうる可能性が考えられたが、予想に反しココナッツ油ではアレルギー性下痢の増悪化は認められず、むしろ抑制傾向が認められた(統計的有意差はなし)。このことは「飽和 vs 不飽和」「 ω 6 vs ω 3」という従来から知られていた概念によらない脂質を介した第三の免疫制御経路が存在することが示唆される。それに関し、研究グループではココナッツ油で飼育したマウスで増加している脂肪酸としてミード酸を同定し、ミード酸を人為的に投与することでアレルギー性下痢の発症が抑制出来ることを見いだした。ミード酸は必須脂肪酸欠乏時に代謝・産生される脂肪酸であることが知られているこ

とから、ココナッツ油が必須脂肪酸をほとんど含まないことがミード酸産生の一因になったと考えられる。また必須脂肪酸を含む通常餌で飼育した際にミード酸を投与することでアレルギー性下痢の発症が抑制できたことから、ミード酸には積極的にアレルギーを抑制できる可能性が示唆される。今後はミード酸による免疫制御メカニズムや中鎖脂肪酸由来の代謝産物の同定などが重要な課題であると考えられる。

E. 結論

ココナッツ油を用いた解析から、「飽和 vs 不飽和」「 $\omega 6$ vs $\omega 3$ 」という既存の概念によらない脂質を介した第三の免疫制御経路が存在することが示唆された。さらにミード酸による食物アレルギー抑制効果も見いだすことが出来た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1 J. Kunisawa*, M. Arita, T. Hayasaka, T. Harada, R. Iwamoto, R. Nagasawa, S. Shikata, T. Nagatake, H. Suzuki, E. Hashimoto, Y. Kurashima, Y. Suzuki, H. Arai, M. Setou, and H. Kiyono, Dietary $\omega 3$ fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut. *Sci Rep* (2015, in press)
- 2 Y. Kurashima, H. Kiyono, and J. Kunisawa*, Pathophysiological role of extracellular purinergic mediators in the control of intestinal inflammation, *Mediators of Inflammation* (2015, in press)
- 3 J. Kunisawa* and H. Kiyono, Vitamins mediate immunological homeostasis and diseases at the surface of the body, *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* (2015, in press)
- 4 Y. Goto, T. Obata, J. Kunisawa, S. Sato, I. I. Ivanov, A. Lamichhane, N. Takeyama, M. Kamioka, M. Sakamoto, T. Matsuki, H. Setoyama, A. Imaoka, S. Uematsu, S. Akira, S. E. Domino, P. Kulig, B. Becher, J. Renauld, C. Sasakawa, Y. Umesaki, Y. Benno, and H. Kiyono, Innate lymphoid cells govern intestinal epithelial fucosylation, *Science* 345(6202): 1254009, 2014
- 5 J. Kunisawa*, E. Hashimoto, A. Inoue, R. Nagasawa, Y. Suzuki, I. Ishikawa, S. Shikata, M. Arita, J. Aoki, and H. Kiyono, Regulation of intestinal IgA responses by dietary palmitic acid and its metabolism, *J Immunol* 193: 1666-1671, 2014
- 6 Y. Kurashima, T. Amiya, K. Fujisawa, N. Shibata, Y. Suzuki, Y. Kogure, E. Hashimoto, A. Otsuka, K. Kabashima, S. Sato, T. Sato, M. Kubo, S. Akira, K. Miyake, J. Kunisawa*, and H. Kiyono, The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis, *Immunity* 40:530-41, 2014
- 7 長竹貴広、國澤純 腸管組織における多元的免疫制御システムと食物アレルギー 医学のあゆみ (印刷中)
- 8 倉島洋介、佐藤健、清野宏、國澤純 DAMPsによるマスト細胞の活性化と疾患 臨床免疫・アレルギー科 62: 675-679, 2014
- 9 長竹貴広、國澤純 脂質を介した腸管免疫システムの制御 医学のあゆみ 248, 1019-1024, 2014
- 10 鈴木英彦、國澤純 粘膜免疫システムの多面的機能を応用したワクチン開発の現状と未来 The Frontiers in Life Sciences 「生命科学からの創薬へのイノベーション」 57-62, 2014
- 11 高里良宏、倉島洋介、清野宏、國澤純 抑

制型免疫システムを応用した次世代型抗アレルギーワクチンの開発 *Bioindustry* 6, 55-60, 2014

2. 学会発表

1. 國澤純、粘膜免疫のユニーク性を標的としたワクチンの開発の最前線 日本薬学会 第 135 年会 神戸 (神戸学院大学) (2015 年 3 月 28 日)
2. Jun Kunisawa、Lipid-mediated immune network in the development of intestinal allergy 第 88 回 日本薬理学会年会 名古屋 (名古屋国際会議場) (2015 年 3 月 20 日)
3. 國澤純、腸管免疫ネットワークの学術的解明と創薬・ワクチン開発への展開 第 7 回 鈴鹿病態薬学研究会 三重 (鈴鹿医療科学大学) (2015 年 2 月 25 日)
4. 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制御の基礎的解明と免疫創薬への応用 千里ライフサイエンスセミナー -アカデミア創薬の進展- 大阪 (千里ライフサイエンスセンター) (2015 年 2 月 13 日)
5. Takahiro Nagatake, Makoto Arita, Ryo Iwamoto, Takahiro Hayasaka, Takashi Harada, Tetsuya Honda, Naomi Matsumoto, Michiko Shimojou, Risa Nagasawa, Shiori Shikata, Eri Hashimoto, Yosuke Kurashima, Yuji Suzuki, Hidehiko Suzuki, Kenji Kabashima, Hiroyuki Arai, Mitsutoshi Setou, Hiroshi Kiyono, and Jun Kunisawa, Dietary ω 3 fatty acid-originated 17,18-epoxyeicostetraenoic acid prevents the development of allergic inflammation in the gut and skin 6th **Phospholipase A2 and Lipid Mediators**, Tokyo, Japan (10 - 12 February, 2015)
6. 國澤純、腸内環境を介した免疫制御とワクチン開発・免疫創薬への展開 第 19 回 関西大学先端科学技術シンポジウム 大阪 (関西大学) (2015 年 1 月 23 日)
7. Sachiko Akashi-Takamura, Natsuko Yamakawa, Takuma Shibata, Yosuke Kurashima, Jun Kunisawa, Hiroshi Kiyono, Kazuhiro Suzuki, Junichi Kikuta, Masaru Ishii, and Kensuke Miyake, MD-1 influences a binding between S1P1 and BCR 第 43 回 日本免疫学会学術集会、京都 (国立京都国際会館) (2014 年 12 月 10-12 日)
8. Jun Kunisawa Functional Diversity of IgA-producing Plasma Cells for the Development of Mucosal Vaccine **The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014** (University of Tokyo, Tokyo, 21 October, 2014)
9. 國澤純、脂質—免疫ネットワークを起点にした免疫疾患の解明と創薬研究への展開 第 87 回 日本生化学会 京都 (国立京都国際会館) (2014 年 10 月 16 日)
10. 國澤純、東洋医学を起点とした粘膜免疫制御メカニズムの解明と創薬への展開 日本生薬学会第 61 回年会 福岡 (福岡大学) (2014 年 9 月 13 日)
11. 國澤純、粘膜免疫のユニーク性に基づく粘膜ワクチンの開発・免疫創薬への新展開 第 30 回 日本 DDS 学会 東京 (慶応義塾大学) (2014 年 7 月 31 日)
12. 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制御の解明と創薬・ワクチン開発への展開 第 18 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会 京都 (同志社大学寒梅館) (2014 年 7 月 15 日)
13. 國澤純、東洋医学を起点とした粘膜免疫制御メカニズムの解明と創薬への展開 第 65 回 日本東洋医学会学術総会 東京 (東京国際フォーラム) (2014 年 6 月 28 日)
14. Jun Kunisawa Commensal Bacteria and Diet in

the Control of Intestinal Immunosurveillance
and Diseases **18th Annual Meeting of
Intestinal Microbiology** (University of Tokyo,
Tokyo, 12 June, 2014)

抗加齢医学会総会 大阪(大阪国際会議場)
(2014年6月6日)

15. 國澤純、腸内環境ネットワークを介した免疫制御とヘルスサイエンス 第14回日本

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

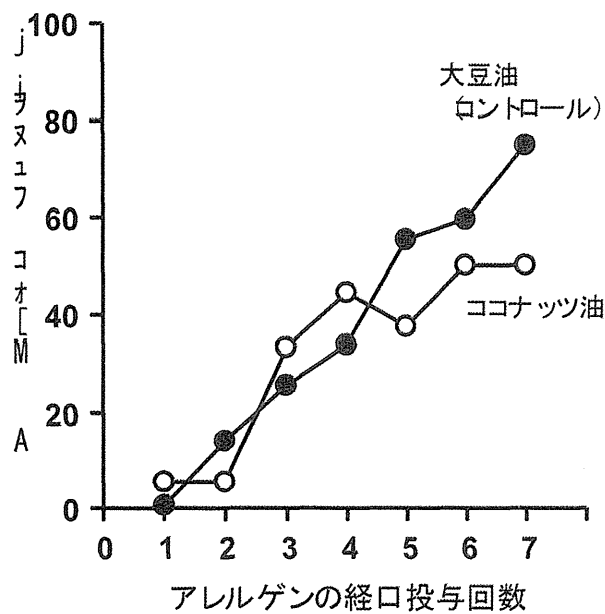


図1 大豆油 (コントロール) もしくはココナッツ油を4%含む特殊餌で2ヶ月間飼育したマウスに食物アレルギーモデルを適用した際のアレルギー性下痢の発症を測定した。

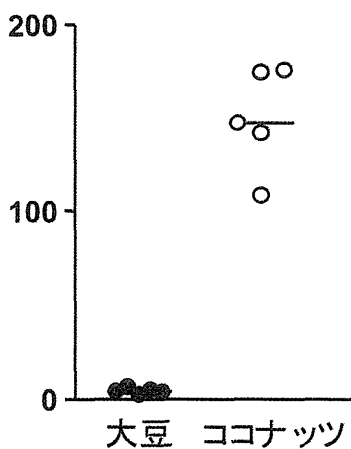


図2 大豆油 (コントロール) もしくはココナッツ油を4%含む特殊餌で2ヶ月間飼育したマウスから血清を回収し、ガスクロマトグラフィーにてミード酸を定量した。

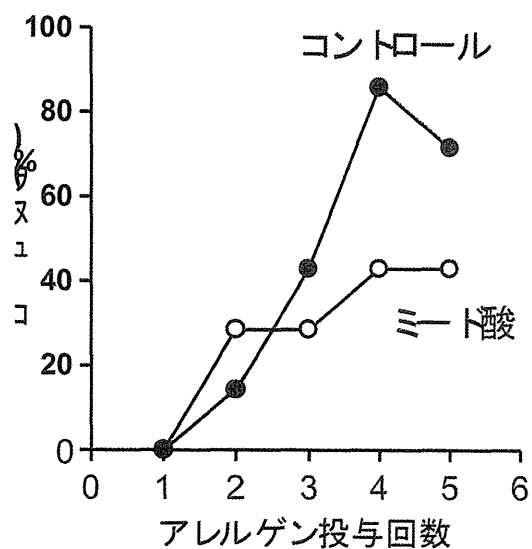


図3 通常餌で飼育したマウスに食物アレルギーモデルを適用した。ミード酸投与群は、アレルゲンの全身感作ならびに経口投与の30分前に1μgのミード酸を腹腔内投与した。

炎症性腸疾患患者における短鎖脂肪酸の解析に関する研究

研究分担者 飯島 英樹 大阪大学医学部 講師

研究要旨

近年、多くの特定保健用食品が販売され、便通や腹部症状の改善を目的に使用されているが、それらには腸内細菌の発酵能を利用して産生される短鎖脂肪酸やエネルギー変換効率の高い中鎖脂肪酸が含まれるものが多い。これら機能性食品が腸管で吸収される際に多くの免疫担当細胞と接するが、そこで様々な免疫反応を生じる。その不適切な免疫学的相互作用が生じた場合、アレルギーや炎症などの発症を引き起こすことが判明している。これまで有効性が強調されてきた機能性食品においても脂肪酸により腸管免疫応答の方向性を左右することで、各種免疫疾患の発症につながる潜在的な危険性が考えられる。しかしながら、ヒトの疾患と脂肪酸をはじめとする代謝物との関係は明らかになっていない。本研究では腸管に慢性炎症を生じる炎症性腸疾患をターゲットとし、収集した炎症性腸疾患患者および健康者の糞便に含まれる脂肪酸濃度の解析を行った。炎症性腸疾患患者では、有意に酪酸が健康者に比して低値であることが明らかとなった。さらに、内視鏡的活動性が高い患者において寛解期患者に比して有意に糞便中酪酸濃度が低値であった。一方、コハク酸やプロピオン酸が炎症性腸疾患患者では増加しており、これらの糞便中脂肪酸が炎症性腸疾患において変化していることが明らかとなり、その病態形成に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

腸管には多くの免疫担当細胞が存在しており、食品との不適切な免疫学的相互作用は、アレルギーや炎症などの発症を引き起こすことが判明している。食品中の、あるいは腸内細菌から産生される脂肪酸は腸管生理や脂質代謝に様々な影響を及ぼすことが報告されているが、免疫系への影響については不明な点が多い。特にヒトの疾患における脂肪酸の関与はほとんど明らかにされていない。本研究は、炎症性腸疾患患者の糞便サンプルにおける短鎖脂肪酸濃度を測定することで、疾患発症や増悪との関わりを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

大阪大学医学部附属病院に通院中の潰瘍性大腸炎患者30人、クローン病患者30人および

健康者24人より新鮮な糞便約20gの提供を受け、速やかに-80度に保存した。匿名化された検体は、東京大学医科学研究所・国際粘膜ワクチンセンター 粘膜バリア学および静岡大学農学部・応用生物化学科 食品栄養化学研究室にてHPLCにより有機酸成分の解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、事前に大阪大学医学系研究科における倫理申請を終え承認を得て実施した[承認番号：13165（大阪大学）]。

C. 研究結果

炎症性腸疾患患者では、有意にn-酪酸が健康者に比して低値であることが明らかとなった[潰瘍性大腸炎患者平均 6.9、クローン病患者 5.0、健康者 11.8 ($\mu\text{mol/g}$ 糞便), $p < 0.05$]。さらに、炎症性腸疾患患者の中では、内視鏡的活動性が高い患者において寛解期患者に比

して有意に糞便中n-酪酸濃度が低値であった[活動期患者 3.7、寛解期患者 7.3($\mu\text{mol/g}$ 糞便), $p < 0.05$]。また、プロピオン酸も内視鏡的活動性が高い患者において寛解期患者に比して有意に低値であった。一方、コハク酸、乳酸は炎症性腸疾患患者において健康者より多い傾向にあったが有意ではなかった。

D. 考察

炎症性腸疾患患者では、健康者と明らかに異なる脂肪酸プロファイルを持つことが明らかとなった。酪酸は、制御性T細胞の誘導に関与することが明らかとなっているが、炎症性腸疾患患者において糞便中酪酸濃度が有意に低下しており、制御性T細胞誘導不全による炎症性腸疾患病態形成への関与が示唆された。一方、有意差には至らなかったが、脂肪酸の中でも炎症性腸疾患において増加傾向を認めるものを認めた。炎症性腸疾患患者における糞便中脂肪酸プロファイルの変化はそれを産生する腸内細菌群の変化を反映している可能性があるが、摂取された何らかの不適切な食品が腸内細菌群の変化を促進している可能性があり、さらに検討を行う必要がある。

E. 結論

過度な免疫活性化を抑制する酪酸の以外に、種々の糞便中脂肪酸が炎症性腸疾患患者で変化しており、摂取した食品が何らかの影響を及ぼしている可能性がある。今後、脂肪酸構成に変化を与える食品について検討を加える必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mukai A, Iijima H, Hiyama S, Fujii H, Shinzaki S, Inoue T, Shiraishi E, Kawai S, Araki M, Hayashi Y, Kondo J, Mizushima T, Kanto T, Egawa S, Nishida T, Tsujii M, Takehara T. Regulation of anergy-related ubiquitin E3 ligase, GRAIL, in murine models

of colitis and patients with Crohn's disease. J Gastroenterol. 2014 Dec;49(12):1524-35.

2. Sakurai T, Kashida H, Watanabe T, Hagiwara S, Mizushima T, Iijima H, Nishida N, Higashitsuji H, Fujita J, Kudo M. Stress response protein cirp links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. Cancer Res. 2014 Nov;74(21):6119-28.

3. 飯島英樹. 治療に必要なバイオマーカーの開発状況. 最新医学. 2015;70(2):250-4.

4. 飯島英樹. 腸内細菌異常と腸管感染症(偽膜性腸炎など). 医学のあゆみ 2014;251:85-88.

2. 学会発表

1. 井上 隆弘, 飯島 英樹, 川井 翔一郎, 荒木学, 白石 衣里, 日山 智史, 新崎 信一郎, 西田 勉, 辻井 正彦, 三善 英治, 竹原 徹郎. 腸管免疫からみたIBD治療の新展開 IgA糖鎖欠損に基づく炎症性腸疾患の病態解明. 消化器と免疫. 2014 2014.03(50):29-32.

2. 新崎信一郎, 飯島英樹, 松岡克善, 武下達矢, 世良田聡, 辻井正彦, 金井隆典, 竹原徹郎, 仲哲治, editors. 炎症性腸疾患バイオマーカーとしての Leucin-rich alpha-2 glycoprotein (LRG)の可能性. 第51回消化器免疫学会; 2014/7/10-11; 京都.

3. 川井翔一郎, 飯島英樹, 新崎信一郎, 山口利朗, 荒木学, 日山智史, 林義人, 辻井正彦, 竹原徹郎. 青黛(indigo naturalis)による腸炎改善効果についての検討. 第11回日本消化管学会学術集会 2015/2/13.

4. 日山智史, 飯島英樹, 辻井正彦, 竹原徹郎, editors. パリエル板はNSAID起因性小腸粘膜傷害に保護的に働く. 日本消化器病学会近畿支部 第101回例会; 2014/10/4; 大阪国際交流センター.

5. 飯島英樹. 炎症性腸疾患の病態と治療. 日本消化器病学会近畿支部第46回教育講演会; 2014/10/4; 大阪国際交流センター.

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
鈴木英彦、 國澤純	粘膜免疫システムの多面的機能を応用したワクチン開発の現状と未来	米田悦啓、 堤康央、 石井健	The Frontiers in Life Sciences「生命科学からの創薬へのイノベーション」	南山堂	東京	2014	57-62

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Lee WJ and Hase K,	Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease.	Nat. Chem. Biol.	10	416-424	2014
Furusawa Y, Obata Y, Hase K.	Commensal microbiota regulates T cell fate decision in the gut.	Semin Immunopathol.	37	17-25	2015
Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H and Hase K.	Epigenetic regulator Uhrfl is critical for functional expansion of colonic regulatory T cells.	Nat. Immunol.	15	571-579	2014
J. Kunisawa, M. Arita, T. Hayasaka, T. Harada, R. Iwamoto, R. Nagasawa, S. Shikata, T. Nagatake, H. Suzuki, E. Hashimoto, Y. Kurashima, Y. Suzuki, H. Arai, M. Setou, and H. Kiyono	Dietary ω3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut	Scientific Reports			2015 (in press)
Y. Kurashima, H. Kiyono, and J. Kunisawa	Pathophysiological role of extracellular purinergic mediators in the control of intestinal inflammation	Mediators of Inflammation			2015 (in press)
Y. Goto, T. Obata, J. Kunisawa, S. Sato, I. I. Ivanov, A. Lamichhane, N. Takeyama, M. Kamioka, M. Sakamoto, T. Matsuki, H. Setoyama, A. Imaoka, S. Uematsu, S. Akira, S. E. Domino, P. Kulig, B. Becher, J. Renault, C. Sasakawa, Y. Umesaki, Y. Benno, and H. Kiyono	Innate lymphoid cells govern intestinal epithelial fucosylation	Science	345	1254009	2014

J. Kunisawa, E. Hashimoto, A. Inoue, R. Nagasawa, Y. Suzuki, I. Ishikawa, S. Shikata, M. Arita, J. Aoki, and H. Kiyono	Regulation of intestinal IgA responses by dietary palmitic acid and its metabolism	J Immunol	193	1666-1671	2014
Y. Kurashima, T. Amiya, K. Fujisawa, N. Shibata, Y. Suzuki, Y. Kogure, E. Hashimoto, A. Otsuka, K. Kabashima, S. Sato, T. Sato, M. Kubo, S. Akira, K. Miyake, J. Kunisawa and H. Kiyono	The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis	Immunity	40	530-41	2014
T. Sakurai, H. Kashida, T. Watanabe, S. Hagiwara, T. Mizushima, H. Iijima, N. Nishida, H. Higashitsuji, J. Fujita and M. Kudo	Stress response protein cirp links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer.	Cancer Res	74	6119-28	2014
A. Mukai, H. Iijima, et al.	Regulation of anergy-related ubiquitin E3 ligase, GRAIL, in murine models of colitis and patients with Crohn's disease	Journal of Gastroenterology	49	1524-35	2014
飯島英樹	腸内細菌異常と腸管感染症（偽膜性腸炎など）	医学のあゆみ	251	85-88	2014
飯島英樹	治療に必要なバイオマーカーの開発状況	最新医学	70	250-4	2015

研究成果の刊行物・別刷