

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關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ッツ油は飽和脂肪酸が多く、かつ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、体に脂肪が付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、フローサイトメータ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) 由来の糞便おサンプルは、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ータ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、

健康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(3脂肪酸を含まない)および大豆油(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、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、「3」/「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

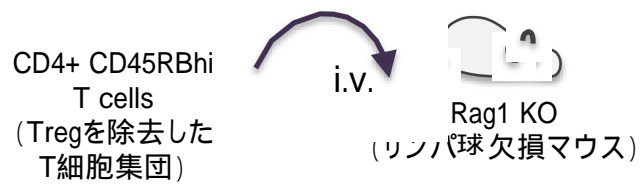


図1 大腸炎モデルマウスの作成

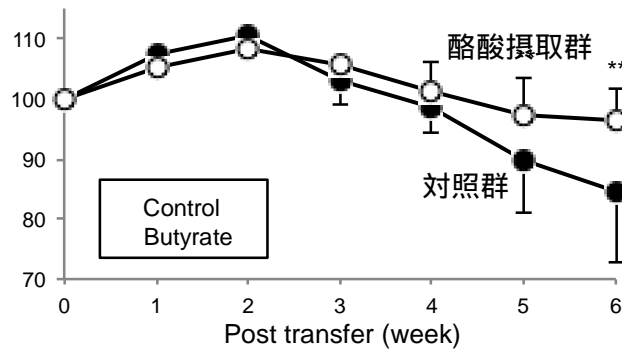


図2 大腸炎モデルにおける体重変化(%)

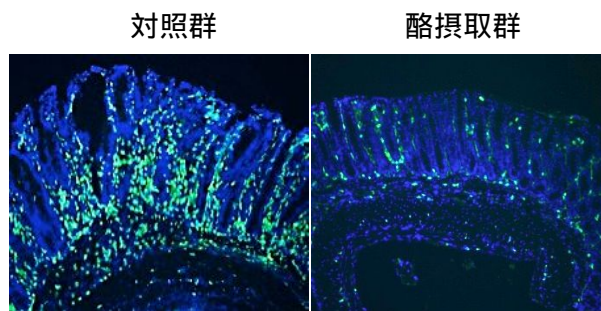


図3 大腸の病理組織像。酪酸摂取群では炎症性細胞浸潤の低下が観察される

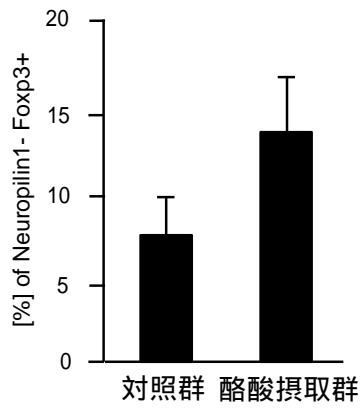


図4 大腸における制御性T細胞の割合(%)

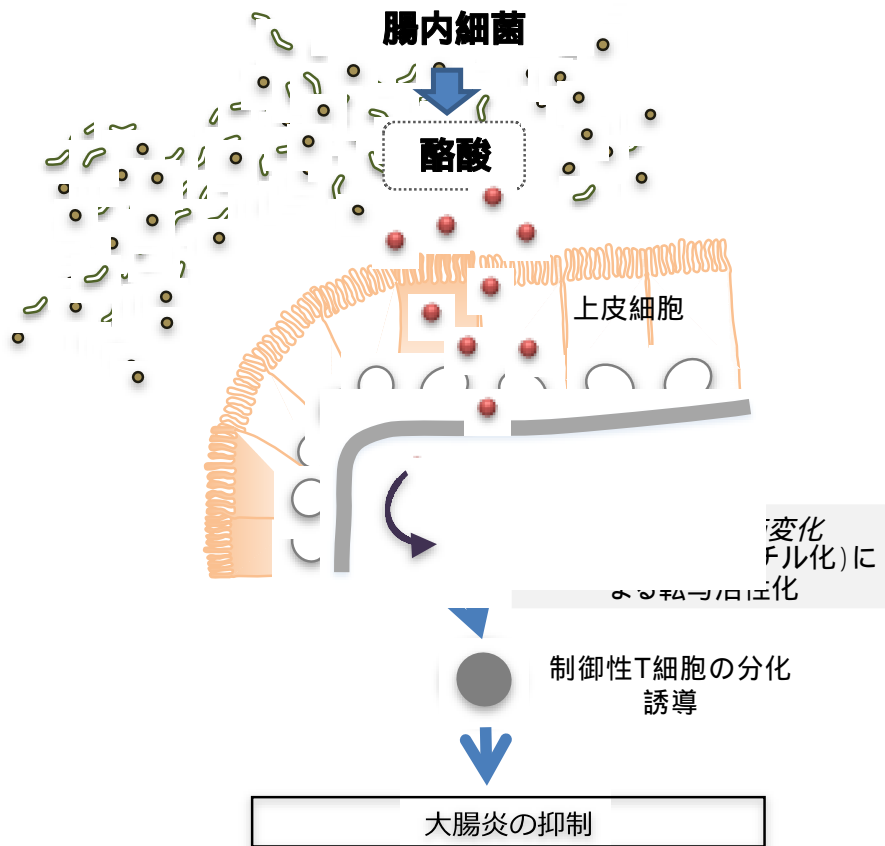


図5 今回の発見を模式的に示す。腸内細菌によって産生された酪酸の一部は腸管組織に取り込まれ、ナイーブT細胞から制御性T細胞への分化を促進し、腸管の炎症を抑制する。