慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ヒト腸内細菌移植マウスを用いた肥満合併重症喘息の解明
Sub Title	Elucidation of severe asthma associated with obesity using human gut bacteria transplanted mice
Author	福永, 興壱(Fukunaga, Kōichi) 有田, 誠(Arita, Makoto) 入江, 潤一郎(Irie, Jun'ichirō)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	喘息悪化に影響を与える因子は様々であるが、今回我々は食生活によって腸内細菌叢の変化が肥満を起こすのみならず、喘息合併患者の病態の難治化に影響を与えている可能性を考えて研究を行った。その結果獲得免疫が関与する肥満モデルマウスでは喘息の悪化を認めたが、自然免疫が関与するモデルマウスでは肥満よりはむしろ食事の餌の種類により病態が悪化することが明らかになった。そしてこれは腸内細菌の影響によるものであることを示した。この結果から食事の質（食物繊維の質や含有量など）が腸内細菌を介して2型自然リンパ球を中心とした気道の自然免疫に影響を与えて肺の好酸球性炎症、すなわち喘息を悪化させることが示唆された。 In this study, we investigated the possibility that changes in the intestinal microbiota due to dietary habits not only cause obesity but also affect the refractoriness of the condition in patients with asthma. As a result, we found that diet-induced obesity mimic adaptive immune response showed worsening of asthma, while innate immune response in mice showed worsening depending on the type of feed rather than obesity. This was attributed to the influence of intestinal bacteria. These results suggest that the quality of the diet (e.g., the quality and content of dietary fiber) affects the innate immunity of the airways, mainly type 2 innate lymphocytes, via the gut bacteria, and exacerbates eosinophilic inflammation of asthma.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2018～2020 課題番号：18K08155 研究分野：呼吸器病学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K08155seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　６ 月　１ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ０８１５５

研究課題名（和文）ヒト腸内細菌移植マウスを用いた肥満合併重症喘息の解明

研究課題名（英文）Elucidation of severe asthma associated with obesity using human gut bacteria transplanted mice

研究代表者
福永　興壱（Fukunaga, Koichi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：６０３２７５１７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：喘息悪化に影響を与える因子は様々であるが、今回我々は食生活によって腸内細菌叢の変化が肥満を起こすのみならず、喘息合併患者の病態の難治化に影響を与えている可能性を考えて研究を行った。その結果獲得免疫が関与する肥満モデルマウスでは喘息の悪化を認めたが、自然免疫が関与するモデルマウスでは肥満よりはむしろ食事の餌の種類により病態が悪化することが明らかになった。そしてこれは腸内細菌の影響によるものであることを示した。この結果から食事の質（食物繊維の質や含有量など）が腸内細菌を介して2型自然リンパ球を中心とした気道の自然免疫に影響を与えて肺の好酸球性炎症、すなわち喘息を悪化させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
喘息の悪化の要因として肥満、食事が関係することを明らかにした。喘息において2型自然リンパ球（ILC2）を介する自然免疫は喘息治療の主軸となるステロイドに対する治療抵抗性にも関与しており、難治性喘息の病態にも深く関わっている。一方ILC2のステロイド抵抗性を改善する有効な治療薬はいまだない。今回の研究成果から日常の食事の質が喘息における自然免疫のコントロールに影響を与える可能性が考えられ、肥満のみならず食事内容にも注意する必要性があることを示すことができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the possibility that changes in the intestinal microbiota due to dietary habits not only cause obesity but also affect the refractoriness of the condition in patients with asthma. As a result, we found that diet-induced obesity mimic adaptive immune response showed worsening of asthma, while innate immune response in mice showed worsening depending on the type of feed rather than obesity. This was attributed to the influence of intestinal bacteria. These results suggest that the quality of the diet (e.g., the quality and content of dietary fiber) affects the innate immunity of the airways, mainly type 2 innate lymphocytes, via the gut bacteria, and exacerbates eosinophilic inflammation of asthma.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：喘息　食事　自然免疫　獲得免疫　2型自然リンパ球　腸内細菌　肥満

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

近年喘息は様々なフェノタイプが存在する疾患として理解されるようになった。その中でも肥満を伴う喘息はコントロールが困難なフェノタイプのひとつである。申請者らが行っている喘息コホート研究の結果でも重症喘息患者の中で肥満合併（BMI 25 以上）の割合は約 30%であり、その頻度は決して少なくない。一方、我が国における肥満増加は食文化の変化がその主たる原因と考えられているが、今回申請者はこの食生活の乱れによる腸内細菌叢の変化が肥満を起こすのみならず、喘息合併患者の病態難治化に影響をあたえている可能性を考えた。そこで肥満患者の腸管でつくられる代謝産物が血流を通し肺内にどのような影響を与えるかについて、肺あるいは血液の網羅的脂質解析を用いて解析する計画を立案し本研究を肥満併存喘息病態の新たなる解明につなげたいと考えた。

２．研究の目的

本研究は肥満合併重症喘息患者の腸内細菌による腸内代謝産物の変化が喘息肺に与える影響について検討することを目的とした。これまで肥満が喘息病態に与える影響についてのマウスを用いた報告は散見され、肥満が喘息の病因に深く関わっている可能性は大きい（Kim HY, *Nat Med*, 2014)。一方、腸内細菌の働きが身体に与える影響については近年注目されている分野であるが、肥満喘息関連の報告として肥満喘息患者に胃縫縮術を施したところ肥満が改善し、その結果喘息が軽快したとの報告がある（Dixon AE, *J Allergy Clin Immunol*, 2011)。これは肥満の改善もさることながら、術後の食事の趣向の変化が腸内細菌叢の変化に影響を与えたことが要因のひとつとして考えられる。しかし、これまで肥満合併重症喘息患者の腸内細菌叢による肺への影響を検討した報告はない。実際に患者の腸内細菌叢が肺に与える影響を調べるためには、腸内細菌叢を調べる一方で、患者肺からもサンプル採取し解析することが望ましいが、現実的に肺からのサンプリングはその侵襲性を考えても困難であることがその理由である。

そこで申請者は肥満による腸内細菌叢の変化が喘息に与える影響を調べるために肥満マウスを作成し喘息モデルで評価を行うことを最初の目的とした。次に被験者の便を無菌マウスに移植し、患者と同じ腸内細菌叢を持つヒト便移植マウスモデルを用いて喘息を惹起させ病態への修飾の有無を検討し、腸管から肺に与える影響について解明することとした。

３．研究の方法

今回申請者は肥満合併喘息患者の腸内細菌叢が喘息病態に与える影響について調べるためにまずは肥満マウスモデルを作成し、さらにこれらを評価のために獲得免疫喘息を模した卵白アルブミン（OVA）感作・暴露モデル（以下 OVA 喘息マウス）および自然免疫喘息を模した IL-33 点鼻モデル（以下 IL-33 喘息マウス）を用いた。まずは通常穀物食（Chow or Grain based diet: 以下 Chow)、精製高脂肪食（以下 rHFD)、また精製高脂肪食の真のコントロール食である精製低脂肪食（以下 rLFD）を摂取させて 3 群で比較検討を行なった。次にこれらのマウスを用いて OVA および IL-33 を用いてそれぞれの喘息モデルを作成した。その結果、肥満 OVA 喘息マウスでは炎症の亢進が認められたものの、通常食（Chow）マウスと比較して高脂肪食（rHFD）摂取肥満マウスにおいて IL-33 によって誘導された好酸球性気道炎症は抑制され、さらに精製低脂肪食(rLFD)を用いて同じ実験を行ったところ、同様に好酸球性炎症は抑制されたことが明らかになった。このためこの IL-33 喘息マウスにおける食物を通じておきた炎症抑制の機序について検討を行うこととした。

そこでまず Chow と rLFD および rHFD の餌の成分の違いについて精査したところ Chow には大豆由来の成分としての可溶性食物繊維などが多く含まれていることがわかった。そこでこの違

いが前述の炎症反応の違いにつながる可能性を考え、これが腸内細菌を介した肺における反応かを検証するために無菌マウスを用いて検討を行った。さらに盲腸における短鎖脂肪酸測定、予測メタゲノム解析を行った。

４．研究成果

最初に肥満マウスを作成した。高脂肪食マウスは明らかに通常食マウスと低脂肪食マウスを比較して 2 か月後の体重増加を認めた（図１）。最初にこれらのマウスに OVA 感作・暴露によって喘息を誘導した。結果高脂肪食マウスでは通常食マウスや精製低脂肪食マウスと比べ、炎症反応の亢進、気管支肺胞洗浄液（BAL）では好酸球、Th2 細胞数の上昇、肺全体では好酸球は上昇傾向、好中球、Th17 細胞の上昇を認めた（図２a)。一方肺組織内のサイトカインは IL-17 のみ mRNA 発現が肺内で亢進していた（図 2b)。次に IL-33 点鼻モデルを用いて検討を行った。結果は OVA 喘息マウスとは逆の結果となり、高脂肪食では炎症細胞特に 2 型自然リンパ球（ILC2)、好酸球数が気道、肺内ともに抑制され、IL-5.IL-13 の産生低下を認め、興味深いことにこの傾向は低脂肪食群でも認められた（図３a,b,c)。これらの結果より、OVA モデルとは異なり、IL-33 点鼻モデルでは、肥満ではなく穀物食と精製食の違いがフェノタイプの違いを誘導していることが示唆された。

そこで餌の成分について精査したところ通常食（Chow）と低脂肪食（rLFD）ならびに高脂肪食(rLFD)には図４のような違いがあることが分かった。次に食餌の違いによるフェノタイプの差が腸内細菌を介した反応であるかを検証するために無菌マウスを用いて検討を行った。結果無菌マウスに Chow あるいは rLFD を摂取させる 2 群を用いて IL-33 で好酸球性炎症を誘導したところ両群とも炎症細胞の増加、IL-5・IL-13 の産生に差はなかった（図５a,b)。これにより IL-33 で誘導される ILC2 を介した好酸球性炎症は腸内細菌を介した機序が予想された。そこで次に両群から採取した肺内の ILC2 を *ex vivo* で刺激を行ったところ IL-5,IL-13 の産生能に違いを認めなかった。このことから食餌の違いは ILC2 そのものの性質には影響を与えないがその増殖（数）に影響する可能性が示唆された。次に Chow 群と rLFD 群の盲腸内の短鎖脂肪酸（SCFA）を測定したところ rLFD 群で低下していることが明らかになった（図６)。さらにそれぞれの群のマウス便を用いて予測メタゲノム解析を行ったところ Chow 群では短鎖脂肪酸の代謝に関わる *Prevotella spp* や *Ruminococcus spp* が上昇、一方で rLFD および hLFD 群では短鎖脂肪酸の代謝に関わる *Bacteroides spp* が上昇しているという結果となった。

以上より当初肥満喘息患者の便検体を無菌マウスに移植して喘息病態に与える影響について検討を行う予定であったが予備実験の結果上記のような結果を得たため予定を変更して研究を進めた。獲得免疫系を介した肥満喘息モデルマウスはこれまで報告にあるような表現型（好酸球炎症および好中球、Th17 細胞の関与）を認めた。しかし、自然免疫系（ILC2）を介する肥満喘息マウスモデルにおいては病態の悪化は認めず、肥満よりむしろ食事の質（食物繊維の質や含有量など）が悪化に影響を与える可能性があることが示唆された。これらは腸内細菌を介して産生される SCFA が肺の ILC2 の増殖に影響を与えている可能性が考えられた。喘息において ILC2 を介する自然免疫はステロイド抵抗性にも関与しており、難治性喘息の病態にも深く関わっている。一方 ILC2 のステロイド抵抗性を改善する有効な治療薬はいまだない。今回の研究成果から日常の食事の質がこの喘息における自然免疫のコントロールに影響を与える可能性が考えられ、肥満のみならず食事内容にも注意する必要性が示唆された。また今後 ILC2 と SFAC との関連についてはさらに研究を進めて行く予定である。

Figure

図 1　食餌の違いによる体重変化

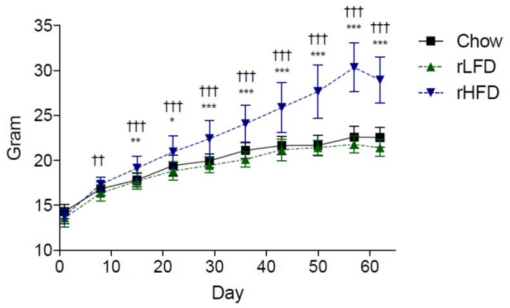


図 2　OVA 曝露・感作喘息マウスモデルを用いた食餌の違いによる気道炎症の検討

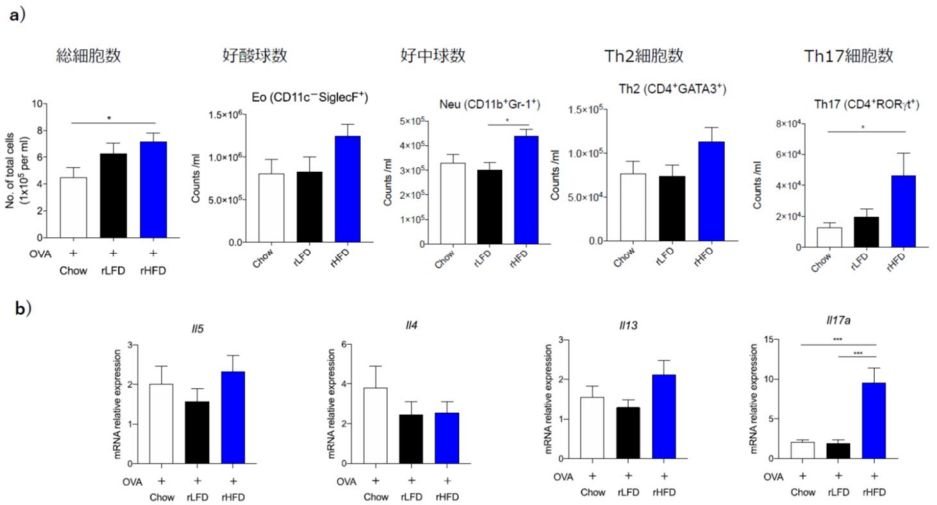


図 3　IL-33 喘息マウスモデルを用いた食餌の違いによる気道炎症の検討

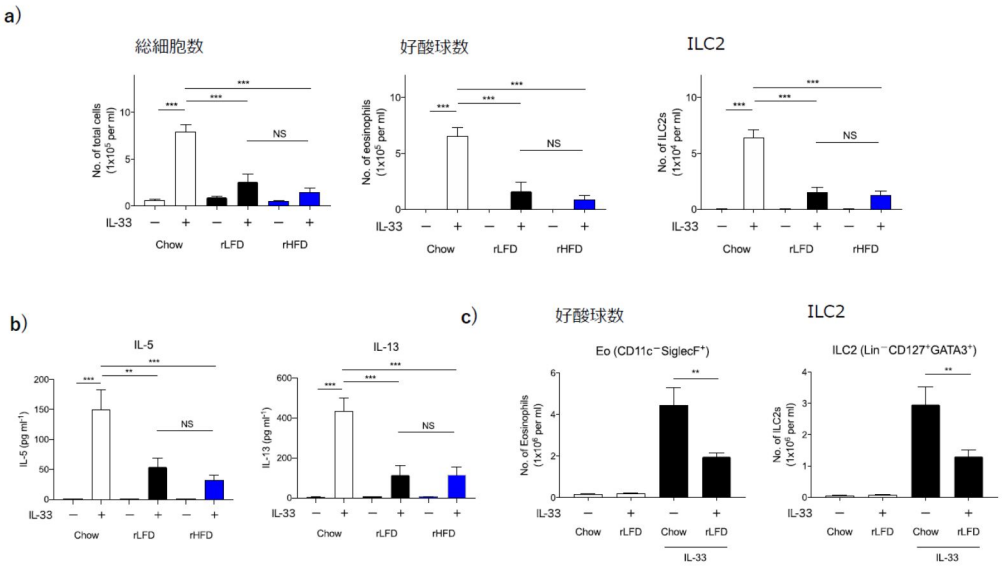


図 4　食餌成分の違い

食餌	穀物食 (Chow)		精製低脂肪食 (rLFD)		精製高脂肪食 (rHFD)	
	成分	kcal%	成分	kcal%	成分	kcal%
タンパク質	大豆粕、ホワイトフィッシュミール、酵母	30	カゼイン	20	カゼイン	20
炭水化物	小麦粉、トウモロコシ、マイロ	60	スクロース、マルトデキストリン、コーンスターチ	70	スクロース、マルトデキストリン	20
脂質	大豆油、胚芽	10	大豆油、ラード	10	大豆油、ラード	60
その他	ビタミン、ミネラル、食物繊維 (可溶/不溶性)		ビタミン、ミネラル、食物繊維 (セルロース)		ビタミン、ミネラル、食物繊維 (セルロース)	

図 5　無菌マウスを用いた IL-33 喘息モデルマウスにおける好酸球性気道炎症への食餌による影響

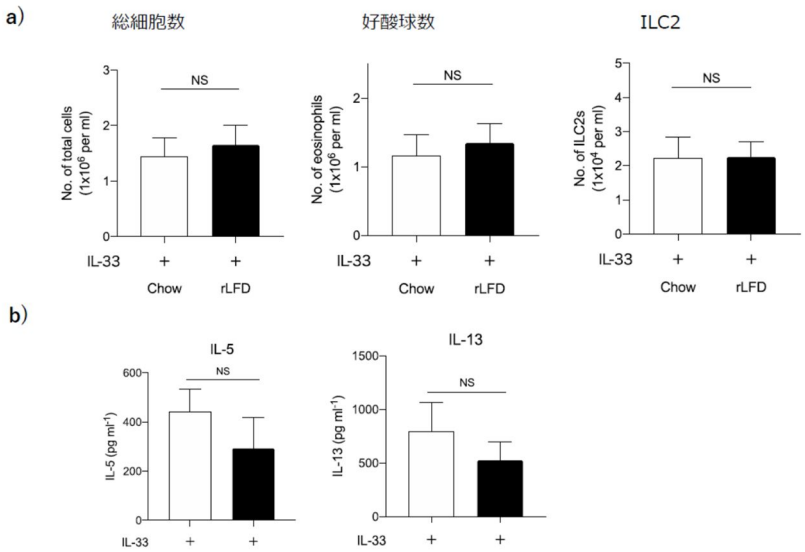
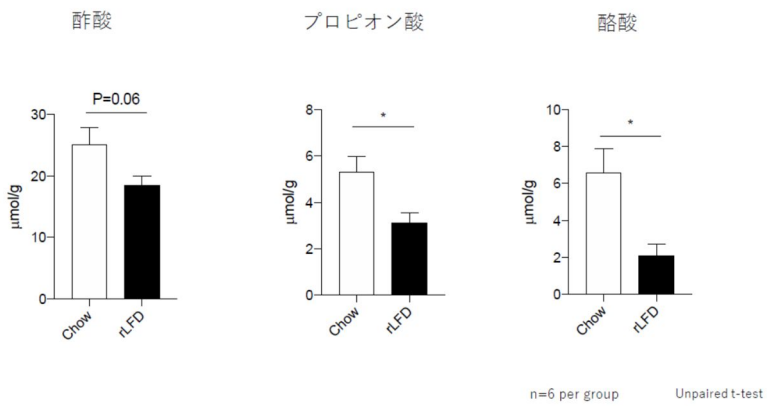


図 6　食餌による盲腸における短鎖脂肪酸産生の違い



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 奥隅真一、宮田純、加畑宏樹、正木克宣、加川志津子、田野崎貴絵、渡辺理沙、桑江美聡、秋山勇人、西江美幸、砂田啓英也、福永興壱
２．発表標題 マウスにおける食餌によるアレルギー性気道炎症への影響に関する検討
３．学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
連携研究者	有田　誠 (Arita Makoto) (80292952)	慶應義塾大学・薬学部・教授 (32612)	
連携研究者	入江　潤一郎 (Irie Junichiro) (70306687)	慶應義塾大学・医学部・講師 (32612)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関