

日本女子大学博士学位論文

母体の炎症環境が出生子に及ぼす影響  
－免疫代謝の視点からの解析－

**The effects of maternal inflammation on offspring:  
Analysis from the view point of immune-metabolism**

2019. 3

今井 敦子

## 目次

序論 .....	1
第1章 母体の強力な炎症が出生仔マウスの免疫・アレルギー病態に及ぼす影響.....	5
[研究1] 実験的アレルギー性鼻炎モデル (Th2 型優位モデル) での検討.....	6
1-1. 緒言 .....	6
1-2. 対象と方法 .....	8
1-2-1. 実験動物および実験プロトコル	
1-2-2. 実験的アレルギー性鼻炎の誘導と病態の評価方法	
1-2-3. 抗原特異的抗体価の測定	
1-2-4. 脾臓細胞の調整と培養方法	
1-2-5. 脾臓細胞の増殖反応の測定	
1-2-6. 血中アディポカイン濃度、脾臓細胞サイトカイン産生量の測定	
1-2-7. 統計解析手法	
1-3. 結果.....	11
1-3-1. 体重推移	
1-3-2. 臓器重量	
1-3-3. 血中アディポカイン濃度と L/A 比	
1-3-4. 脾臓細胞の増殖反応およびサイトカイン産生量	
1-3-5. OVA 特異的 IgE 抗体価と実験的アレルギー性鼻炎の病態評価	
1-4. 考察.....	13
図表	
[研究2] コラーゲン誘導性関節炎モデル (Th1 型優位モデル) での検討.....	22
1-6. 緒言.....	22
1-7. 対象と方法.....	23
1-7-1. 実験動物および実験プロトコル	
1-7-2. 免疫方法	
1-7-3. 足関節厚の測定と関節腫脹度の算出	

1-7-4. 脾臓細胞の調整と培養方法	
1-7-5. 増殖反応の測定	
1-7-6. 血中アディポカイン・サイトカイン濃度と 脾臓細胞サイトカイン産生量の測定	
1-7-7. 抗原特異的抗体価の測定	
1-7-8. 足関節の組織学的観察と CIA スコア	
1-7-9. 統計解析手法	
1-8. 結果 .....	26
1-8-1. 体重推移	
1-8-2. 関節腫脹の推移および CIA スコア	
1-8-3. 解剖時における血中指標	
1-8-4. 脾臓リンパ球幼若化反応およびサイトカイン産生量	
1-8-5. 解剖時（26 週齢）における血中 IL-6 およびレプチン濃度の関連	
1-9. 考察 .....	28
図表	

## 第2章：母マウスの食餌誘導性肥満による慢性炎症が出生仔マウスの加齢変化に及ぼす影響 [研究3]

2-1. 緒言 .....	38
2-2. 対象と方法 .....	40
2-2-1. 実験動物および実験飼料	
2-2-2. 実験プロトコル	
2-2-3. OVA 免疫方法	
2-2-4. OVA 特異的 IgG, IgE 抗体価の測定	
2-2-5. 脾臓細胞調整方法と培養方法	
2-2-6. 脾臓細胞の増殖反応の測定	
2-2-7. 血中アディポカイン・サイトカイン濃度、 脾臓細胞サイトカイン産生量の測定	
2-2-8. 胸腺細胞の調整	
2-2-9. 胸腺および脾臓細胞表面抗原と核内転写因子の測定方法	
2-2-10. 肝臓の組織学的観察と非アルコール性脂肪肝疾患の評価	

2-2-11. 統計解析手法	
2-3. 結果	44
2-3-1. 体重推移	
2-3-2. 臓器重量と血清アディポカイン濃度	
2-3-3. 血清アディポネクチン濃度と体重減少の関連	
2-3-4. 免疫学的指標	
2-3-5. 肝臓の組織学的観察と非アルコール性脂肪肝疾患の評価	
2-3-6. NAFLD の評価	
2-4. 考察	47
図表	

### 第3章：母体における自己抗原の経口摂取が仔マウスの自己免疫疾患の病態に及ぼす影響 [研究4]

3-1. 緒言	61
3-2. 対象と方法	63
3-2-1. 実験動物および実験プロトコル	
3-2-2. 経口免疫寛容の誘導	
3-2-3. 免疫方法（コラーゲン誘導性関節炎の誘導）	
3-2-4. 関節腫脹度の測定	
3-2-5. フン抽出液の作成	
3-2-6. 脾臓細胞およびペリエル板細胞の調整と培養方法	
3-2-7. サイトカイン産生量の測定	
3-2-8. 抗原特異的抗体価の測定	
3-2-9. 統計解析手法	
3-3. 結果	66
3-3-1. 関節腫脹度の推移	
3-3-2. 脾臓細胞のサイトカイン産生量	
3-3-3. 腸管免疫機能	
3-4. 考察	67
図表	

総 括.....	76
Summary.....	79
参 考 文 献 .....	82
謝 辞 .....	92

## 序論

妊娠中の母親の胎内環境は出生子の健康及び疾病の発症リスクに影響する。1980年代から1990年代初頭にかけて「低出生体重児は成人期に糖尿病や高血圧、高脂血症など、いわゆるメタボリックシンドロームを発症するリスクが高い」という疫学調査結果が相次いで報告され[1]、現在では「将来の健康や特定の病気へのかかりやすさは、胎児期や生後早期の環境の影響を強く受けて決定される」というDOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) の概念が提唱されている[2]。言い換えれば、健康寿命の進展及び病気の予防のためには、胎生期や生後早期からの対策が必要であると言える。現在の日本では、20代から30代の妊娠年齢のやせが問題になっているが、一方で若年女性での脂質エネルギー比率の増加も報告されている[3]。また晩婚化や生殖医療技術の進歩による妊娠年齢の高年齢化も進んでいる。厚生労働省の統計によれば35歳以上で妊娠する女性はすでに肥満傾向にあり、加齢による肥満（内臓脂肪蓄積）は母体の糖代謝異常や動脈硬化を伴い慢性炎症の基盤を持つことで、妊娠高血圧症候群や妊娠糖尿病などの周産期合併症を増加させると考えられている。さらに世界的にみても妊娠年齢女性の3割以上が肥満もしくは過体重であるとの調査報告がある[4]。現在のこの状況は、40～50年先の将来の疾病構造に大きな影響を及ぼすと考えられるが、その影響は十分に明らかにされていない。

一方、炎症は様々な疾患の発症及び病態形成に関与する。感染症や創傷のみならず、心血管疾患や脳血管疾患のリスク因子となる肥満、糖尿病、動脈硬化症、癌、さらには近年高齢者の健康障害として問題になっているサルコペニアなどにおいても炎症は病態形成に重要な役割を果たす。壮年期から高齢期にかけて増加するこれらの慢性疾患は、先進国のみならず発展途上国も含めて全世界的に急増しており、世界保健機関（WHO）は、生活習慣病や癌を総称して「非感染性疾患（non-communicable disease: NCD）」と定義し、新たな重要課題と位置づけている[5]。多くのNCDは加齢とともに有病率が上昇するため、超高齢社会であるわが国においては、罹患者の生活の質（Quality of life: QOL）向上、健康寿命の延伸、医療経済的側面からも取り組まれるべき喫緊の課題である。

炎症は本来、生体の恒常性維持のために起炎体を排除し修復するための生体防

御反応であり免疫反応と深く結びついている。微生物感染や創傷などにより誘導される「急性炎症 (acute inflammation)」は、いわゆる炎症の四徴 (熱感・発赤・疼痛・腫脹) を呈する典型的な生体防御反応であり、一過性に誘導された後、炎症反応のピークを越えると組織は恒常状態を回復する[6]。これに対して、生活習慣病等でみられる「慢性炎症 (chronic low-grade inflammation)」では明らかな急性炎症の特徴を示さないままに低レベルの炎症反応が持続・遷延化することが特徴である。炎症を惹起する傷害要因が取り除かれずに組織への傷害が持続することにより、周辺の細胞・組織の損傷・障害が生じ、治癒や修復をもたらそうとする応答として血管新生や細胞の増殖、線維化といったプロセスが持続する。組織障害と修復の機転が同時に続くことにより、線維化等により組織構築の改変 (組織リモデリング) が生じる。組織リモデリングが高度に進行すると最終的には不可逆な臓器機能障害が引き起こされる。このような明確な組織学的変化を示さない時期においても、炎症は細胞の機能を変調させ、組織機能を障害する[7]。

脂肪組織は余剰エネルギーを中性脂肪として貯蔵する機能だけでなく、アディポカインと総称される生理活性物質を分泌する内分泌臓器である。また、単なる成熟脂肪細胞の集合体ではなく、その間質に前駆脂肪細胞や内皮細胞、免疫細胞などの多様な細胞集団を含む。肥満により過剰に蓄積した内臓脂肪組織ではアディポカイン分泌の質的・量的パターンの変化や間質細胞における炎症性の細胞動態 (慢性炎症) が認められ、メタボリックシンドロームや遠隔組織 (または全身性) の炎症性変化の病態形成に関与する[8]。内臓脂肪組織の炎症は脂肪組織からの炎症性サイトカイン分泌を増加させる一方で、アディポネクチン等の一部のアディポカインの発現を低下させる。さらに脂肪組織炎症は脂肪酸の放出を促進する。このような代謝系と免疫系の連携に着目した免疫代謝 immune-metabolism と呼ばれる領域が注目を集めている[9]。通常、代謝系と免疫系は相互に連携し、機能が保たれている。しかしながら、免疫・アレルギーの炎症病態に代謝系の変化が及ぼす影響の理解は不十分である。また、加齢に伴い、免疫代謝のシステムの機能低下、またはバランスの変化等に起因して恒常性の変化が生じ、それに伴う慢性炎症状態が起りやすくなることが推察されるが、加齢による変化が免疫代謝に及ぼす影響も十分には解明されていない。

そこで、本研究は母体の胎内環境が出生子に及ぼす影響を解析することを目

的に行った。本論文は3章(研究1～4)で構成される。病態モデルマウスを用い、母体の環境が出生仔マウスに及ぼす影響を、免疫・代謝応答、炎症性疾患の病態、さらに加齢変化の視点から解析した。本研究は慢性炎症が病態に関与する疾患の発症予防・改善を目的とした栄養療法を発展させるための基礎研究としても位置づけられる。

## **第1章：母体の強力な炎症環境が出生仔マウスの免疫・アレルギー病態に及ぼす影響**

胎生期の炎症の影響を観察するため、はじめに母マウスにLipopolysaccharide (LPS) による強力な炎症を誘導し、出生仔マウスの免疫・アレルギー疾患モデルの病態に及ぼす影響を検討した。免疫応答が過剰に起こることで炎症を生じるアレルギー疾患と自己免疫疾患の病態モデルマウスを用い、その病態と免疫および代謝機能との関連を解析した。

### **【研究1】実験的アレルギー性鼻炎モデル(Th2型優位モデル)での検討**

実験的アレルギー性鼻炎モデル(allergic rhinitis, AR)はヒトの即時型(I型)アレルギー性鼻炎のモデルであり、Th2型優位で発症しやすい。母体の炎症環境が及ぼす影響について、アレルギー性鼻炎の病態と免疫機能および代謝機能との関連について解析した。

### **【研究2】コラーゲン誘導性関節炎モデル(Th1型優位モデル)での検討**

自己免疫疾患であるヒト関節リウマチの病態モデルであるコラーゲン誘導性関節炎(collagen induced arthritis, CIA)はTh1型優位で発症しやすい。母体の炎症環境が及ぼす影響について、仔マウスのCIAの病態(関節腫脹)を長期間にわたって観察し、免疫機能および代謝機能との関連について解析した。

## **第2章：母マウスの食餌誘導性肥満による慢性炎症が出生仔マウスの加齢変化に及ぼす影響【研究3】**

ヒト単純性肥満モデルである食餌誘導性肥満モデルマウスは内臓脂肪蓄積により慢性炎症(脂肪組織炎症)を生じる。low-gradeの炎症環境である慢性炎症(脂肪組織炎症)の影響を検討するため、母マウスに食餌誘導性肥満を誘導した。仔マウスを老齢期まで飼育し、免疫機能および代謝機能の加

齡変化に及ぼす影響を解析した。さらにその影響の機序を検討するため、新生仔期（0～7日齢）における胸腺細胞の解析も行った。

### **第3章：母体における自己抗原の経口摂取が仔マウスの自己免疫疾患の病態に及ぼす影響【研究4】**

第1章、第2章において、母体の胎生期や生後早期の炎症環境が仔マウスの炎症病態を変化させることを示した。これをふまえ、仔マウスでの炎症病態を抑制、予防するための胎生期、生後早期の環境を検討することを目的に、炎症性の自己免疫疾患である関節リウマチモデルマウスを用い、母マウスの自己抗原の経口投与が仔マウスの関節炎病態に及ぼす影響を解析した。

## 第 1 章：母体の強力な炎症環境が出生仔マウスの免疫・アレルギー病態に及ぼす影響[研究 1、2]

近年、免疫・アレルギー疾患の炎症病態と代謝病態との間に関連があり、肥満などによる代謝機能異常が免疫・アレルギー疾患の炎症病態に影響を及ぼすことが示唆されている[10, 11]。

本研究では母体の炎症が仔マウスの免疫・アレルギーの炎症病態に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、母マウスに Lipopolysaccharide (LPS) 投与による強力な炎症を誘導し、出生仔マウスの免疫・アレルギー疾患モデルの病態に及ぼす影響について、免疫代謝の視点から検討した。

妊娠中の環境が子の免疫・アレルギー疾患に及ぼす影響について、いくつかの疫学研究の報告がある[12-15]。LPS はグラム陰性桿菌の細胞壁成分であり、生体内ではマクロファージなどの自然免疫系細胞の Toll-like receptor (TLR) 4 により認識される[16]。LPS によりヘルパーT (Thelper: Th) 細胞のうち、特に Th1 型の細胞性免疫応答が誘導され、急性の炎症反応が生じる。

動物実験による機序の検討において、母マウスへの LPS 投与は、母体及び出生仔マウスのヘルパーT細胞機能を Th1 型優位にすることで実験的アレルギー性鼻炎や喘息の病態を軽減することが報告されている[17, 18]。しかしながら、仔マウスのヘルパーT細胞機能が Th1 型優位になっても、必ずしもアレルギー病態が軽減されないという報告もある[19]。一方、自己免疫疾患に関する母親の胎内環境の影響についての報告は少ない。また、母マウスへの LPS 投与による炎症誘導は仔マウスの脂肪蓄積を増加させ、代謝機能の恒常性を障害する（インスリン抵抗性の亢進など）ことが報告されている[20, 21]。これらの変化は、仔マウスにおける炎症反応や免疫応答を変化させる可能性があるが、その影響は不明である。

以上のことから、母マウスへの LPS 投与による炎症誘導が仔マウスの免疫・アレルギー疾患の病態に及ぼす影響についての検討は不十分である。

第 1 章では Th タイプの異なる病態モデルを用い、Th バランス及びアディポカイン産生などの免疫代謝機能が炎症病態に及ぼす影響を解析した。

## 【研究 1】実験的アレルギー性鼻炎モデル（Th2 型優位モデル）での検討

### 1-1. 緒言

近年、アレルギー疾患の発症が増加している。アレルギーは遺伝的要因に環境要因が加わって発症すると考えられるが、近年の急激な増加は、遺伝的要因よりむしろ環境要因の変化が重要な役割を果たしていると考えられるがその詳細は不明である。環境要因の変化として食習慣の変化、衛生環境をはじめとする生活環境の変化などがあげられる。

アレルギーは本来生体に有害ではない抗原に対して過剰な免疫応答が生じる状態であり、抗原特異的な獲得免疫機能の異常であるが、自然免疫系と獲得免疫系が複雑に関与し合って発症する[22]。アレルギー疾患はヘルパーT細胞機能がTh2型優位で発症しやすい。妊娠期にはセミアログラフトである胎児を拒絶しないためのトレランス機構が働く。Thバランスの面からは、妊婦はTh2型優位な状態を保つことでTh1型免疫応答から始まる胎児への細胞傷害性を減弱させている[17, 23]。胎児もTh2型優位な状態から、徐々に細菌やウイルスに曝されることによりTh1型の細胞性免疫が働くようになり、Th2型優位が和らいでいく。アレルギーを発症した幼児では強いTh2型優位が認められており、胎生期の子宮内環境から出生後早期の環境が幼児の免疫機能発達に影響すると考えられている[24]。

これらを背景として、近年、環境中の微生物との接触とアレルギー疾患の発症リスクとの関連についての研究が行われ、環境中のグラム陰性桿菌の細胞膜成分であるLPS量とアレルギー発症リスクとの間に関連があり、特に生後1年までのLPS曝露がアレルギー疾患発症を予防すると報告されている[25]。また、動物実験においても母体へのLPS投与が出生仔のアレルギー発症を抑制することが報告されている[17, 19, 26, 27]。その機序として、自然免疫系によりLPSが認識され、それにより非特異的なTh1型の免疫応答が優位になることでTh2型優位のアレルギー応答が抑制される。一方、LPS投与は免疫系への影響だけでなく、内分泌系におけるホルモン分泌および神経系にも影響を及ぼす。実際に、母体へのLPS投与は出生仔の体重増加、脂肪蓄積、血中レプチン濃度の増加を引き起こす[20, 21, 28]。したがって、母体のLPS投与による炎症環境が出生仔に及ぼす影響を検討するにあたり、免疫学的な側面のみならず、出生仔の代謝機能の変化も考慮する必要がある。しか

しながら、アレルギーの炎症病態に影響を及ぼす母体環境因子の検討は十分になされていない。

近年、肥満や過体重者では標準体重の人に比し、喘息やアトピー性疾患の発症率が高いことが報告されている[29, 30]。また、肥満の喘息患者では減量により喘息症状の改善がみられた[31]。以上のことから、本研究では LPS 投与による母体の炎症環境が出生仔マウスのアレルギー性鼻炎の病態に及ぼす影響について、抗原特異的免疫応答に加えて、代謝機能も解析し、相互の関連について検討した[32]。

## 1-2. 対象と方法

### 1-2-1. 実験動物および実験プロトコル

母マウスとして DBA/1J マウス（三協ラボサービス㈱）を用い、さらにこのマウスの交配から生まれた仔マウスを実験に用いた。マウスは固形飼料 MF（オリエンタル酵母㈱）と蒸留水を自由摂取させ、1 週間の馴化飼育後に実験に用いた。照明、室温、湿度を管理した環境で実験を行った（12 時間明暗サイクル、温度 20～26℃、湿度 40～70%を維持するように管理した）。本研究は日本学術会議による「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を元に作成された「日本女子大学動物実験規定」に則って行い、日本女子大学の実験動物委員会による承認を得て行った（承認番号：第 II 12-8）。

雌マウスに LPS (from *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich Co. LLC., 2 µg/g body weight) を腹腔内に 1 回投与した。コントロールには PBS のみ投与した。LPS または PBS の投与 5 日後、同系雄マウスと交配し、仔マウスは離乳まで出産した母マウスと同ケージで飼育し、授乳させた。仔マウスが 3 週齢のときに離乳し、LPS の投与を受けた母マウスから生まれた仔マウスを母炎症群 (the maternal LPS group)、PBS を投与された母マウスから生まれた仔マウスをコントロール群 (the control group) とした。生まれた仔マウスのうち、本研究には雌マウスのみを使用した。体重測定と食事摂取量の測定を週 1 回行った。7 週齢と 8 週齢で ovalbumin (OVA, grade V, Sigma-Aldrich) 免疫し、OVA を経鼻投与して実験的アレルギー性鼻炎を誘導し、9 週齢で解剖した。アレルギー病態の評価の翌日に、麻酔下で採血後、頸椎脱臼して安楽殺した。採取した血液は遠心分離して血清を回収し、測定まで -30° C で保存した。実験プロトコルを Fig. 1-1 に示した。

### 1-2-2. 実験的アレルギー性鼻炎の誘導と病態の評価方法

すべての仔マウスに実験的アレルギー性鼻炎を誘導した [33]。7 週齢において、OVA solution (100 µg of OVA with 4 mg of aluminum potassium sulfate in 500 µl of total volume) を腹腔内に投与した。8 週齢に 7 週齢と同様に追加免疫した。追加免疫の 1 週間後から 6 日間連続で OVA solution (25 µg/ml solution in PBS, 20 µl/mouse) を経鼻投与して実験的アレルギー性鼻炎を誘導した。

6 日目の OVA 経鼻投与の直後にマウスを 1 匹ずつケージに入れて、5 分間

のくしゃみ、ひっかき回数をカウントした。2 人の評価者がそれぞれどちらかの指標を観察した。評価者はどちらの群のマウスかわからないように blinded conditions で行った。

### 1-2-3. 抗原特異的抗体価の測定

血清中の OVA 特異的 IgE 抗体価を ELISA 法にて測定した。

OVA solution 100 $\mu$ L (100  $\mu$ g/ml in NaHCO<sub>3</sub> buffer, pH9.5) を固相化し、3 回洗浄後、blocking solution 100  $\mu$ l (3% BSA in PBS with 0.05% Tween 20) を 1 時間室温で作用させた。血清 (1:50 dilution) を作用させた後、検出系には OptEIA™ (Mouse IgE ELISA Set, biotinylated Detection antibody and Streptavidin-HRP, BD Biosciences) を用いた。発色基質は 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (MP Biomedicals, LCC, 100 $\mu$ L, in sodium-citrate buffer in the presence of 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を用いた。反応停止には 2N-HCl (50 $\mu$ L) を用いた。吸光度は主波長 450nm、副波長 570nm で測定した。OVA 特異的抗体価は OVA を固相化したウェルの吸光度から固相化していないウェルの吸光度を引いて求めた。

### 1-2-4. 脾臓細胞の調整と培養方法

解剖時に無菌的に取り出した脾臓は RPMI1640 培地に浸した。ステンレスメッシュ (200 $\mu$ m) とナイロンメッシュ (250 $\mu$ m) を用いて細胞を分離した後、遠心分離 (1,200 rpm for 10 minutes at 4° C) して 3 回洗浄し、牛胎児血清 (FCS) 5 % 添加 RPMI1640 培地\* (日水製薬㈱) に浮遊した。細胞濃度はリンパ球幼若化反応測定用には  $5 \times 10^6$  個/ml、サイトカイン産生量測定のための培養には  $1 \times 10^7$  個/ml に調整した。

リンパ球幼若化反応測定には 96 穴平底マルチウェルプレート (Falcon) を使い、細胞浮遊液 50  $\mu$ l ( $5 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ l per well) と、免疫抗原である OVA (100  $\mu$ g/ml)、またはマイトジェン刺激として concanavalin A (ConA, 5  $\mu$ g/ml, Difco)、LPS (10  $\mu$ g/ml, Difco Laboratories) を添加して OVA 刺激は 120 時間、マイトジェン刺激は 72 時間培養した (37° C、5 % CO<sub>2</sub>)。

サイトカイン産生量の測定のために、24 穴平底マルチウェルプレート (Falcon) に細胞浮遊液 500 $\mu$ L (細胞数  $5 \times 10^6$  個/well) とリンパ球幼若化反

応と同様の刺激を添加して 37° C、5 % CO<sub>2</sub> 環境下で 48 時間培養した。培養上清を回収し、サイトカイン産生量の測定まで -30° C で凍結保存した。

\* FCS 5 % 添加 RPMI1640 培地

RPMI1640		95mL
FCS	5 %	5 mL
L-glutamine (GIBCO)	2mmol/L	1mL
penicillin (GIBCO)	100U/mL	} 1mL
streptomycin (GIBCO)	100μg/mL	

#### 1-2-5. 脾臓細胞の増殖反応の測定

脾臓細胞を培養後、リンパ球幼若化反応の指標として Alamar Blue assay により増殖率を測定した。Alamar Blue solution (Serotec, Oxford, UK) 10μL/well 添加し、再度培養した (4 h at 37° C in 5% CO<sub>2</sub>) .

4 時間後、励起波長 544nm、吸収波長 590nm で蛍光強度を測定した。下記の計算式により細胞増殖率を求めた。

細胞増殖率 = (刺激した蛍光強度 - 無刺激蛍光強度) / 無刺激の蛍光強度

#### 1-2-6. 血中アディポカイン濃度、脾臓細胞サイトカイン産生量の測定

血中アディポカイン、脾臓細胞産生サイトカイン量の測定には DuoSet ELISA Development system (R&D Systems) を用いた。脾臓細胞産生サイトカイン量の測定には、ConA (IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ, and IL-17) または LPS (IL-6, TNF-α) で刺激した培養上清を用いた。

#### 1-2-7. 統計解析手法

データは平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析には IBM SPSS 22 (日本 IBM 株) を用いた。正規性の検定には Kolmogorov-Smirnov test を用いた。正規性のある指標は Student's t test、非正規分布の指標には Mann-Whitney U test を用いた。危険率 5 % 未満を統計学的有意とした。

### **1-3. 結果**

#### **1-3-1. 体重推移**

体重推移を Fig. 1-2 に示した。離乳時の体重は母炎症群がコントロール群に対して有意に高値であった。その後 2 群間の差は認められなくなった。OVA 免疫後、母炎症群の体重は減少せず、コントロール群に対して有意に高値であった。さらに OVA 免疫後からアレルギー性鼻炎誘導時も母炎症群の体重は有意に高値であった。

#### **1-3-2. 臓器重量**

解剖時に摘出した臓器の重量を測定した (Table 1-2)。脾臓重量は母炎症群が有意に低値であった。一方、腹膜下脂肪重量は母炎症群が有意に高値であった。

#### **1-3-3. 血中アディポカイン濃度と L/A 比 (Fig. 1-3)**

血中レプチン濃度は母炎症群で有意に高値であり、血中レプチン／アディポネクチン比率は母炎症群がコントロール群に対して有意に高値であった。なお、血中アディポネクチン濃度は両群間に有意差を認めなかった。

#### **1-3-4. 脾臓細胞の増殖反応およびサイトカイン産生量**

マイトジェン刺激 (ConA, LPS) に対する脾臓細胞の増殖反応は母炎症群が有意に低値であった。同様に、抗原刺激 (OVA) に対する増殖反応も母炎症群で抑制されていた (Fig. 3-4)。

サイトカイン産生量について、母炎症群は  $\text{IFN}\gamma$  の産生が有意に高値であり、その結果、 $\text{IFN}\gamma$ ／ $\text{IL-4}$  比率がコントロール群に対して有意に高値であり、実験的アレルギー鼻炎誘導による Th2 優位が抑制されていた。また、母炎症群はコントロール群に対して、T 細胞による  $\text{IL-10}$  産生が有意に高値であった。一方、 $\text{TNF}\alpha$  は有意に低値であった (Table 1-2)。

#### **1-3-5. OVA 特異的 IgE 抗体価と実験的アレルギー性鼻炎の病態評価**

OVA 特異的 IgE 抗体価とアレルギー性鼻炎症状（5 分間のくしゃみ、ひっかかり回数の合計）ではアレルギー性鼻炎誘導群は非誘導群に対して有意に高値であった。しかしながら、母炎症群とコントロール群の間に差は認められなかった（Table 1-3）。

#### 1-4. 考察

本研究では LPS 投与による母体の炎症環境が出生仔に及ぼす影響を検討することを目的に、実験的アレルギー性鼻炎の病態と免疫機能および代謝機能との関連を解析した。

はじめに代謝機能について、母炎症群は体重および内臓脂肪重量が有意に高値であり、また血中レプチン濃度も有意に高値であった。レプチンは脂肪細胞が分泌するアディポカインであり、食欲やエネルギー消費を調節する。肥満により肥大した脂肪細胞や脂肪組織に遊走した炎症性細胞の影響により脂肪細胞からのアディポカイン分泌は変化する[34]。血中レプチン濃度は脂肪重量と正相関し、肥満により増加する。感染や炎症刺激においてもレプチン産生は亢進する[35]。喘息やアトピー性皮膚炎のようなアレルギー疾患の患者において血中レプチン濃度は高値であることから、肥満とアレルギー炎症との関連において、レプチンが重要な役割を果たしていると考えられる[11]。

本研究の結果では、母炎症群は体重及び内臓脂肪重量が有意に高値であり、血中レプチン濃度も高値であった。一方、母炎症群において脾臓細胞培養上清中の IFN $\gamma$  産生が高値であり、Th バランスの指標となる IFN $\gamma$  /IL-4 比率はコントロール群に対して有意に高値であった。すなわち母炎症群は Th バランスが Th1 優位であった。レプチンは T 細胞の分化や活性に影響し、特に IFN $\gamma$  産生を促す。その結果、Th1 型優位を促進する。一方で、好酸球からの MCP-1 分泌を促進する。MCP-1 は肥満細胞からのヒスタミンやプロスタグランジン D2 の放出を促進し、I 型アレルギー応答を促進する。すなわち Th2 型応答にも関与する[11]。この他にもレプチンは好酸球のアポトーシスを抑制して慢性炎症の収束を阻害することや、肥満者において脂肪組織の制御性 T 細胞数を減少させるとの報告もある[36]。これらのことから、レプチンは炎症病態に多面的に働き、炎症病態を調節する可能性がある[11]。本研究において、脾臓細胞のサイトカイン分泌により評価した Th バランスは、母炎症群において Th1 型優位であり、また OVA 刺激による脾臓リンパ球幼若化反応は抑制されていた。しかしながら、アレルギー病態の指標となる OVA 特異的 IgE 抗体価や実験的アレルギー性鼻炎の病態（くしゃみ・ひっかき回数）の抑制が認められなかった。抗原特異的なリンパ球増殖反応や Th バランスはアレルギーの主要な免疫指標であり、母の炎

症はアレルギー抑制的に作用したと考えられるが、本研究において母炎症群の IgE 抗体価やアレルギーの病態が抑制されなかった要因として、レプチンが Th バランスに影響を及ぼすとともに、アレルギーの局所炎症を亢進する役割を果たした可能性が推測された。

母体の炎症環境が出生仔のアレルギー炎症に及ぼす影響について、脂肪組織機能の変化の視点から更に検討する必要がある。

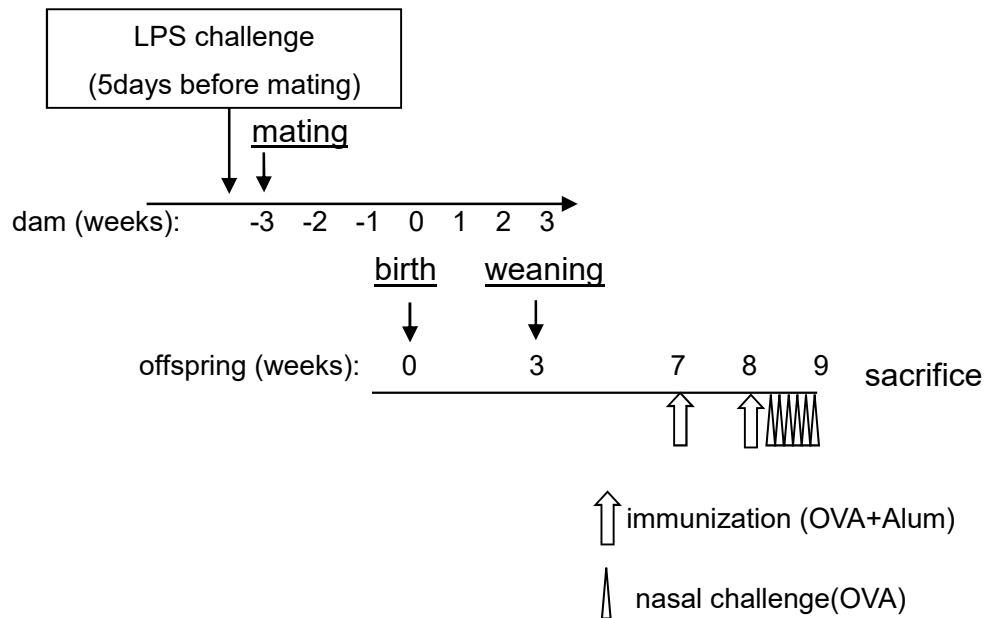


Fig.1-1 Experimental design.

The number of offspring in each group in the maternal LPS group (n=7), control group (n=7). OVA, ovalbumin; Alum, Aluminum Hydroxide.

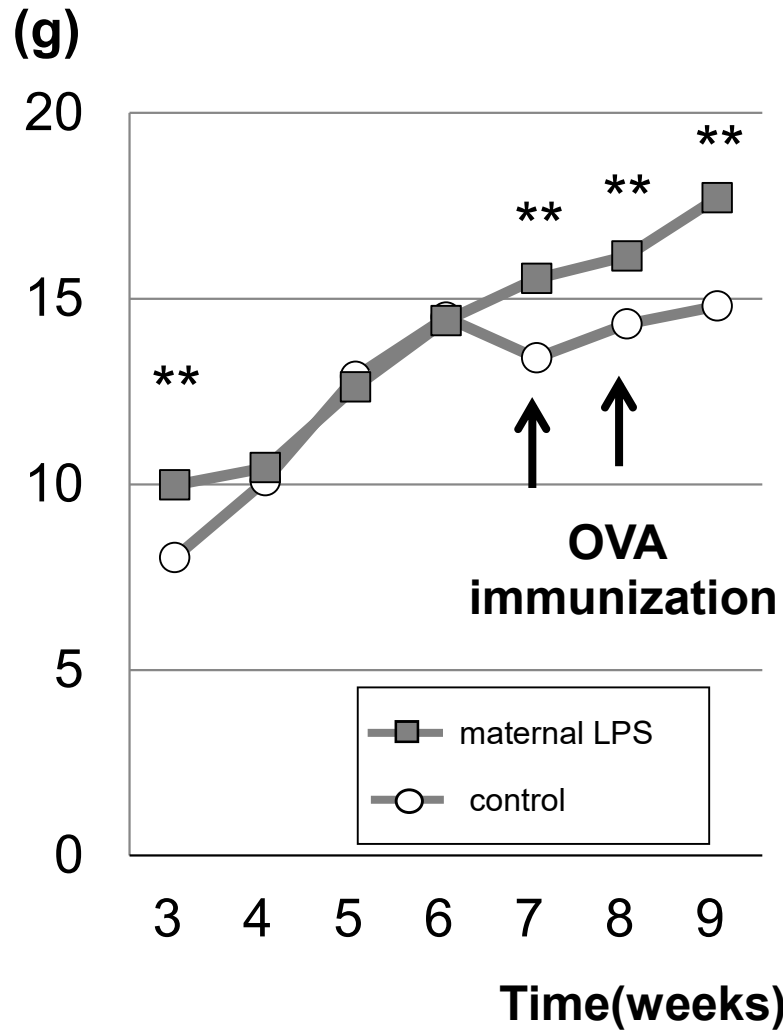


Fig.1-2 Time course of changes in body weight of offspring of the control group and the maternal LPS group.

The difference between the 2 groups of mice was significant at 3 weeks, point of weaning, and after first immunization (7 to 9 weeks) (Values are mean $\pm$ SE, \*\*:  $P < 0.01$ ). The number of offspring in each group in the maternal LPS group (n=7), control group (n=7).

Table1-1 Organ weights

	control	maternal LPS	
Spleen (g)	0.125 ± 0.023	0.081 ± 0.034	*
Thymus (g)	0.047 ± 0.008	0.046 ± 0.007	
Liver (g)	0.915 ± 0.076	0.886 ± 0.052	
Kidney (g)	0.228 ± 0.017	0.222 ± 0.014	
Subperitoneal fat pad (g)	0.070 ± 0.035	0.131 ± 0.019	**
Inguinal fat pad(g)	0.129 ± 0.044	0.158 ± 0.070	

Values are mean±SE,\*, $P<0.05$ , \*\*, $P<0.01$

The number of offspring in each group in the maternal LPS group (n=7), control group (n=7).

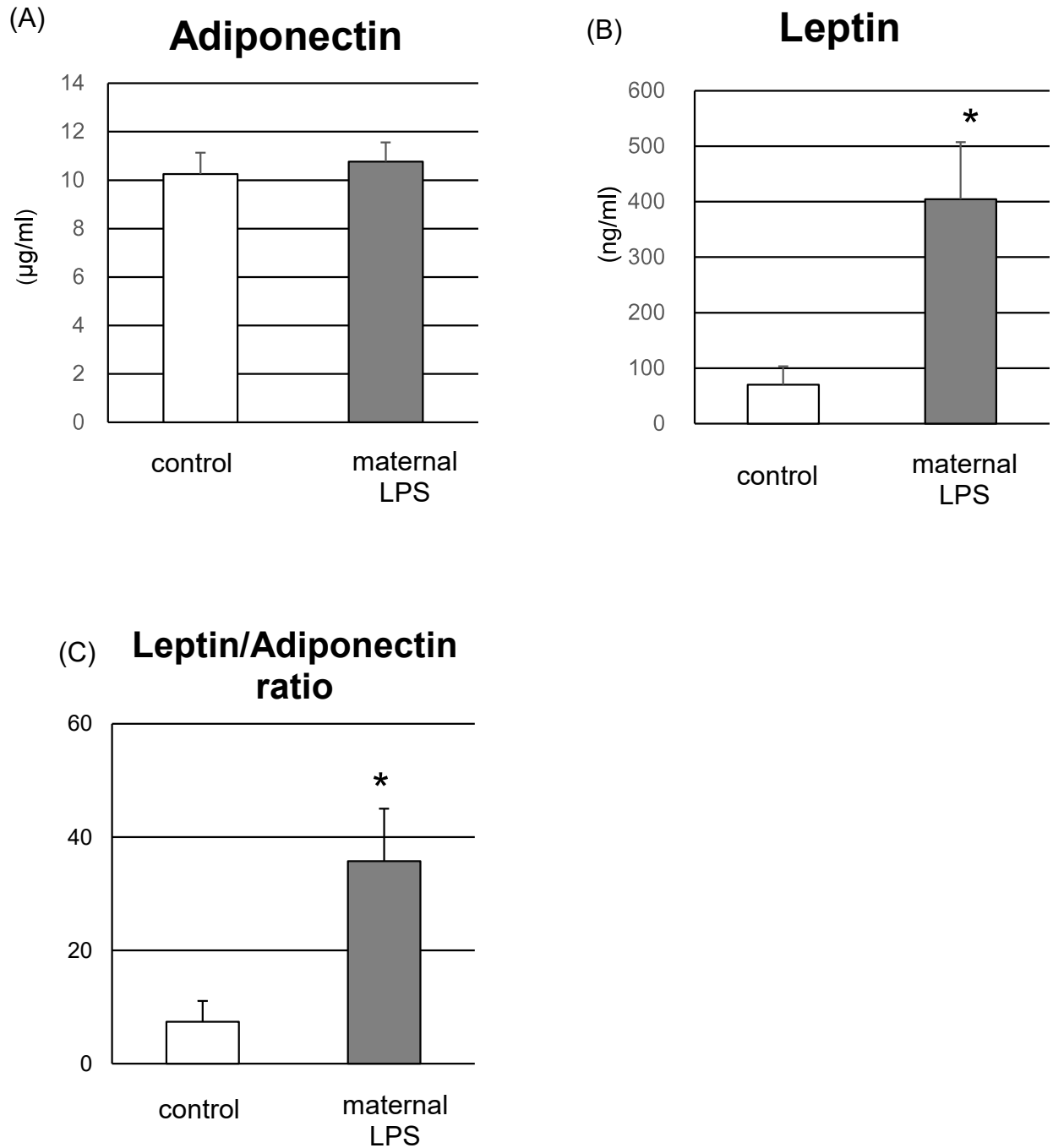


Fig.1-3 Serum levels of adipokines

(A) adiponectin, (B) Leptin, and (C) Leptin/Adiponectin ratio (Values are mean $\pm$ SE, \*\*; $P$ <0.01).

The number of offspring in each group in the maternal LPS group (n=7), control group (n=7).

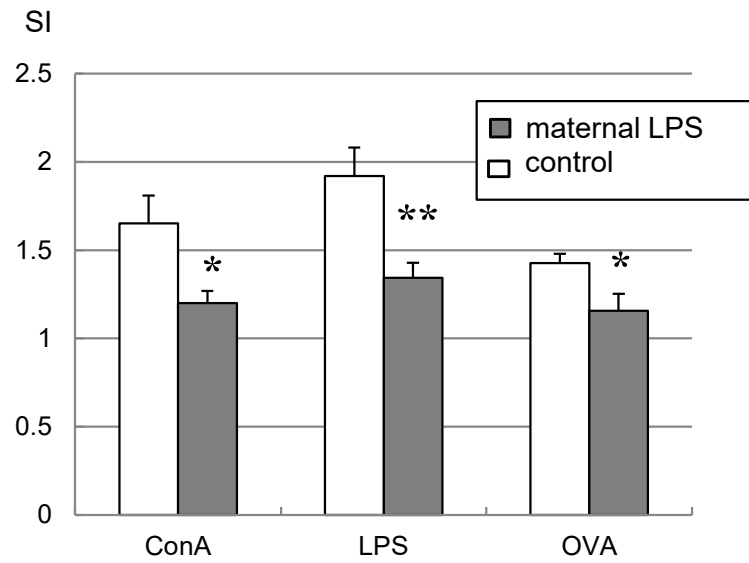


Fig.1-4 Proliferative response of splenocytes.

SI, stimulation index (Values are mean $\pm$ SE, \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ ).

The number of offspring in each group in the maternal LPS group (n=7), control group (n=7).

Table 1-2 Cytokine production by splenocytes

	control	maternal LPS	
IFN- $\gamma$ (ng/ml )	3.51 $\pm$ 0.234	4.69 $\pm$ 0.324	*
IL-2(ng/ml )	1.39 $\pm$ 0.233	1.66 $\pm$ 0.325	
IL-4(pg/ml)	49.12 $\pm$ 3.353	47.88 $\pm$ 2.534	
IL-6(pg/ml)	45.70 $\pm$ 4.500	58.80 $\pm$ 4.700	
IL-10(pg/ml)	175.63 $\pm$ 49.050	295.02 $\pm$ 35.634	*
IL-17(ng/ml )	0.69 $\pm$ 0.070	0.64 $\pm$ 0.082	
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	214.70 $\pm$ 6.185	142.94 $\pm$ 26.727	*
IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio	73.00 $\pm$ 9.330	102.61 $\pm$ 9.792	*

Splenocytes ( $5 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ l per well) were cultured after 48h of culture in the presence of 5  $\mu$ g/ml concanavalin A (ConA), or 10  $\mu$ g/ml lipopolysaccharide (LPS) as a non-specific response at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

ELISA was used on supernatans of splenocytes stimulated with either LPS(IL-6,TNF- $\alpha$ ) or ConA(others). Values are mean $\pm$ SE, \*; $P$ <0.05

The number of offspring in each group in the maternal LPS group (n=7), control group (n=7).

Table 1-3 OVA- specific IgE titer and allergic rhinitis-like symptoms (sneezes and scratches)

	control	maternal LPS	allergy(-)
OVA specific IgE (OD )	0.036 ± 0.010 #	0.026 ± 0.008 #	0.000 ± 0.000
sneezes and scratches ( times/5 min )	51.4 ± 12.1 †	60 ± 12.2 #	28 ± 2.96

OVA-specific IgE antibody titre in sera was determined by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) using OVA to coat plates.

Data are shown as values obtained by subtracting optimal density (OD) of non-coated well from OD of OVA-coated well. Allergy(-), female offspring without intranasal challenge with OVA.

Allergic rhinitis-like symptoms were evaluated at the number of sneezes and scratches for 5 min under blinded conditions just after the last intranasal instillation with OVA.

# :  $P < 0.05$  vs allergy(-), † :  $P < 0.1$  vs allergy(-), OVA, ovalbmin; OD, optical density

The number of offspring in each group in the maternal LPS group (n=7), control group (n=7).

## 【研究 2】コラーゲン誘導性関節炎モデル（Th1 型優位モデル）での検討

### 1-6. 緒言

近年、ヒト関節リウマチ患者ではリウマチ性悪液質や中心性肥満を認め、冠動脈疾患の罹患率が高いことが報告されている[37, 38]。関節リウマチの炎症病態が代謝機能に影響し、中心性肥満を引き起こす可能性がある。また、中心性肥満（内臓脂肪蓄積）による脂肪組織炎症をはじめとする代謝異常が関節リウマチの炎症病態に影響を及ぼすと考えられる。

レプチンは脂肪細胞から分泌されるアディポカインであり、食欲やエネルギー代謝を調節する。肥満による脂肪細胞の肥大に伴い分泌量が増加する[34]。肥満者において血清レプチン濃度が高値であることが慢性炎症の病態に影響し、肥満者は冠動脈疾患や 2 型糖尿病を発症しやすい。さらに自己免疫疾患や癌などの免疫異常による疾患においても病態形成に関与する可能性が指摘されている。

関節滑膜液中のレプチン濃度は骨びらんのある患者では骨びらの無い患者に対して高値であると報告されており、関節内でのレプチン代謝は関節リウマチの骨びらんに関連している可能性がある[39, 40]。しかしながらレプチンが関節の骨びらん形成に直接的に関連するかどうかは不明である。

コラーゲン誘導性関節炎（CIA）は自己免疫疾患であるヒト関節リウマチの病態モデルである[41]。自己抗原である II 型コラーゲン（CII）投与により誘導され、特に Th1 型に傾くと発症しやすい。Th バランスの変化に加えて、近年、関節リウマチの炎症病態に影響を及ぼす可能性が指摘されている代謝病態に着目した。

そこで、研究 2 では母体の炎症が仔の免疫機能および代謝機能を調節し、炎症性疾患の病態形成に影響を及ぼすと仮説を立て、コラーゲン誘導性関節炎の発症に及ぼす影響を解析した。脚関節腫脹を 75 日間にわたって観察し、その後解剖して足関節の組織学的観察、CII 特異的抗体価、全身性免疫機能の指標としてリンパ球機能を解析した。さらに、足関節腫脹と血清中炎症性サイトカイン、およびレプチン濃度の関連を検討した[42]。

## 1-7. 対象と方法

### 1-7-1. 実験動物および実験プロトコル

母マウスとして DBA/1J マウス（三協ラボサービス㈱）を用い、さらにこのマウスの交配から生まれた仔マウスを実験に用いた。マウスは固形飼料 MF（オリエンタル酵母㈱）と蒸留水を自由摂取させ、1 週間の馴化飼育後に実験に用いた。照明、室温、湿度を管理した環境で実験を行った（12 時間明暗サイクル、温度 20～26℃、湿度 40～70%を維持するように管理した）。本研究は日本学会議による「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を元に作成された「日本女子大学動物実験規定」に則って行い、日本女子大学の実験動物委員会による承認を得て行った（承認番号：第 II 12-8）。

雌マウスに LPS (from *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich Co. LLC., 2 µg/g body weight) を腹腔内に 1 回投与した。コントロールには PBS のみ投与した。LPS または PBS の投与 5 日後、同系雄マウスと交配し、仔マウスは離乳まで出産した母マウスと同ケージで飼育し、授乳させた。仔マウスが 3 週齢のときに離乳し、LPS の投与を受けた母マウスから生まれた仔マウスを母炎症群 (the maternal LPS group)、PBS を投与された母マウスから生まれた仔マウスをコントロール群 (the control group) とした。生まれた仔マウスのうち、本研究には雄マウスのみを使用した。体重測定と食事摂取量の測定を週 1 回行った。13 週齢と 16 週齢でタイプ II コラーゲンを免疫し、コラーゲン誘導性関節炎を誘導した。病態の指標として足関節厚を測定し、関節腫脹度を求めて病態の指標とした。経時的に足関節厚を測定し、26 週齢において麻酔下で採血後、頸椎脱臼して安楽殺した。採取した血液は遠心分離して血清を回収し、測定まで -30° C で保管した。実験プロトコルを Fig. 1-5 に示した。

### 1-7-2. 免疫方法

仔マウスは両群ともすべてのマウスにコラーゲン誘導性関節炎を誘導した [43]。CII 50mL [2mg/mL in 0.024M acetic acid (AA) solution] と等量の完全フロイントアジュバント (Difco) と混合してオイルエマルジョンとし、尾根部に 100µL 皮下免疫した。13 週齢で初回免疫し、3 週間後の 16 週齢において初回と同様に追加免疫を行って関節炎を誘導した。

### 1-7-3. 足関節厚の測定と関節腫脹度の算出

2 回の CII 免疫により関節炎を誘導した後、経時的に足関節厚を測定した。両側の後足関節厚をダイヤルシックスゲージ（モデル-G、Peacock）を用いて 2 回測定し、平均値を足関節厚とした。以下の計算式より関節腫脹度を求めた。

関節腫脹度＝免疫後の足関節厚／免疫前の足関節厚

### 1-7-4. 脾臓細胞の調整と培養方法

脾臓細胞の調整と培養方法は 1－2－4 と同様に行った。但し、抗原特異的刺激には CII solution（100µg/mL）を用いた。

### 1-7-5. 増殖反応の測定

1－2－5 と同様に行った。

### 1-7-6. 血中アディポカイン・サイトカイン濃度および脾臓細胞サイトカイン産生量の測定

測定は 1－2－6 と同様に行った。脾臓細胞産生サイトカイン量の測定には ConA（IFN $\gamma$ ，IL-2，IL-4，IL-10，and IL-17）、または LPS（TNF- $\alpha$ ）刺激した培養上清を用いた。

### 1-7-7. 抗原特異的抗体価の測定

96 穴マルチウェルプレート（for ELISA、住友ベークライト株式会社）に CII（10 µg/ml，50 µl/well in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> buffer，pH 9.5）を固相化した（4° C、over night）。ブロッキング液として 3% skim milk in PBS（300 µl）を用い 1 時間反応させた。その後、血清（1:8000 dilution）100 µL を加えて室温で 90 分間反応させた。検出抗体としてビオチン化 goat anti-mouse IgG（1:2000 dilution; Zymed）、streptavidin-HRP（1:4000 dilution; Dako）、発色基質は 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine（MP Biomedicals, LCC, 100µL, in sodium-citrate buffer in the presence of 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）を用いた。反応停止には 2N-HCl（50µL）を用いた。吸光度は主波長 450nm、副波長 570nm で測定した。CII

特異的抗体価は CII を固相化したウェルの吸光度から固相化していないウェルの吸光度を引いて求めた[43]。

#### **1-7-8. 足関節の組織学的観察と CIA スコア**

26 週齢の解剖時に、足関節を採取し 10%中性緩衝ホルマリン液に漬けて固定した。パラフィン包埋、HE 染色標本の作製は札幌総合病理研究所に依頼した。関節炎の重症度について、(1)炎症性細胞の浸潤、(2)滑膜細胞の増殖、(3)血管新生、(4)骨・軟骨の破壊を観察した。それぞれの項目を 4 段階のスケール(なしまたはごく軽度 = 0、軽度 = 1、中等度 = 2、重度 = 3)で評価した。後足 2 本の標本について、2 人の評価者がすべての項目を評価し、その平均値を用いた。観察はマウスの群がわからないように blinded condition で行った。

#### **1-7-9. 統計解析手法**

データは平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析には IBM SPSS 22 (日本 IBM ㈱)を用いた。正規性の検定には Kolmogorov-Smirnov test を用いた。正規性のある指標は Student's t test、非正規分布の指標には Mann-Whitney U test を用いた。2 変数の相関関係は The Spearman rank correlation で評価した。危険率 5 %未満を統計学的有意とした。

## 1-8. 結果

### 1-8-1. 体重推移

離乳後から解剖までの体重推移を Fig.1-6 に示した。離乳時は母炎症群がコントロール群に対して有意に高値であった。5～9週齢、13、15～18週齢において母炎症群が有意に高値であった。19週齢以降、2群間の差は認められなくなった。

解剖時の臓器重量を Table 1-4 に示した。肝臓重量は母炎症群で有意に高値であった。脾臓、胸腺、腎臓および脂肪組織重量には2群間に差は認められなかった。

### 1-8-2. 関節腫脹の推移および CIA スコア

関節腫脹は追加免疫以後の各時点の足関節厚から追加免疫前の16週齢時の足関節厚を引いて求めた。観察期間中すべてのマウスで四肢の少なくとも1箇所以上で腫れまたは発赤が観察され、CIAが誘導されたことが確認された。追加免疫以降の発症早期において(8～35日)、母炎症群はコントロール群に対して関節腫脹が軽度であった(Fig.1-7)。特に12日目、21日目は有意に母炎症群が低値であった。しかしながら、徐々に母炎症群でも関節腫脹が強くなり、2群間の差は認められなくなった。さらに67日目において、母炎症群がコントロール群に対して有意に高値であった。

組織学的観察において、26週齢の解剖時(追加免疫75,76日目)の後足関節2本の関節をHE染色標本で評価し、CIAスコアを求めた。その結果、母炎症群がコントロール群よりもCIAスコアが有意に低値であった(Fig.1-8)。追加免疫後、発症初期に関節腫脹が高度であった個体では骨・軟骨の破壊が進行していた。解剖時点での骨・軟骨破壊はコントロール群が高値傾向であった( $P=0.009$ )。

### 1-8-3. 解剖時における血中指標

CII 特異的 IgG 抗体価は母炎症群がコントロール群に対して有意に低値であった( $P<0.05$ 、Table 1-4)。

炎症性サイトカインである IL-6 の血中濃度は母炎症群が有意に高値であ

った ( $P=0.038$ )。同じく炎症性のサイトカインである  $\text{TNF } \alpha$  は母炎症群が高値傾向であった ( $P=0.080$ )。

血中レプチン濃度は母炎症群がコントロール群に対して低値傾向であった ( $P=0.078$ )。

#### **1-8-4. 脾臓リンパ球幼若化反応およびサイトカイン産生量**

免疫抗原である CII、またはマイトジェン刺激に対する脾臓細胞の増殖反応を測定した結果、2 群間に差は認められなかった。脾臓細胞産生サイトカイン量について、 $\text{IFN } \gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-17 (ConA 刺激)、 $\text{TNF } \alpha$  (LPS 刺激) は 2 群間に差は認められなかった。Th バランスの指標となる  $\text{IFN } \gamma / \text{IL-4}$  比についても 2 群間に差は認められなかった (Table 1-5)。

#### **1-8-5. 解剖時 (26 週齢) における血中 IL-6 およびレプチン濃度の関連**

解剖時である 26 週齢 (追加免疫 75, 76 日目) において、炎症性サイトカインである IL-6 の血中濃度と血中レプチン濃度に負の相関を認めた ( $r=-0.703$ ,  $P=0.005$ , Fig. 1-9)。

## 1-9. 考察

本研究では、母炎症群において発症初期の足関節腫脹が有意に軽度であった。しかしながら、長期の観察により、徐々にコントロール群との差はなくなった。一方で、解剖時点（26 週齢）における足関節の組織学的観察による CIA スコアと CII 特異的 IgG 抗体価は母炎症群において有意に低値であった。これらの結果より、母体の炎症環境は出生仔マウスの CIA 発症を遅らせる、または調節することが示された。

体重の経時変化において、3～9 週齢および免疫後から 18 週齢までの間、母炎症群はコントロール群に対して体重が高値であった。先行研究において、母マウスへの LPS 投与が仔マウスの脂肪蓄積を増加させ、インスリン抵抗性や血中コルチコステロン濃度を上昇させることが報告されている [20, 21, 28]。関節リウマチ（rheumatoid arthritis, RA）患者ではしばしばリウマチ性悪液質や中心性肥満が生じ、非 RA 患者より冠動脈疾患の発症が多いことが報告されており [37, 38]、RA の炎症病態が中心性肥満（内臓脂肪蓄積）を引き起こし、脂肪組織炎症が冠動脈疾患発症に影響すると考えられる。すなわち本研究においても、母体の炎症環境が仔マウスの免疫および代謝機能に影響し、それらが相互に影響し合って仔マウスの CIA 病態に影響を及ぼした可能性がある。

追加免疫後 75 日目にあたる解剖時（26 週齢）での検討では、RA において疾患活動性の指標となる血清 IL-6 濃度は、母炎症群において有意に高値であった。血清 TNF $\alpha$  濃度もコントロール群に対して高値傾向であり、また、血中レプチン濃度は低値傾向であった。血中レプチン濃度は体重や体脂肪量と正相関する。しかしながら、RA 患者では BMI とは関連せず、CRP や IL-6 といった炎症の程度を表わす指標と逆相関するとの報告がある [44]。本研究でも 26 週齢の体重および脂肪重量には 2 群間に差は認められず、血中レプチン濃度は血中 IL-6 濃度と逆相関した。研究室の先行研究においても、疾患活動性が高い RA 患者は血中レプチン値が有意に低値であった [45]。また CIA 誘導により血中レプチン濃度は低値を示した [46]。炎症性サイトカイン刺激下で脂肪細胞を培養するとレプチンの mRNA 発現およびタンパク産生が抑制されるという *in vitro* 実験の結果がある [44]。関節局所では関節滑膜液の炎症性サイトカイン産生は亢進しており、関節内でのレプチン代謝を抑制

しているかもしれない[40]。以上の先行研究の結果より、26 週齢における血中 IL-6 濃度高値、レプチン濃度低値は母炎症群の CIA 病態が今後、増悪する傾向にあることを示している可能性がある。

母体の LPS 投与が仔マウスのサイトカインバランスを Th1 型優位にした場合、母炎症群では CIA が増悪する可能性が当初推測された。しかしながら本研究では CIA 発症初期の母炎症群の関節腫脹度は抑制された。先行研究において、LPS 投与によって引き起こされた母体の炎症は仔マウスにおいてエンドトキシンに対する免疫応答を抑制し、特に単球系の細胞からの炎症誘導性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、MCP-1 の産生を強く抑制したとの報告がある。また LPS 投与による母体の炎症は仔マウスの血中コルチコステロン濃度を上昇させると報告されている[20, 21, 28]。コルチコステロンは炎症性細胞の局所への遊走や成熟化を抑制して免疫応答を抑制する。本研究においても母体の炎症環境が仔マウスの血中コルチコステロン濃度を上昇させ、その結果、炎症性細胞機能が低下し、発症初期の CIA の関節腫脹が軽減された可能性がある。しかしながら、本研究では解剖時（26 週齢）の解析において炎症性サイトカインである IL-6 や TNF $\alpha$  はむしろ高値であり、脾臓 T 細胞機能、サイトカインバランスには差は認められず、観察期間の短い先行研究の結果からは説明できない。CIA 誘導初期の関節腫脹度が低値であった時期のサイトカインバランスは 26 週齢時点とは異なっていた可能性があり、関節腫脹度と併せてサイトカインバランスについても経時的な検討が必要である。

最後に、本研究の結果が得られた機序について考察する。母マウスの妊娠期の炎症が仔マウスの免疫機能および代謝機能に影響することが報告されている[47, 48]。胸腺は胎児において最も早期に発達する免疫臓器である。低容量の LPS 投与は初期受精卵の内部細胞塊（ICM）の細胞数を減少させる。胸腺細胞は ICM から発生し、胎生期におけるアポトーシスは胸腺細胞の発達に重要な過程である。胎生期において胸腺細胞のアポトーシスの増加や分化が障害されることは胸腺重量の低下や胸腺細胞の形質変化を引き起こす。合成女性ホルモンであるジェチルスチルベストロールは胸腺細胞のアポトーシスを促すことで胸腺の萎縮を引き起こす[49]。本研究において、母炎症群の母マウスでは、LPS 投与により妊娠初期の血中 IL-6 濃度が高値であった。これにより胎生マウスの ICM が減少し、胸腺細胞の形質に変化をもたらした結果、仔マウスの免疫機能を変化させた可能性がある。本研究の結

果が得られたメカニズムを検討するためには母体の炎症環境が出生仔の胸腺および T 細胞の発達に及ぼす影響を解析する必要があると考える。

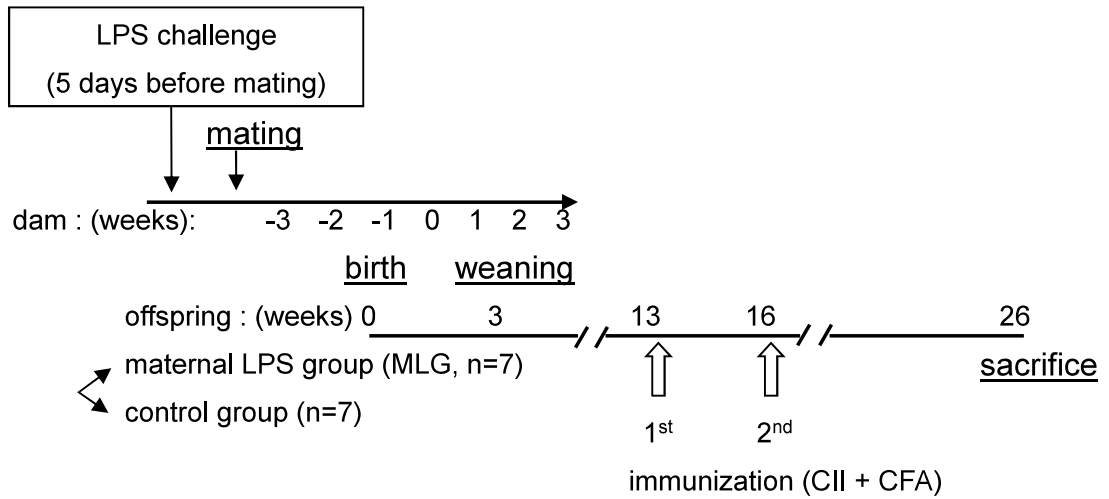


Fig. 1-5 Experimental design.

There were seven offspring included in the maternal LPS group (MLG) and control group. CII, type II collagen; CFA, Freund's complete adjuvant.

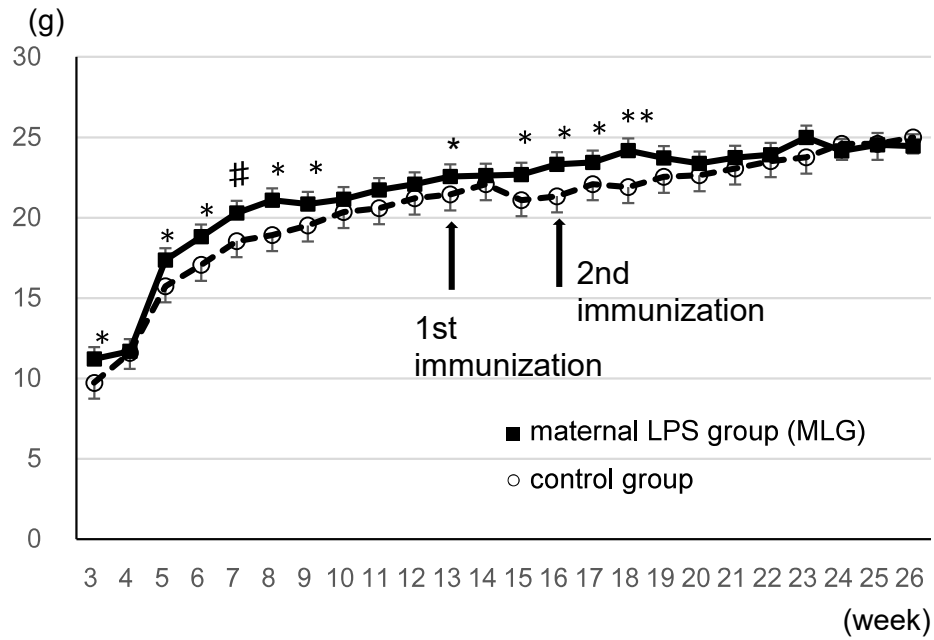


Fig. 1-6 Time course of the changes in body weight.

The difference between the two groups of mice was significant at 3 weeks (weaning); at 5, 6, 8, and 9 weeks; and after immunization (13 and 15 to 18 weeks).

Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.; \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, # $P$ <0.1.

The number of offspring in each group in the maternal LPS group ( $n=7$ ), control group ( $n=7$ ).

Table 1-4 Parameters at 26weeks old

	control group (n=7)	maternal LPS group (MLG, n=7)	<i>P</i> value
Body weight (g)	23.7 ± 1.0	25.3 ± 0.3	0.175
Spleen (g)	0.090 ± 0.004	0.092 ± 0.006	0.812
Thymus (g)	0.021 ± 0.002	0.029 ± 0.005	0.176
Liver (g)	1.021 ± 0.128	1.323 ± 0.031	0.017 *
Kidney (g)	0.508 ± 0.017	0.527 ± 0.011	0.405
Subcutaneous fat pad (g)	0.157 ± 0.029	0.158 ± 0.016	0.970
Visceral fat pad (g)	0.157 ± 0.032	0.133 ± 0.011	0.534
Serum cytokines and adipokines			
IL-6 (pg/mL)	28.1 ± 3.4	70.0 ± 20.2	0.038 *
TNF-α (pg/mL)	16.5 ± 1.7	21.2 ± 1.1	0.080
Leptin (pg/mL)	790 ± 242	271 ± 151	0.073
Adiponectin (μg/mL)	2.32 ± 0.11	2.41 ± 0.10	0.610
CII-specific IgG (OD)	1.50 ± 0.03	1.34 ± 0.05	0.027 *

Body and organ weights, serum cytokines and adipokines, and anti-CII IgG titers at 26 weeks old (75 or 76 days after the second immunization).

Data are presented as the mean ± S.E. \**P*<0.05.

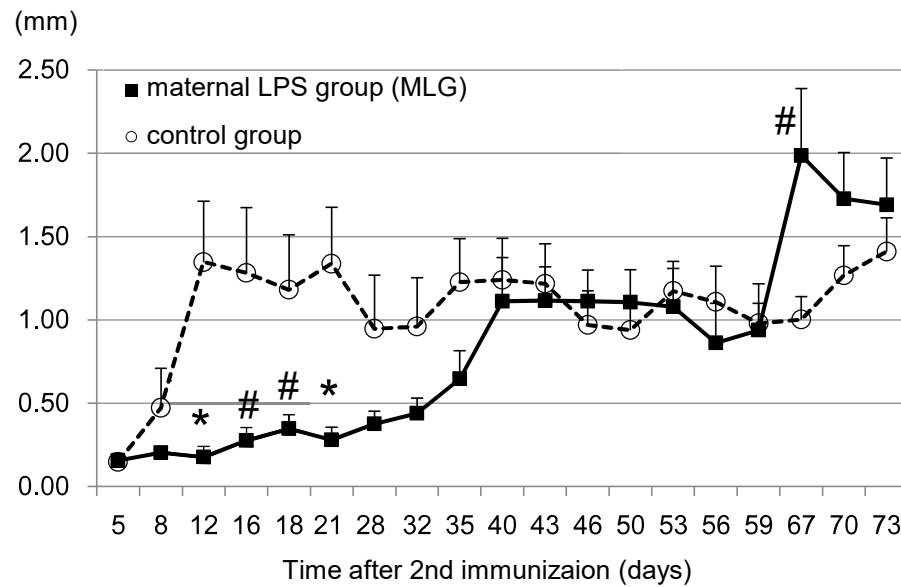


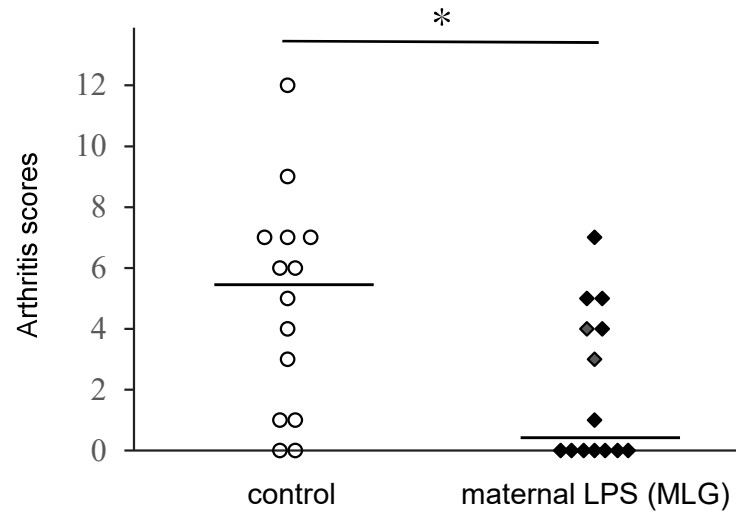
Fig. 1-7 Joint swelling.

Mice were assessed twice a week to determine the thickness of four paws. Joint swelling was calculated as the difference between the total paw thickness at each time point and that before second immunization at 16 weeks.

Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.; \* $P < 0.05$ , # $P < 0.1$ .

The number of offspring in each group in the maternal LPS group ( $n=7$ ), control group ( $n=7$ ).

(A) Arthritis scores



(B) Hematoxylin-eosin staining of the joint

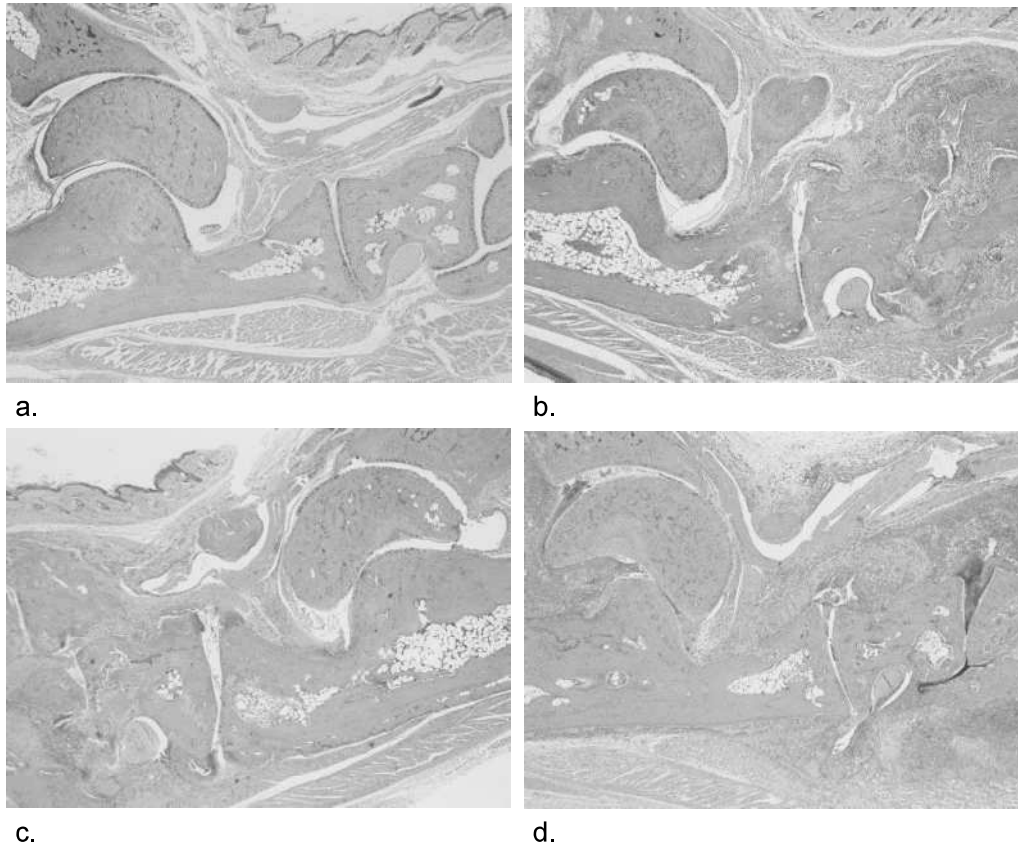


Fig. 1-8 Evaluation of collagen-induced arthritis.

(A) Arthritis scores. The severity of (1) inflammatory cell infiltration, (2) synovial cell proliferation, (3) vascularization, and (4) bone/cartilage destruction was scored on a four-point scale (none or mild: 0, slight: 1, moderate: 2, and severe: 3). The total score is the sum of the scores for the four indices. \* $P < 0.05$ . Maternal LPS group ( $n=7$ ), control group ( $n=7$ ).

(B) Hematoxylin-eosin staining of the joint. Representative images are shown. (a) Mild arthritis (score 0) in the maternal LPS group (MLG). (b) Slight arthritis (score 3) in the control group. (c) Moderate arthritis (score 5) in the maternal LPS group (MLG). (d) Severe arthritis (score 9) in the control group.

Table 1-5 Splenocytes proliferation and cytokine production at 26weeks old

	control (n=7)	maternal LPS group (MLG, n=7)	<i>P</i> value
Splenocytes proliferation			
ConA	0.64 ± 0.10	0.48 ± 0.11	0.304
LPS	0.70 ± 0.11	0.43 ± 0.12	0.108
CII	0.13 ± 0.06	0.12 ± 0.05	0.902
Cytokine production by splenocytes			
IFN $\gamma$ (ng/mL)	2.17 ± 0.16	2.51 ± 0.32	0.363
IL-2 (ng/mL)	2.08 ± 0.33	2.29 ± 0.24	0.623
IL-4 (pg/mL)	21.5 ± 3.6	19.7 ± 5.4	0.788
IL-10 (pg/mL)	274 ± 33	215 ± 18	0.144
IL-17 (pg/mL )	449 ± 58	431 ± 47	0.807
TNF $\alpha$ (pg/mL)	197 ± 25	239 ± 15	0.189
IFN $\gamma$ /IL-4 ratio	121 ± 22	211 ± 60	0.194

ELISAs were performed on supernatans of splenic lymphocytes stimulated with either LPS(TNF- $\alpha$ ) or ConA(others).

Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.

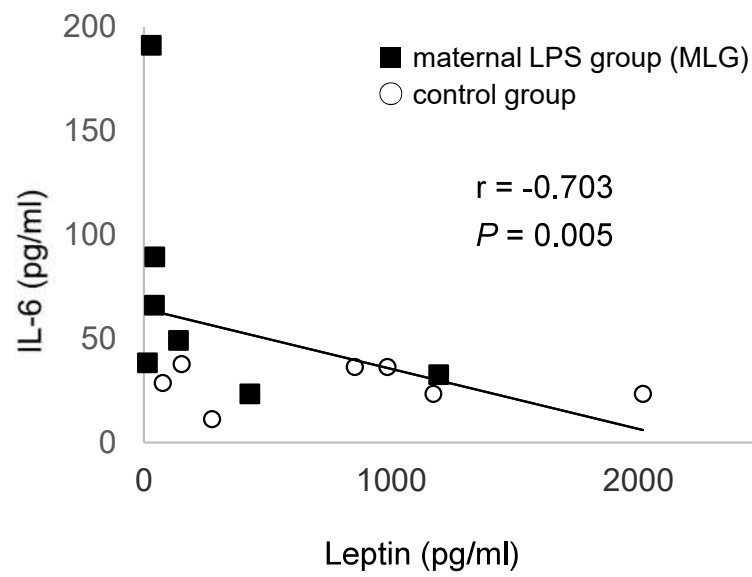


Fig. 1-9 Correlation between serum IL-6 and leptin at 26 weeks.

The number of offspring in each group in the maternal LPS group (n=7), control group (n=7).

## 第2章 母マウスの食餌誘導性肥満による慢性炎症が 出生仔マウスの加齢変化に及ぼす影響[研究3]

### 2-1. 緒言

第1章では、母体のLPSによる強力な炎症環境が出生仔マウスの脂肪組織機能に影響し、免疫・アレルギー疾患の病態に影響を及ぼすことを示した。第2章では、low-gradeの炎症環境である食餌誘導性肥満による慢性炎症が出生仔マウスに及ぼす影響を検討する。

慢性炎症は生活習慣病や癌などの加齢関連疾患に共通する基盤病態である。高齢者では慢性炎症が生じやすく、炎症が加齢関連疾患の発症や病態の進展に関与していると考えられる。高齢者において慢性炎症が生じやすい原因として、加齢に伴う免疫系の機能変化や全身の代謝・内分泌系の変化、細胞や組織の変化などがあり、これらは相互に関連しあっていると考えられる[50]。

加齢に伴い免疫系は大きく変化する。特に獲得免疫応答の低下、炎症増大傾向および自己免疫疾患の増加が知られており、これらの加齢に伴う免疫機能の変化を「免疫老化」と呼ぶ[51, 52]。免疫老化のなかでも炎症増大傾向は加齢関連疾患の発症と関連すると考えられる。また、肥満により過剰に蓄積した内臓脂肪組織ではアディポカイン分泌の変化や間質細胞における炎症性の細胞動態（慢性炎症）が認められ、メタボリックシンドロームや遠隔組織（または全身性）の炎症性変化の病態形成に関与する。このような免疫系と代謝系の連携に着目した免疫代謝 immune-metabolism と呼ばれる領域が注目を集めている[53]。通常、免疫系と代謝系は相互に連携し、生体の恒常性維持に役割を果たしている。しかしながら、加齢に伴いこれらのシステムの機能低下、またはバランスの変化等に起因して恒常性の変化が生じ、それに伴い慢性炎症状態が起りやすくなることが推測される。

一方、「将来の健康や特定の病気へのかかりやすさは、胎児期や生後早期の環境の影響を強く受けて決定される」というDOHaDの概念について、妊娠中の母親の肥満は幼少期から成人期にかけての肥満や非アルコール性脂肪肝疾患の疾患感受性を高めることが報告されている[54-56]。しかしながら母親の肥満が子世代の高齢期に及ぼす影響を検討した報告はない。そこで本研究では加齢による免疫機能の

変化である「免疫老化」に着目し、母マウスの食餌誘導性肥満が仔マウスの老齢期の免疫及び代謝機能に及ぼす影響を解析した。さらに老齢期での影響の機序を検討するため、新生仔期（0～7日齢）における胸腺細胞の解析も行った。

## 2-2. 対象と方法

### 2-2-1. 実験動物および実験飼料

母マウスとして 8 週齢の C57BL6/J mice (CLEA Japan, Inc.) を用い、さらにこのマウスの交配から生まれた仔マウスを実験に用いた。マウスには普通食を摂取させ、1 週間の馴化飼育後に実験に用いた。

母マウス 9 週齢時にランダムに 2 群に分け、AIN-93G 変形高脂肪食または AIN-93G 食を摂取させた (Research Diets, Inc.)。実験食の組成を Table 2-1 に示した。実験食とイオン交換水は自由摂取とした。照明、室温、湿度を管理した環境で実験を行った (12 時間明暗サイクル、温度 20~26℃、湿度 40~70% を維持するように管理した)。本研究は日本学術会議による「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を元に作成された「日本女子大学動物実験規定」に則って行い、日本女子大学の実験動物委員会による承認を得て行った (承認番号：第 II 15-6)。

### 2-2-2. 実験プロトコル

9 週齢時に雌マウスを同系雄マウス (普通食摂取) と交配し、得られた仔マウスを実験に用いた。仔マウスは離乳まで出産した母マウスと同じケージで飼育して授乳させた。母マウスは 9 週齢から妊娠前、妊娠期間、授乳期を通じて同じ実験食を摂取した。仔マウス 3 週齢で離乳した。離乳に際し、母マウス高脂肪食摂取群から生まれた仔マウスと、母マウス普通食群から生まれた仔マウスをそれぞれ 2 群に分け、高脂肪食 (HF) または普通食 (CON) を摂取させ、計 4 群に分けた。仔マウスの群の名称は母マウス普通食摂取/仔マウス普通食摂取の群を CON/CON 群とした。以下、CON/HF 群、HF/CON 群、HF/HF 群とした。週 1 回の体重測定、餌摂取量の測定を行い、加齢の影響を観察した。67 および 69 週齢で OVA 免疫し、1 週間後の 70 週齢で解剖した。70 週齢で解剖した仔マウスを老齢マウスとした。

加齢による変化の機序を検討するため、母マウスを同様に飼育して得られた仔マウスを新生仔期 (0 日、3 日、7 日齢) に解析し、胸腺細胞の T 細胞分化について検討した。

若齢コントロールとして 8 週齢のマウスを実験に用いた。9 および 11 週齢

で OVA 免疫し、12 週齢で解剖した (young 群)。加齢による変化の検討には老齢マウスの CON/CON 群と young 群を比較した。

### 2-2-3. OVA 免疫方法

すべての仔マウスに OVA 免疫を行った。老齢マウス 67 週齢、若齢マウス 9 週齢において、OVA(200 µg ovalbumin, Sigma) with aluminum potassium sulfate (Alum; 4 mg/0.5 ml in phosphate-buffered saline; Sigma) を腹腔内投与して免疫した。老齢マウス 69 週齢、若齢マウス 11 週齢で初回と同様に追加免疫を行った。追加免疫 1 週間後の 70 週齢、または 12 週齢に解剖した。免疫方法は老齢マウスの OVA 特異的免疫機能を評価した先行研究の方法に基づいて行った[57]。

### 2-2-4. OVA 特異的 IgG, IgE 抗体価の測定

血清中の OVA 特異的 IgG 抗体価は ELISA 法にて測定した。96-well plates に OVA solution (120 µg/ml, 50 µl/well in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> buffer, pH 9.5) 固相化した後 (overnight at 4° C)、blocking solution 300 µl (3% BSA in PBS with 0.05% Tween 20) でブロッキングした。(1 h at room temperature)。血清 (diluted 1:32000) を反応させた後 (90 min at room temperature)、biotin-labeled goat anti-mouse IgG antibody (1:8000 dilution; Zymed)、streptavidin-HRP (1:4000 dilution; Dako) を用いて検出した。The enzyme reaction には o-phenylene diamine (in a sodium-citrate buffer (pH 5.0) in the presence of 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the dark, Sigma)を用いた。2N HCl (50 µl) で反応を停止した。吸光度は 492 nm で測定した。OVA 特異的抗体価は OVA を固相化したウェルの吸光度から固相化していないウェルの吸光度を引いて算出した。

IgE 抗体価の測定は 1 - 2 - 3 と同様に行った。但し、固相化に用いた OVA solution 濃度は 120µg/mL、血清の希釈は 1:200 とした。発色反応、測定は IgG と同様に行った。

### 2-2-5. 脾臓細胞調整方法と培養方法

脾臓細胞の調整と培養方法は 1-2-4 と同様に行った。T 細胞レセプターによるシグナル伝達を介した増殖反応、サイトカイン産生量を測定するため、anti-CD3 mAb (0.5 µg/mL, BD Pharmingen) を固相化し、soluble anti-CD28 mAb (1 µg/mL, BD Pharmingen) を添加した条件での培養も行った。

#### 2-2-6. 脾臓細胞の増殖反応の測定

脾臓細胞の増殖反応の測定は 1-2-5 と同様に行った。

#### 2-2-7. 血中アディポカイン・サイトカイン濃度、脾臓細胞サイトカイン産生量の測定

血中アディポカイン、サイトカイン濃度、脾臓細胞産生サイトカイン量の測定は 1-2-6 と同様に行った。

#### 2-2-8. 胸腺細胞の調整

胸腺細胞の調整は 1-2-4. の脾臓細胞と同様に行った。

#### 2-2-9. 脾臓細胞表面抗原と核内転写因子の解析方法

胸腺細胞および脾臓細胞浮遊液 ( $1 \times 10^7$  cells/ml) は lysis buffer を作用させて溶血した (7 min on ice)。PBS containing 2% FCS (10mL) を加えて遠心後分離して上清を吸引除去した (1400 rpm, 5 min)。細胞 pellets を PBS containing 2% FCS 1 mL に再浮遊した。細胞浮遊液 50µL をフローサイトメータ用チューブに入れ、monoclonal antibodies と反応させた (30 minutes on ice to avoid placing the tubes in direct light)。Flow cytometer 測定は Gallios instrument (Beckman Coulter Co., Ltd.) を用い、測定データは Kaluza 1.2 software (Beckman Coulter Co.) により解析した。使用した monoclonal antibodies を以下に示した。胸腺：CD4 (GK1.5; Sony); CD8a (53-6.7; BD Bioscience)、脾臓：CD3e (145-2C11; Sony); CD4 (GK1.5; Sony); CD8a (53-6.7; BD Bioscience); CD25 (PC61; iCyt); CD45RB (C363-16A; SONY); CD44 (IM7; BioLegend); CD62 L (MEL-14; eBioscience); PD-1 (RMP1-30; BioLegend); NK1.1 (PK136; iCyt) and FOXP3 (150D; BioLegend)。核内転写因子 FOXP3 の染色には、FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (BioLegend) を用い

た。

#### 2-2-10. 肝臓の組織学的観察と非アルコール性脂肪肝疾患の評価

肝臓の組織学的観察のため、10%中性緩衝ホルマリンに浸漬して固定した。パラフィン包埋、hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson trichrome (MT) staining は札幌総合病理研究所 (Sapporo, Japan) に委託した。NAFLD の病態について、(1) steatosis (macrovesicular lipid accumulation), (2) lobular inflammation (lymphomonocytic infiltration) according to HE staining, and the severity of (3) fibrosis according to MT staining を観察した。それぞれの項目を4段階または5段階のスケール (none =0, mild =1, moderate =2, severe =3 and very severe =4) で評価した。2名の評価者がすべての項目を評価し、その平均値を用いた。観察はマウスの群がわからないように blinded condition で行った。

仔マウスの肝臓組織について、NAFLD severity を評価した。ヒト NALFD の評価に用いられている steatosis, activity and fibrosis (SAF) score を一部修正して使用した {{16}}。本研究では steatosis severity は脂肪蓄積を顕微鏡観察により4段階で評価し、疾患活動性の評価は lobular inflammation 使用し4段階で評価した。両指標とも HE 染色標本で評価した。Fibrosis は MT 染色標本で5段階で評価した。

#### 2-2-11. 統計解析手法

データは平均値±標準誤差で示した。統計解析には IBM SPSS 22 (日本 IBM ㈱) を用いた。

加齢による影響を検討するため、加齢マウスの CON/CON 群と young group を2群間比較した。新生仔期の検討は母マウスの実験食の違いを検討するため母高脂肪食群と母普通食群を2群間比較した。正規性の検定には Kolmogorov-Smirnov test を用い、正規性が認められた指標は Student's t-test、非正規分布の指標は Mann-Whitney U test を用いた。母マウスの実験食と仔マウスの実験食の2要因の主効果は二元配置分散分析により解析した。交互作用が有意であった項目について、単純主効果の検定を行った。2変数の相関関係は The Spearman rank correlation で評価した。危険率5%未満を統計学的有意とした。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 体重推移

8 から 30 週齢において、母マウスの実験食の影響について、母高脂肪食の影響により仔マウスの体重は有意に高値であった。しかしながら、中齢期から老齢期に相当する 54~66 週齢では母高脂肪食摂取の影響によりむしろ有意に低値であった。仔マウスの実験食について高脂肪食摂取の体重への影響は実験期間を通して有意に高値であった (Fig. 2-2)。すなわち、母マウス高脂肪食が仔マウスの体重に及ぼす影響はライフステージの前半と後半で異なっていた。加齢マウスではすべての群で観察期間中に加齢に伴うと考えられる体重減少が生じたが、体重減少に転じる前の各マウスの最高体重に達した週齢は、母高脂肪食の影響により有意に早まった (Fig. 2-3)。

なお、実験食摂取量から算出したエネルギー摂取量は仔マウス高脂肪食摂取の影響により高値であった。

### 2-3-2. 臓器重量と血清アディポカイン濃度

まず加齢による影響について、内臓脂肪重量（および体重あたりの組織重量）は老齢 CON/CON 群と young 群の間に差は認められなかった。皮下脂肪重量と肩甲骨周囲褐色脂肪重量（および体重あたりの組織重量）は CON/CON 群で有意に高値であった。除脂肪体重の指標としたヒフク筋重量は CON/CON 群が有意に高値であったが、体重あたりの組織重量は CON/CON 群が有意に低値であった。

次に、老齢マウス群間の比較について、母高脂肪食摂取の影響により、内臓脂肪、皮下脂肪、褐色脂肪重量（および体重あたりの組織重量）は有意に低値であった。ヒフク筋重量は母高脂肪食摂取の影響は認められなかった。

一方、仔高脂肪食摂取の影響により、脂脂肪組織重量（内臓、皮下、褐色、および体重あたりの組織重量）とヒフク筋重量は有意に高値であった。体重あたりのヒフク筋重量は仔高脂肪食摂取により有意に低値であった。

血清アディポカイン濃度はレプチンとアディポネクチンを測定した。加齢の影響により、レプチン、アディポネクチンともに老齢 CON/CON 群が young 群に対して有意に高値であった。

老齢マウスにおいて、血清レプチン、アディポネクチン濃度は母マウス高

脂肪食の影響により有意に低下した。一方、仔マウス高脂肪食の影響によりレプチン濃度は有意に高値であった (Table 2-2)。

#### 2-3-3. 血清アディポネクチン濃度と体重減少の関連 (Fig. 2-4)

全老齢マウスのデータを用いた解析において、血清アディポネクチン濃度と体重減少率 (各マウスの解剖時体重/ピーク体重×100) は負の相関を示した ( $r=-0.377$ ,  $P=0.021$ )。

#### 2-3-4. 免疫学的指標 (Table 2-3)

##### ・脾臓細胞増殖反応

加齢の影響について、ConA 刺激に対する脾臓細胞増殖反応は老齢 CON/CON 群において young 群に対して有意に低値であった。抗 CD3/CD28 刺激では低値傾向であった。

老齢マウス群間での検討において、ConA、LPS、抗 CD3/CD28 刺激について、仔マウス高脂肪食摂取の影響により有意に低下した。母マウス高脂肪食摂取の影響はこれらの刺激による増殖反応には認められなかった。また、免疫抗原である OVA 刺激による増殖反応にも本研究の条件下では影響が認められなかった。

##### ・脾臓細胞サイトカイン産生量

加齢の影響について、LPS 刺激による  $\text{TNF}\alpha$  産生は老齢 CON/CON 群が young 群に対して有意に高値であった。老齢マウス群間での検討において、母マウスおよび仔マウスの実験食の違いによる影響は認められなかった。

##### ・OVA 特異的 IgG 抗体価

加齢の影響について、IgG 抗体価は老齢 CON/CON 群は young 群に対して有意に低値、IgE 抗体価は有意に高値であった。

老齢マウス群間での検討において、IgG、IgE 共に仔マウス高脂肪食摂取により低下した。母マウス高脂肪食摂取の影響は認められなかった。

##### ・フローサイトメトリーによる T 細胞サブセットの解析

加齢の影響により、老齢 CON/CON 群は naïve/memory ratio、NK cells 比率が young 群に対して有意に低下した。一方で、regulatory T cells,  $\text{PD-1}^+\text{CD44}^{\text{high}}\text{CD62 L}^{\text{low}}$  (memory phenotype, MP)  $\text{CD4}^+\text{T cells}$  and NKT cells の細

胞比率は CON/CON 群において有意に増加した。

老齢マウスでの検討において、母マウスおよび仔マウス高脂肪食の影響により PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup>T cells 比率は有意に増加、NKT cells 比率は有意に低下した。

新生仔期の検討において (Fig. 2-5)、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>比率は母高脂肪食群が母普通食群に対して有意に低値を示した (P<0.001、Fig. 2-5a)。CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>比率は母高脂肪食群が有意に高値であった (P<0.01、Fig. 2-5b)。CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>比率および CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>比率は母高脂肪食群が有意に低値であった (P<0.01、Fig. 2-5c)。胸腺内 T 細胞分化のプロセスを Fig. 2-5d に示した。

#### 2-3-5. 肝臓の組織学的観察と非アルコール性脂肪肝疾患の評価

各群における肝臓の組織学的観察から得られた所見を解析した。

young 群の肝組織は脂肪滴の蓄積は見られず、正常な肝小葉構造が認められた (Fig. 2-6a)。

加齢の影響により、CON/CON 群の肝組織は脂肪滴の蓄積や肝小葉への炎症性細胞浸潤は認められないものの、軽度の線維の増加が認められた (Fig. 2-6b)。

CON/HF 群では、重度の脂肪滴の蓄積が観察された (Fig. 2-6c)。

HF/CON 群では、脂肪滴蓄積は認めないものの、中程度の肝小葉への炎症細胞の浸潤 (Fig2-6d) と線維化が認められた。HF/HF 群は軽度の脂肪滴蓄積を認め、さらに高度の肝小葉への炎症細胞浸潤と線維化が起っていた (Fig. 2-6e, f)。

#### 2-3-6. NAFLD の評価 (Table 2-4)

非アルコール性脂肪肝疾患の評価は SAF スコアを調整した方法で行った。

仔マウス普通食群 (CON/CON 群、HF/CON 群) は脂肪肝は生じていなかった。しかし HF/CON 群はわずかに肝小葉への免疫細胞浸潤をみとめ、中等度の線維化が起っていた。

仔マウス高脂肪食群 (HF/CON 群、HF/HF 群) において、HF/HF 群は CON/HF 群より脂肪肝が軽度であった。一方で、肝小葉への炎症細胞浸潤と線維化は HF/HF 群が CON/HF 群に対して強く観察された。

## 2-4. 考察

本研究では、妊娠前から授乳期まで高脂肪食を摂取させた母マウスから生まれた仔マウスを老齢期まで飼育して観察し、加齢による変化を解析した。その結果、母マウス高脂肪食摂取の影響により、仔マウスの体重は若齢期では母マウス高脂肪食摂取の影響により、有意に高値を示した。これに対して老齢期では逆に母マウス高脂肪食摂取の影響により低値を示した。また、すべての群においてピーク体重に達した後、加齢が進むに連れて仔マウスの体重は減少した。ピーク体重に達した週齢は母マウス高脂肪食の影響により有意に早期であった。以上のことから、母マウス高脂肪食摂取の影響により、加齢に伴う体重減少が早まり、老化が促進した可能性が示唆された。

70 週齢時の体組成の解析結果において、内臓脂肪の指標として測定した子宮周囲脂肪、皮下脂肪の指標としたそけい部皮下脂肪、ならびに肩甲骨周囲褐色脂肪の各組織重量は、母高脂肪食摂取の影響により有意に低値であった。一方骨格筋量の指標としたヒフク筋重量には母高脂肪食摂取の影響は認められなかった。よって母高脂肪食摂取により仔マウスで観察された加齢による体重減少は、筋肉量の低下ではなく、脂肪量の低下による影響を受けている可能性が考えられた。加齢に伴い脂肪組織の機能が低下する。前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞に分化する過程が障害され、その結果、脂肪細胞が脂肪を蓄える能力が低下し脂肪細胞のサイズが小さくなる[50]。

血清アディポネクチン値は母マウス高脂肪食摂取の影響により低下し、仔マウス高脂肪食摂取の影響でも同様に低下した。また、各マウスのピーク体重から解剖時までの体重減少率と血清アディポネクチン濃度は負の相関を示した。通常、血清アディポネクチン濃度は肥満により低下し、体重減少による脂肪組織量の減少により増加する[58]。また、アディポネクチンは脂肪細胞以外の細胞からも炎症局所において、炎症反応性に産生されることが確認されている[59-61]。百寿者では血中アディポネクチン濃度が高値であると報告がある一方で、65歳以上では死亡率と関連があるとの報告がある。高齢者における血中アディポネクチン濃度の調節機構の変化は血中のアディポネクチンの機能低下または加齢により増加する全身の炎症に反応した結果であると考えられる[62]。先行研究において、母高脂肪食摂取の影響により仔マウスの脂肪組織での炎症性マクロファージ浸潤の

増加や炎症惹起性サイトカイン発現の亢進[63]、また脾臓細胞による炎症性サイトカイン産生の増加が報告されており[64]、母マウス高脂肪食摂取では仔マウスにおいて慢性炎症が増悪していることが推測される。本研究では脂肪重量減少に対するアディポネクチン濃度の上昇および代償性的アディポネクチン値増加が認められず、母高脂肪食摂取により、通常の適応反応が生じていない可能性が示唆された。

免疫機能は加齢により大きく変化する。抗原特異的免疫応答の変調は新規抗原に対する応答性の低下、ワクチン効率の低下および自己免疫疾患の増加に繋がる。また炎症素因の増大は加齢関連疾患の病態に影響すると考えられる。これらの免疫系の加齢変化を「免疫老化」と呼ぶ。加齢による胸腺の退縮により胸腺での新しい T 細胞の分化と末梢への供給が低下する。すなわち新規抗原に対する反応性をもつナイーブ型 ( $CD44^{low}CD62^{high}$ ) T 細胞の供給が低下する。一方で、すでに抗原に感作されたメモリー型 ( $CD44^{high}CD62^{low}$ ) T 細胞は抗原非依存性の恒常性増殖により一定の量が維持されるため、加齢により T 細胞の集団はナイーブ型からメモリー型にシフトする。この T 細胞集団の変化が免疫老化において中心的な役割を果たすと考えられている。本研究では「免疫老化」を評価するため、抗原特異的免疫応答、T 細胞表面抗原の変化を評価した。OVA 特異的 IgG, IgE 産生においては、加齢による変化は認められたものの、母高脂肪食摂取による影響は認めなかった。OVA 刺激に対するリンパ球幼若化反応においても、本研究では母高脂肪食摂取による影響は認められなかった。一方で、フローサイトメトリー法による T 細胞の表面抗原解析の結果、ナイーブ/メモリー比率は有意に低下、また加齢関連 T 細胞として加齢による増加が報告されている  $PD-1^{+}MP\ CD4^{+}T$  細胞比率が加齢により有意に高値を示した。さらに、 $PD-1^{+}MP\ CD4^{+}T$  細胞比率は母高脂肪食摂取の影響により有意に増加した。 $PD-1^{+}MP\ CD4^{+}T$  細胞は加齢により増加し、TCR 刺激に対する増殖反応を示さないこと、強力な炎症性サイトカインであるオステオポンチンを大量に分泌することから、獲得免疫機能の低下および炎症素因の増大という免疫老化の現象と符合し、免疫老化に重要な役割を果たす細胞であることが提唱されている。加えて、 $PD-1^{+}MP\ CD4^{+}T$  細胞は加齢のみならず、食餌誘導性肥満マウスの内臓脂肪組織中に増加する。 $PD-1^{+}MP\ CD4^{+}T$  細胞の増殖に直接影響する因子は同定されていない

が、肥満した内臓脂肪組織の環境が PD-1<sup>+</sup>MP CD4<sup>+</sup>T 細胞を増加させることが推測されている [65]。本研究では、母マウス高脂肪食摂取の影響により PD-1<sup>+</sup>MP CD4<sup>+</sup>T 細胞比率が増加したことから、母マウス高脂肪食摂取は仔マウスの脂肪組織の加齢変化を引き起こし、「免疫老化」を促進した可能性が推測された。

肝臓の組織学的観察において、HF/HF 群では単純脂肪肝より NAFLD が進んだ状態である脂肪肝炎が観察された。それに対して、CON/HF 群は重度の脂肪肝を認めたものの、炎症や線維化は生じていなかった。すなわち、周産期だけでなく離乳後も高脂肪食を摂取することにより脂肪肝炎が増悪した。これまでも母高脂肪食摂取の影響により仔マウスの肥満や脂肪肝が増悪することが報告されている。メカニズムとしてミトコンドリアの機能低下による脂肪異化の低下 [54] や脂肪合成遺伝子発現の変化 [56] が報告されているが、これらだけでは HF/HF 群での炎症や線維化の増悪は説明されない。肝臓では自然免疫系が恒常性維持、肝細胞の再生に役割を果たしている。NKT 細胞は様々な生理活性を有し、状況に応じて迅速かつ大量のサイトカインを産生して免疫応答を調節する。健康な肝臓では NKT 細胞は肝臓類洞に存在し、肝臓の恒常性維持に役割を果たす [66]。ヒト NAFLD において、脂肪肝では NKT 細胞の数が減少すること、NASH の生検組織では脂肪肝の程度が増すと NKT 細胞数が低下することが報告されている [67] [68]。またヒト NAFLD において、末梢と肝実質の NKT 細胞出現頻度には関連があることが報告されている。本研究では NKT 細胞数は母高脂肪食摂取および仔高脂肪食摂取の影響により有意に低下していた。以上のことから、母高脂肪食摂取は自然免疫系による肝臓の恒常性維持機能を変化させ、そのことが肝臓における炎症や線維化をもたらす原因となったと推測している。

また、老齢期における脾臓 T 細胞サブセットの変化の機序を検討するため、老齢マウスの母マウスと同じ飼育条件で飼育した母マウスから生まれた仔マウスについて、新生仔期における胸腺の発達を検討した。出生日 (day0)、3 日齢 (day3)、7 日齢 (day7) で解析したところ、胸腺の発達段階である CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (double negative, DN) ⇒ CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (double positive, DP) ⇒ CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> または CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (single positive, SP) の分化段階において母高脂肪食摂取の仔マウスと母普通食摂取の仔マウスの群間に有意な差が認められた (母高脂肪食摂取群の仔マウスにおいて DP 細胞比率が増加、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> および CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> 細胞比率の

低下、Fig. 2-5)。我々の研究室の先行研究において、母マウス高脂肪食摂取により仔マウスの胸腺皮質厚が低下したことを報告している。胸腺皮質は皮質内上皮細胞が密な網の目構造を形成している。T 細胞の分化・増殖は皮質外層の被膜下上皮細胞で始まり、成熟に伴い皮質深部に移動する[69]。以上のことから母高脂肪食摂取は新生仔マウスの胸腺の発達段階に影響し、胸腺内に移行する細胞を増加させるが、MHC 分子を認識しない、自己抗原を認識してしまうなどの正常に機能しない細胞を増加させ、 $CD4^+CD8^-$ および  $CD4^-CD8^+$ 細胞への分化を妨げることが推測された。また、10 週齢の解析において、母高脂肪食摂取群では 2 次リンパ節である脾臓において  $CD4^+CD8^-$ および  $CD4^-CD8^+$ 細胞比率の低下を確認しており（未発表データ）、母高脂肪食による T 細胞分化の変化は成長後まで引き継がれていた。本研究の加齢マウスの解析において、Treg 細胞や加齢関連 T 細胞、NKT 細胞の比率に変化が認められた。先行研究でも加齢による免疫機能の変化は T 細胞の機能変化に依るところが大きいと示唆されている。母マウス高脂肪食摂取は、一次リンパ節である胸腺の発達を変化させ、胸腺内での T 細胞の分化に影響し、脂肪組織や肝臓における加齢変化を促進した可能性があり、さらに詳細な機序の検討が必要である。

本研究から、母マウス高脂肪食摂取は仔マウスにおける脂肪組織の加齢経過を促進し、加齢関連 T 細胞を増加させ、さらに肝臓における非アルコール性脂肪肝疾患を増悪させることが示された。これらの代謝系と免疫系の変化は相互に関連することが推測される。今後は仔マウスを時間経過を追って観察し、母マウス高脂肪食摂取が仔マウスの脂肪組織および免疫機能の加齢変化に及ぼす影響を解析する必要がある。

	Control diet (CON)		High fat diet (HF)	
	gram%	kcal%	gram%	kcal%
Protein	20	20	26	20
Carbohydrate	64	64	30	23
Fat	7	<b>16</b>	32	<b>56</b>
Total		100		100
kcal/gram	4		5.2	
<b>Ingredient</b>	<b>gram</b>	<b>kcal</b>	<b>gram</b>	<b>kcal</b>
Casein	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12
Corn Starch	397.486	1590	0	0
Maltodextrin 10	132	528	124.5	498
sucrose	100	400	100	400
cellulose	50	0	50	0
Soybean oil	70	630	70	630
Lard	0	0	180	1620
t-Butylhydroquinone	0.014	0	0.014	0
AIN-93G Mineral mix	35	0	35	0
AIN-93 Vitamin mix	10	40	10	40
Choline Bitartrate	2.5	0	2.5	0
Total	1000	4000	775.014	4000

Table 2-1 Composition of experimental diet

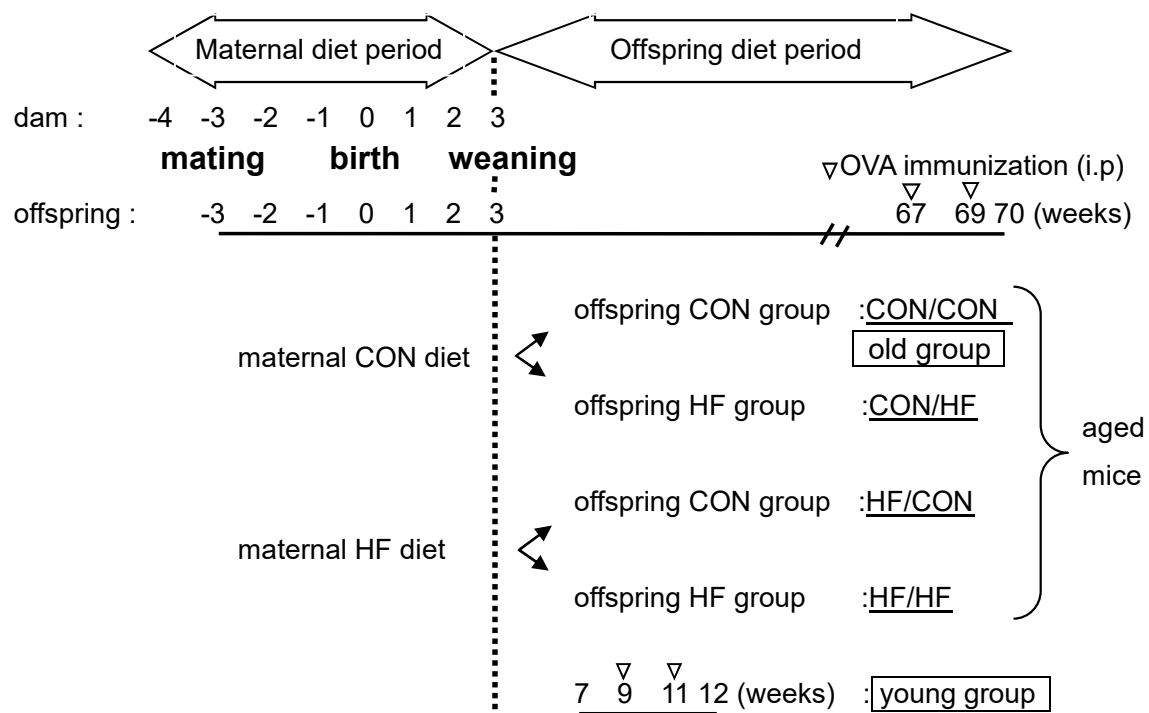


Fig. 2-1 Experimental design

Mice were fed either a control (CON) or high-fat (HF) diet. The number of mice in each group was as follows; CON/CON (n=8), CON/HF (n=9), HF/CON (n=9), and HF/HF (n=11). OVA, ovalbumin.

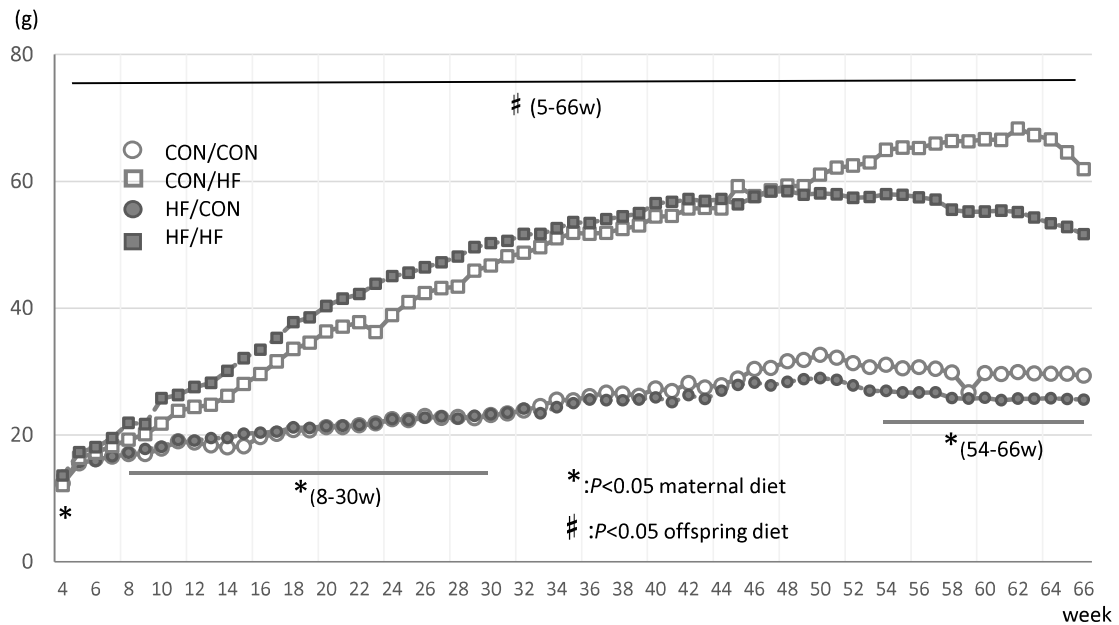


Fig.2-2 Time course of body weight changes

The body weights were significantly higher in the maternal HF groups (HF/CON, HF/HF) than the maternal CON groups (CON/CON, CON/HF) when the mice were of 8 to 30 weeks of age. However, from 54 to 66 weeks, the body weights of the maternal HF groups were significantly lower than those of the maternal CON groups. The body weights were significantly higher in the offspring HF groups than in the offspring CON groups at these points. The data are presented as the mean  $\pm$  S.E. CON, control; HF, high-fat. The number of mice in each group was as follows; CON/CON (n=8), CON/HF (n=9), HF/CON (n=9), and HF/HF (n=11).

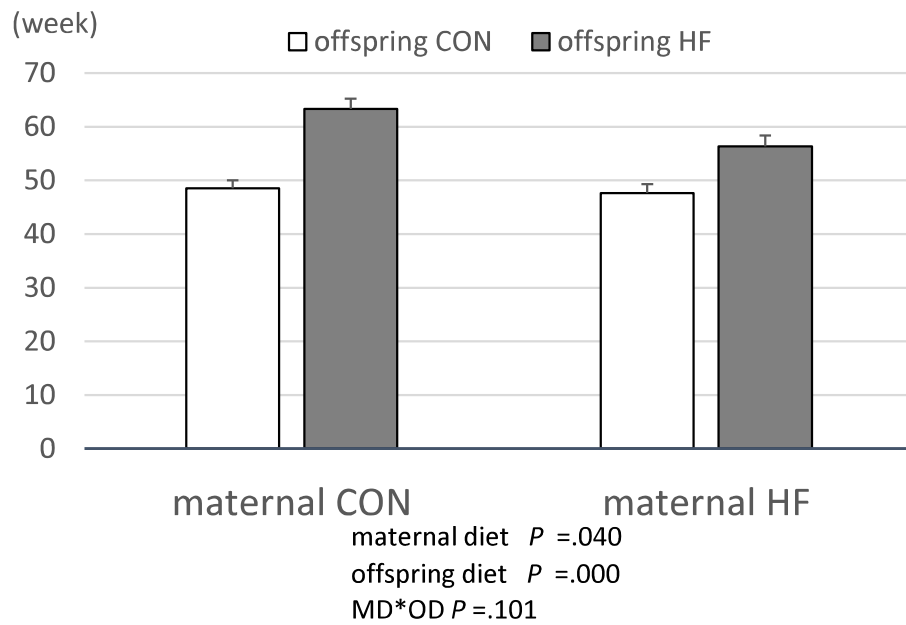


Fig.2-3 Week when maximum body weight was reached

The week of when the maximum body weight was achieved for each mouse was earlier in the maternal HF groups than the maternal CON groups. CON, control; HF, high-fat. The number of mice in each group was as follows; CON/CON (n=8), CON/HF (n=9), HF/CON (n=9), and HF/HF (n=11).

	young (12weeks)	old(70weeks)				Statistic			
		maternal CON		maternal HF		young vs old (CON/CON)	maternal diet	offspring diet	MD*OD
		offspring CON CON/CON	offspring HF CON/HF	offspring CON HF/CON	offspring HF HF/HF				
body weight(g)	19.4 ± 0.32	27.2 ± 0.66 <sup>a</sup>	58.2 ± 2.65 <sup>b</sup>	23.8 ± 0.44 <sup>a</sup>	40.0 ± 3.97 <sup>c</sup>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.010</b>
visceral fat pad (mg)	45 ± 6	290 ± 44 <sup>a</sup>	2163 ± 111 <sup>b</sup>	122 ± 15 <sup>a</sup>	854 ± 168 <sup>c</sup>	0.105	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>
visceral fat pad /BW(mg)	2.3 ± 0.28	7.9 ± 2.12 <sup>a</sup>	35.1 ± 1.55 <sup>b</sup>	5.1 ± 0.64 <sup>a</sup>	19.2 ± 2.46 <sup>c</sup>	0.105	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.008</b>
subcutaneous fat pad (mg)	72 ± 5	269 ± 26 <sup>a</sup>	1280 ± 131 <sup>b</sup>	133 ± 11 <sup>a</sup>	563 ± 186 <sup>c</sup>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.032</b>
subcutaneous fat pad/BW(mg)	3.7 ± 0.27	9.9 ± 0.84	21.5 ± 1.87	5.6 ± 0.43	12.0 ± 2.25	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.130
brown adipose tissue (mg)	54 ± 6	121 ± 7	433 ± 52	76 ± 6	258 ± 72	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.037</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.204
brown adipose tissue/BW(mg)	2.8 ± 0.27	4.4 ± 0.21	7.4 ± 0.75	3.2 ± 0.21	5.7 ± 0.86	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.032</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.783
Gastrocnemius (mg)	117 ± 3	133 ± 4	149 ± 10	130 ± 3	152 ± 7	<b>&lt;0.001</b>	0.996	<b>0.006</b>	0.607
Gastrocnemius /BW(mg)	6.0 ± 0.16	4.9 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.13 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.09 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.30 <sup>c</sup>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.027</b>
serum adiponectin (µg/mL)	6.4 ± 1.13	14.7 ± 1.74	16.5 ± 2.27	12.2 ± 1.12	11.8 ± 1.40	<b>0.001</b>	<b>0.039</b>	0.673	0.493
serum leptin (ng/mL)	0.58 ± 0.05	5.00 ± 0.72 <sup>a</sup>	30.40 ± 3.43 <sup>b</sup>	1.51 ± 0.30 <sup>a</sup>	10.57 ± 4.38 <sup>c</sup>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.014</b>

Table 2-2 Body weight, organ weight, body composition, and serum adipokines

CON, control diet; HF,high fat diet; MD,maternal diet; OD, offspring diet.

Values with different superscript are significantly different.

The number of mice in each group was as follows; CON/CON (n=8), CON/HF (n=9), HF/CON (n=9), and HF/HF (n=11).

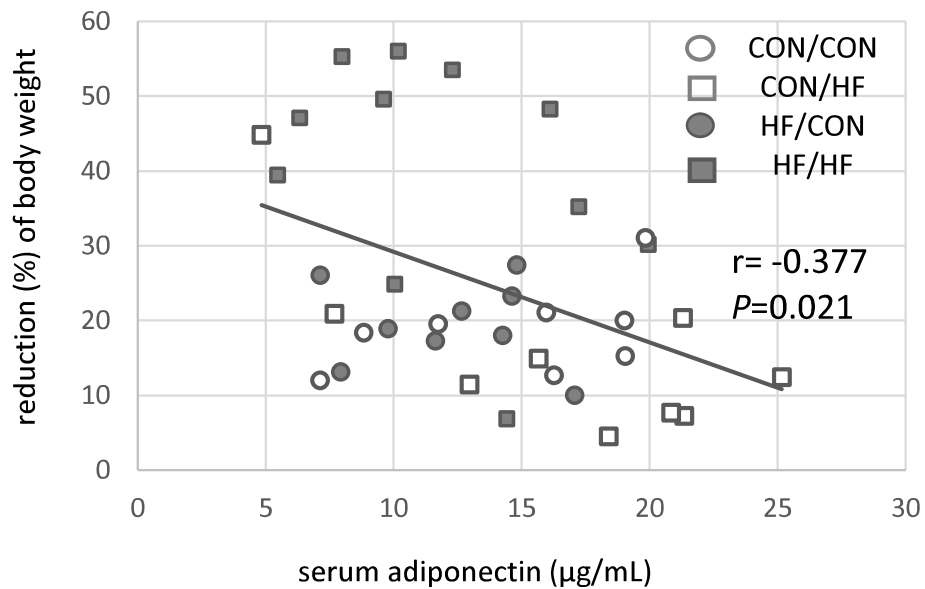


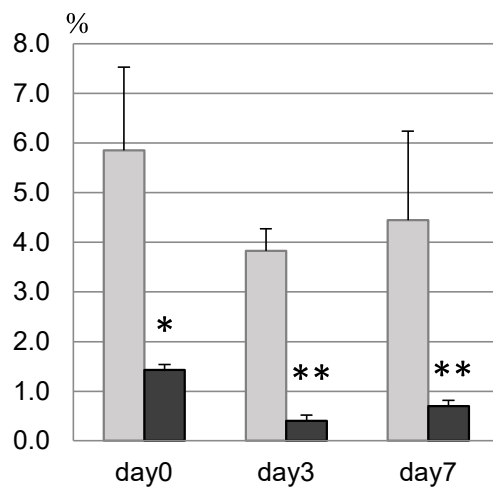
Fig.2-4 Correlation between serum adiponectin levels and body weight reductions.

The body weight reductions, which were calculated by subtracting the weight at sacrifice from the maximum weight of each mouse. According to the regression analysis using data from all aged mice, serum adiponectin levels were negatively correlated with the body weight reductions. CON, control; HF, high-fat. The number of mice in each group was as follows; CON/CON (n=8), CON/HF (n=9), HF/CON (n=9), and HF/HF (n=11).

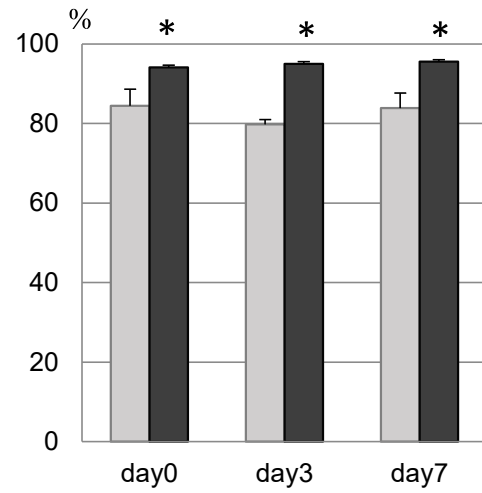
	young 12weeks	old(70weeks)				Statistic			
		maternal CON		maternal HF		young vs old (CON/CON)	maternal diet	offspring diet	MD*OD
		offspring CON CON/CON	offspring HF CON/HF	offspring CON HF/CON	offspring HF HF/HF				
<i>Splenocytes proliferation</i>									
ConA	0.990 ± 0.120	0.582 ± 0.106	0.360 ± 0.065	0.743 ± 0.093	0.278 ± 0.055	<b>0.023</b>	0.618	<b>&lt;0.001</b>	0.134
LPS	1.055 ± 0.154	0.719 ± 0.143	0.555 ± 0.097	0.835 ± 0.119	0.450 ± 0.074	0.132	0.960	<b>0.015</b>	0.310
anti-CD3/CD28	1.026 ± 0.127	0.680 ± 0.121	0.360 ± 0.061	0.694 ± 0.091	0.195 ± 0.046	0.069	0.352	<b>&lt;0.001</b>	0.270
OVA	0.367 ± 0.140	0.199 ± 0.079	0.331 ± 0.052	0.223 ± 0.052	0.226 ± 0.083	0.291	0.567	0.338	0.360
<i>Cytokine secretion by splenocytes (by LPS stimulation)</i>									
TNF- α (pg/mL)	56.2 ± 12.1	109.0 ± 12.8	113.7 ± 15.7	127.7 ± 11.3	130.8 ± 22.2	<b>0.010</b>	0.458	0.645	0.860
<i>OVA- specific antibody titer</i>									
IgG	1.038 ± 0.058	0.781 ± 0.062	0.402 ± 0.109	0.882 ± 0.114	0.350 ± 0.064	<b>0.009</b>	0.788	<b>&lt;0.001</b>	0.399
IgE	0.009 ± 0.002	0.076 ± 0.024	0.028 ± 0.010	0.049 ± 0.014	0.026 ± 0.009	<b>0.015</b>	0.325	<b>0.018</b>	0.369
<i>Flowcytometry analysis of splenic lymphocytes</i>									
T cell (%)	22.6 ± 1.05	12.8 ± 0.79	12.7 ± 1.03	12.3 ± 0.69	14.0 ± 1.58	<b>&lt;0.001</b>	0.710	0.485	0.860
CD4/CD8	1.11 ± 0.02	1.34 ± 0.18	1.05 ± 0.14	1.11 ± 0.10	1.26 ± 0.16	0.377	0.929	0.663	0.191
Naïve/Memory	1.35 ± 0.11	0.17 ± 0.05	0.08 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.07 ± 0.02	<b>&lt;0.001</b>	0.730	<b>&lt;0.001</b>	0.389
regulatory T cell	10.07 ± 0.59	13.87 ± 1.44	15.66 ± 1.95	14.40 ± 0.90	18.15 ± 2.76	<b>0.029</b>	0.481	0.201	0.647
PD-1 <sup>+</sup> MP CD4 <sup>+</sup> T cell	32.3 ± 3.40	66.7 ± 3.23	74.2 ± 3.91	77.0 ± 1.96	82.6 ± 2.87	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.041</b>	<b>0.005</b>	0.749
NK cell (%)	1.74 ± 0.11	1.32 ± 0.14	2.14 ± 0.25	1.24 ± 0.09	2.11 ± 0.20	<b>0.032</b>	0.764	<b>&lt;0.001</b>	0.888
NKT cell (%)	0.84 ± 0.04	1.47 ± 0.15	0.90 ± 0.14	0.91 ± 0.08	0.88 ± 0.14	<b>0.003</b>	<b>0.042</b>	<b>0.033</b>	0.050

Table 2-3 Immunological parameters

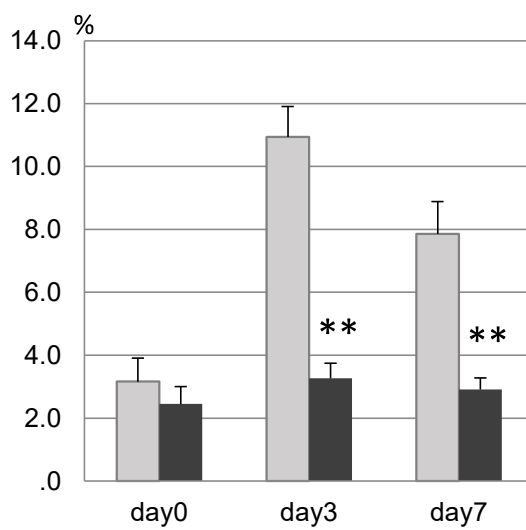
CON, control diet; HF, high fat diet; MD, maternal diet; OD, offspring diet; SI, stimulation index; OD, optical density; MP, memory phenotype  
The number of mice in each group was as follows; CON/CON (n=8), CON/HF (n=9), HF/CON (n=9), and HF/HF (n=11).



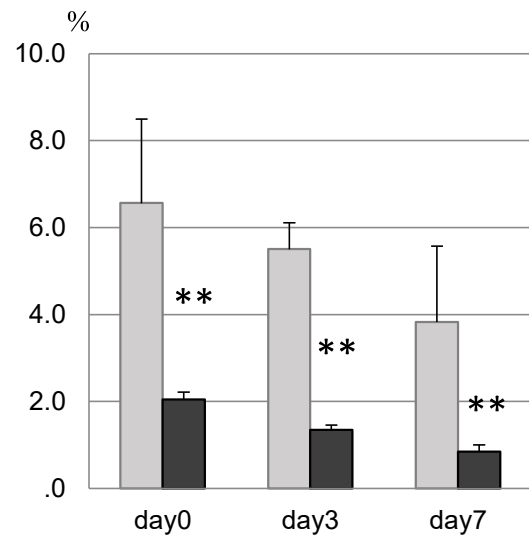
a. CD4-CD8-



b. CD4+CD8+



c. CD4-CD8+



CD4+CD8-

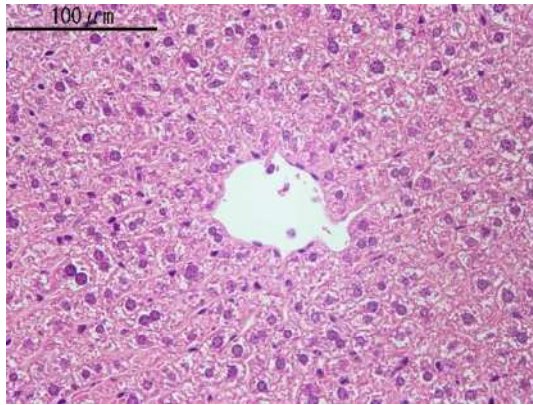
■ CON  
■ HF

Fig.2-5 Flowcytometry analysis of thymocytes of newborn

\*:  $P < 0.05$

\*\* :  $P < 0.01$

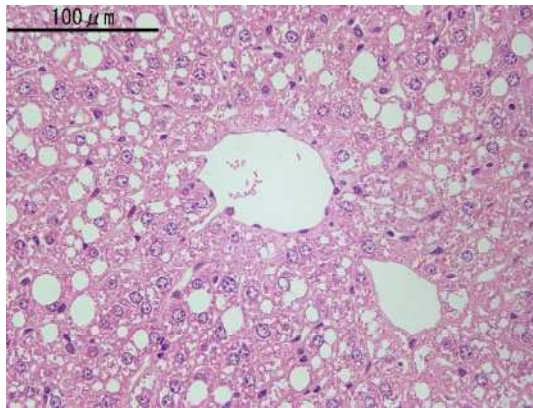
a.



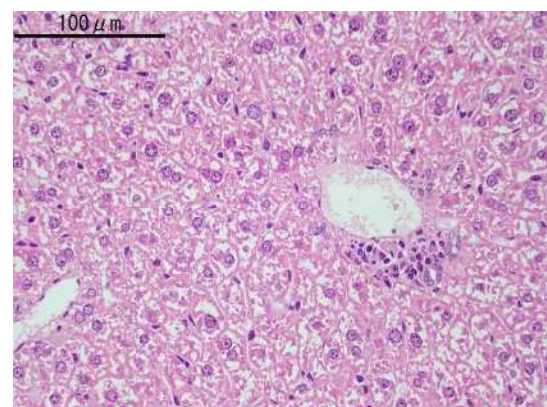
b.



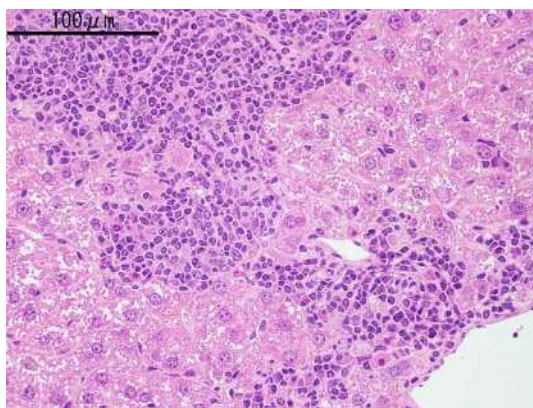
c.



d.



e.



f.

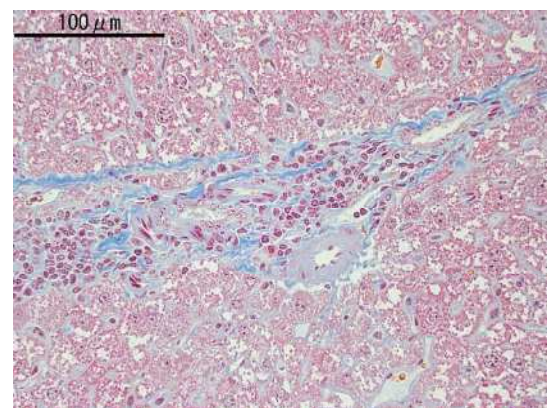


Fig. 2-6 Histological analysis (a-f) of offspring livers.

- a. Young group, hematoxylin-eosin (HE) staining      b. CON/CON group, HE staining  
c. CON/HF group showing severe steatosis, HE staining  
d. HF/CON group showing little steatosis but lobular inflammation, HE staining  
e. HF/HF group showing severe lobular inflammation, HE staining  
f. HF/HF group showing severe fibrosis, Masson trichrome staining

	Steatosis (0-3)	Lobular Inflammation (0-3)	Fibrosis (0-4)
CON/CON (old)	0	0	1
CON/HF	3	1	2
HF/CON	0	1	2
HF/HF	2	3	3
young	0	0	0

Table 2-4 Accesment of liver morphology  
Modified SAF score was used. For each group(n=4),  
the mean score for each characteristic is given.

## 第3章：母体の自己抗原の経口摂取が仔マウスの自己免疫疾患の病態に及ぼす影響 [研究4]

### 3-1. 緒言

関節リウマチ（rheumatoid arthritis, RA）は原因が不明の多発性関節炎を主徴とする進行性かつ炎症性の疾患である。関節滑膜に病変の主座があると考えられ、滑膜の増殖から次第に周囲の軟骨・骨が侵され、関節の破壊と変形に至ることが多い。RAの最初の炎症は関節滑膜を中心に始まると考えられている。初期のRAの病理変化として、滑膜の増殖、T細胞を主体としたリンパ球浸潤とともに、血管内腔の閉塞、内皮細胞間隙の出現など微小血管系の損傷がある。完成されたRAでは、滑膜の増殖とCD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T細胞を主体とし、さらにCD8<sup>+</sup>T細胞、B細胞などを含むリンパ球浸潤が特徴的な病理変化である[70]。

RAの発症には遺伝要因に加えて環境要因が関与する。遺伝的要因が関与する根拠としてRAの多発家系が存在することや、一卵性双生児におけるRA発症の一致率が二卵性双生児に対して高いことなどが上げられる。しかしながら、一卵性双生児においてもRA発症の一致率は12～32%程度であり、遺伝要因だけでなく、環境要因が発症に強く関与することが推測される。環境要因としていくつかの微生物が候補に上げられているが、現在のところ確実なものはない。強い心理的ストレスや感染を契機にRAが発症することもある。

一方、RAに対する治療は抗リウマチ薬や生物学的製剤が用いられ、炎症や痛みを抑えるだけでなく、病態の進行を食い止めて関節の破壊を防ぐ治療が開発され、患者の生活の質（QOL）改善を目指す治療が出来るようになってきた[71]。しかしながら、関節リウマチの根本原因は未解明であり、根治的な治療法が確立していない。また、これらの新しい治療法の問題点として、副作用や医療費の増大がある。

より生理的な治療法として注目されるのが経口免疫寛容療法である[72]。経口免疫寛容とは、経口摂取した抗原、すなわち粘膜面から取り込んだ抗原に対して抗原特異的免疫応答が抑制される現象である。人体にとって異物である食物に対して過剰な免疫応答を起こさないための仕組みであると考えられている。特に食物アレルギーの治療においては減感作療法としてアレルギー症状が出ない程度の少量の抗原の経口摂取を繰り返すことで、その抗原に対する免疫寛容を誘導することを目

的に、経口免疫寛容のしくみが臨床治療に応用されている[73]。関節リウマチは滑膜の増殖、T細胞を主体としたリンパ球浸潤から始まる疾患であり、自己の関節成分に対して自己免疫応答が生じ、炎症反応が引き起こされる。そこで関節成分の一つであるタイプ II コラーゲンを経口摂取することにより、免疫寛容を誘導し、関節炎を抑制する治療法が試みられている[74]。

RA は遺伝要因が発症に関与することから、妊娠・出産に際し、患者は子供が RA を発症することに対して不安を持つことが少なくない。そこで、胎児期や生後早期の環境調節による予防法を探索するための実験的試みとして、自己抗原であるタイプ II コラーゲンを母マウスに経口投与し、その後、出生仔マウスに誘導したコラーゲン誘導性関節炎の病態に及ぼす影響を検討した。

## **3-2. 対象と方法**

### **3-2-1. 実験動物および実験プロトコル**

母マウスとして4週齢のDBA/1Jマウス（三協ラボサービス㈱）を用い、さらにこのマウスの交配から生まれた仔マウスを実験に用いた。マウスは固形試料MF（普通食、オリエンタル酵母㈱）と蒸留水を自由摂取させ、1週間の馴化飼育後に実験に用いた。

母マウス6～8週齢において、タイプIIコラーゲン（CII、Elastin Product CO.）溶液、または酢酸溶液（acetic acid；AA）を経口投与した。8週齢で同系雄マウスと交配し、仔マウスは離乳まで出産した母マウスと同ケージで飼育して授乳させた。仔マウス3週齢で離乳し、解剖までMFと蒸留水を自由摂取させた。仔マウスが6週齢のときに、母マウスがCIIを経口投与を受けた群から生まれた仔マウスとAAを経口投与から生まれた仔マウスをそれぞれ2群に分け、CIIまたはAAを経口投与した。8および11週齢でCII免疫し、コラーゲン誘導性関節炎（CIA）を誘導した。病態の推移を観察し、13週齢で解剖した。群分けと実験プロトコルをFig.3-1に示した。

### **3-2-2. 経口免疫寛容の誘導**

自己抗原としてタイプIIコラーゲン（CII, 100 $\mu$ L (600 $\mu$ g/mL) in 0.024M acetic acid solution) を母マウスには6週齢より14日間、仔マウスには授乳期間終了後に6週齢から10日間連続で経口投与した。経口投与にはマウス用経口ゾンデ（㈱夏目製作所）を用いた。

### **3-2-3. 免疫方法（コラーゲン誘導性関節炎の誘導）**

仔マウスはすべての群にコラーゲン誘導性関節炎（CIA）を誘導した。CII 50mL（2mg/mL in AA solution）と等量の完全フロイントアジュバント（Difco）と混合してオイルエマルジョンとし、尾根部に100 $\mu$ L皮下免疫した。初回免疫3週間後に初回と同様に追加免疫を行って関節炎を誘導した。

### **3-2-4. 関節腫脹度の測定**

2回のCII免疫により関節炎を誘導した後、経時的に足関節厚を測定した。両

側の後足関節厚をダイヤルシクネスゲージ（モデル-G、Peacock）を用いて2回測定し、平均値を足関節厚とした。以下の計算式より関節腫脹度を求めた。

関節腫脹度＝免疫後の足関節厚／免疫前の足関節厚

### 3-2-5. フン抽出液の作成

解剖直前に排泄直後のフンを3～6個採取し、計量済みのチューブに入れ、1時間真空乾燥させた。重量を測定し、Protease inhibitor 入り PBS (Complete protease inhibitor cocktail, Roche Diagnostics Corp.) を定量加え、激しくボルテックスにて混和した。4° C、6000rpm で15分間遠心し、上清を回収してフン抽出液とした[75]。測定まで-30° Cで保存した。

### 3-2-6. 脾臓細胞および腸管パイエル板細胞の調整と培養方法

解剖時に無菌的に取り出した脾臓およびパイエル板の細胞を分離し、牛胎児血清（FCS）10%添加 RPMI1640 培地（日水製薬㈱）に浮遊した。細胞濃度は $1 \times 10^7$  個/ml に調整した。24 穴平底マルチウェルプレート（Falcon）に細胞浮遊液 500μL（細胞数  $5 \times 10^6$  個/well）と CII 溶液 500μL（100μg/mL）を混合して 37° C、5 %CO<sub>2</sub> 環境下で 48 時間培養した。培養上清を回収し、サイトカイン産生量の測定まで-30° Cで凍結保存した。

### 3-2-7. サイトカイン産生量の測定

脾臓およびパイエル板細胞の培養上清中のサイトカイン産生量を ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法により測定した。IL-2 の測定には Mini-Kit (ENDOGEN)、IL-10 の測定には DuoSet ELISA Development System (R&D Systems) を使用した。

### 3-2-8. 抗原特異的抗体価の測定

96 穴マルチウェルプレート（for ELISA、住友ベークライト㈱）に CII（10 μg/ml, 50 μl/well in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> buffer, pH 9.5）を固相化した（4° C、over night）。ブロッキング液として 3% skim milk in PBS（300 μl）を用い1時間反応後、血清（1:50 dilution）またはフン抽出液（1:16 dilution）100 μL

を加えて室温で 90 分間反応させた。検出抗体としてビオチン化 goat anti-mouse IgG (1:2000 dilution; Zymed)、またはビオチン化 goat anti-IgA (1:2000 dilution; Sigma)、streptavidin-HRP (1:4000 dilution; Dako)、発色基質として o-phenylene diamine solution (Sigma, 50 $\mu$ L/well, in a sodium-citrate buffer (pH 5.0), 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を加え、遮光下で反応させた。反応停止には 2N HCl (50  $\mu$ l)を用いた。吸光度は 492 nm で測定した。CII 特異的抗体価は CII を固相化したウェルの吸光度から固相化していないウェルの吸光度を引いて求めた。

### 3-2-9. 統計解析手法

データは平均値 $\pm$  標準誤差で示した。統計解析には IBM SPSS 22 (日本 IBM ㈱)を用いた。母 CII 経口投与と出生後 CII 経口投与の 2 要因の主効果を二元配置分散分析により解析した。交互作用が有意であった項目について、単純主効果の検定を行った。危険率 5 %未満を統計学的有意とした。

### **3-3. 結果**

#### **3-3-1. 関節腫脹度の推移**

追加免疫後、関節炎病態の指標として後足関節厚を測定し、関節腫脹度を求めた。追加免疫後の足関節厚の経時推移を Fig. 3-2 に示した。追加免疫後に足関節の腫脹が観察され、CIA の誘導が確認された。

追加免疫 14 日後の足関節腫脹度は母 CII 経口投与の影響により、有意に低値であった ( $P=0.012$ )。出生後 CII 経口投与の影響によっても同様に有意に低下した ( $P=0.042$ )。特に母および出生後の両方に経口投与した CII-CII 群は 4 群のなかで関節腫脹度が最も低値であった (Fig. 3-3)。

#### **3-3-2. 脾臓細胞のサイトカイン産生量**

脾臓細胞の CII 刺激に対する IL-2 産生量は、母 CII 経口投与の影響により有意に高値であった ( $P=0.009$ )。出生後 CII 経口投与の影響により低値を示したが、統計学的有意差は認められなかった (Fig. 3-4)。

IL-4、IL-10 産生量には母および出生後の CII 経口投与の影響は認められなかった。

#### **3-3-3. 腸管免疫機能**

パイエル板細胞の CII 刺激に対する IL-10 産生量は CII-CII 群が他の 3 群に対して有意に高値であった ( $P<0.001$ 、Fig. 3-5)。

腸管関連リンパ組織からの IgA 分泌の指標としたフン抽出液中 CII 特異的 IgA 抗体価は母 CII 経口投与により有意に低値を示した ( $P=0.026$ )。一方、出生後 CII 経口投与により低値を示したが、統計学的有意差は認められなかった (Fig. 3-6)。

### 3-4. 考察

本章では RA の病態モデルである CIA において、母マウスに対する自己抗原 CII による経口投与が、出生仔マウスの CIA 病態に及ぼす影響を検討した。CIA の病態評価は足関節腫脹の程度で評価した。その結果、仔マウスの足関節腫脹は母マウスへの CII 経口投与の影響により、有意に軽度であった。出生後の仔マウスにも CII 経口投与することで足関節腫脹はさらに軽減された。また、腸管パイエル板細胞の CII 刺激による IL-10 産生量は母マウスおよび仔マウスの両方に CII を経口投与した CII-CII 群において有意に高値であった。IL-10 は抑制性サイトカインであり、主に制御性 T 細胞 (Treg) から産生され、自己免疫応答に対する免疫寛容に重要な役割を果たすと考えられている。以上の結果より、母マウスへの経口投与は仔マウスにおける経口投与による経口免疫寛容の誘導を促進する可能性が示唆された。

経口免疫寛容の成立機序には主に 3 つの経路があると報告されている [72]。少量の抗原の頻回摂取による制御性 T 細胞 (Treg) による能動的抑制、大量の抗原摂取によるヘルパー T 細胞の低応答化やクローンの消失である。ヒト RA では原因となる自己抗原が特定されていないが、炎症はまず関節滑膜に対して起こる。Treg による能動的抑制では、炎症局所で Treg が抗原を認識し、炎症性サイトカインである IL-10 や TGF- $\beta$  を産生する [76]。この場合、Treg が認識する抗原は必ずしも疾患の原因となっている抗原ではなくても、関節滑膜周辺で Treg が作用すれば炎症が抑制される。よって、自己免疫疾患に対する経口免疫寛容療法においては特定の抗原に対する低応答化やクローンの消失よりも Treg による能動的抑制の誘導が重要である。本研究では腸管関連リンパ組織のパイエル板細胞において、母への自己抗原の経口投与により CII 刺激に対する IL-10 の産生が有意に高値であり、能動的抑制機構が誘導されたことが示唆された。

本研究では腸管関連リンパ組織の IgA 分泌量の指標としてフン抽出液中 CII 特異的 IgA 抗体価を測定した。その結果、CII 特異的 IgA 抗体価は母 CII 経口投与により有意に低値であった。特定の抗原に対する経口免疫寛容が誘導されると、その抗原に対する全身性の免疫応答が抑制され、一方で粘膜関連リンパ組織においてはその抗原を排除するための抗原特異的 IgA 抗体の分泌が亢進する [77]。しかしながら本研究では逆に母 CII 経口投与により CII 特異的 IgA 抗体価が低下した。CIA 誘導のために CII を皮下投与すると、腸管関連リンパ組織において胚中心反応が亢

進し、胚中心 B 細胞が増加すると報告されている。本研究では母 CII 経口投与の影響により CII に対する抗原特異的応答性が抑制され、その結果、CII 特異的 IgA 産生も低下し、足関節腫脹が抑制された可能性がある。

最後に、母マウスに対する経口投与が仔マウスの CIA の脚関節腫脹を抑制した機序について考察する。母マウスに対する自己抗原の経口投与について検討した報告は見られないが、食物アレルギーのアレルゲンとなる食事性蛋白を母ラットに経口摂取させることで、仔に誘導した実験的食物アレルギーが抑制されたという報告がある[78]。経口摂取されたタンパク質はほとんどが消化されるが、10 万分の 1 程度は未消化の形で吸収されると考えられている。その経路としてパイエル板表面の M 細胞によるトランスサイトーシスがある。これは消化を免れた蛋白抗原の積極的な取り込み機構であり、M 細胞直下の腸管免疫系により認識されて経口免疫寛容が惹起される。パイエル板 M 細胞には IgA 受容体が発現しており、IgA と抗原成分の免疫複合体 (Immunocomplex: IC) IgA-IC を効率よく取り込むこと、IC として取り込まれた抗原は M 細胞下の樹状細胞やリンパ球に提示されることで免疫寛容の誘導が亢進することが報告されている[79]。本研究では母乳の解析は行っていないが、前述のアレルゲンとなる食事性蛋白の母ラットへの経口投与では、母乳中に食事性蛋白の成分と IgA の IgA-IC が分泌され、仔での経口免疫寛容誘導に寄与したと報告されている。

胎生期や生後早期の環境を受けてプライミングされた免疫応答性は成長後も維持されることが示唆されている。最近、生後に食物抗原に曝される時期が遅いほど、その食物抗原に対する食物アレルギーが起りやすいことが報告された[80, 81]。本研究では仔マウスへの経口投与に加えて、母マウスにも経口投与した群で最も関節腫脹が軽度であった。生後早期の母乳を介した抗原曝露が免疫寛容獲得に有効に働いた可能性がある。RA の発症のピークは女性で 35 歳から 55 歳、男性で 40 歳から 60 歳であり[70]、生後早期に発症する食物アレルギーとは発症時期が異なるが、本研究は仔マウスが 8 および 11 週齢時に免疫して CIA を誘導しており、母乳を介して獲得した免疫寛容はある程度継続することが推測された。

以上の結果より、自己免疫疾患である RA の病態モデルである CIA において、母マウスへの自己抗原の経口投与が仔マウスの CIA 病態を軽減する可能性が示唆された。またその機序として、腸管免疫系の応答の変化が関節局所の免疫応答の抑

制に関与した可能性が示唆される。今回得られた結果の機序をさらに検討し、RAの予防法として応用が可能であるか検討する必要がある。

A.

母マウス	仔マウス	
CII 経口投与群(CII 群)	CII 経口投与群(CII 群)	CII-CII 群
	AA 経口投与群(AA 群)	CII-AA 群
AA 経口投与群(AA 群)	CII 経口投与群(CII 群)	AA-CII 群
	AA 経口投与群(AA 群)	AA-AA 群

CII: タイプ II コラーゲン、AA: 酢酸

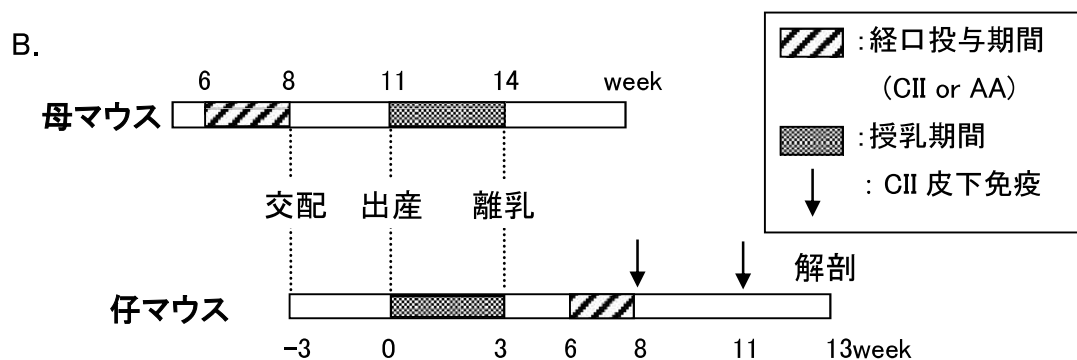


Fig.3-1 群分け(A)と実験プロトコール(B)

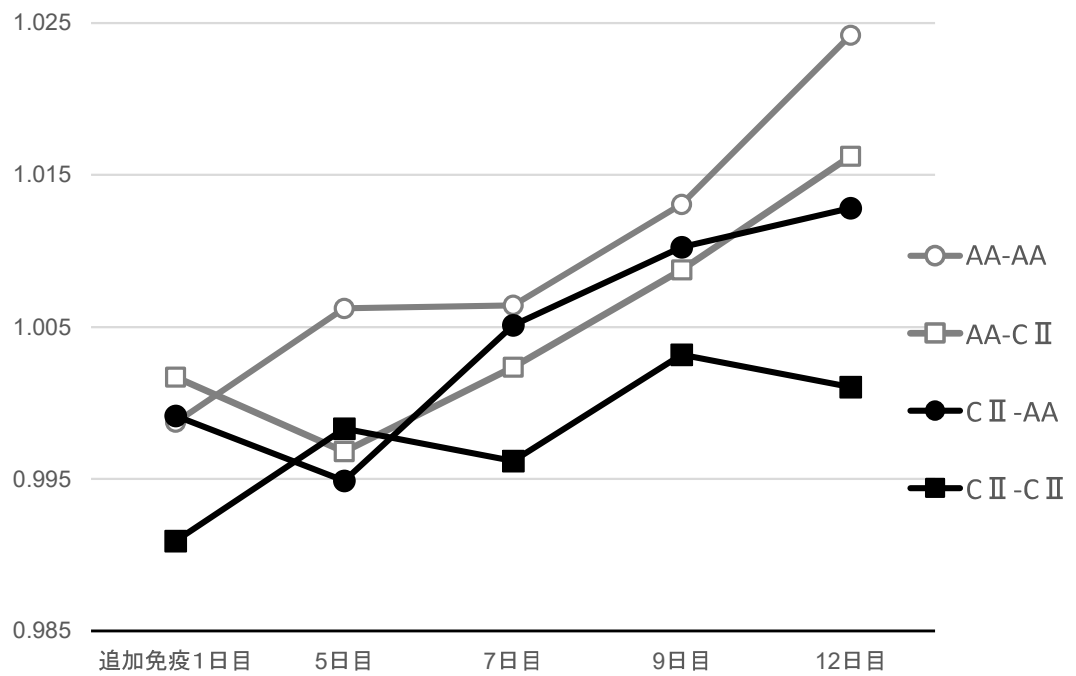


Fig.3-2 関節腫脹度の推移

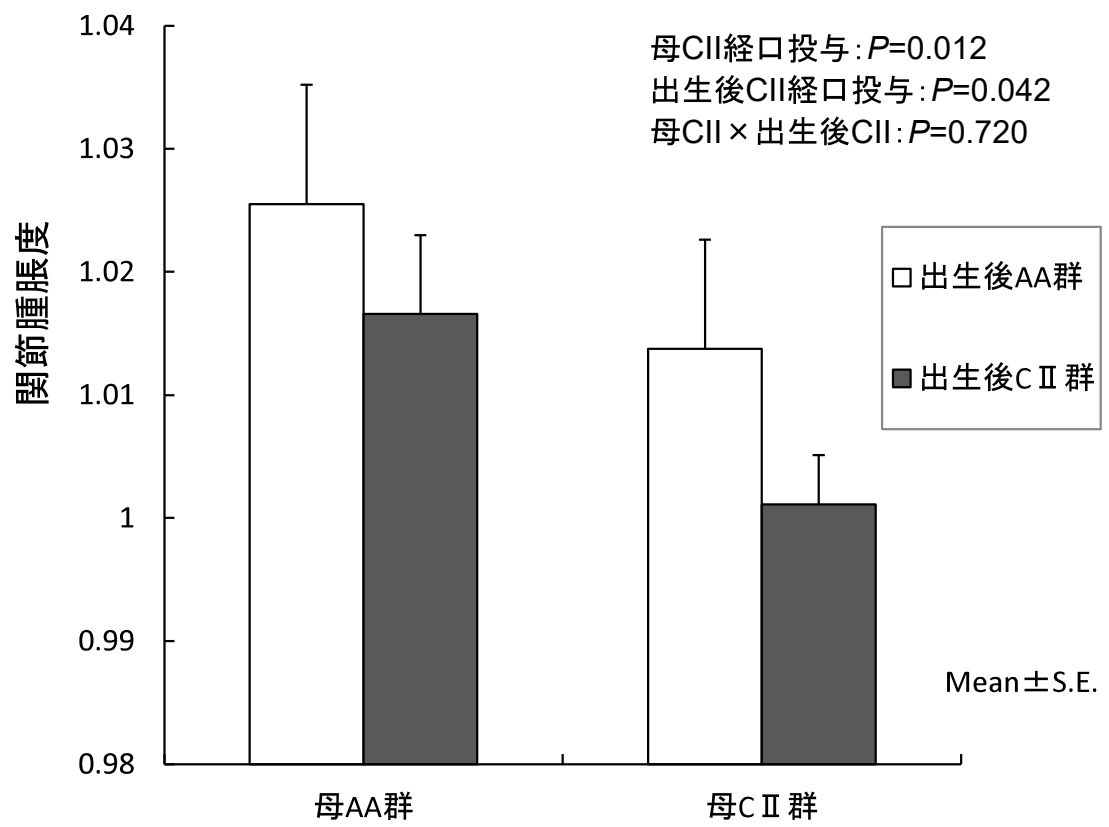


Fig.3-3 関節腫脹度

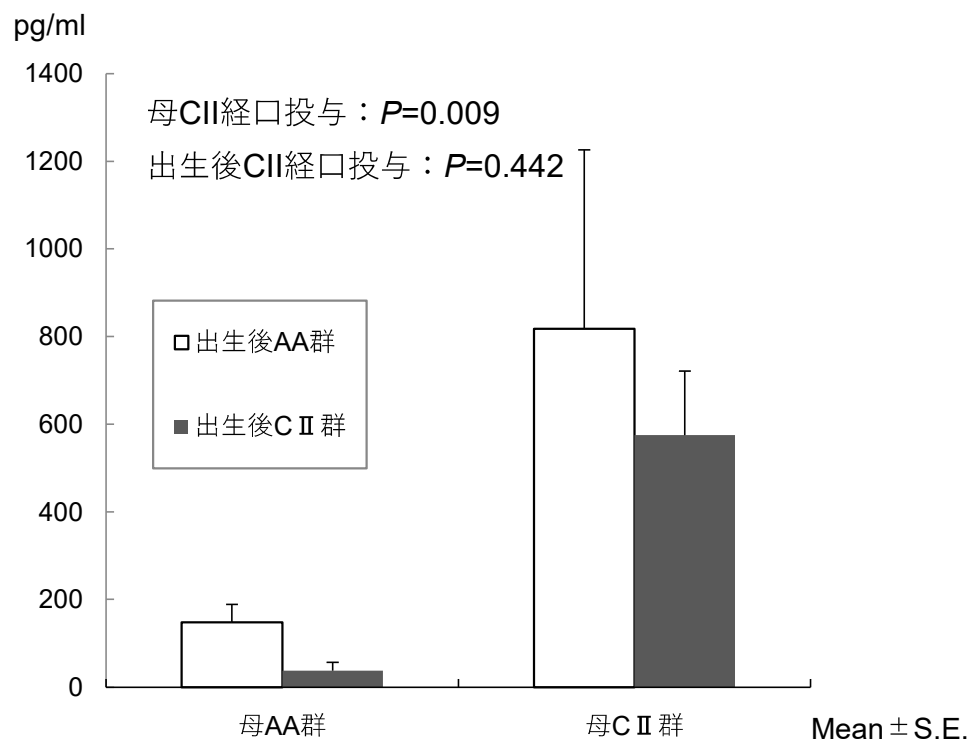


Fig.3-4 脾臓細胞培養上清中IL-2産生量(CII刺激)

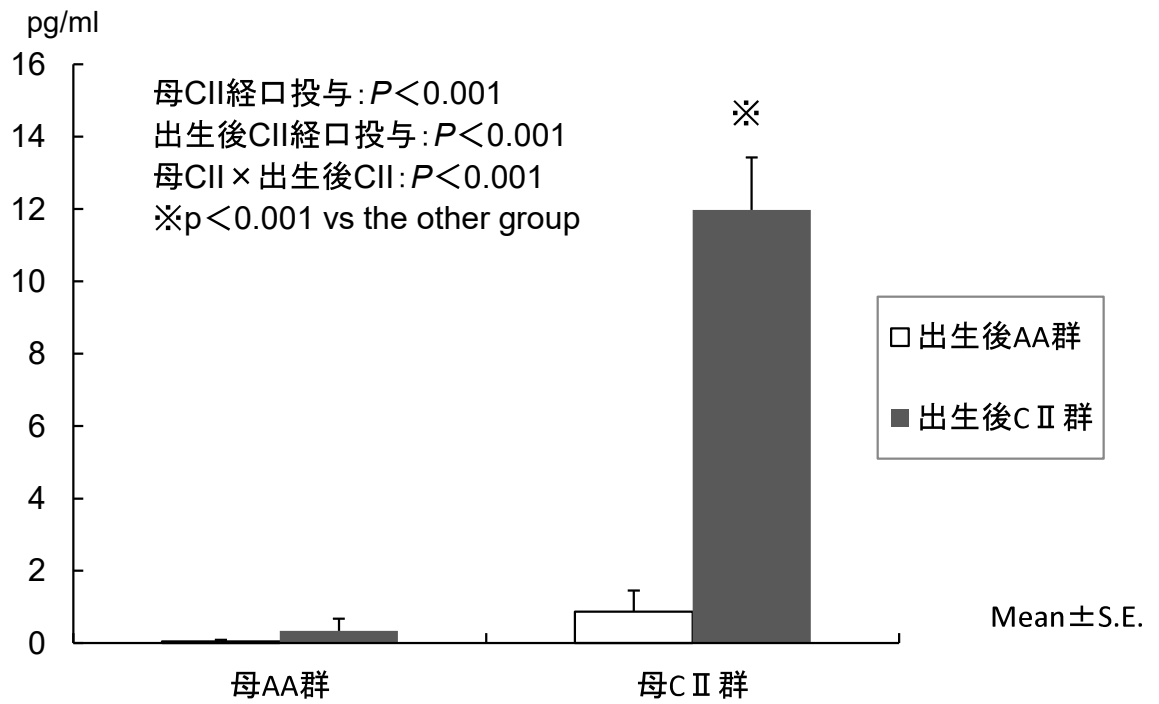


Fig.3-5 パイエル板細胞培養上清中IL-10産生量(CII刺激)

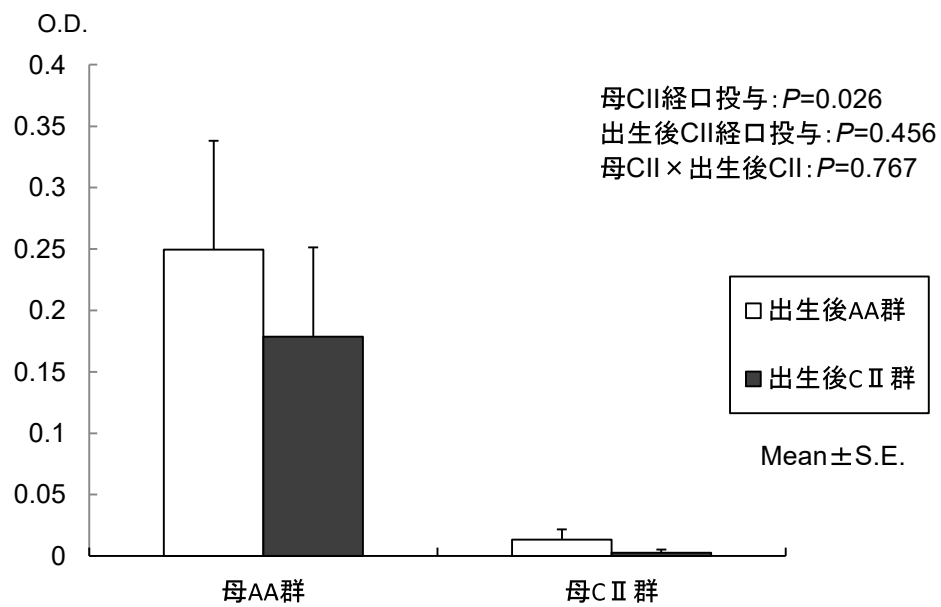


Fig.3-6 フン抽出液中CII特異的IgA抗体価

## 総括

近年、「将来の健康や特定の病気へのかかりやすさは、胎児期や生後早期の環境の影響を強く受けて決定される」という DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) の概念が提唱され、数多くの疫学・実験研究の結果から広く支持されるようになってきている。現在の妊娠年齢女性を取り巻く環境が 40～50 年先の将来の疾病構造に影響を及ぼすと考えられる。

一方、壮年期から高齢期にかけて増加する心血管疾患や脳血管疾患、悪性新生物のリスク因子となる肥満、糖尿病、動脈硬化症、さらには近年高齢者の健康障害として問題になっているサルコペニアなどの慢性疾患において、病態の共通の基盤として慢性炎症の存在があることがわかってきた。先進国のみならず発展途上国も含めて全世界的に急増しており、世界保健機関 (WHO) は、生活習慣病や癌を総称して「非感染性疾患 (non-communicable disease: NCD)」と定義し、新たな重要課題と位置づけている。多くの NCD は加齢とともに有病率が上昇するため、超高齢社会であるわが国においては、罹患者の生活の質 (Quality of life: QOL) 向上、健康寿命の延伸、医療経済的側面からも取り組まれるべき喫緊の課題である。

本研究はこれらの課題に取り組むための基礎研究として位置づけられる。第 1 章 [研究 1, 2]、第 2 章 [研究 3] では病態モデルマウスを用いて、母体の炎症環境が出生仔に及ぼす影響について、炎症の病態に深く関与する免疫機能と代謝機能の相互作用に着目して解析を行った。第 3 章 [研究 4] では炎症性疾患である関節リウマチの病態モデルマウスを用い、子供での予防法を探索するための実験的試みとして胎児期や生後早期の環境調節が病態に及ぼす影響を検討した。

第 1 章 [研究 1, 2] では、母体の強力な炎症環境が出生仔マウスの免疫・アレルギー疾患モデルの病態に及ぼす影響を解析した。アレルギーと自己免疫疾患は免疫機能が過剰に反応することで炎症を生じる疾患であることに加えて、近年、その炎症病態と代謝機能との相互作用が重症度や合併症発症に影響することが報告されている。本研究では母体の強力な炎症環境は仔マウスの免疫機能の変化のみならず、体重増加や血中レプチン濃度の増加などの代謝機能の変化を介して炎症病態を変化させることが示唆された。

第2章[研究3]においては、low-gradeの炎症環境である食餌誘導性肥満による慢性炎症が仔マウスに及ぼす影響を解析した。その結果、母マウス高脂肪食摂取の影響により、加齢による体重減少が有意に早く、高度に起ること、加齢関連T細胞と呼ばれ、免疫老化に関連するT細胞の割合が増加することが明らかになった。

以上のことから、母マウスの高脂肪食摂取による慢性炎症は、仔マウスの脂肪組織機能および免疫機能の加齢変化を促進することが示された。またこれらの加齢変化が相互に作用し、肝臓組織において肝小葉への炎症性細胞浸潤や肝硬変形成の前段階である線維化が生じ、非アルコール性脂肪肝疾患の病態を悪化させることが示唆された。また、T細胞サブセットの変化はすでに新生仔期に生じており、これらの変化が老齢期における加齢変化を促進した可能性がある。

第3章[研究4]では、第1章、第2章において、母体の胎生期や生後早期の炎症環境が仔マウスの炎症病態を変化させることを示した。これをふまえ、仔マウスでの炎症病態を抑制、予防するための胎生期、生後早期の環境を検討することを目的に、炎症性の自己免疫疾患である関節リウマチモデルマウスを用い、母マウスの自己抗原の経口投与が仔マウスの関節炎病態に及ぼす影響を解析した。その結果、母マウスへの自己抗原経口投与により、仔マウスでは抗原特異的応答が低下、または抑制性応答が亢進したことが示唆された。今後は得られた結果の機序をさらに検討し、子供での予防法として応用可能か検討する必要がある。

以上の章からなる本研究により、母マウスの炎症環境は出生仔マウスの炎症病態に影響し、その背景として脂肪組織機能の変化を介した‘免疫応答と代謝機能との相互作用’の変化があることが示唆された。また仔の炎症病態の予防・改善に胎生期、生後早期の環境調節が有効である可能性が示唆された。

最後に、本研究を行うことで胎生期から生後早期という発達の初期段階の生体を取り巻く環境が成長後の健康・疾患に大きな影響を及ぼすことを改めて認識した。また、栄養と免疫は生体の恒常性を保つ基本的な事象であり、相互に影響しあっていることは古くから認識されてきたが、近年、その相互作用の分子機構の研究が進み、様々な疾患の発症、特に全世界で問題になっているNCDの病態に深く関与していることが明らかになってきている。しかしながら、栄養状態と免疫系の相互作用の理解は未だ不十分であり、immune-metabolismの視点から栄養状態と免疫機能の関わりを追求することは、慢性炎症やそれに伴い増加する加齢関連

疾患の理解、栄養療法の発展に必要である。

動物モデルを用いた本研究の結果はすぐにヒトに外挿できるものではないが、妊娠年齢女性の生活習慣是正のための基礎情報として、さらに immune-metabolism の視点から栄養療法を発展させるための基礎研究として有用であると考ええる。栄養療法による炎症性疾患の予防、改善のため、管理栄養士の視点からこれらの課題に取り組んでいきたい。

## **Summary**

### **The effects of maternal inflammation on offspring: Analysis from the view point of immune-metabolism**

Atsuko Imai

Maternal health and nutritional status influence on offspring health and diseases. Inflammation plays an important role in the pathological process of various diseases, including not only immune disorders but also obesity and related abnormalities. Aberrant immune reaction in obesity, such as the accumulation of proinflammatory immune cells within visceral adipose tissue, plays a major role in the development of systemic chronic, low-grade inflammation and limits the function of adipocytes. From the such background, the field of immune-metabolism has been drawn attention.

In addition, it is speculated that aging may lead to decrease the function of the immune-metabolism system or a change in the balance, resulting in a disturbance in homeostasis and a chronic inflammatory condition. However, the effect of aging on immune metabolism has not been sufficiently elucidated. The aim of studies is to investigate the effect of maternal inflammation on offspring.

We investigated the influence of maternal environment on offspring using experimental animal model from the viewpoint of immune-metabolism, inflammatory pathology, and aging.

#### **Chapter 1 [study 1, 2] :**

#### **The effects of maternal inflammation induced by LPS on postnatal allergic and immunologic pathologies in offspring**

##### **[study 1] Analysis of experimental allergic rhinitis**

Maternal inflammation induced by LPS promoted leptin production and altered Th balance in offspring, however did not improve allergic symptoms in a

mouse model of allergic rhinitis. It might suggest that inflammation during pregnancy influenced on the adipose tissue function, which diversely effected on allergic inflammation in offspring.

#### **[study 2] Analysis of collagen-induced arthritis (CIA)**

We evaluated the effect of maternal inflammation on offspring joint swelling for 75days after induction of CIA. Maternal inflammation did not merely suppress inflammation; it could delay CIA process in offspring. Nevertheless, the analysis of inflammatory cytokines and leptin concentrations at 26 weeks suggested that the pathophysiology of arthritis might be worsening thereafter. This study suggests that maternal inflammation modulates postnatal inflammatory response in offspring.

#### **Chapter 2 [study 3] :**

##### **The effects of maternal chronic inflammation induced by diet-induced obesity on aging process in offspring**

We demonstrated that a maternal high-fat diet might accelerate the aging process in adipose tissue, increase senescence-associated T cells in splenic lymphocytes, and induce histological non-alcoholic fatty liver disease changes in the livers of aged offspring. These alterations may be related to each other. In addition, the changes of the T cell subsets had already occurred in the neonate period, which might promote an aging alteration in aged offspring. It would be necessary to investigate the time course changes in offspring, in order to analyze the effects of maternal high-fat diet on aging from the view point of adipose tissue function and immunological changes in offspring.

#### **Chapter 3 [study 4] :**

##### **The effects of maternal oral administration of self-antigen on postnatal autoimmune disease**

The aim of this study is to explore whether fetal environmental immune-

modulation could control pathology of inflammation in offspring. Maternal oral administration of self- antigen suppressed the joint swelling in offspring collagen-induced arthritis. Antigen specific immune response could be suppressed through intestinal immunity. It was suggested that oral administration of self-antigen in fetal period enhanced the efficacy of oral tolerance induction in offspring.

In conclusion, maternal inflammation influenced on inflammatory pathophysiology in offspring. It was suggested that the changes of interaction between immune response and the metabolic function through the alterations of adipokine secretion from adipose tissue played an important role in the inflammatory process. These findings are significant as fundamental researches to develop the nutritional therapy from a viewpoint of immune- metabolism.

## 参考文献

- 1 Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986;1(8489):1077-81.
- 2 Gluckman PD, Hanson MA, Pinal C. The developmental origins of adult disease. *Matern Child Nutr* 2005;1(3):130-41.
- 3 平成 27 年度国民健康・栄養調査結果の概要.; 2016.
- 4 Brown K, Apuzzio J, Weiss G. Maternal obesity and associated reproductive consequences. *Womens Health (Lond)* 2010;6(2):197-203.
- 5 Hunter DJ, Reddy KS. Noncommunicable diseases. *N Engl J Med* 2013;369(14):1336-43.
- 6 谷口 克, 宮坂 昌之. 標準免疫学. 第 1 版 edn.: 医学書院; 1997.
- 7 Manabe I. Chronic inflammation links cardiovascular, metabolic and renal diseases. *Circ J* 2011;75(12):2739-48.
- 8 DiSpirito JR, Mathis D. Immunological contributions to adipose tissue homeostasis. *Semin Immunol* 2015;27(5):315-21.
- 9 Zmora N, Bashirdes S, Levy M, et al. The Role of the Immune System in Metabolic Health and Disease. *Cell Metab* 2017;25(3):506-21.
- 10 Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(5):911,9; quiz 920.

- 11 Wong CK, Cheung PF, Lam CW. Leptin-mediated cytokine release and migration of eosinophils: implications for immunopathophysiology of allergic inflammation. *Eur J Immunol* 2007;37(8):2337-48.
- 12 Gereda JE, Leung DY, Liu AH. Levels of environmental endotoxin and prevalence of atopic disease. *JAMA* 2000;284(13):1652-3.
- 13 Bottcher MF, Bjorksten B, Gustafson S, et al. Endotoxin levels in Estonian and Swedish house dust and atopy in infancy. *Clin Exp Allergy* 2003;33(3):295-300.
- 14 Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002;347(12):869-77.
- 15 Ege MJ, Bieli C, Frei R, et al. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(4):817-23.
- 16 Morris MC, Gilliam EA, Li L. Innate immune programming by endotoxin and its pathological consequences. *Front Immunol* 2015;5:680.
- 17 Gerhold K, Avagyan A, Seib C, et al. Prenatal initiation of endotoxin airway exposure prevents subsequent allergen-induced sensitization and airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(3):666-73.
- 18 Gleditsch DD, Shornick LP, Van Steenwinckel J, et al. Maternal inflammation modulates infant immune response patterns to viral lung challenge in a murine model. *Pediatr Res* 2014;76(1):33-40.

- 19 Blumer N, Herz U, Wegmann M, et al. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 2005;35(3):397-402.
- 20 Nilsson C, Larsson BM, Jennische E, et al. Maternal endotoxemia results in obesity and insulin resistance in adult male offspring. *Endocrinology* 2001;142(6):2622-30.
- 21 Nilsson C, Niklasson M, Eriksson E, et al. Imprinting of female offspring with testosterone results in insulin resistance and changes in body fat distribution at adult age in rats. *J Clin Invest* 1998;101(1):74-8.
- 22 Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2008;8(3):218-30.
- 23 Adkins B, Du RQ. Newborn mice develop balanced Th1/Th2 primary effector responses in vivo but are biased to Th2 secondary responses. *J Immunol* 1998;160(9):4217-24.
- 24 Warner JA, Jones CA, Jones AC, et al. Prenatal origins of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(2 Pt 2):S493-8.
- 25 Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001;358(9288):1129-33.
- 26 Kirsten TB, de Oliveira BP, de Oliveira AP, et al. Single early prenatal lipopolysaccharide exposure prevents subsequent airway inflammation response in an experimental model of asthma. *Life Sci* 2011;89(1-2):15-9.

- 27 Cao L, Wang J, Zhu Y, et al. Maternal endotoxin exposure attenuates allergic airway disease in infant rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298(5):L670-7.
- 28 Reul JM, Stec I, Wiegers GJ, et al. Prenatal immune challenge alters the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult rats. *J Clin Invest* 1994;93(6):2600-7.
- 29 Luder E, Melnik TA, DiMaio M. Association of being overweight with greater asthma symptoms in inner city black and Hispanic children. *J Pediatr* 1998;132(4):699-703.
- 30 Mishra V. Effect of obesity on asthma among adult Indian women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28(8):1048-58.
- 31 Stenius-Aarniala B, Poussa T, Kvarnstrom J, et al. Immediate and long term effects of weight reduction in obese people with asthma: randomised controlled study. *BMJ* 2000;320(7238):827-32.
- 32 Imai A, Satoi K, Fujimoto E, et al. Inducing maternal inflammation promotes leptin production in offspring but does not improve allergic symptoms in a mouse model of allergic rhinitis. *Heliyon* 2017;3(6):e00327.
- 33 Onishi N, Kawamoto S, Ueda K, et al. Dietary pulverized konjac glucomannan prevents the development of allergic rhinitis-like symptoms and IgE response in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71(10):2551-6.
- 34 Ito A, Suganami T, Miyamoto Y, et al. Role of MAPK phosphatase-1 in the induction of monocyte chemoattractant protein-1 during the course of adipocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 2007;282(35):25445-52.

- 35 Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, et al. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest* 1996;97(9):2152-7.
- 36 Zeng H, Chi H. The interplay between regulatory T cells and metabolism in immune regulation. *Oncoimmunology* 2013;2(11):e26586.
- 37 Giles JT, Allison M, Blumenthal RS, et al. Abdominal adiposity in rheumatoid arthritis: association with cardiometabolic risk factors and disease characteristics. *Arthritis Rheum* 2010;62(11):3173-82.
- 38 Elkan AC, Engvall IL, Cederholm T, et al. Rheumatoid cachexia, central obesity and malnutrition in patients with low-active rheumatoid arthritis: feasibility of anthropometry, Mini Nutritional Assessment and body composition techniques. *Eur J Nutr* 2009;48(5):315-22.
- 39 Erbasan F, Alikanoglu AS, Yazisiz V, et al. Leptin and leptin receptors in salivary glands of primary Sjogren's syndrome. *Pathol Res Pract* 2016;212(11):1010-4.
- 40 Bokarewa M, Bokarew D, Hultgren O, et al. Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(10):952-6.
- 41 Stuart JM, Watson WC, Kang AH. Collagen autoimmunity and arthritis. *FASEB J* 1988;2(14):2950-6.
- 42 Imai A, Fujimoto E, Sato K. The Influence of LPS-Induced Maternal Inflammation on Postnatal Collagen-Induced Arthritis. *Inflammation* 2018;.

- 43 Hosoda T, Mito N, Yoshino H, et al. Estrogen altered oral tolerance induction in type II collagen-induced murine arthritis. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;133(1):19-28.
- 44 Bruun JM, Pedersen SB, Kristensen K, et al. Effects of pro-inflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 2002;190(1-2):91-9.
- 45 Hayashi H, Satoi K, Sato-Mito N, et al. Nutritional status in relation to adipokines and oxidative stress is associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition* 2012;28(11-12):1109-14.
- 46 Hamaguchi K, Itabashi A, Kuroe Y, et al. Analysis of adipose tissues and stromal vascular cells in a murine arthritis model. *Metabolism* 2012;61(12):1687-95.
- 47 Williams CL, Teeling JL, Perry VH, et al. Mouse maternal systemic inflammation at the zygote stage causes blunted cytokine responsiveness in lipopolysaccharide-challenged adult offspring. *BMC Biol* 2011;9:49, 7007-9-49.
- 48 Hodyl NA, Krivanek KM, Clifton VL, et al. Innate immune dysfunction in the neonatal rat following prenatal endotoxin exposure. *J Neuroimmunol* 2008;204(1-2):126-30.
- 49 Brown N, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Induction of apoptosis in murine fetal thymocytes following perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Int J Toxicol* 2006;25(1):9-15.

- 50 Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13(12):875-87.
- 51 Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 2004;5(2):133-9.
- 52 Shimatani K, Nakashima Y, Hattori M, et al. PD-1+ memory phenotype CD4+ T cells expressing C/EBPalpha underlie T cell immunodepression in senescence and leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(37):15807-12.
- 53 Oishi Y, Manabe I. Integrated regulation of the cellular metabolism and function of immune cells in adipose tissue. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2016;43(3):294-303.
- 54 Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, et al. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology* 2009;50(6):1796-808.
- 55 McCurdy CE, Bishop JM, Williams SM, et al. Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J Clin Invest* 2009;119(2):323-35.
- 56 Hori H, Umezawa M, Uchiyama M, et al. Effect of high-fat diet prior to pregnancy on hepatic gene expression and histology in mouse offspring. *J Perinat Med* 2014;42(1):83-91.
- 57 Wakabayashi A, Utsuyama M, Hosoda T, et al. Induction of immunological tolerance by oral, but not intravenous and intraportal, administration of ovalbumin and the difference between young and old mice. *J Nutr Health Aging*

2006;10(3):183-91.

58 Miller KN, Burhans MS, Clark JP, et al. Aging and caloric restriction impact adipose tissue, adiponectin, and circulating lipids. *Aging Cell* 2017;16(3):497-507.

59 Takahashi T, Yu F, Saegusa S, et al. Impaired expression of cardiac adiponectin in leptin-deficient mice with viral myocarditis. *Int Heart J* 2006;47(1):107-23.

60 Miller M, Cho JY, Pham A, et al. Adiponectin and functional adiponectin receptor 1 are expressed by airway epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 2009;182(1):684-91.

61 Yoda-Murakami M, Taniguchi M, Takahashi K, et al. Change in expression of GBP28/adiponectin in carbon tetrachloride-administrated mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285(2):372-7.

62 Gulcelik NE, Halil M, Ariogul S, et al. Adipocytokines and aging: adiponectin and leptin. *Minerva Endocrinol* 2013;38(2):203-10.

63 Umekawa T, Sugiyama T, Du Q, et al. A maternal mouse diet with moderately high-fat levels does not lead to maternal obesity but causes mesenteric adipose tissue dysfunction in male offspring. *J Nutr Biochem* 2015;26(3):259-66.

64 Odaka Y, Nakano M, Tanaka T, et al. The influence of a high-fat dietary environment in the fetal period on postnatal metabolic and immune function. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18(9):1688-94.

- 65 Shirakawa K, Yan X, Shinmura K, et al. Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue. *J Clin Invest* 2016;126(12):4626-39.
- 66 Wree A, Broderick L, Canbay A, et al. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10(11):627-36.
- 67 Kremer M, Thomas E, Milton RJ, et al. Kupffer cell and interleukin-12-dependent loss of natural killer T cells in hepatosteatosis. *Hepatology* 2010;51(1):130-41.
- 68 Tajiri K, Shimizu Y, Tsuneyama K, et al. Role of liver-infiltrating CD3+CD56+ natural killer T cells in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21(6):673-80.
- 69 桂 義元, 廣川 勝昱. 胸腺と T 細胞 T 細胞はこうしてつくられる. 東京: 医学書院; 1998.
- 70 宮坂 信之. 最新 膠原病・リウマチ学. 初版 edn. 東京: 朝倉書店; 2001.
- 71 高崎 芳成. 関節リウマチ診療ガイドライン 2014. 東京: メディカルレビュー社; 2014.
- 72 Rezende RM, Weiner HL. History and mechanisms of oral tolerance. *Semin Immunol* 2017;30:3-11.
- 73 佐藤さくら, 海老澤元宏, et al. 食物アレルギーの経口免疫療法 食物アレルギーの経口免疫療法(総論). *月刊臨床免疫・アレルギー科* 2014;61(2):164-72.

- 74 戸田佳孝. HLA - DRB1\*0405 遺伝子陽性 RA 患者に対する熱変性 II 型コラーゲン経口投与療法の臨床効果における至適量について. *臨床リウマチ* 2002;14(2):101-7.
- 75 Grewal HM, Karlsen TH, Vetvik H, et al. Measurement of specific IgA in faecal extracts and intestinal lavage fluid for monitoring of mucosal immune responses. *J Immunol Methods* 2000;239(1-2):53-62.
- 76 Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000;101(5):455-8.
- 77 清野. 宏. 粘膜免疫－腸は免疫の司令塔.: 中山書店; 2001.
- 78 木津久美子, 廣瀬潤子, 本庄勉, et al. 母乳哺育により母ラットの摂取タンパク質特異的に仔ラットの Th2 応答が抑制される. *日本栄養・食糧学会誌* 2012;65(1):13-19 (J-STAGE).
- 79 Weltzin R, Lucia-Jandris P, Michetti P, et al. Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J Cell Biol* 1989;108(5):1673-85.
- 80 Natsume O, Kabashima S, Nakazato J, et al. Two-step egg introduction for prevention of egg allergy in high-risk infants with eczema (PETIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2017;389(10066):276-86.
- 81 Du Toit G, Sayre PH, Roberts G, et al. Effect of Avoidance on Peanut Allergy after Early Peanut Consumption. *N Engl J Med* 2016;374(15):1435-43.

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、長年にわたる懇切丁寧な研究へのご指導と多大なるご教示を賜りました日本女子大学家政学部教授、佐藤和人先生に心より深く感謝申し上げます。また、本論文を御高閲戴き、貴重なご助言を賜りました同教授、丸山千寿子先生、五関正江先生、ならびに東京医科歯科大学教授、江石義信先生に深謝致します。

本研究の遂行や取りまとめにおいて、多くのご協力をいただいた日本女子大学食物学科臨床栄養学・免疫病理学研究室の皆様、フローサイトメーターの実験について多くのご助言を下さいました宇津山正典先生に御礼申し上げます。

最後に、これまでの研究生活を支えてくれた家族に、この場を借りて心より感謝の意を表します。