

## スギ花粉症の感作・発症に関する遺伝子の機能解析

<sup>1)</sup>福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

<sup>2)</sup>筑波大学遺伝医学

意元 義政<sup>1)</sup> 野口恵美子<sup>2)</sup> 徳永 貴広<sup>1)</sup> 山田武千代<sup>1)</sup> 藤枝 重治<sup>1)</sup>

**Key words:** allergic rhinitis — microarray — sensitization

### はじめに

スギ花粉症は本邦における最も罹患率の高い季節性アレルギー性鼻炎である。最近の20年間を検討してもスギ花粉症患者数は増加しており、発症年齢も低くなっている<sup>1)</sup>。この原因は、スギ花粉飛散数の増加によるところが大きく、その対策が疾患予防の重要な鍵ともなっている<sup>2)</sup>。それと共にスギ花粉症の的確な診断、費用対効果の高い抗原曝露防止策、そして患者満足度が高い新規の根治的治療開発が急務とされている<sup>3,4)</sup>。そのためにはスギ花粉症発症機序の解明が必須である。しかしながら遺伝因子や環境因子など多くの影響を受けている疾患であるため、困難な作業となっている。今回我々はスギ花粉症の感作から発症の変化に着目し、スギ花粉症未発症者の分類を行った。さらに鼻粘膜擦過細胞を用いた網羅的遺伝子解析により、スギ花粉症の感作から発症に関連する遺伝子を同定したので、それらについて述べる<sup>5)</sup>。本研究はヘルシンキ宣言を遵守し、福井大学倫理委員会の承認を得て行った。

### 皮内反応試験と血清抗原特異的IgEの問題点

スギ花粉症は抗原特異的IgEが関与するアレルギー性鼻炎である。アレルギー疾患が発症するには、抗原に対する特異的IgE抗体が産生される過程(感作)が必要である。現在診療において汎用されている検査では、抗原特異的皮内反応試験と、血清抗原特異的IgEを測定する方法が代表的である。これらの検査は比較的容易に施行できる点で有用であり、これらの

結果を組み合わせることで、よりの確な診断を得ることができる<sup>6)</sup>。しかしながらこれらの検査結果が必ずしも症状と一致しないことも報告されている<sup>7)</sup>。これは生体内に存在するIgE抗体が他の抗原に対する交差抗原性を有すると、症状がなくても他抗原に対する陽性反応を示すことがあるためである<sup>8)</sup>。小児では、皮内反応試験と血清抗原特異的IgEとの乖離があり、年齢により変化することも知られている<sup>9)</sup>。皮内反応試験と血清抗原特異的IgEとの乖離は、抗原に対する免疫応答の場(皮膚と血中)の違いや<sup>10)</sup>、IL-10やIgGによる影響であることが知られている<sup>11,12)</sup>。しかしそのメカニズムは依然として不明な点が多い。血清抗原特異的IgEと皮内反応試験、そして症状との乖離は非常に興味深い事実であり、これらについて詳細に検討することは、アレルギー疾患の感作から発症の解明に重要であると考えられる。

### スギ花粉症の罹患率と感作率

これまで本邦におけるアレルギー性鼻炎に関する疫学調査で、1998年から2008年の10年間でアレルギー性鼻炎の有病率は10%増加している<sup>13)</sup>。この背景には、スギ花粉症の増加が大きいとされている。そしてスギ花粉症患者の増加は、スギ抗原に対する感作率の増加を伴っている。2006年~2008年の成人対象に福井県で行った疫学調査では、スギ花粉に対する感作率は53~59%と高率であった<sup>1)</sup>。さらに最近の我々が行った3453人を対象とした調査でも、スギに対する感作率が最も高率(57.5%)であることを検証できた<sup>14)</sup>。一方

Received: September 9, 2015. Accepted: May 17, 2016

ANALYSIS FOR GENE FUNCTION RELATED TO SENSITIZATION AND ONSET OF JAPANESE CEDAR POLLINOSIS

Yoshimasa Imoto<sup>1)</sup>, Emiko Noguchi<sup>2)</sup>, Takahiro Tokunaga<sup>1)</sup>, Takechiyo Yamada<sup>1)</sup> and Shigeharu Fujieda<sup>1)</sup>

Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui, Japan<sup>1)</sup>, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan<sup>2)</sup>

**Abbreviations:** BAT "Basophil Activation Test", CST1 "Cystatin SN", ITLN1 "Intelectin 1", ZO-1 "Zonula occludens-1"

意元義政: 福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 [〒910-1104 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3]

E-mail: yimoto@u-fukui.ac.jp

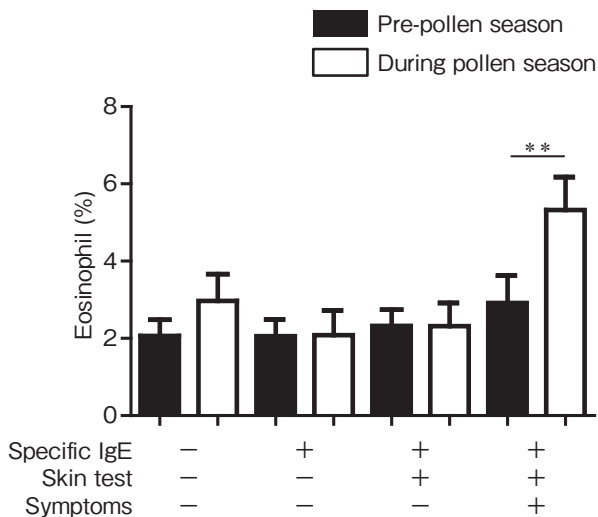


Fig. 1. The ratio of eosinophils in peripheral blood cells. During pollen season, the ratio of eosinophils in peripheral blood increased among Japanese cedar pollinosis patients. However there are no significant change between pre-pollen season and pollen season among non-sensitized subjects and sensitized subjects without any pollinosis related symptoms.

\*\* $p < 0.01$

でスギ抗原に対する感作を認めているにも関わらず、27.8%の人がスギ花粉症を発症していないことも判明した<sup>15)</sup>。感作が成立していながらも未発症である感作陽性未発症者について、なぜ発症しないのか、あるいは今後いつ発症するかを予測することは困難である。我々は感作陽性未発症者32人に対し、スギ抗原に対する皮内反応試験を行った。その結果16人(50%)がスギ抗原に対する陽性反応を示したが、16人(50%)は陰性反応であることを確認した。一方、スギに対する血清抗原特異的IgE陰性者は全員皮内反応陰性であった。この結果よりスギ花粉症未発症者には、①感作陰性皮内反応陰性者(非アレルギー者)、②感作陽性(血清抗原特異的IgE陽性)皮内反応陰性者、③感作陽性皮内反応陽性者が存在していると考えた。そこでスギ花粉症患者を含め、これらの者の末梢血中の好酸球と好塩基球について調査した。

末梢血好酸球数の増加は、アレルギー疾患の危険因子や増悪因子である<sup>16)</sup>。我々の調査で、スギ花粉飛散期にはスギ花粉症患者の末梢血好酸球数は飛散前と比較して有意に増加していた。一方未発症者では末梢血好酸球数の変化は認めなかった(Fig. 1)。好塩基球は末梢血に1%しか存在していないが、アレルギー炎症の重要な炎症細胞である。末梢血好塩基球活性化試験(Basophil Activation Test: BAT)は、アレルギー反応を示す一つの指標として近年報告されている<sup>17)</sup>。好塩基球は細胞表面にFcεレセプターを発現している。そ

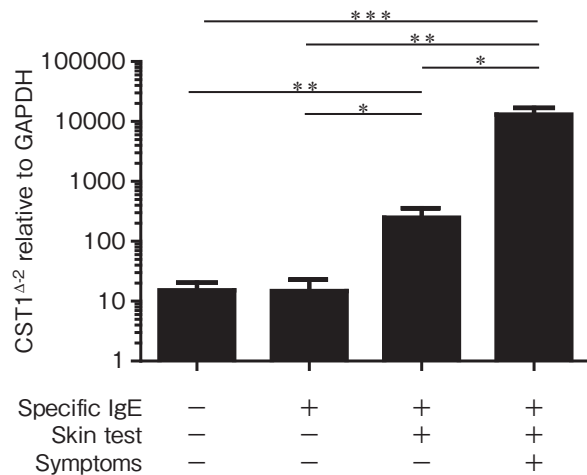
してアレルゲンにより細胞表面のIgE抗体が架橋されると細胞の活性化が生じる。活性化した好塩基球は脱顆粒し、ヒスタミンやIL-4などを放出することでアレルギー炎症を惹起する<sup>18)</sup>。この際に細胞表面に誘導されるのがCD203cである<sup>19)</sup>。我々は末梢血好塩基球の反応を、スギ抗原であるCryj1で刺激し、フローサイトメトリーで好塩基球のCD203cを測定した。その結果スギ花粉症患者では未発症群と比較して有意に上昇していた<sup>14)</sup>。感作陽性皮内反応陽性者は感作陽性皮内反応陰性者と比較して高い傾向にあったが、個人間のばらつきもあり今後の検討が必要であると考えられた。このようにスギ花粉症においては、スギ抗原曝露と共に末梢血好酸球数が上昇することや、好塩基球のCD203cの発現が亢進していることが未発症と異なっており、スギ花粉症の発症との関連が示唆された。

### 鼻粘膜搾過細胞の網羅的遺伝子解析

アレルギー性鼻炎では、鼻粘膜に好酸球や肥満細胞などの炎症細胞が浸潤し、様々な炎症性サイトカイン、ケモカイン、そして炎症性メディエーターを放出することで、鼻粘膜の変化を生じている。一方で気道上皮はIL-33やTSLP(thymic stromal lymphopoietin)を放出し、炎症細胞の浸潤やアレルギー炎症を惹起させる<sup>20)21)</sup>。このように、鼻(局所)においては多種多様の細胞が複雑に関与している。我々はスギ花粉飛散時期に、下甲介粘膜の搾過細胞を採取し、網羅的遺伝子解析を行った。解析方法として、スギ花粉症患者と感作陰性皮内反応陰性者(非アレルギー者)の2群間で網羅的遺伝子解析を行い、発現変化を認めた遺伝子については、他の未発症者(感作陽性皮内反応陰性者と感作陽性皮内反応陽性者)を含め、定量real time PCR法により追認した。その結果、スギ花粉症患者と非アレルギー者で、2倍以上優位な発現変化を示す32遺伝子を同定した。その中で、スギ花粉症患者で10倍以上の高発現を認めた遺伝子はCystatin SN(CST1)とIntelectin 1(ITLN1)であった<sup>5)</sup>。

CST1はCystatin familyに属するprotease inhibitorである<sup>22)</sup>。Cystatinは炎症疾患や悪性腫瘍においても認められるが、各Cystatinの種類によりその機能は様々である。鼻粘膜搾過細胞におけるCST1の発現を定量real time PCR法により検討したところ、スギ花粉症患者では、非アレルギー者と感作陽性未発症者に比べ有意に亢進していた(Fig. 2)。そして感作陽性未発症者では、スギ抗原に対する皮内反応陽性者が、陰性者と比べ有意にCST1が高いことが判明した。感作、そして抗原に対する生体内の反応として皮内反応が生じているのならば、CST1がアレルギー性鼻炎の感作から発症に関連する新規候補遺伝子と考えられる。次

に *CST1* の免疫組織化学を行ったところ、*CST1* は鼻粘膜上皮細胞に存在していることが分かった<sup>5)</sup>。*CST1* の機能については protease に対する拮抗作用以外には未だに十分に解明されていない<sup>23)</sup>。花粉やダニなどの protease は、上皮細胞のバリア機能を障害し、

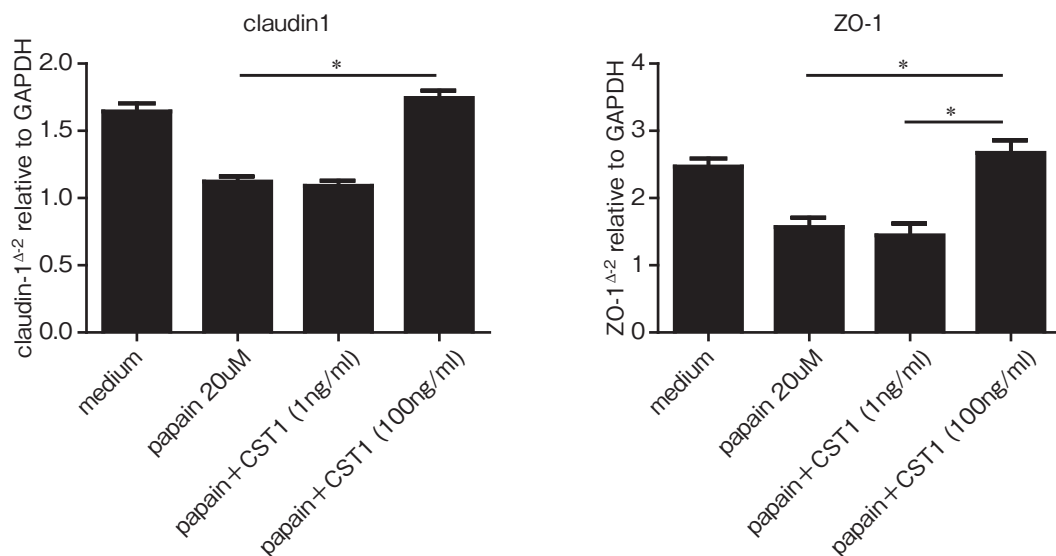


**Fig. 2.** The expression of *CST1* in nasal epithelial cells. The expression level of *CST1* in Japanese cedar pollinosis patients was significantly higher than sensitized subjects without any pollinosis related symptoms and non-sensitized subjects. Among sensitized subjects without any pollinosis related symptoms, subjects who show positive skin reaction against Japanese cedar pollen also showed significantly higher level of *CST1* than control subjects and sensitized without positive skin reaction.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$

protease-activated receptor-2 (PAR-2) を活性化させ、TSLP を放出させることでアレルギー炎症を惹起する<sup>24)</sup>。生体は外因性 protease に対して防御機構を備えており、Cystatin はその一つかもしれない。同じ Cystatin family である Cystatin A は皮膚のケラチノサイトや汗腺で発現している。これまでに解明された Cystatin A の機能は、Der fl や Der p1 といったダニ抗原の protease 活性に拮抗し、皮膚のバリア機能に貢献していることである<sup>25)</sup>。そこで我々は鼻粘膜より樹立した培養上皮細胞を用いて、*CST1* の上皮のバリア機能に対する影響について検討した。その結果、培養鼻粘膜上皮細胞に papain を作用させると、ZO-1 (zonula occludens-1) と claudin-1 の mRNA は有意に発現が減少するが、Recombinant *CST1* で前処理すると、papain による作用は濃度依存性に解除された (**Fig. 3**)。この結果は *CST1* が、papain の protease 活性に拮抗していることを示している。さらに培養鼻粘膜上皮細胞に IL-4 と IL-13 を作用させると *CST1* が誘導されることを確認した(未発表データ)。これらの結果より、スギ花粉症患者では局所の Th2 サイトカインにより *CST1* の発現が誘導され、抗原 (protease) 刺激から鼻粘膜上皮細胞を防御している可能性があると考えられる。しかしスギ花粉症患者において *CST1* が上昇しているため、すべてはアレルギー反応の結果を反映している可能性もある。今後の検討が必要である。

Intelectin 1 (*ITLN1*) は lactoferrin receptor である。*ITLN1* は、細菌や真菌に存在するアラビノガラクトランを認識し、腸管粘膜における免疫応答<sup>26)</sup>、細菌に対す

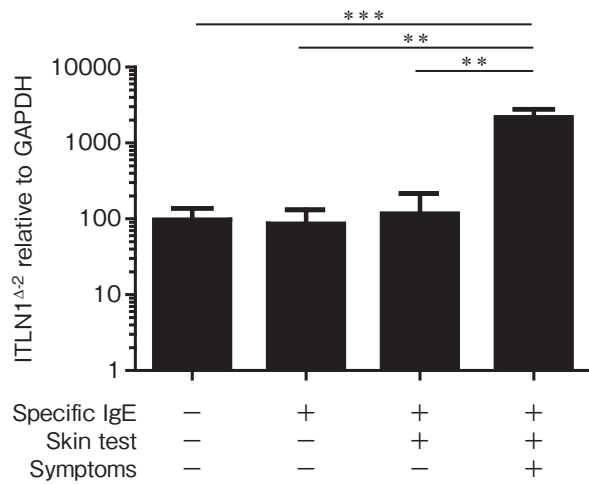


**Fig. 3.** The anti-protease activity of *CST1*.

Papain down-regulate the expression of claudin-1 and ZO-1 mRNA. Pre-incubation with *CST1* inhibited the down-regulation of claudin-1 and ZO-1 mRNA.

\* $p < 0.05$

る防御機能<sup>27)</sup>、さらにグルコース吸収と代謝と炎症反応にも関与していることが知られている<sup>28)</sup>。これまでアレルギー性鼻炎と *ITLN1* との関連については全く知られていなかった。この *ITLN1* も *CST1* 同様に、ス



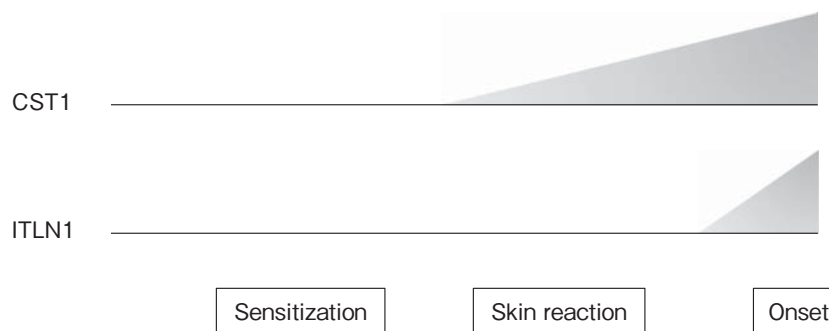
**Fig. 4.** The expression of *ITLN1* in nasal epithelial cells. The expression level of *ITLN1* in Japanese cedar pollinosis patients was significantly higher than sensitized subjects without any pollinosis related symptoms and non-sensitized subjects.

\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$

ギ花粉症患者において高発現していた遺伝子である<sup>5)</sup>。しかし感作陽性未発症者では、非アレルギー者と同様に低発現であり、*CST1* の発現パターンとは異なっていた (**Fig. 4**)。即ち、*ITLN1* は発症に関連する遺伝子であることが示唆された (**Fig. 5**)。我々は鼻粘膜上皮において *ITLN1* が IL-4 と IL-13 の刺激により発現が亢進することを確認している<sup>29)</sup>。気管支喘息患者で *ITLN1* の発現が亢進していることや<sup>30)</sup>、*ITLN1* の遺伝子多型との関連が報告されていることから<sup>31)</sup>、*ITLN1* が気道におけるアレルギー反応に関与していることが考えられる。これまで *CST1* と *ITLN1* について、遺伝子発現変化を中心に言及してきたが、これら以外にも多数の遺伝子を同定しており、スギ花粉症のどの過程で誘導、あるいは抑制されていくかということを理解していくことは、スギ花粉症の新規治療、そして診断という観点から重要である。我々が注目した *CST1* と *ITLN1* が、アレルギー性鼻炎の早期診断のバイオマーカーになる可能性もあり、臨床データと合わせこれらの機能解析を現在詳細に検討している (**Table 1**)。

**最後に**

本稿ではスギ花粉症の感作と発症に関して、我々の行った調査をもとに言及したが、これらのみでは十分



**Fig. 5.** The expression patterns of *CST1* and *ITLN1*.

*CST1* is up-regulated after skin test reactive phase, whereas *ITLN1* is up-regulated in the onset phase.

**Table 1**

|                                   | non pollinosis patient |   |     | pollinosis patient |
|-----------------------------------|------------------------|---|-----|--------------------|
| symptom                           | -                      | - | -   | +                  |
| skin test                         | -                      | - | +   | +                  |
| Ag specific IgE in serum          | -                      | + | +   | +                  |
| Eosinophils                       | →                      | → | →   | ↑                  |
| Basophil activation test (CD203c) | →                      | → | →~↑ | ↑                  |
| <i>ITLN1</i>                      | →                      | → | →   | ↑                  |
| <i>CST1</i>                       | →                      | → | →~↑ | ↑↑                 |

に説明できない点も多い。スギ花粉症の危険因子には発症因子と増悪因子があり、それぞれに遺伝因子（個体因子）と環境因子がある。遺伝因子が生命設計図であり、環境因子は後天的に生命経験の中で蓄積され、遺伝情報と環境との相互作用の積み重ねで病態が形成されていく。スギ花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、そして食物アレルギーはこの数十年で患者数が増加し<sup>32)</sup>、環境因子とこれに伴うエピジェネティックな変化の影響によるとも考えられる<sup>33)</sup>。西欧式食事などは、代謝疾患、悪性新生物、そしてアレルギー疾患の発症に関与しており<sup>34)35)</sup>、この10年でスギ花粉症患者は増加していることは、日本人の食事形態や生活スタイルによる変化も原因のひとつかもしれない。ITLN1のように腸管上皮細胞に発現している遺伝子が、気道上皮細胞でも誘導され、そして気道のアレルギー疾患に関与するという事実は非常に興味深い。腸管の免疫機能と代謝能力が、肺（気道）の免疫反応にも影響する<sup>36)</sup>。アレルギー性鼻炎の対策には、抗原曝露からの回避や適切な内服のみならず、食生活やスキンケアなど幅広い知見からの対策も必要であると考えられる。

利益相反 (conflict of interest) に関する開示：講演料：藤枝重治（鳥居薬品、田辺三菱製薬）

## 文 献

- 1) Sakashita M, Hirota T, Harada M, Nakamichi R, Tsunoda T, Osawa Y, et al. Prevalence of allergic rhinitis and sensitization to common aeroallergens in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 151: 255-61.
- 2) Yamada T, Saito H, Fujieda S. Present state of Japanese cedar pollinosis: the national affliction. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 632-9.
- 3) Fujieda S, Kurono Y, Okubo K, Ichimura K, Enomoto T, Kawauchi H, et al. Examination, diagnosis and classification for Japanese allergic rhinitis: Japanese guideline. *Auris Nasus Larynx* 2012; 39: 553-6.
- 4) Osawa Y, Suzuki D, Ito Y, Narita N, Ohshima Y, Ishihara Y, et al. Prevalence of inhaled antigen sensitization and nasal eosinophils in Japanese children under two years old. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012; 76: 189-93.
- 5) Imoto Y, Tokunaga T, Matsumoto Y, Hamada Y, Ono M, Yamada T, et al. Cystatin SN upregulation in patients with seasonal allergic rhinitis. *PLoS One* 2013; 2013: 8e67057.
- 6) Knight AK, Shreffler WG, Sampson HA, Sicherer SH, Noone S, Mofidi S, et al. Skin prick test to egg white provides additional diagnostic utility to serum egg white-specific IgE antibody concentration in children. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 842-7.
- 7) Custovic A, Lazic N, Simpson A. Pediatric asthma and development of atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013; 13: 173-80.
- 8) Christensen LH, Ipsen H, Nolte H, Maloney J, Nelson HS, Weber R, et al. Short ragweeds is highly cross-reactive with other ragweeds. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2015; 115: 490-5.
- 9) Schoos AM, Chawes BL, Folsgaard NV, Samandari N, Bonnelykke K, Bisgaard H. Disagreement between skin prick test and specific IgE in young children. *Allergy* 2015; 70: 41-8.
- 10) Macaubas C, Sly PD, Burton P, Tiller K, Yabuhara A, Holt BJ, et al. Regulation of T-helper cell responses to inhaled allergen during early childhood. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1223-31.
- 11) Meiler F, Zumkehr J, Klunker S, Ruckert B, Akdis CA, Akdis M. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med* 2008; 205: 2887-98.
- 12) Custovic A, Soderstrom L, Ahlstedt S, Sly PD, Simpson A, Holt PG. Allergen-specific IgG antibody levels modify the relationship between allergen-specific IgE and wheezing in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 1480-5.
- 13) 馬場廣太郎, 中江公裕. 鼻アレルギーの全国疫学調査 2008 (1998年との比較) —耳鼻咽喉科医およびその家族を対象として—. *Prog Med* 2008; 28: 2001-12.
- 14) Imoto Y, Takabayashi T, Sakashita M, Tokunaga T, Ninomiya T, Ito Y, et al. Peripheral basophil reactivity, CD203c expression by Cryj1 stimulation, is useful for diagnosing seasonal allergic rhinitis by Japanese cedar pollen. *Immun Inflamm Dis* 2015; 3: 300-8.
- 15) 藤枝重治, 伊藤有未, 坂下雅文, 意元義政. アレルギー性鼻炎のバイオマーカー. *アレルギー* 2013; 62: 523-31.
- 16) Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, Hamilton R, Spector SL, Tan R, et al. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 100: S1-148.
- 17) Fujisawa T, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Tokuda R, Usui S, et al. Biomarkers for allergen immunotherapy in cedar pollinosis. *Allergol Int* 2009; 58: 163-70.
- 18) Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, et al. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2009; 10: 706-12.
- 19) MacGlashan D Jr. Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic de-

- granulation processes. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 1365-77.
- 20) Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 184-94.
- 21) Yoshimoto T, Matsushita K. Innate-type and acquired-type allergy regulated by IL-33. *Allergol Int* 2014; 1: 3-11.
- 22) Dickinson DP, Thiesse M, Hicks MJ. Expression of type 2 cystatin genes CST1-CST5 in adult human tissues and the developing submandibular gland. *DNA Cell Biol* 2002; 21: 47-65.
- 23) Romas LM, Hasselrot K, Aboud LG, Birse KD, Ball TB, Broliden K, et al. A comparative proteomic analysis of the soluble immune factor environment of rectal and oral mucosa. *PLoS One* 2014; 9:e100820.
- 24) Matsumura Y. Role of Allergen Source-Derived Proteases in Sensitization via Airway Epithelial Cells. *J Allergy* 2012; 903659: 27.
- 25) Kato T, Takai T, Mitsuishi K, Okumura K, Ogawa H. Cystatin A inhibits IL-8 production by keratinocytes stimulated with Der p 1 and Der f 1: biochemical skin barrier against mite cysteine proteases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 169-76.
- 26) Tsuji S, Uehori J, Matsumoto M, Suzuki Y, Matsuhisa A, Toyoshima K, et al. Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J Biol Chem* 2001; 276: 23456-63.
- 27) Shin K, Wakabayashi H, Yamauchi K, Yaeshima T, Iwatsuki K. Recombinant human intelectin binds bovine lactoferrin and its peptides. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 1605-8.
- 28) Tan BK, Adya R, Randeva HS. Omentin: a novel link between inflammation, diabetes, and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2010; 20: 143-8.
- 29) 意元義政, 藤枝重治. スギ花粉症に関する鼻上皮細胞の網羅的遺伝子解析. 耳鼻免疫アレルギー 2011 ; 29 : 201-7.
- 30) Kerr SC, Carrington SD, Oscarson S, Gallagher ME, Solon M, Yuan S, et al. Intelectin-1 is a prominent protein constituent of pathologic mucus associated with eosinophilic airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189: 1005-7.
- 31) Pemberton AD, Rose-Zerilli MJ, Holloway JW, Gray RD, Holgate ST. A single-nucleotide polymorphism in intelectin 1 is associated with increased asthma risk. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 1033-4.
- 32) Devereux G. The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 869-74.
- 33) Begin P, Nadeau KC. Epigenetic regulation of asthma and allergic disease. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2014; 10: 27.
- 34) Palmer DJ, Huang RC, Craig JM, Prescott SL. Nutritional influences on epigenetic programming: asthma, allergy, and obesity. *Immunol Allergy Clin North Am* 2014; 34: 825-37.
- 35) Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* 2014; 158: 705-21.
- 36) Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med* 2014; 20: 159-66.