

令和元年6月5日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11084

研究課題名(和文) 口腔内細菌による食物アレルギー抑制効果の解明

研究課題名(英文) Analysis of suppression effects of food allergy elicited by oral bacteria

研究代表者

片岡 嗣雄 (Kataoka, Hideo)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60451390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、卵白アルブミンを抗原として食物アレルギーモデルマウスを作製し、その糞便中の生菌をMALDI-ToF-MS法(バイテックMS使用)で解析して、Citrobacter amalonaticusが顕著に増加していることを発見した。この菌は、マウス腸管上皮細胞株からTh2応答を促進するサイトカインであるIL-33の発現を誘導していた。以上より、食物アレルギーによって腸内で増殖したCitrobacterが、IL-33の産生を介して症状を増悪させていることが示された。また、同マウス口腔内ではIgAとそれに結合する細菌が増加しており、食物アレルギーによって口腔細菌叢も変化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔内細菌叢を構成する細菌は、全身疾患にも影響を及ぼすことは報告されているが、その詳細は未だ不明である。本研究では、食物アレルギーで増加する腸内細菌とそれに対する免疫応答が、口腔内細菌叢の構成を変化させることを示した。この研究成果によって、口腔内細菌叢と食物アレルギー症状の関連性が初めて明らかになった。近年、食物アレルギーの患者は増加傾向にあるが、その有効な治療法は未だ確立されていない。本研究の成果から、食物アレルギーの治療だけでなく予防においても口腔内細菌を活用できる可能性が示された。さらにこの成果から、他の自己免疫疾患の治療と予防にも口腔内細菌を活用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Food allergy is a life-threatening response to specific foods, and microbiota imbalance in gut is considered a cause of this disease. In this study, we analyzed effects of gut and oral microbiota on development of food allergy. A murine model of food allergy was established via ovalbumin (OVA) injection in BALB/c mice. Viable fecal bacteria in feces of the allergic mice were identified using MALDI-TOF MS. Citrobacter sp. increased in the feces of allergic mice and induced il33, known as a cytokine that stimulates Th2 responses, expression in colon 26, mouse intestinal epithelial cells. Orally administered Citrobacter sp. exacerbated systemic allergic symptoms and reduced intestinal Th17 cells. Salivary IgA and IgA-bound oral bacteria increased in the allergic mice. From the above, food allergy affects constitution of both gut and oral microbiota. Citrobacter sp. aggravated allergic symptoms by inducing IL-33 release from intestinal epithelial cells.

研究分野：免疫学、微生物学

キーワード：食物アレルギー 口腔内細菌叢 腸内細菌 IL-33 Citrobacter

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーの発症は、腸管における免疫抑制作用の破綻が原因の一つと考えられている。近年、腸内の常在細菌叢を構成する細菌の中に、腸管組織での免疫寛容を誘導し、Th2 応答を抑制する働きを示す菌種が存在することが報告された。一方、食物と共に腸管に達することが考えられる口腔内細菌の免疫応答については、口腔内疾患との関連性において研究が進められているものの、腸管での免疫応答に与える影響については未知であった。口腔内細菌は多種の細菌と共存しながら様々な免疫応答を誘導する性質を持つため、腸管組織での免疫応答、腸内細菌との相互作用に影響を及ぼすことが予想された。

2. 研究の目的

本研究では以下の実験を行い、口腔内常在菌が腸管の組織で誘導する免疫応答と腸内細菌との相互作用を詳細に解析し、口腔内細菌が食物アレルギーの抑制に及ぼす作用を解明すると共に、それに関与する細菌性因子を明らかにする。

(1) 腸内細菌叢の構成変化の解析

食物アレルギーマウスとコントロールマウスの糞便中に含まれる細菌の菌種と比率を比較し、食物アレルギーにおいて顕著に増加あるいは減少する菌種を同定する。

(2) 口腔内細菌による腸管細菌叢の構成変化の解析

口腔内細菌を食物アレルギーマウスならびにコントロールマウスに経口投与し、糞便中の細菌群の変化を解析して、腸内細菌叢に影響を及ぼす口腔内細菌を同定する。また、この細菌が腸管粘膜上皮細胞でどのような免疫応答を誘導するかを検討して、食物アレルギーに及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 食物アレルギーモデルマウスの作製

卵白アルブミン (OVA) を抗原として、アジュバントの水酸化アルミニウムゲルと混合して、近交系マウス (BALB/c、8 週齢雌、体重 20g) に腹腔内投与することで食物アレルギーモデルマウス (OVA/alum) を作製した。この際、OVA を 4 μ g/匹で腹腔内投与し、その一週間後に再び等量の OVA を同様に投与して感作した。そして、感作の一週間後から 10mg/匹の OVA を 1 日おきに 4 回経口投与した後、さらに一週間おいて 50mg/匹の OVA を経口投与して食物アレルギーを誘導した。食物アレルギーの成立は、血清中の抗 OVA-IgE 抗体価を ELISA 法により測定して評価し、食物アレルギー症状は、OVA 経口投与直後の直腸温で評価した。コントロール群マウスは、OVA の代わりにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を alum と混合して投与した (PBS/alum)。

(2) 食物アレルギーにおける腸内細菌叢の構成の解析

(1) で作成した OVA/alum ならびに PBS/alum の糞便を採取して 5% ヒツジ血液寒天平板上で嫌気培養し、形成されたコロニーを MALDI-TOF-MS 法 (VITEK[®]MS) で解析することで、食物アレルギーによって腸内で増加する生きた菌種を同定した。

(3) 食物アレルギーで著名な増加が見られた腸内細菌が免疫応答に及ぼす影響の解析

OVA/alum ならびに PBS/alum の糞便から単離した *Citrobacter* 属、*Enterococcus* 属および *Lactobacillus* 属の生菌でマウス腸管上皮細胞株 (colon26) を刺激して、細胞内におけるサイトカイン IL-33 の発現をリアルタイム PCR 法で評価した。また、食物アレルギーで著名な増加が見られた腸内細菌を単離、培養し、マウスに経口投与して、腸管内への定着を上記の VITEK[®]MS で、腸管粘膜固有層の T 細胞サブセットをフローサイトメトリーで解析した。

(4) 食物アレルギーが口腔内細菌叢に及ぼす影響の解析

OVA/alum ならびに PBS/alum の口腔内を滅菌綿棒で拭って生理食塩水に浸漬し、プルシアンブループレートに塗布して過酸化水素産生菌数を比較した。また、両群マウスに麻酔下でピロカルピン腹腔内注射を行い、採取した唾液中の IgA を ELISA にて定量した。さらに、同様の方法で採取したマウス唾液中の細菌を SYTO-BC で染色し、染色された細菌に IgA が結合しているかどうかを Alexa Flour 647 標識抗-mouse IgA 抗体を用いてフローサイトメトリーで計測した。

4. 研究成果

(1) 食物アレルギーモデルマウスの作製

上述の方法によって感作、誘導を行った OVA/alum ならびに PBS/alum から採血し、血清中の OVA 特異的 IgE 濃度を ELISA にて計測したところ、OVA/alum の方が PBA/alum より濃度が有意に高かった。また、OVA 経口投与直後の直腸温を計測したところ、直腸温低下率は、食物アレルギー群マウスの方が有意に大きかった。以上のことから、OVA/alum マウスは OVA を抗原として感作され OVA 特異的な IgE が産生されていること、そして、OVA 経口投与によってアナフィラキシーに特有な直腸温低下が見られたことから、OVA 特異的な食物アレルギーの症状が起こっていることが明らかになった。

(2) 食物アレルギーにおける腸内細菌叢の構成の解析

OVA/alum ならびに PBS/alum から採取した糞便を MALDI-TOF-MS 法 (VITEK[®]MS) にて解析したところ、*Citrobacter* 属、*Enterococcus* 属および *Lactobacillus* 属の生菌が同定できた。そして、OVA/alum から採取したサンプルでは *Citrobacter* 属が有意に増加していた (図 1)。この方法では、培養によってコロニーを形成した菌のみをサンプルとして解析するため、糞便を通して腸内の生菌のみの情報を得ることができる。この結果から、食物アレルギーでは腸管内で *Citrobacter* 属が増殖していることが示唆された。

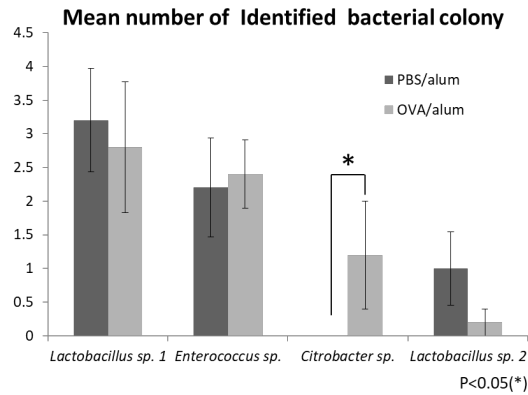


図1: マウス糞便中の生菌数(同定済みコロニー数)の比較

(3) 食物アレルギーで著名な増加が見られた腸内細菌が免疫応答に及ぼす影響の解析

まず、OVA/alum ならびに PBS/alum の糞便から単離した *Citrobacter* 属、*Enterococcus* 属および *Lactobacillus* 属の生菌でマウス腸管上皮細胞株 (colon26) を刺激して、細胞内におけるサイトカイン IL-33 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で評価した。その結果、単離した糞便中細菌の中で *Citrobacter* 属のみが濃度依存的に IL-33 遺伝子発現を誘導した (図 2)。

IL-33 は、主に腸管上皮細胞が侵害刺激に対応して放出するサイトカインであり、腸管粘膜固有層において Th2 応答を促進する作用がある¹⁾。したがって、この結果から、OVA/alum の腸内で有意に増加していた *Citrobacter* 属は、腸管上皮細胞を刺激し IL-33 産生を誘導することで食物アレルギー症状を増悪させていることが示唆された。

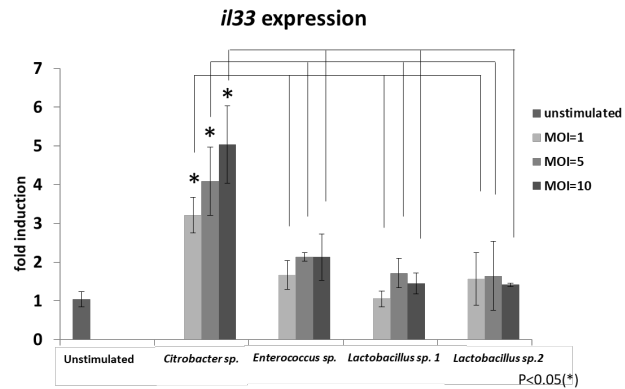


図2: 腸管上皮細胞からのIL-33誘導能の比較

次に、*Citrobacter* 属細菌をマウスに経口投与して、一週間後に糞便中の生菌を上述の MALDI-TOF-MS 法 (VITEK[®]MS) にて解析することで、*Citrobacter* 属細菌が両群マウス腸管内にどの程度定着するかを見た。その結果、OVA/alum では PBS/alum より有意に多くの *Citrobacter* 属生菌が糞便中に見られた。また、OVA/alum では、*Citrobacter* 属細菌の投与により OVA 経口投与後の直腸温低下率が有意に増加し、*Citrobacter* 属細菌による食物アレルギー症状の増悪作用が示された。さらに、*Citrobacter* 属細菌を両群マウスに経口投与した後、腸管粘膜固有層のヘルパー T 細胞サブセットをフローサイトメトリーにて検索したところ、PBS/alum では *Citrobacter* 属細菌の投与によって Th17 の占有率が増加していたが、OVA/alum ではこの増加が見られなかった (図 3)。

Th17 は、サイトカイン IL-17 などを産生することで好中球を集積し、病原性細菌の排除において中心的な役割を果たすヘルパー T 細胞である²⁾。したがってこれらの結果から、PBS/alum では、投与された *Citrobacter* 属細菌に対して Th17 の応答が促進され *Citrobacter* 属細菌が排除されるが、OVA/alum ではアレルギーによりヘルパー T 細胞のバランスが Th2 に偏っているため Th17 応答が促進されず、*Citrobacter* 属細菌が排除されず腸内に長期間残存することが示唆された。そして、この残存した *Citrobacter* 属細菌が腸管上皮細胞から IL-33 の産生を促進することで、食物アレルギー症状は増悪していくものと考えられる。

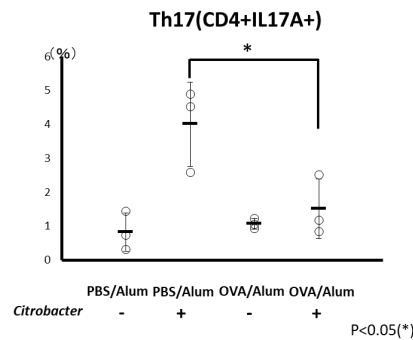


図3: *Citrobacter*がTh17応答に及ぼす影響の解析

(4) 食物アレルギーが口腔内細菌叢に及ぼす影響の解析

まず、OVA/alum ならびに PBS/alum の口腔内を拭ったサンプルをプルシアンブループレートに塗布して培養した。プルシアンブループレートは、過酸化水素を産生する細菌がコロニーを形成すると、コロニー周囲に青い呈色が見られる³⁾。その結果、PBS/alum では過酸化水素産生菌のコロニー形成に伴う青色の呈色が多く見られたが、OVA/alum ではこの呈色がほとんど見られなかった (図 4A)。過酸化水素を産生する細菌は、ヒトにおいてもマウスにおいても口腔内細菌叢の優勢菌種である。したがってこの結果から、OVA/alum では食物アレルギー症状に伴い、

口腔内細菌叢の構成が変化していることが示唆された。次に、両群マウスから採取した唾液中の IgA を ELISA にて定量すると、OVA/alum の唾液中 IgA が有意に増加していた(図 4B)。また、唾液中の細菌を SYTO-BC で染色し、染色された細菌に IgA が結合しているかどうかを Alexa Flour 647 標識 a-mouse IgA 抗体を用いてフローサイトメトリーで計測したところ、OVA/alum の方が唾液中の IgA 結合細菌の比率が高かった(図 4C)。これらの結果から、食物アレルギーによって腸内で増加する菌種があり、それが原因となって粘膜免疫循環帰巢システムにより唾液中にも IgA が増加する。そして、この増加した IgA が口腔内で常在菌と結合して口腔内細菌叢の構成が変化することが示唆された。

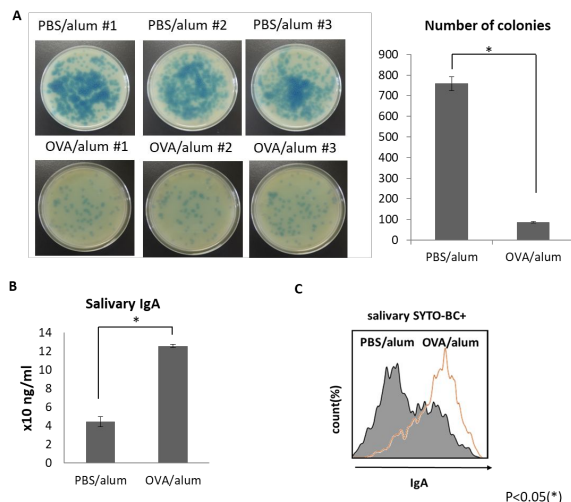


図4:食物アレルギーが口腔内細菌叢に及ぼす影響の解析

このように、当初の目的である食物アレルギーを抑制する口腔内細菌の菌種同定には到達できなかった。しかし、腸内細菌においては、食物アレルギー症状に影響を及ぼす細菌性因子とそのメカニズムについては多くの知見が得られた。さらに、食物アレルギーは、腸内細菌の構成変化とそれに対する免疫応答を通じて口腔内細菌叢に影響を及ぼしていることも明らかとなった。本研究は、今年度新たに科研費基盤研究(C)で採択となった研究課題「口腔内細菌の経口投与による 型糖尿病ならびに食物アレルギーの抑制効果の解明 (19K10096)」で、その内容を進めていく予定である。

<引用文献>

- 1) Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2016 Nov;16(11):676-689.
- 2) Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008 Apr;28(4):454-467.
- 3) Saito M, Seki M, Iida K, Nakayama H, Yoshida S. A novel agar medium to detect hydrogen peroxide-producing bacteria based on the prussian blue-forming reaction. *Microbiol Immunol.* 2007;51(9):889-892.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

片岡 嗣雄、桑田 啓貴 MALDI-TOF-MS analysis of gut microbiota in murine model of food allergy 第 58 回 歯科基礎医学会 2016

片岡 嗣雄、桑田 啓貴 MALDI-TOF-MS analysis of gut microbiota in murine model of food allergy 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会 2017

Matsui S, Kataoka H, Miyakubo A, Miyake S, Maruoka Y, Kuwata H Analysis of Intestinal dysbiosis in a murine model of food allergy 第 72 回日本口腔科学会学術集会 2018

Matsui, S., Kataoka, H., Maruoka, Y. and Kuwata, H Analysis of intestinal dysbiosis in murine model of food allergy. The International Conference on Oral Immunology & Oral Microbiology 2018

松井 庄平、片岡 嗣雄、丸岡 靖史、桑田 啓貴 食物アレルギーマウスにおける腸内細菌叢のディスバイオーシスの解析. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会. 2018

片岡 嗣雄、松井 庄平、深町 はるか、森崎 弘史、桑田 啓貴 食物アレルギーマウスにおける腸内細菌叢のディスバイオーシスの解析. 食物アレルギーマウスにおける腸内細菌叢のディスバイオーシスの解析. 第 33 回日本酸化ストレス学会関東支部会 2018

松井 庄平、片岡 嗣雄、深町 はるか、森崎 弘史、岡橋 暢夫、桑田 啓貴 Intestinal dysbiosis elicited excessive Th2 responses induces oral dysbiosis. 第 92 回日本細

菌学会総会 2019

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕(計 0件)

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：桑田 啓貴

ローマ字氏名：Kuwata Hirotaka

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