

令和 2 年 9 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08389

研究課題名(和文)常在細菌による免疫制御ネットワークの解明

研究課題名(英文)The host immune responses influenced by resident microbiota

研究代表者

肥田 重明(Hida, Shigeaki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授

研究者番号：10345762

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)：アレルゲンや環境因子と病原体センサーを含めた2型免疫応答の関与について未だ明らかになっていない。さらに常在細菌である黄色ブドウ球菌は、アトピー性皮膚炎の発症や悪化と相関があるとされているが、その詳細な分子機構は明らかになっていない。今回、我々は黄色ブドウ球菌由来の分子である-ヘモリジンやSSL12が、IgE非依存的にマスト細胞を活性化し、化学伝達物質やサイトカイン産生を誘発することを報告した。これらの結果は、細菌由来分子がマスト細胞などの自然免疫細胞を活性化し、アレルギー性疾患などの発症や炎症の慢性化に関与している可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では環境因子による自然免疫細胞群の活性化と免疫バランスには偏りが生じうること、そしてそれが各種免疫疾患のQOLに影響することに注目した。これまで不明であった細菌と宿主免疫細胞の相互作用を明らかにする研究から、疾患の基礎研究と常在細菌の分類や性質を解析することによって、感染症や免疫反応の理解と臨床薬学への応用が本研究の成果として期待される。また、本研究課題の解析により、免疫細胞や組織細胞の制御をターゲットにした新規免疫制御方法の開発が可能となり、これまでの治療法に加えたアレルギー、自己免疫疾患、感染防御の新規治療、予防法の開発に対して指針を与えることにつながる。

研究成果の概要(英文)：Mast cells and basophils have recently been recognized as an effectors of type 2 immune responses in response to various antigen-specific IgE. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bacteria is a common pathogen. It colonizes approximately 30% of the population asymptotically, but may cause a variety of inflammatory diseases such as allergy. We found that *S. aureus*-derived alpha-hemolysin and SSL12 evokes the degranulation and cytokine production by mast cells without cell membrane damage. These findings indicate bacteria-derived molecules likely play important roles in both initiation phase and effector phase of allergic and type 2-immune responses.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー 毒素 サイトカイン 炎症 細菌 自然免疫細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体内の常在細菌には、皮膚や腸管、粘膜組織などに生息し、宿主との相互作用によって、生体の恒常性を維持している微生物が存在している。しかしながら、哺乳類の宿主生体に対し、食中毒や敗血症など悪影響を及ぼす細菌も多量存在することが知られている。病原性細菌である黄色ブドウ球菌などは、エンテロトキシンのような毒素に加えて、複数のプロテアーゼなどの様々な分子を発現・産生しており、これらの分子が宿主の免疫応答に影響を与えていると考えられている。環境因子のひとつである常在細菌由来の物質と宿主の免疫相互作用を明らかにすることによって、炎症性疾患の発症機構や生体の恒常性維持の解明につながることを期待できる。

### 2. 研究の目的

結核菌やウイルス感染症については、Toll 様受容体 (TLR) や細胞質内の RIG-I, インフラマソームなどのパターン認識受容体 (pattern-recognition receptor: PRR) を介した病原体の認識と病原体排除の免疫応答がよく知られている。その一方で、I 型アレルギー性疾患やある種の寄生虫感染症に関与する 2 型免疫応答については、病原体受容体を含めた詳細な免疫分子機構は不明のままである。

アレルギー性疾患においては、外来のアレルゲンや環境因子と宿主免疫細胞に発現する病原体センサーを含めた液性免疫の分子メカニズムについて未だ明らかになっておらず、常在細菌由来の分子群を用いた免疫細胞の活性化機構の解析は、疾患の発症・悪化・慢性化を明らかにする上で重要であると考えている。本研究課題ではアレルギー反応や寄生虫感染症などで起こる 2 型免疫応答に関与する自然免疫系細胞として、マスト細胞、好塩基球、マクロファージに着目した。免疫反応を惹起する常在細菌由来の毒素や菌体因子を明らかにし、免疫細胞に発現している病原由来分子を認識する受容体とその刺激に伴う化学伝達物質の産生やサイトカイン IL-4/IL-13 産生の分子機構について解析を行う。IgE とアレルゲンによる免疫応答と常在細菌の相互作用やアレルギー性疾患発症や悪化との関連性について新しい知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

マウスの生体内には病原体センサー分子を発現している自然免疫担当細胞は少数しか存在しないため、骨髄細胞からサイトカインを用いて自然免疫細胞を誘導して解析を行った。黄色ブドウ球菌などの種々の常在細菌由来分子を用いて、化学伝達物質やサイトカイン産生を指標に免疫応答を検証した。微生物由来の分子については、そのリコンビナントタンパク質をエンドトキシン活性のない変異型大腸菌 (ClearColi) を用いて、これまでに黄色ブドウ球菌やピフィズス菌の細胞表面タンパク質や分泌性の液性分子を中心に作製した。免疫応答の解析に用いた細胞は、マウスの骨髄を IL-3 で約 4 週間培養した細胞をマウス骨髄由来マスト細胞 (Bone marrow-derived mast cells; BMMC)、約 2 週間培養した細胞 (c-kit<sup>+</sup>, FcεRIα<sup>+</sup>) を培養好塩基球として実験に用いた。また、M-CSF を用いてマクロファージを分化誘導し実験に用いた。これらの自然免疫細胞を用いて、細菌由来リコンビナントタンパク質による刺激を行い脱顆粒とサイトカイン産生について検討した。さらに TLR 受容体欠損マウスや抗体受容体欠損マウス由来の細胞を用いることで、細菌由来分子の受容体の同定やシグナル伝達の詳細な解析を行った。

ラット好塩基球様白血球細胞株 RBL は、黄色ブドウ球菌の培養上清やリコンビナントタンパク質に脱顆粒や IL-4 mRNA 発現を誘導しなかった。そこでレトロウイルスベクターを用いて、転写因子 NFAT のプロモーター依存的に GFP や CD2 を発現するレポーター細胞株を樹立した。このレポーター細胞は、イオノマイシンや IgE/抗原複合体刺激で GFP を濃度依存的に発現する。このレポーター細胞株に種々の遺伝子を導入することで、環境因子の受容体の同定やシグナル伝達制御機構について解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 黄色ブドウ球菌は複数の膜孔形成毒素を分泌し、ヒトやマウスなどの哺乳類の血球成分を破壊する。その一つ ヘモリジンは、多量体を細胞膜上で形成し細胞を傷害することが知られている。マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) に対する作用を検討したところ、予想通り ヘモリジンは多量体を形成し、細胞表面上に結合した。しかしながら、BMMC の細胞死は誘導しなかった。また、ヘモリジン単独では、濃度を上げてヒスタミンなどの化学伝達物質の脱顆粒を誘導しなかった。しかしながら、IgE/抗原複合体やイオノマイシンとヘモリジンを同時に刺激した場合、IgE/抗原複合体やイオノマイシン単独刺激に比較して、有意に  $\alpha$ -ヘキソサミンナーゼを指標にした脱顆粒を促進した。これらの結果は、黄色ブドウ球菌が存在する場合、アレルギー反応が増強される可能性があることを示している。その分子機構を明らかにするために、培養液中のイオン濃度を変えてマスト細胞の反応性について調べた。細胞外 K<sup>+</sup> (カリウム) 濃度を 130 mM

にした場合、ヘモリジンによる脱顆粒の増強効果は観察できなくなった。膜孔形成に依存した陽イオンの細胞内外の流出入が、脱顆粒の増強に関与している可能性がある。そこで、ヘモリジンの膜孔形成に必須の領域を削除した変異体ヘモリジンを用いたところ、細胞表面への結合は見られたものの、脱顆粒の増強効果は観察できなかった。これらの結果は、少なくとも膜孔形成はアレルゲンなどの刺激による脱顆粒増強効果に必須であることを示している。

(2) 黄色ブドウ球菌由来の分泌毒素群であるスーパー抗原様物質 (Staphylococcus superantigen-like proteins ; SSL) ファミリー分子についても、マスト細胞の活性化作用の有無について検討した。SSLは14種類の分子群から構成されている。三次元立体構造がSEBなどのスーパー抗原と類似しているが、SSLの分子間のアミノ酸相同性は30-50%程度とかなり低い。これら14種類の毒素を用いて、BMDCの活性化を調べたところ、SSL12がマスト細胞の脱顆粒やサイトカイン産生(IL-6, IL-13)を単独で誘導した。これまでに黄色ブドウ球菌由来毒素である $\alpha$ -toxinも同様の作用を示すことが報告されているが、 $\alpha$ -toxinは細胞傷害性を示すのに対し、SSL12は細胞死を誘導しなかった。これらの結果は、 $\alpha$ -toxinとSSL12は、異なる分子機構でマスト細胞を活性化していることを示している。さらに、*in vivo*においてもSSL12は血管透過性の亢進を引き起こすことを見出した。これまでの結果から、SSL12はマスト細胞の細胞表面上の受容体に結合し、脱顆粒やサイトカイン産生を誘導していると考えられた。さらに骨髄や脾臓に存在する好塩基球を用いてSSL12に対する反応性を調べたところ、IL-4, IL-6などのサイトカインを大量に産生した。骨髄由来培養好塩基球を用いた場合でも同様の結果が得られたことから、少なくともマスト細胞や好塩基球にはSSL12の受容体が存在すると考えられる。TLR2およびTLR4遺伝子欠損マウス由来のマスト細胞や好塩基球を用いた場合でも、野性型マウスを同程度のサイトカイン産生が観察されたことから、これらの病原体センサー分子の関与は無いと考えている。SSL12を認識する受容体は、現在探索中である。アトピー性皮膚炎では、多くの患者で黄色ブドウ球菌の感染が報告されていたが、その意味は不明であった。今回の我々の研究成果は、黄色ブドウ球菌由来の毒素群が、アレルギー炎症の病態に関与していることを示唆するものであると考えている。

(3) 植物性アレルゲンのひとつであるパピインが、*in vivo*で2型免疫応答を誘導することが報告された。マウス骨髄由来の培養好塩基球を用いた実験系では、パピインはIL-4やIL-6等のサイトカインを産生誘導することが観察されたため、その受容体やシグナル伝達機構について解析を行った。システインプロテアーゼ阻害剤存在下で好塩基球を刺激した場合は、IL-4やIL-6産生が抑制されたことから、そのプロテアーゼ活性が必須の役割を果たしていると考えられる。また抗体受容体のアダプター分子であるFcR $\gamma$ 遺伝子欠損マウス由来の好塩基球ではパピインによるサイトカイン産生が全く認められなくなった。この結果はパピインを認識している受容体がFcR $\gamma$ を介して、IL-4産生シグナルを伝えていると考えられた。

マウスCD8aはパピイン感受性で切断されることから、CD8a/FcR $\gamma$ の融合タンパクを作成した。RBL-pNFAT-GFPレポーター細胞に発現させることで、パピイン刺激応答性を観察したところ、興味深いことにGFP発現が誘導された。この結果からプロテアーゼによる受容体の切断が重要である可能性が示唆された。好塩基球やマスト細胞特異的な分子であるFcRIに注目したが、フローサイトメトリー解析やタンパク質プロットではパピインによる切断は確認できなかったことから、他のFcR結合分子の可能性が示唆された(未発表)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi M, Kitano T, Nishiyama S, Sanjo H, Onozaki K, Taki S, Itoh S, Hida S.	4. 巻 551
2. 論文標題 Staphylococcal superantigen-like 12 activates murine bone marrow derived mast cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 350-355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.02.052.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi K, Itoh S, Morikawa A, Onozaki K, Taki S, Tsuji T, Hida S.	4. 巻 508
2. 論文標題 Staphylococcal -hemolysin does not induce cell damage in murine mast cells but it augments the degranulation induced by Fc RI cross-linking and ionomycin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 263-269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.11.113.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kohno K, Itoh S, Hanai A, Takii T, Fujiwara T, Onozaki K, Tsuji T, Hida S	4. 巻 497
2. 論文標題 Identification of matrix metalloproteinase 9-interacting sequences in staphylococcal superantigen-like protein 5.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 713-718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.02.138.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura T, Itoh S, Onozaki K, Tsuji T, Hida S	4. 巻 1
2. 論文標題 Identification of the Regions Responsible for Binding to Human Immunoglobulin G in Staphylococcal Superantigen-Like Protein 10	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BPB reports	6. 最初と最後の頁 35-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura T, Hida S, Kitazawa M, Fujii C, Kobayashi A, Takeoka M, Taniguchi SI, Miyagawa S	4. 巻 293
2. 論文標題 Fascin1 suppresses RIG-I-like receptor signaling and interferon- production by associating with I B kinase in colon cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6326-6336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.819201.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itoh S, Takii T, Onozaki K, Tsuji T, Hida S.	4. 巻 485
2. 論文標題 Identification of the blood coagulation factor interacting sequences in staphylococcal superantigen-like protein 10	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 201-208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.02.053.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Furuhashi H, Irie R, Hida S, Okada y, Kurihara C, Ebinuma H, Nakamoto N, Saito H, Hibi T, Miura S, Hokari R, Kanai T	4. 巻 67
2. 論文標題 Free cholesterol accumulation in liver sinusoidal endothelial cells exacerbates acetaminophen hepatotoxicity via TLR9 signaling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 780-790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2017.05.020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北野拓真, 元木優也, 山条秀樹, 瀧伸介, 伊藤佐生智, 肥田重明
2. 発表標題 IL-3が炎症時の好塩基球のIgE反応性と体内局在を制御する
3. 学会等名 第65回 日本薬学会 東海支部総会・大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Naoto Fujioka, Yuma Itoh, Shungo Sasaki, Saotomo Itoh, Shun'ichiro Taniguchi, Shigeaki Hida
2. 発表標題 Immune modulation by Bifidobacteria-derived molecules
3. 学会等名 第49回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 元木優也, 北野拓真, 瀧伸介, 伊藤佐生智, 肥田重明
2. 発表標題 炎症時における好塩基球の末梢リンパ組織への局在の制御
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会2019
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 前原有紀子, 竹内亮人, 北野拓真, 瀧伸介, 伊藤佐生智, 肥田重明
2. 発表標題 自然免疫細胞に対するスタチン系薬剤の影響
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Shigeaki Hida
2. 発表標題 Molecular regulation of type-2 immune responses
3. 学会等名 大韓薬学会2019秋季国際学術大会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 伊藤佐生智, 金光東, 小林正都, 北野拓真, 滝藤遥希, 林知仁, 井上ひかる, 占部彩花, 大矢進, 肥田重明
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌のStaphylococcal superantigen-like (SSL) 12によるマスト細胞活性化作用
3. 学会等名 第140回 日本薬学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 金光東, 小林正都, 北野拓真, 滝藤遥希, 林知仁, 占部彩花, 肥田重明, 伊藤佐生智
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌毒素SSL12はマスト細胞を活性化する
3. 学会等名 第31回 微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 北野拓真, 岸田啓太郎, 瀧伸介, 伊藤佐生智, 肥田重明
2. 発表標題 炎症時におけるIL-3依存的な好塩基球のIgE刺激応答性の上昇
3. 学会等名 第83回 日本生化学会 中部支部例会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Takuma Kitano, Saotomo Itoh, Shinsuke Taki, Shigeaki Hida
2. 発表標題 IL-3 changes activation-dependent intracellular signaling pathways for IL-4 production in and tissue localization of murine basophils
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 藤岡直人, 林知仁, 伊藤佐生智, 肥田重明
2. 発表標題 微生物由来分子による免疫制御機構
3. 学会等名 フォーラム2018 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 林知仁, 伊藤佐生智, 森川ありさ, 辻勉, 肥田重明
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌 毒素のマウスマスト細胞脱顆粒増強作用
3. 学会等名 第19回 Pharmaco-Hematology Symposium
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 林知仁, 伊藤佐生智, 森川ありさ, 辻勉, 肥田重明
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌 毒素はFc RIクロスリンク, イオノフォア, トキシンによるマウスマスト細胞からの脱顆粒を促進する
3. 学会等名 第30回 微生物シンポジウム
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 北野拓真, 元木優也, 山条秀樹, 瀧伸介, 伊藤佐生智, 肥田重明
2. 発表標題 IL-3が炎症時の好塩基球のIgE反応性と体内局在を制御する
3. 学会等名 第64回 日本薬学会 東海支部総会・大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 河野克洋, 伊藤佐生智, 辻勉, 肥田重明
2. 発表標題 Staphylococcal superantigen-like protein 5(SSL5)のMMP-9プロテアーゼ活性阻害領域の同定
3. 学会等名 第29回 微生物シンポジウム
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 北野拓真, 柴田将成, 蓮池浩太, 瀧伸介, 伊藤佐生智, 肥田重明
2. 発表標題 環境因子による好塩基球やマスト細胞の活性化制御機構
3. 学会等名 フォーラム2017 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Arisa Morikawa, Saotomo Itoh, Hideki Sanjo, Shinsuke Taki, Shigeaki Hida
2. 発表標題 Innate immune cells sense Staphylococcus aureus-derived cysteine protease via their cell surface molecules to produce proinflammatory cytokines.
3. 学会等名 第46回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 伊藤佐生智, 河野克洋, 辻勉, 肥田重明
2. 発表標題 Staphylococcal superantigen-like protein 5のMMP-9に対する結合 / 阻害に関 わる最小機能領域の同定
3. 学会等名 第138回 日本薬学会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	伊藤 佐生智  (Itoh Saotomo)  (70308013)	名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授    (23903)	