

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10096

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Investigation of suppressive effects on food allergy and type 1 diabetes by means of oral administration of oral bacteria.

研究代表者

片岡 嗣雄 (Kataoka, Hideo)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：60451390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 型糖尿病モデルマウスと食物アレルギーモデルマウスの糞便中で増加していた *Citrobacter* 属細菌のアレルギー症状増悪メカニズムを明らかにした。*Citrobacter koseri* 生菌は、マウス樹状細胞株 DC2.4 において、多量に産生する ATP を介して、Th2 サイトカインである IL-33 の発現を強く誘導した。本菌の LPS は Toll-like receptor 4 シグナルを介して IL-33 発現を抑制していた。以上のことから、*C. koseri* は、多量に産生した ATP で IL-33 発現を誘導し、アレルギー症状を増悪するが、その死菌から遊離した LPS は症状を抑えている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果は、食物アレルギーと腸内細菌の関連性を分子レベルで明らかにしたものであり、今後、食物アレルギーの予防と治療において新たな方法を確立するための知見となり得る。腸内細菌の LPS が TLR4 シグナルを介して、アレルギー症状の増悪につながる Th2 応答を抑制しているという知見は、常在細菌叢と自然免疫応答のバランスが免疫疾患の予防につながる可能性を示唆したものであり、食物アレルギーにとどまらず、他の免疫疾患の予防法にも応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)： We previously reported that *Citrobacter* species, which have propagated in the feces of mice with food allergy and type 1 diabetes, were found to worsen allergic symptoms by inducing IL-33 production in intestinal epithelial cells. In this study, we therefore analyzed whether *Citrobacter koseri* induces IL-33 production in dendritic cells. Bacterial LPS derived *C. koseri* JCM1658 was extracted by phenol-water method. Expression of IL33 in a DC2.4 mouse dendritic cell line was detected by real time PCR. Expression of IL33 was induced by live bacteria of *C. koseri*, but not by extracted LPS in DC2.4. LPS reduced Expression of IL33 induced by live bacteria and DC2.4 proliferation. Live bacteria of *C. koseri* increased ATP concentration in the culture supernatant but LPS inhibited this increment. From the above, *C. koseri* increases IL-33 production through ATP production but LPS restricted the production by inhibiting dendritic cell proliferation.

研究分野：微生物学 免疫学

キーワード：食物アレルギー 微生物叢 型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

型糖尿病の患者は世界で増加しているが、インスリン製剤の継続的使用以外に有効な治療は困難である。近年、腸内細菌の経口投与が発症を遅らせることが示されたが、型糖尿病患者の多くが歯周病を併発していることから、口腔内細菌も発症の原因である可能性が考えられた。一方、食物アレルギーの発症は、腸内細菌叢の構成変化に伴う粘膜免疫系の破綻が原因の一つと考えられている。食物アレルギー患者と型糖尿病患者の免疫応答に類似性があることが報告されており、申請者は、型糖尿病モデルマウスと食物アレルギーモデルマウスの唾液中の細菌構成が類似しているという実験結果を得た。これらのことは、型糖尿病と食物アレルギーの両方の疾患に共通して増加あるいは減少している口腔内常在細菌が存在していることを示している。この細菌が引き起こす免疫応答を解析することは、これらの免疫疾患のメカニズムを解明することにつながると考えられ、さらに、高価な製剤に頼らずに複数の免疫疾患を同時に治療できる方法を確立できることも示唆された。

2. 研究の目的

本研究では以下の実験を行い、食物アレルギーならびに型糖尿病で顕著な増減がみられる常在菌が腸管の組織で誘導する免疫応答を詳細に解析し、これらの免疫疾患の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。また、これらの免疫疾患に特徴的な常在細菌叢が、互いの症状にどのような影響を及ぼすのかを明らかにして、両方の疾患の予防と治療に効果のある細菌を同定することも目的とする。

(1) *Citrobacter* 属細菌による食物アレルギー増悪メカニズムの解析

申請者は、食物アレルギーモデルマウスを作製してその糞便中の細菌を精査し、その糞便中で *Citrobacter* 属細菌が最も増加していたこと、そして、この *Citrobacter* 属細菌は、腸管上皮細胞において、Th2 サイトカインである IL-33 の発現を誘導してアレルギーを増悪させることを既に報告した。そこで、本研究では、*Citrobacter* 属細菌がどのようにアレルギー症状を増悪させているのか、その詳細な分子メカニズムを明らかにする。

(2) 口腔内細菌が型糖尿病ならびに食物アレルギー症状に及ぼす影響の解析

口腔内細菌を食物アレルギーマウスならびに型糖尿病モデルマウスに経口投与し、食物アレルギー症状ならびに血糖値にどのような変化が起こるかを観察する。そして、糞便中の細菌群の変化を解析して、腸内細菌叢の構成に及ぼす影響を明らかにする。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、食物アレルギーならびに型糖尿病の症状改善に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 樹状細胞における *Citrobacter* 属細菌による IL-33 発現誘導の解析

腸管粘膜では、上皮細胞だけでなく樹状細胞も粘膜免疫機構において重要な役割を果たすことが知られていることから、*Citrobacter* 属細菌が樹状細胞において IL-33 の発現を促進するかどうかを解析した。マウス樹状細胞株 (DC2.4) を *Citrobacter koseri* JCM1658, *Escherichia coli* K12, 食物アレルギーモデルマウス糞便から分離した *Enterococcus gallinarum* の生菌でそれぞれ刺激し (OD₆₀₀=0.5 logarithmic phase, MOI=5, 24h) IL-33 の発現はリアルタイム PCR で評価した。また、生菌と死菌による IL-33 発現誘導の差を比較するため、100、30 分で熱処理した菌と同様に DC2.4 を刺激し、IL-33 の発現を計測した。

(2) IL-33 発現誘導における *Citrobacter* 属細菌由来 LPS の役割の解析

Citrobacter 属細菌はグラム陰性菌なので、様々な自然免疫応答を引き起こす細菌構成成分であるリポ多糖 (LPS) を持っている。そこで、*C. koseri* JCM1658 からフェノール・クロロホルム法で LPS を抽出し、DC2.4 を前処理 (10ng/ml 1hr) した後、*C. koseri* 生菌 (OD₆₀₀=0.5 logarithmic phase, MOI=5) で 24h 刺激して IL33 の発現をリアルタイム PCR で評価した。また、LPS 前処理によって樹状細胞の生菌除去活性に変化があるかどうかを明らかにするため、LPS 前処理の後に *C. koseri* 生菌を投与した DC2.4 の培養上清を BHI プレートに播いて形成されたコロニー数を計測した (CFU/50ml sup.)。

(3) IL-33 発現誘導における *Citrobacter* 属生菌由来 ATP の役割の解析

Citrobacter 属生菌と死菌で樹状細胞の応答がどのように異なるかを解析するうえで、生菌のみが産生する細胞外 ATP に着目し、IL-33 発現誘導に及ぼす影響を調べた。ATP のレセプターである P2X7R のアンタゴニストである A-438079 で DC2.4 を前処理 (10μM, 40μM, 1h) した後、*C. koseri* 生菌で刺激して IL-33 発現を計測した。また、LPS 前処理の有無による培養上清中の ATP 量は、BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega) にて計測し比較し

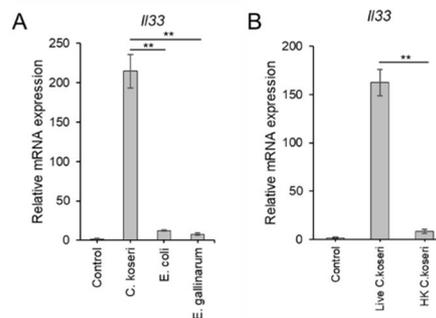
た。さらに、前述した他の腸内細菌 (*E. coli* K12, *E. gallinarum*) の生菌 (OD₆₀₀=0.5 logarithmic phase, MOI=5) を DC2.4 培養上清中に添加し、同様に 24h 後の ATP 濃度を計測し比較した。

4. 研究成果

(1) 樹状細胞における *Citrobacter* 属細菌による IL-33 発現誘導の解析

上述の方法で IL-33 の発現を計測したところ、*C. koseri* は *E. coli*, *E. gallinarum* よりも著しく強く IL33 発現を誘導した (Fig. 1A)。また、*C. koseri* 生菌を 100、30 分で熱処理して IL-33 発現をみたところ、熱処理によって IL-33 発現誘導は大きく損なわれていた (Fig. 1B)。この結果から、*C. koseri* の生菌に IL-33 発現を誘導する活性があることが示唆された。

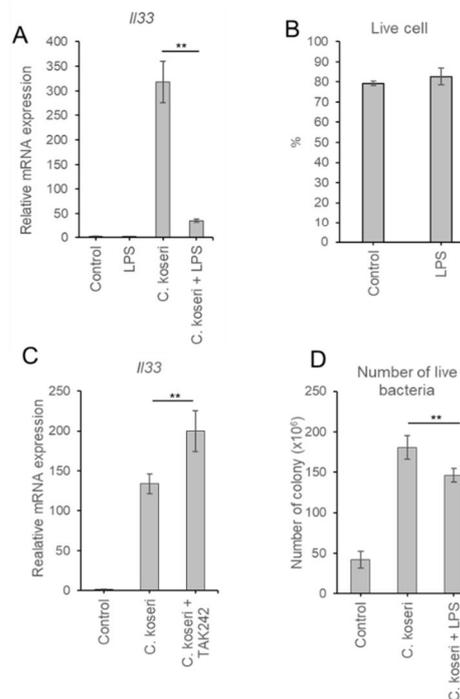
Fig. 1



(2) IL-33 発現誘導における *Citrobacter* 属細菌由来 LPS の役割の解析

抽出 LPS は IL33 の発現を誘導せず、*C. koseri* 生菌が誘導する IL33 発現増加を抑制していた (Fig. 2A)。LPS による前処理は DC2.4 の生存率に影響しなかった (Fig. 2B)。LPS - TLR4 シグナル伝達の阻害剤である TAK242 で前処理 (1μM 1h) した後に生菌で刺激すると IL33 発現が増加した (Fig. 2C)。このことから、*C. koseri* 由来 LPS には生菌による IL-33 発現誘導を抑制する作用があることが示された。

Fig. 2



また、Fig. 1B の結果から、生菌が IL-33 発現誘導に参与していることが示唆されたので、LPS 前処理が生菌の増減に及ぼす影響を調べた。LPS 前処理の後に *C. koseri* 生菌を投与した培養上清では、生菌数を示すコロニー数は有意に減少していた (Fig. 2D)。このことから、*C. koseri* 由来 LPS は樹状細胞による殺菌を促進することで生菌による IL-33 発現誘導を抑制している側面もあることが示された。

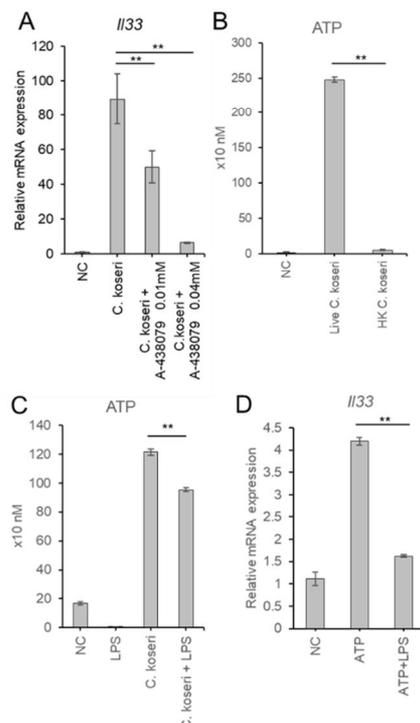
(3) IL-33 発現誘導における *Citrobacter* 属生菌由来 ATP の役割の解析

A-438079 は濃度依存的に IL-33 発現誘導を抑制していた (Fig. 3A)。*C. koseri* の生菌を添加して 24h 後に検出された培養上清中の ATP は、添加の際に熱処理で死菌にしておくと、ほとんど検出されなかった (Fig. 3B)。このことから、*C. koseri* 生菌が放出する細胞外 ATP が IL-33 発現を誘導していることが示唆された。LPS 前処理によって培養上清中の ATP は有意に減少していた (Fig. 3C)。このことは、LPS 前処理によって生菌が減少 (Fig. 2D) したことに対応している。また、ATP 単独の刺激でも IL-33 発現は誘導され、LPS 前処理によってこの発現誘導は抑制された (Fig. 3D)。このことから、LPS 認識による細胞内シグナルは、ATP 刺激による細胞内シグナルを抑制していることが示された。

さらに、他の腸内細菌と *C. koseri* の ATP 産生量と生菌数を比較した。Fig. 1A で用いた *E. coli*, *E. gallinarum*, *C. koseri* の生菌

(OD₆₀₀=0.5 logarithmic phase, MOI=5) を DC2.4 培養上清中に添加し、24h 後の ATP 濃度を計測したところ、*C. koseri* を添加した培養上清中の ATP 濃度は、他の 2 菌種を添加した培養上清と比較して有意に高かった (Fig. 4A)。これらの培養上清中の生菌数を計測 (CFU/50ml sup.) すると、*C. koseri* の生菌数は他の 2

Fig. 3



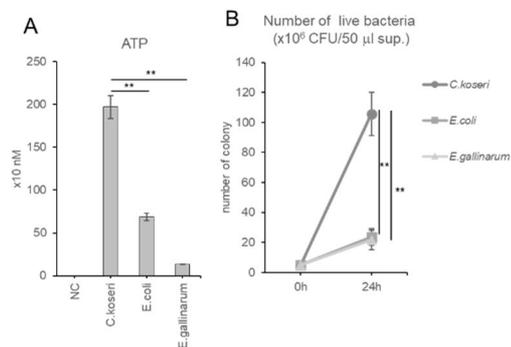
菌種よりも著しく多かった (Fig. 4B)。これらの結果から、*C. koseri* は高い増殖活性によって多量の ATP を産生し IL-33 の発現を誘導していることが示唆された。

以上の結果から、食物アレルギーモデルマウスの糞便中で最も多かった菌種である

C. koseri は、他の腸内細菌より旺盛に増殖し多量の ATP を産生することで、樹状細胞における IL-33 発現を誘導し、Th2 応答を促進していることが示された。その一方で、菌の死滅に伴って遊離する LPS が TLR4 シグナルを介して、この IL-33 発現誘導を抑制している可能性も示唆された。

この研究成果は、食物アレルギーと腸内細菌の関連性を分子レベルで明らかにしたものであり、今後、食物アレルギーの予防と治療において新たな方法を確立するための知見となり得る。腸内細菌の LPS が TLR4 シグナルを介して、アレルギー症状の増悪につながる Th2 応答を抑制しているという知見は、常在細菌叢と自然免疫応答のバランスが免疫疾患の予防につながる可能性を示唆したものであり、食物アレルギーにとどまらず、他の免疫疾患の予防法にも応用が期待できる。型糖尿病と食物アレルギーの両方に効果のある口腔内細菌は、解析途中である。しかし、口腔内細菌の *Rothia dentocariosa* の経口投与が型糖尿病モデルマウスにおいて血糖値を低下させるという実験結果は得られており、今後の研究によってさらに詳細な知見が得られるものと期待できる。

Fig. 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hideo Kataoka, Taiki Mori , Takeshi Into	4. 巻 70
2. 論文標題 Citrobacter koseri stimulates dendritic cells to induce IL-33 expression via abundant ATP production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Med Microbiol .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.001303	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 Hideo Kataoka, Ayumi Saeki, Akira Hasebe, Ken-Ichiro Shibata, Takeshi Into	4. 巻 9
2. 論文標題 Naringenin suppresses Toll-like receptor 2-mediated inflammatory responses through inhibition of receptor clustering on lipid rafts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Sci Nutr .	6. 最初と最後の頁 963-972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/fsn3.2063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taiki Mori, Hideo Kataoka, Takeshi Into	4. 巻 63
2. 論文標題 Effect of Myd88 deficiency on gene expression profiling in salivary glands of female non-obese diabetic (NOD) mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Oral Biosci .	6. 最初と最後の頁 192-198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2021.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 片岡 嗣雄、森 大気、引頭 毅
2. 発表標題 Citrobacter koseriはATP産生を介して樹状細胞にIL-33を誘導する
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡 嗣雄、森 大気、引頭 毅
2. 発表標題 Analysis of IL-33-inducing activity of Citrobacter koseri in dendritic cells
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------