

令和 6 年 6 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：2020～2023

課題番号：20K07017

研究課題名（和文）アレルギー疾患の病態形成に關与する常在細菌と自然免疫細胞応答の解析

研究課題名（英文）Skin microorganisms have important roles in pathogenesis of allergic diseases

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：I型アレルギー疾患における常在細菌などの環境因子の関与については明らかになっていない。アトピー性皮膚炎の発症や病態悪化と相関する黄色ブドウ球菌や、逆に恒常性維持に重要な表皮ブドウ球菌による自然免疫細胞応答について解析をおこなった。黄色ブドウ球菌由来の分子である種々の毒素が、マスト細胞や好塩基球を活性化し、化学伝達物質やIL-4などのTh2サイトカイン産生を誘発することを明らかにした。逆に表皮ブドウ球菌由来分子は、Th2分化やIgE産生を抑制した。これらの結果は、皮膚細菌叢を構成する細菌が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慢性化に影響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、皮膚細菌叢などの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、そしてそれがアレルギー性疾患のQOLに影響することに注目した。これまで不明であった皮膚常在細菌と免疫細胞の相互作用を明らかにする研究から、疾患の病態を解析することによって、免疫疾患や慢性炎症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、免疫細胞や皮膚細菌由来分子の制御をターゲットにした新規アレルギー反応の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疾患の新規治療、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）：The involvement of environmental factors such as commensal bacteria in type I allergic disease is unclear. We analyzed innate immune cell responses to *Staphylococcus aureus*, which correlates with the onset and exacerbation of atopic dermatitis, and to *Staphylococcus epidermidis*, which is important in maintaining homeostasis. We found that *Staphylococcus aureus* toxins activate mast cells and basophils, inducing degranulation and production of Th2 cytokines such as IL-4. Conversely, *Staphylococcus epidermidis* products inhibited Th2 differentiation and IgE production. These results suggest that bacteria comprising the skin microbiota may activate innate immune cells and influence the development and chronicity of allergic and other diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー サイトカイン 細菌 炎症

1. 研究開始当初の背景

適応免疫応答は病原体に対する感染防御に必要な生体反応であり、健康維持には必要不可欠なメカニズムである。ウイルスや結核菌などに対する免疫応答では、樹状細胞やマクロファージに発現する Toll 様受容体(TLR)などのパターン認識受容体(pattern-recognition receptor: PRR)が病原体特異的なパターン分子 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)を認識し、IL-12 などのサイトカイン依存的なヘルパーT 細胞の Th1 型への分化と細胞性免疫が重要である。すでにワクチンなどにも応用されている。しかしながら、寄生虫やアレルギー疾患などの 2 型免疫応答に関与する自然免疫細胞や PAMP、その病原体センサー分子については、殆ど明らかになっていない。近年、花粉、食品、薬物など本来無害である「物質」に対する過敏症(アレルギー性疾患)が増加している。アレルギーは主に 4 種類に分類されているが、最もよく知られているものが IgE を介した I 型アレルギーであり、マスト細胞や好塩基球がエフェクター細胞として機能し、ヒスタミンなどの化学伝達物質やサイトカインを産生することで炎症を惹起している。

アレルギー疾患は遺伝的な背景以外に環境因子が関与し、種々の環境因子からの刺激が疾患発症に影響を与えていると考えられている。特に、皮膚、粘膜系の常在細菌とその分泌タンパク質や代謝産物は、宿主の恒常性維持に重要な役割を持っていることが分子レベルで明らかになってきた。常在細菌由来分子群による宿主生体反応の分子メカニズムを明らかにすることは、健康維持や疾患発症・悪化を含めた QOL を考える上で重要な課題である。代表的なアレルギー疾患であるアトピー性皮膚炎は、黄色ブドウ球菌の関連が数多く報告されている。特に黄色ブドウ球菌由来毒素については、皮膚炎との関連で注目されている。しかしながら、この分子以外にもアレルギー疾患発症や悪化に関与する分子があると考えられる。

2. 研究の目的

アレルギー疾患の治療は、主に抗ヒスタミン薬などの対症療法が一般的であるが、環境因子の同定と制御機構を明らかにすることによって、予防や新たな治療薬の開発や治療方針の提案に繋がると考えられる。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偏りが生じた結果として病理性 Th2 細胞が生成し、そしてそれが各種免疫疾患の慢性化と QOL に影響することに着目した。今回、I 型アレルギー疾患に関与していると考えられる細菌とその産生物質を用いて、マスト細胞・好塩基球などの自然免疫細胞応答を調べる。免疫細胞に発現している病原微生物由来分子を認識する受容体とそのシグナル伝達から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 と抗原(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。特に皮膚や粘膜組織の常在細菌の分類や性質を解析することによって、免疫応答や炎症疾患の理解と臨床薬学への応用が本研究の成果として期待できる。さらに、本研究課題の解析を通じて、免疫細胞や炎症反応を制御できる新規免疫制御方法の開発につながる標的分子についても同定する。これまでの治療法に加えたアレルギー疾患の新規治療と予防法の開発に対して指針を与えることにつなげたい。

3. 研究の方法

(1) 宿主免疫細胞の受容体シグナル伝達経路の解析

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、骨髓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。種々の皮膚常在細菌の培養上清を用いて、化学伝達物質やサイトカイン産生を指標に免疫応答について解析した。免疫応答の解析に用いた細胞は、マウスの骨髓細胞を IL-3 で約 4 週間培養した細胞をマウス骨髓由来マスト細胞(Bone marrow-derived mast cells; BMMC)、約 2 週間培養した細胞(c-kit⁺, FcεR1α⁺)を培養好塩基球として実験に用いた。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病細胞株 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 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/アレルゲン複合体刺激で 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。

(2) 細菌由来タンパク分子の合成と自然免疫細胞に発現する受容体の同定

黄色ブドウ球菌や表皮ブドウ球菌は、様々な多くの代謝産物とタンパク質分子を産生している。微生物由来の分子については、細胞表面タンパク質や分泌性の液性分子を中心にそのリコンビナントタンパク質を作製した。特に細菌が産生する分泌物は、全身への影響も考えられるため、菌の培養上清を硫酸沈殿で濃縮・透析したのち、陰イオン交換カラムとゲル濾過カラムで粗分画した。マウス骨髄から培養した樹状細胞、好塩基球、マスト細胞を刺激後、サイトカイン産生、脱顆粒、細胞表面上の活性化マーカーについて解析を行った。活性の高かった分画について質量分析をおこない候補分子の同定を試みた。

TLR2/TLR4 二重欠損マウス、抗体欠損マウスや抗体受容体アダプター分子 FcR 欠損マウス由来細胞を用いて解析を行うことで、細菌の菌体および培養上清中のリガンド分子とその受容体候補の検索を行った。質量分析の結果から得られた候補分子については、リコンビナントタンパク質を作製するため、LPS を持たない大腸菌 (ClearColi) にレアコドンの補充によるタンパク合成効率化を行った。

4. 研究成果

(1) 宿主免疫細胞の受容体シグナル伝達経路の解析

皮膚常在細菌の1つである表皮ブドウ球菌およびその分泌物が自然免疫細胞に及ぼす影響を調べるため、自然免疫細胞モデルとして骨髄由来培養自然免疫細胞を調製し、表皮ブドウ球菌の生菌菌体および菌培養上清を用いて刺激し、サイトカイン産生を評価した。骨髄由来培養樹状細胞 (BMDC) では、菌体および菌培養上清による刺激において、炎症性サイトカイン IL-6 および Type1 サイトカインである IL-12 の産生がみられた。骨髄由来培養好塩基球 (BMBa) では、IL-4 の産生は菌体による刺激においてわずかにみられたが、菌培養上清は IL-4 の産生を誘導しなかった。一方で菌体および菌培養上清による刺激において、BMDC と同様の IL-6 や IL-12 の産生がみられた。マスト細胞についても同様の検討を行ったところ、骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) においては、菌体および菌培養上清の刺激によるサイトカイン産生はみられなかった。以上の結果より、樹状細胞および好塩基球は表皮ブドウ球菌の菌体および分泌物に対して反応し、IL-6, IL-12 を産生することが示された。BMDC および BMBa の両者ともに、菌培養上清に対して PBS 透析処理した場合と無処理の場合を比較して、IL-6 の産生に有意な変化はみられなかった。表皮ブドウ球菌の分泌物に含まれる低分子物質は、自然免疫細胞に対するサイトカイン産生誘導に影響しないものと考えられる。TLR2^{-/-} BMDC および BMBa においては、菌培養上清の刺激による IL-6 の産生はみられなくなった。一方で菌体の刺激による IL-6 の産生は減弱したものの消失せず、残存した。TLR4^{-/-} BMDC および BMBa においては、菌体および菌培養上清の刺激による IL-6 の産生は、コントロール群と比較して有意な変化はみられなかった。以上の結果より自然免疫細胞における表皮ブドウ球菌の認識には TLR4 は関与しない。また、表皮ブドウ球菌による分泌物は TLR2 を介して認識されることが明らかになった。さらに表皮ブドウ球菌の生菌菌体成分を認識する TLR2 以外の受容体の存在が示唆された。表皮ブドウ球菌培養上清および卵白アルブミン (OVA) 特異的 CD4⁺ T 細胞受容体トランスジェニック (OT-tg) マウスの T 細胞を用いて、表皮ブドウ球菌による分泌物が実際の Th 分化に対して与える影響を検討した。その結果、表皮ブドウ球菌培養上清存在下では、IL-4 を産生する Th2 への分化は顕著に抑制されていた。表皮ブドウ球菌の分泌物と OVA をマウス腹腔に投与した場合の血清中 IgE, OVA 特異的な IgG1 産生量を調べたところ、表皮ブドウ球菌の分泌物存在下では、顕著に IgE, OVA 特異的 IgG1 産生量が減少していた。

黄色ブドウ球菌由来分子毒素 (SSL12, ヘモリジン) を用いて好塩基球やマスト細胞を刺激した場合、単独刺激、もしくは IgE/アレルゲンによる共刺激によって好塩基球からの IL-4 産生、マスト細胞の脱顆粒を促進した。アトピー性皮膚炎の増悪期には黄色ブドウ球菌が増加していることが報告に存在することから、これらの毒素が 2 型の炎症反応を増強していると考えられた。また、TLR2, TLR4, FcR γ , Rag1 の欠損マウス由来 BMMC, BMBa でも、サイトカインの産生が認められたことから、抗体やその受容体に依存していない。これら毒素のセンサー受容体についてもレポーター細胞を用いて同定する予定である。

(2) 細菌由来タンパク分子の合成と自然免疫細胞に発現する受容体の同定

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が、SSL12 のみ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 α -toxin も同様の作用を示すことが報告されているが、 α -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、 α -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。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。その他の毒素であるヘモリジンでも同様の結果が得られている。*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、野性型マウスと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。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。

黄色ブドウ球菌の増殖を抑える作用をもつ皮膚ブドウ球菌は、2 型免疫応答を抑制する物質を産生している可能性がある。皮膚ブドウ球菌培養上清から質量分析で得られた候補分子についても大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質を作成した。BMBa やレポーター細胞を刺激したときのサイトカインや GFP 発現を指標に同定を行っている。透析とゲル濾過による粗精製の結果から、少なくとも 50 kDa 以上の分子と想定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kitano T., Togawa K., Takemori J., Motoki Y., Kishida K., Itoh S., Takamoto M., Taki S., Hida S.	4. 巻 28
2. 論文標題 Interleukin-3-dependent potentiation of IgE responsiveness in mouse basophils	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 226-236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13007	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 Ogata A., Hayashi K., Kitano T., Onozaki K., Itoh S., Hida S.	4. 巻 632
2. 論文標題 Staphylococcal α -hemolysins induce IL-4 production in murine basophils	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 107-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.09.070	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 Kim G., Itoh S., Itoh Y., Ohya S., Hida S.	4. 巻 27
2. 論文標題 Identification of responsible amino acid residues in staphylococcal superantigen-like 12 for the activation of mast cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 559-567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12973	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 Nishiyama S, Urabe A, Morikawa A, Kobayashi M, Onozaki K, Itoh S, Hida S	4. 巻 532
2. 論文標題 Staphylococcal superantigen-like 12 induces the production of interleukin 4 in murine basophils	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 200-204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.08.029. Epub 2020 Aug 25	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16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 肥田重明、石川怜、伊藤佐生智、小笠原康悦、瀧伸介
2. 発表標題 T細胞依存的な皮膚の慢性炎症性疾患の解析
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（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 竹森樹梨、北野拓真、戸川果歩、伊藤佐生智、肥田重明
2. 発表標題 type2 炎症におけるCD36の役割
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
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 向井中 玲菜、伊藤 佑真、伊藤 佐生智、肥田 重明
2. 発表標題 好塩基球におけるグラム陽性菌認識機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 北野拓真、竹森樹里、松井優佳、瀧伸介、伊藤佐生智、肥田重明
2. 発表標題 炎症初期における好塩基球活性化の IL-3 依存的スイッチング
3. 学会等名 日本生化学会中部支部第85回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 緒方郁奈、林知仁、森川ありさ、肥田重明、伊藤佐生智
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌 毒素によるマスト細胞の活性化増強作用
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 占部彩花、森川ありさ、西山彩史、小林正都、北野拓真、肥田重明、伊藤佐生智
2. 発表標題 Staphylococcal superantigen like (SSL) 12 によるマスト細胞・好塩基球の活性化作用
3. 学会等名 第33回 微生物シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井優佳、森川ありさ、伊藤佐生智、瀧伸介、肥田重明
2. 発表標題 Type2炎症反応に関与する好塩基球のIL-4産生におけるFcR の役割
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
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金光東、井上ひかる、占部彩花、緒方郁奈、小林正都、北野拓真、滝藤遥希、林知仁、大矢進、肥田重明、伊藤佐生智
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌毒素SSL12によるマスト細胞の活性制御
3. 学会等名 フォーラム2020 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 北野拓真, 岸田啓太郎, 松井優佳, 瀧伸介, 伊藤佐生智, 肥田重明
2. 発表標題 T細胞依存的な好塩基球のIgE抗体反応性増強作用と細胞内シグナル伝達
3. 学会等名 フォーラム2020 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 伊藤佐生智, 西山彩史, 占部彩花, 森川ありさ, 小林正都, 北野拓真, 肥田重明
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌毒素SSL12によるマスト細胞・好塩基球の活性化
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2020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
---------	---------