

令和元年5月30日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00889

研究課題名(和文)細菌外毒素による腸管からの損傷関連分子パターンの放出と食物アレルギー反応の誘導

研究課題名(英文) Damage-associated molecular pattern released from intestinal epithelia damaged by bacterial exotoxin induces food allergy

研究代表者

若林 あや子 (Wakabayashi, Ayako)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：30328851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：コレラ毒素(CT)はアレルギー・免疫反応を賦活するものの、その免疫誘導の詳細についてはよく分かっていなかった。我々はCTが腸管上皮細胞の細胞死を誘導すること、損傷上皮からHMGB1のような損傷関連分子パターン(DAMP)が放出されること、放出されたHMGB1が腸管樹状細胞を活性化し食物抗原に対する過剰な液性・細胞性免疫を媒介することを明らかにした。さらに、HMGB1阻害剤であるグリチルリチンのマウスへの投与によりアレルギー・免疫反応が抑制できた。

本研究によって、CTが腸管の上皮細胞死とHMGB1放出を誘導すること、HMGB1は食物アレルギーの抗原感作と進行を媒介する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘膜や皮膚は様々なアレルギーが体内に入る門戸であると同時に、細菌感染などにより細胞損傷を受けやすい部位でもある。細菌外毒素により損傷した腸管上皮は損傷関連分子パターンであるHMGB1を放出し、アレルギー・炎症を引き起こす起点となることが明らかとなった。損傷上皮から侵入したアレルギーは活性化樹状細胞に取り込まれ、T・B細胞活性化と抗体産生を誘導し、食物アレルギーを引き起こす可能性が示唆された。

食物アレルギーの予防のために、消化器急性感染時は粘膜損傷が治癒するまでアレルギーを含む食品の摂取を控えた方がよいと考えられる。アレルギー予防の食事指針の確立に向けて、本研究結果は極めて重要な意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Cholera toxin (CT) is a mucosal adjuvant and oral administration of ovalbumin (OVA) plus CT induces OVA-specific T cell responses and antibody production in mice.

We showed that oral CT enhances expression of CD80 and CD86 and antigen presentation to T cells of intestinal dendritic cells (DCs). We found that oral CT enhances cell death and cytoplasmic expression of high-mobility group box 1 protein (HMGB1) in intestinal epithelial cells (IECs), and fecal HMGB1 levels. HMGB1 dose-dependently enhanced the expression of CD80 and CD86 on DCs in vitro, and intravenous or oral administration of glycyrrhizin, an HMGB1 inhibitor, suppressed intestinal DC activation and induction of OVA specific T cell responses, IgA production, and delayed-type hypersensitivity induced by oral CT.

These results showed that oral CT triggers cell death of IECs and the release of HMGB1 from the damaged IECs, and that the released HMGB1 may mediate antigen sensitization and progression of food allergy.

研究分野：食生活学、免疫学、アレルギー学、食品衛生学

キーワード：細胞外毒素 コレラ毒素 損傷関連分子パターン (DAMPs) HMGB1 樹状細胞 共刺激分子 食物アレルギー 卵白アルブミン

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

## 1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーを含むアレルギー疾患は、近年増加の一途をたどっている。アレルギーの発症には一部遺伝的要素の関与が指摘されてはいるが、後天的な環境因子がその発症や進行に大きく関与すると考えられる。環境因子の中でも細菌感染は、アレルギー疾患の発症のきっかけや増悪因子であることが、臨床的・実験的に多々報告されている。例えば、アレルギー性鼻炎や気道アレルギーは細菌感染に起因・悪化する症例が非常に多い。また、アトピー性皮膚炎の患者の皮膚からは、黄色ブドウ球菌とそれらが放出する毒素が多く検出される。このように細菌感染とアレルギーの発症・進行は深く関与することが考えられるが、そのメカニズムについてはまだよく分かっていない。

コレラ菌の外毒素であるコレラ毒素は強力な粘膜免疫賦活作用を有し、申請者はこれまでに、卵白アルブミン (OVA) と共にコレラ毒素を経口投与したマウスにおける、OVA 特異的な腸管粘膜 IgA と血中 IgG 産生 (文献 1) および CD8<sup>+</sup>細胞傷害性 T リンパ球 (CTLs) の腸管粘膜誘導 (文献 2) を報告した。またコレラ毒素は IgE を産生しやすい系統マウスでは、IgE 産生が関与する実験的食物アレルギーを誘導する。

コレラ毒素を投与したマウスでは下痢が誘発されると共に著しい消化管のびらんがみられ、腸管上皮細胞の細胞死や損傷が起こっている可能性がある。死細胞や損傷細胞は、損傷関連分子パターン (DAMPs) と呼ばれる物質を放出し、アレルギーや炎症反応の誘導に深く関与することが示唆されてはいるものの、詳細は未だ不明な点が多い。特に、消化管粘膜における細胞の損傷による DAMPs の放出と食物アレルギーとの関係についての詳細はまだよく分かっていない。

## 2. 研究の目的

細菌外毒素であるコレラ毒素を OVA と共にマウスに経口投与すると、OVA に対する過剰な免疫・アレルギー反応が誘導される。本研究では、コレラ毒素によって腸管上皮細胞が損傷し細胞死が誘導されるか否か、損傷した腸管上皮から high-mobility group box 1 (HMGB1) 核タンパクのような DAMPs が放出されるか否か、放出された HMGB1 が腸管樹状細胞を活性化して特異的 T 細胞への OVA 抗原提示を増強するか否か、について検討した。細菌外毒素の腸管上皮損傷による DAMPs の放出と、食物アレルギーへの関与を明らかにし、アレルギー予防のために消化管感染・損傷時のアレルゲン摂取への注意を喚起することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) マウス：実験には 6 週齢の C57BL/6 雌マウスを用いた。マウスは日本医科大学動物実験施設において、特定病原体を含まない (SPF) 環境下で飼育した。

(2) マウスへの経口投与：イソフルラン吸入麻酔下のマウスに、胃ゾンデを用いてコレラ毒素、コレラ毒素 A または B サブユニット、OVA を経口投与した。

(3) マウス腸管樹状細胞の分離と解析：マウス腸管膜リンパ節よりパーコール比重分離法および MACS カラムを用いて CD11c 陽性樹状細胞を分離・精製した。

(4) 樹状細胞表面抗原の解析：細胞表面における CD80、CD86、MHC クラス I・II などの活性化マーカーの発現の変化を、蛍光標識抗体による染色とフローサイトメトリーを用いた測定によって解析した。

(5) 樹状細胞による OVA 特異的 CD4<sup>+</sup> OT<sup>-</sup> および CD8<sup>+</sup> OT-I T 細胞活性化能の検討：マウス腸管樹状細胞を OT-I または OT<sup>-</sup> 細胞 (OVA 特異的 TCR を遺伝子導入した CD8<sup>+</sup> または CD4<sup>+</sup> T 細胞) と 4 日間共培養する。T 細胞の増殖を細胞増殖色素カルボキシフルオレセイン・ジアセテート (CFSE) を用いてフローサイトメトリーで測定した。

(6) 腸管上皮細胞の生死の解析：マウス小腸よりパーコール比重分離法を用いて上皮細胞を分離した。トリパンブルー染色液を用いて顕微鏡下に生細胞数を測定した。また蛍光抗体による上皮細胞接着分子 (EpCAM) を発現する小腸上皮細胞の同定に加え、Annexin V と 7-AAD の二重染色法によって上皮死細胞の割合をフローサイトメトリーで測定した。

(7) ELISA 法による糞中・血中 HMGB1 濃度の定量：マウスより糞および血液を採取し、糞抽出液および血漿中の HMGB1 量を酵素標識抗体を用いた ELISA 法により測定した。

(8) HMGB1 添加による樹状細胞活性化および HMGB1 阻害剤添加による活性化阻害：マウス腸管から分離した樹状細胞に様々な濃度の HMGB1 および HMGB1 阻害剤グリチルリチンを添加して 16 時間培養した後、樹状細胞表面の活性化マーカーをフローサイトメトリーで解析した。

(9) マウスへの HMGB1 阻害剤投与による腸管樹状細胞および T 細胞の活性化抑制：マウスにグリチルリチンを静脈または経口投与し、コレラ毒素投与後の腸管樹状細胞表面における CD80 と CD86 の発現をフローサイトメトリーで解析した。また樹状細胞を OT<sup>-</sup> または OT-I T 細胞と共培養し、それら T 細胞の増殖を測定した。

(10) マウスへの HMGB1 阻害剤投与による抗体産生抑制：マウスにグリチルリチンを静脈または経口投与し、コレラ毒素と OVA 経口投与後の糞を採取した。糞抽出液中抗 OVA IgA 抗体価を ELISA 法により測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 経口コレラ毒素による腸管樹状細胞の共刺激分子発現と抗原提示機能の増加

OVA 抗原に対する T 細胞免疫反応が誘導されるためには、OVA タンパク抗原を取り込んだ抗原提示細胞が断片化ペプチドを MHC 分子上に提示し、これを認識したナイーブ T 細胞が活性化され分化増殖する必要がある。コレラ毒素をマウスに経口投与したところ、腸管の抗原提示細胞である CD11c<sup>+</sup> 樹状細胞における CD80、CD86 といった共刺激分子 (図 1A) および MHC クラス II 分子の発現が著しく増加した。また OVA と共にコレラ毒素を経口投与したマウスより分離精製したこれら活性化した腸管 CD11c<sup>+</sup> 樹状細胞は OVA 特異的 CD4<sup>+</sup> OT<sup>-</sup> 細胞と CD8<sup>+</sup> OT<sup>-</sup> 細胞のいずれをも増殖させた (図 1B)。しかしコレラ毒素 A または B サブユニットを経口投与した場合、腸管樹状細胞における CD80、CD86、MHC クラス II の発現増加および CD4<sup>+</sup> T 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞への抗原提示活性は観察されなかった (図 1A, B)。

さらに、コレラ毒素が試験管内で樹状細胞を直接活性化することはなかったことより、我々はコレラ毒素刺激によって放出を促された何らかの腸管局所のメディエーターが樹状細胞を活性化するのではないかと仮説を立てた。

##### (2) 経口コレラ毒素による腸管上皮細胞の損傷・細胞死の誘導

コレラ毒素を経口投与したマウスは一過性に下痢を起こすと共に肉眼的に消化管のびらんが見られ、これらのマウスの小腸上皮では生細胞数が有意に減少した。しかしコレラ毒素 A または B サブユニットを経口投与した場合は肉眼的な変化は見られず、上皮の生細胞数にも変化はなかった。さらに上皮細胞接着分子 (EpCAM) を発現する小腸上皮細胞において Annexin V と 7-AAD の二重染色法を用いて死細胞を測定したところ、コレラ毒素経口投与マウスの EpCAM<sup>+</sup> 上皮では Annexin V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup> 死細胞の割合が著しく増加していた (図 2)。

##### (3) 経口コレラ毒素による核タンパク HMGB1 の上皮細胞質発現と細胞外放出

細胞が様々なストレスを受けると、核タンパクである HMGB1 は細胞質に移行し細胞死を促進する。死細胞は HMGB1 を細胞外に放出さし、細胞外に放出された HMGB1 は DAMP・アラームインメディエーターとして炎症を引き起こす。また HMGB1 は活性化した樹状細胞やマクロファージからも分泌され、炎症をますます促進させる。

我々はコレラ毒素経口投与によって細胞死した腸管上皮から HMGB1 が放出されるか調べるため、マウスの糞中 HMGB1 量を測定した。コレラ毒素経口投与 6 時間後と 16 時間後のマウスの糞で HMGB1 量の有

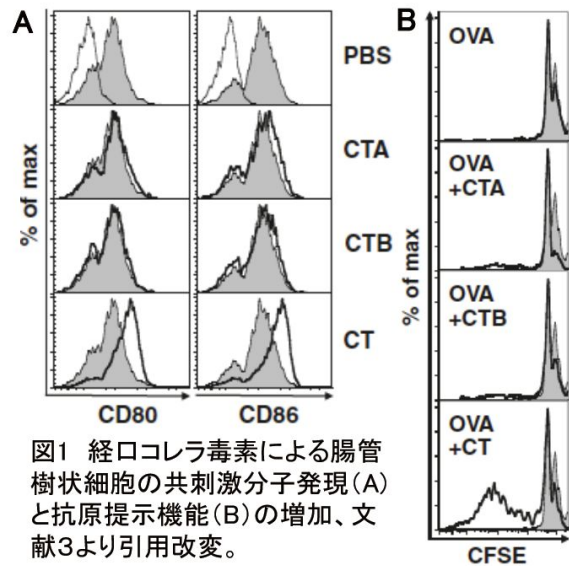


図1 経口コレラ毒素による腸管樹状細胞の共刺激分子発現(A)と抗原提示機能(B)の増加、文献3より引用改変。

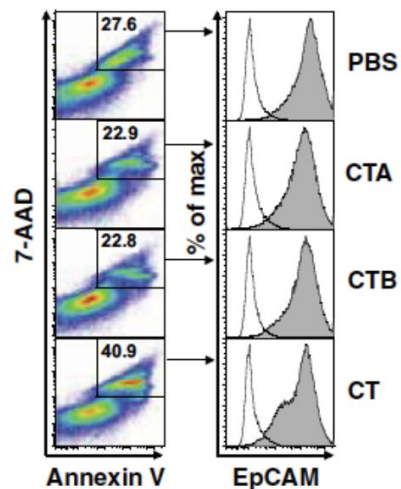


図2 経口コレラ毒素による腸管上皮細胞の細胞死誘導、文献3より引用改変。

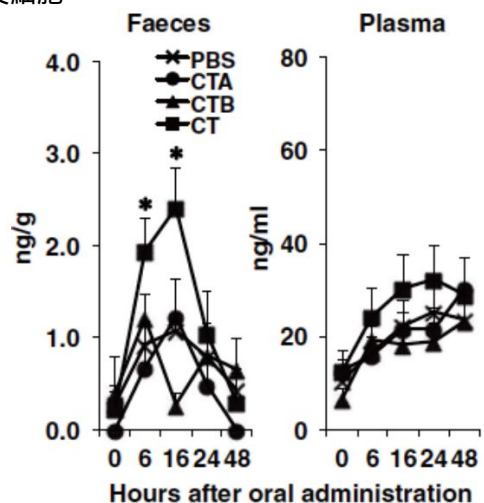


図3 経口コレラ毒素による糞中HMGB1濃度の増加、文献3より引用改変。

意な増加がみられ、糞中 HMGB1 量の増加は CTA や CTB サブユニットを経口投与したマウスでは見られなかった(図3)。次に我々はマウスの小腸上皮細胞を分離して細胞質 HMGB1 の発現を調べた。そうしたところコレラ毒素を経口投与したマウス小腸の EpCAM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> 上皮細胞において細胞質 HMGB1 の明らかな発現増加がみられた。これらの結果は、コレラ毒素が腸管上皮細胞に作用して核 HMGB1 タンパクを細胞質に移行させること、および上皮細胞死を誘導して死細胞から HMGB1 が腸管局所に放出されることを示す。

(4) HMGB1 添加による樹状細胞の活性化と HMGB1 阻害剤添加による活性化阻害

HMGB1 はヒトやラットの樹状細胞の CD80 や CD86 といった共刺激分子の発現を増加させることが報告されている。我々は HMGB1 がマウスの樹状細胞を試験管内で活性化するかを調べた。HMGB1 は濃度依存的にマウスの CD11c<sup>+</sup>

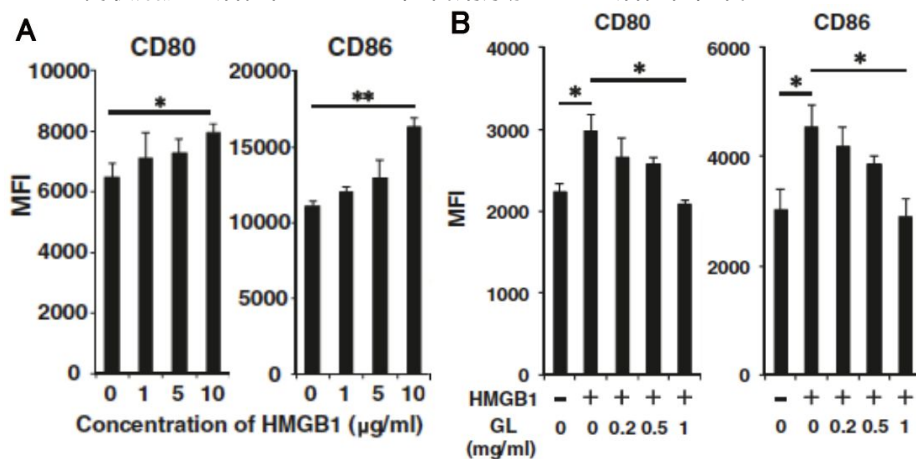


図4 HMGB1添加による腸管樹状細胞の活性化(A)とHMGB1阻害剤添加による活性化阻害(B)、文献3より引用改変。

樹状細胞の CD80 と CD86 の発現を増強させ(図4A) これらの発現増強は HMGB1 阻害剤であるグリチルリチンによって濃度依存的に抑制された(図4B)。

(5) HMGB1 阻害剤投与による腸管樹状細胞の活性化と液性・細胞性免疫誘導の阻害

最後に、HMGB1 阻害剤グリチルリチンをマウスに投与することで、コレラ毒素を経口投与したときの腸管上皮細胞からの HMGB1 放出、腸管樹状細胞の活性化、抗原特異的 T 細胞反応、抗体産生などが抑制されるかを調べた。

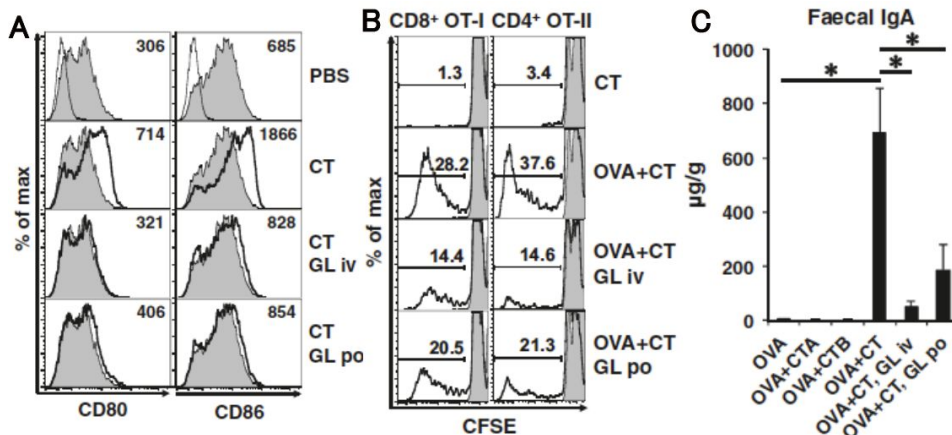


図5 HMGB1阻害剤投与による腸管樹状細胞の活性化(A)と液性・細胞性免疫誘導(B, C)の阻害、文献3より引用改変。

その結果、グリチルリチンを静脈または経口投与したマウスにおいて、コレラ毒素投与後の腸管の樹状細胞における CD80 と CD86 の発現増強(図5A) CD4<sup>+</sup> と CD8<sup>+</sup> T 細胞への抗原提示能(図5B)が著しく抑制された。さらには、コレラ毒素による腸管における OVA 特異的 IgA 産生(図5C)および遅延型過敏反応の誘導は、HMGB1 阻害剤グリチルリチン投与によって有意に抑制された。これらの結果より、コレラ毒素によって損傷した腸管上皮細胞から放出される HMGB1 のような DAMP は、腸管由来抗原を取り込んだ樹状細胞の活性化と抗原提示を促し、腸管における過剰な CD4<sup>+</sup> と CD8<sup>+</sup> T 細胞反応や IgA 産生、および遅延型アレルギー反応に寄与することが明らかになった。

(6) 結論

強力な免疫反応・アレルギーを賦活することが知られているコレラ毒素であるが、その液性免疫および細胞性免疫の誘導の機構についてはこれまでよく分かっていなかった。本研究において我々は、コレラ毒素が腸管上皮細胞の細胞死を誘導すること、損傷した腸管上皮細胞から HMGB1 核タンパク質のような DAMPs が放出されること、放出された HMGB1 が腸管樹状細胞を活性化し食物抗原に対する過剰な液性免疫および細胞性免疫を媒介することを明らかにした。

さらには HMGB1 阻害剤であるグリチルリチンをマウスに投与することによって、この食物抗原に対する過剰な免疫・アレルギー反応を抑制することができた。グリチルリチンは薬用植物

である甘草に含まれる成分であり、古くから抗炎症・抗アレルギー作用が知られている物質である。

粘膜や皮膚は様々なアレルギーが体内に入る門戸であると同時に、細菌感染などによって細胞損傷を受けやすい部位でもある。本研究によって、腸管上皮の細胞死および DAMPs の放出が食物アレルギー感作に深く関与する可能性が示唆された。したがって、消化管細菌感染などによって腸管上皮が損傷している際にアレルギーを含む食品を摂取することは、食物アレルギーの発症や増悪に関与する可能性がある。食物アレルギー予防の観点から、消化器急性感染時は粘膜損傷が治癒するまでアレルギーを含む食品の摂取を控えた方がよいと考えられる。また、甘草成分グリチルリチンのような DAMPs 阻害剤の摂取によって、食物アレルギーの感作や増悪が抑制できる可能性が示唆された。今後も食物アレルギーの予防や治療に応用可能な基礎研究に真摯に取り組む所存である。

#### (7) 参考文献

Wakabayashi A, Kumagai Y, Watari E, Shimizu M, Utsuyama M, Hirokawa K, Takahashi H. Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. *Immunology*, 119(2) 167-177, 2006年10月

Wakabayashi A, Nakagawa Y, Shimizu M, Moriya K, Nishiyama Y, Takahashi H. Suppression of an already established tumor growing through activated mucosal CTLs induced by oral administration of tumor antigen with cholera toxin. *Journal of Immunology*, 180(6) 4000-4010, 2008年3月

Wakabayashi A, Shimizu M, Shinya E, Takahashi H. HMGB1 released from intestinal epithelia damaged by cholera toxin adjuvant contributes to activation of mucosal dendritic cells and induction of intestinal cytotoxic T lymphocytes and IgA. *Cell death & disease*, 9(6) 631, 2018年5月

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計3件)

(1) 若林 あや子, 高橋 秀実. 経口コレラトキシン刺激による腸管上皮細胞死, 核蛋白 HMGB1 の上皮細胞質発現と細胞外放出. *臨床免疫・アレルギー科*, 70(4) 408-416, 2018年10月

(2) Wakabayashi A, Shimizu M, Shinya E, Takahashi H. HMGB1 released from intestinal epithelia damaged by cholera toxin adjuvant contributes to activation of mucosal dendritic cells and induction of intestinal cytotoxic T lymphocytes and IgA. *Cell death & disease*, 9(6) 631, 2018年5月

(3) Murakami R, Nakagawa Y, Shimizu M, Wakabayashi A, Negishi Y, Hiroi T, Okubo K, Takahashi H. Effects of dendritic cell subset manipulation on airway allergy in a mouse model. *International Archives of Allergy and Immunology*, 168(4) 219-232, 2015年

##### [学会発表](計16件)

(1) Wakabayashi A, Shimizu M, Yonekawa M, Shinya E, Takahashi H. HMGB1 released from intestinal epithelia damaged by cholera toxin contributes to activation of mucosal DCs and induction of intestinal CTLs and IgA. 第47回日本免疫学会学術集会. 2018年12月10-12日, 福岡

(2) Wakabayashi A, Shimizu M, Shinya E, Takahashi H. High mobility group box protein 1 released from damaged intestinal epithelial cells triggers antigen sensitization. The Joint Congress of the Asia Pacific Association of Allergy, Asthma and Clinical Immunology & the Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology and Immunology. 2018年10月11-14日, Bangkok, Thailand

(3) Wakabayashi A, Shimizu M, Shinya E, Takahashi H. Glycyrrhizin inhibits high-mobility group box 1 protein released from damaged intestinal epithelia and antigen sensitization. 11th International Symposium on Immunonutrition. 2018年9月10-12日, London, UK

(4) Wakabayashi A, Shimizu M, Shinya E, Takahashi H. HMGB1 released from intestinal epithelia damaged by cholera toxin adjuvant contributes to activation of mucosal DCs and induction of intestinal CTLs and IgA. 5th European Congress of Immunology. 2018年9月2-5日, Amsterdam, Netherlands

(5) Wakabayashi A, Shimizu M, Shinya E, Takahashi H. HMGB1 released from intestinal epithelia damaged by cholera toxin activates mucosal DCs and induces cytotoxic T lymphocytes and IgA. 第27回日本Cell Death学会学術集会. 2018年7月27-28日, 京都

(6) Wakabayashi A, Shimizu M, Yonekawa M, Ishii K, Kumagai Y, Takahashi H. Epithelial

- cell damage and high mobility group box protein 1 released from the damaged EpCAM+CD45- intestinal epithelial cells trigger intestinal DC activation and antigen sensitization. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会. 2018 年 6 月 22-24 日, 幕張
- ( 7 ) Wakabayashi A, Shimizu M, Yonekawa M, Ishii K, Kumagai Y, Takahashi H. Enhancement of epithelial cell death, cytoplasmic HMGB1 expression in IECs, and increase of HMGB1 release by oral CT-stimulation. 第 46 回日本免疫学会学術集会. 2017 年 12 月 12-14 日, 仙台
- ( 8 ) Wakabayashi A, Yonekawa M, Ishii K, Takahashi H. Predominant distribution of DCIR2+ dendritic cells in the intestinal tissues and their activation by with high mobility group box protein 1 released through by cholera toxin. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会. 2017 年 6 月 16-18 日, 東京
- ( 9 ) 村上亮介, 中川洋子, 清水真澄, 若林あや子, 根岸靖幸, 廣井隆親, 大久保公裕, 高橋秀実樹状細胞亜群の選択的活性化によるアレルギー制御の可能性. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会. 2017 年 6 月 16-18 日, 東京
- ( 10 ) Wakabayashi A, Yonekawa M, Takeshita H, Azuma H, Kumagai Y, Takahashi H. Intestinal DEC-205+ DCs activated by HMGB-1 released through cholera toxin-stimulation contribute to cross-priming of mucosal CTLs. 第 45 回日本免疫学会学術集会. 2016 年 12 月 5-7 日, 沖縄
- ( 11 ) Takahashi H, Murakami R, Shimizu M, Wakabayashi A, Takeshita H, Koike E, Negishi Y, Ohkura S, Ohkubo K. Airway allergy induced by histamine released from IgE-sensitized mast cells can be controlled through dendritic cell subset manipulation in a mouse model. 第 45 回日本免疫学会学術集会. 2016 年 12 月 5-7 日, 沖縄
- ( 12 ) Wakabayashi A, Yonekawa M, Ishii K, Kuroki K, Shinya E, Takahashi H. HMGB-1 contributes to the enhancement of co-stimulatory molecule-expression and cross-presentation by mucosal DCs through oral administration of cholera toxin. 16th International Congress of Immunology. 2016 年 8 月 21-26 日, Melbourne, Australia
- ( 13 ) Takahashi H, Murakami R, Nakagawa Y, Shimizu M, Wakabayashi A, Negishi Y, Hiroi T, Shinya E, Ohkubo K. Airway allergy can be controlled through dendritic cell subset manipulation in a mouse model. 16th International Congress of Immunology. 2016 年 8 月 21-26 日, Melbourne, Australia
- ( 14 ) Wakabayashi A, Yonekawa M, Ishii K, Murakami R, Takahashi H. High mobility group box protein-1 released from damaged intestinal tissues contributes to the activation of mucosal dendritic cells and the sensitization of antigen-specific T cells. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 2016 年 6 月 17-19 日, 東京
- ( 15 ) 村上亮介, 中川洋子, 清水真澄, 若林あや子, 根岸靖幸, 廣井隆親, 大久保公裕, 高橋秀実アレルギー性鼻炎マウスモデルにおける DEC-205 陽性樹状細胞亜群選択的活性化による抗アレルギー効果の検討. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 2016 年 6 月 17-19 日, 東京
- ( 16 ) Wakabayashi A, Yonekawa M, Ishii K, Murakami R, Date T, Takahashi H. HMGB-1 contributes to the enhancement of co-stimulatory molecule-expression on mucosal DCs by oral administration of cholera toxin. 第 44 回日本免疫学会学術集会. 2015 年 11 月 18-20 日, 札幌

[ その他 ]

ホームページ等

- ( 1 ) <https://researchmap.jp/read0064948/>
- ( 2 ) <https://nrid.nii.ac.jp/ja/nrid/1000030328851/>