

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07107

研究課題名(和文) ボツリヌス毒素の体内侵入機構を利用した粘膜ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of mucosal vaccine using the invasion mechanism of botulinum toxin

研究代表者

松村 拓大 (Matsumura, Takuhiro)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：00456930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに血清型A型ボツリヌス毒素が生体防御を担う細胞である腸管M細胞の機能を利用することにより体内に侵入し、中毒を引き起こすことを明らかにした。本研究では、他の血清型(B型)毒素との比較解析から腸管吸収に寄与する因子を同定し、各血清型の吸収機構を利用した新しい薬物送達システム・粘膜ワクチンの開発を目指す。B型毒素複合体はマウスにおいてA型と比較して数十倍経口毒性が高く腸管内局在が異なることから、腸管吸収機構が異なることが示唆される。我々はこの吸収機構の違いに關与する候補因子としてムチン層に着目し、毒素複合体中のHAとムチンとの相互作用の違いが毒素の吸収に影響していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、不明であった血清型B型毒素の腸管吸収機構について解析し、M細胞特異的に侵入するA型とは異なる吸収機構を持つことを明らかにした。さらに吸収機構の違いを規定している宿主側の因子としてムチン層、毒素側の因子としてHAを明らかにし、これらの因子の相互作用の違いが毒性や種特異性に寄与している可能性が考えられた。本研究成果はボツリヌス食中毒発症機構の全貌解明だけでなく新規治療法や予防法の開発へと繋がる可能性がある。またA型およびB型のHAを輸送担体として用いることにより、それぞれの特徴(A型：M細胞特異的、B型：腸管上皮全体)を活かした粘膜ワクチンの開発へ応用が可能である。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that type A BoNT complex (BoNT and non-toxic component) exploits intestinal microfold (M) cells to breach the intestinal epithelial barrier. In this study, we analyzed the intestinal absorption mechanism of other serotype BoNT (type B) complexes, and aimed to develop a novel delivery system for vaccines and drugs using the invasion mechanism of BoNT. Type B BoNT complex showed potent oral toxicity and different intestinal localization in mice compared with type A, suggesting that type B BoNT has a different intestinal absorption mechanism. We focused on the mucin layer as a possible factor leading to the different intestinal absorption mechanism, and analyzed the interactions of type A and type B BoNT complexes with mucin. As the result, it was found that a difference in the interaction of hemagglutinin (HA) in the toxin complex with mucin affects the intestinal absorption of BoNT.

研究分野：細菌学

キーワード：ボツリヌス 神経毒素 食中毒 腸管吸収 M細胞 ムチン HA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス食中毒の発症には、経口摂取された神経毒素が活性を保持したまま腸管から吸収され、血中へ移行する事が必要であるが、巨大分子(分子量 150 kDa)である本毒素が腸管上皮を通過する部位および機構については長年不明であった。一方で、本毒素は常に無毒成分(NTNHA および hemagglutinin: HA)との複合体として産生され(図1)、無毒成分が結合することによりその経口毒性が飛躍的に高まることが知られていた(文献1)。

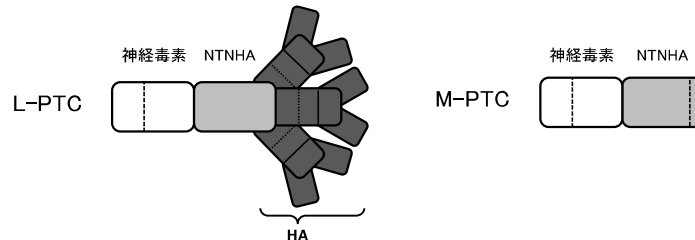


図1 ボツリヌス神経毒素複合体の構造

我々は、マウスを用いた *in vivo* の解析から、血清型 A 型毒素が無毒成分の一種 hemagglutinin (HA) を介して腸管パイエル板に存在する Microfold cell (M 細胞) 上の glycoprotein 2 (GP2) と結合し、腸管上皮細胞バリアを突破する、他の毒素にはない巧妙な体内侵入機構を持つことを明らかにした(文献2)。M 細胞は抗原を取り込み免疫細胞に受け渡し抗原特異的免疫応答を誘導させる生体防御において重要な細胞である。我々は、この HA はワクチン抗原を免疫細胞に輸送し、効率的に免疫応答を誘導させることができる輸送担体へ応用できるのではないかと考えた。

一方で、我々は、A 型と同様にヒトに中毒を引き起こす B 型神経毒素複合体が A 型と比較して数十倍経口毒性が高く、腸管内局在が異なることも明らかにしている。これは B 型毒素が A 型とは異なる機構で腸管上皮細胞バリアを突破できることを示唆している。本機構を明らかにすることにより、A 型とは異なる経路をもつ経粘膜薬物送達システムへの応用が可能である。

### 2. 研究の目的

高い致死活性を持つボツリヌス毒素は食中毒だけでなく、バイオテロの手段としても注目されている。中毒発症機構を解明することは、治療法や予防法の開発につながり、世界的に見ても非常に重要な課題である。我々は長年不明であったボツリヌス毒素の腸管上皮通過機構を世界に先駆けて明らかにしている(文献1)。前述した通り、本来 M 細胞は抗原特異的な免疫応答を誘導させるきっかけとなる重要な役割を担っている。このように宿主の生理的な機能を利用した侵入機構を持つ毒素は他に報告がない。一方で、A 型~G 型の 7 種類存在する毒素は種特異性や毒素活性が異なるが、それが何に起因しているのかは不明である。我々は A 型と B 型毒素の腸管内局在が異なることを明らかにしている。この局在~吸収機構の違いが毒素活性や種特異性に寄与している可能性がある。腸管吸収に関する宿主側および毒素側の因子を明らかにすることにより、ボツリヌス食中毒発症機構の全貌解明へと繋がる。また、本毒素無毒成分 HA は M 細胞標的輸送担体としての応用が可能である。M 細胞を介した粘膜免疫システムは、抗原特異的免疫応答を全身に加えて消化器、呼吸器等の粘膜に局所的に誘導することができる。また HA はレクチン活性(糖鎖結合能)があるため、HA 自身がアジュバント活性を持つ可能性あり、M 細胞配向性に加えてアジュバント能を持つ新規輸送担体となり得る。感染症の多くは粘膜感染型であり、この HA を利用した粘膜免疫ワクチンが最適な予防法となることが期待できる。

### 3. 研究の方法

(1) 毒素の腸管吸収に関する宿主側の因子としてムチン層に着目し、血清型 A 型および B 型間での相互作用の違いについて解析する。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

粘液溶解剤(ムチン除去剤、NAC)をマウスへ前投与後、毒素複合体(L-PTC)を投与し、中毒発症や毒素の局在に対するムチン層の影響を確認する。

毒素複合体やHAとムチンとの結合をELISAで解析する。またTranswellを用いて毒素複合体のムチン透過を解析する。ムチンはマウス腸管より単離、もしくは市販されているBSM(ウシ顎下腺ムチン)やPGM(ブタ胃ムチン)を用いる。

HAは3つのサブコンポーネント(HA1、HA2、HA3)から構成される。各血清型HAサブコンポーネントを組換えタンパク質として発現させ、それぞれを再構成させることによりキメラHAを作成し、と同様にムチンとの相互作用を解析する。

HA1およびHA3の持つ糖鎖結合活性を消失させた変異体を作成し、と同様にムチンとの相互作用を解析する。

(2) B型HAと抗原OVAを混合しマウス腸管内・鼻腔内に投与した際のそれぞれの局在を免疫蛍光染色にて解析する。

### 4. 研究成果

#### ボツリヌス毒素複合体もしくはHAとムチンとの相互作用の解析

腸管上皮は厚いムチン層で覆われており、この物理的バリアが血清型間の腸管内局在や経口毒性の違いに影響している可能性がある。毒素複合体の経口毒性(中毒発症)に対するムチンの影響を確認するために、ムチン除去剤(NAC)を前投与した後、L-PTCを投与し、中毒の発症を確認した。その結果、A型毒素複合体を投与した群においては、NACを前投与することにより発症が増強された。一方で、B型毒素複合体投与群はNAC投与の影響はなかった。すなわちA型の中毒発症においてムチンが抑制的に働いていることが示唆される。次にマウス腸管ムチン、BSM(ウシ顎下腺ムチン)、PGM(ブタ胃ムチン)を用いて毒素複合体との結合を解析した。その結果、B型がA型と比較してムチンとの結合が低いことが明らかとなった。また、無毒成分hemagglutinin(HA)を持つ毒素複合体L-PTCがムチンと強く結合し、HAを持たない毒素複合体M-PTCは結合しないことから、ムチンとの結合は毒素複合体中のHAが担っていることも明らかとなった(図2)。さらにTranswellを用いてL-PTCのムチン層の透過を比較した結果、結合性の低かったB型がA型と比較して効率よくムチン層を透過した(図3)。これらの結果より、ムチン層を効率よく透過できることがB型の腸管内局在や高い経口毒性に寄与していることが示唆された。

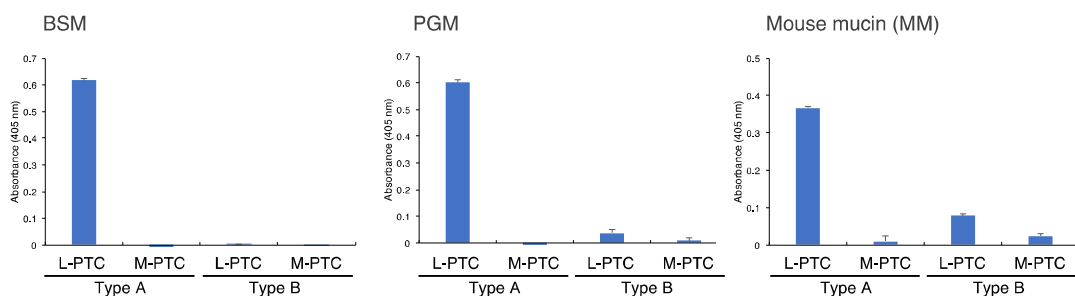


図2 ボツリヌス神経毒素複合体とムチンの結合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

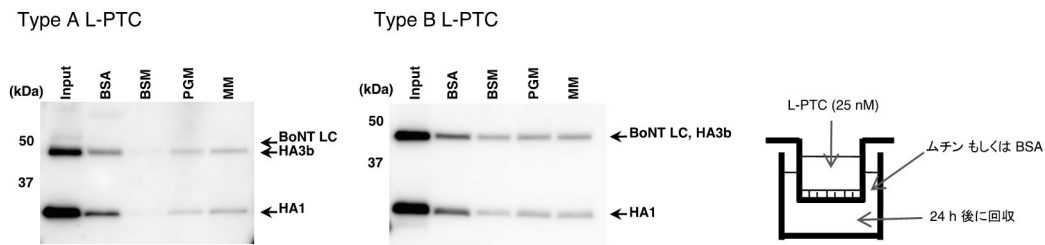


図3 ボツリヌス神経毒素複合体 L-PTC のムチンの透過

次に、ムチンとの相互作用に重要な HA サブコンポーネントを同定するために、A 型 HA と B 型 HA のそれぞれのサブコンポーネント (HA1、HA2、HA3) を用いて再構成したキメラ HA を用いてマウスムチンとの結合を解析した。その結果、HA1 が結合の違いに大きく寄与していることが示唆された (図 4)。次にムチンの透過を比較した結果、HA1 が B 型のキメラ HA が効率よくムチンを透過した。さらにマウス腸管内局在を解析した結果、HA1 もしくは HA3 が B 型のキメラ HA が絨毛上皮に結合している様子が観察された。これらの結果から、HA1 及び HA3 がムチンとの相互作用に関与しており、その寄与度は HA1 が大きいことが示唆された。

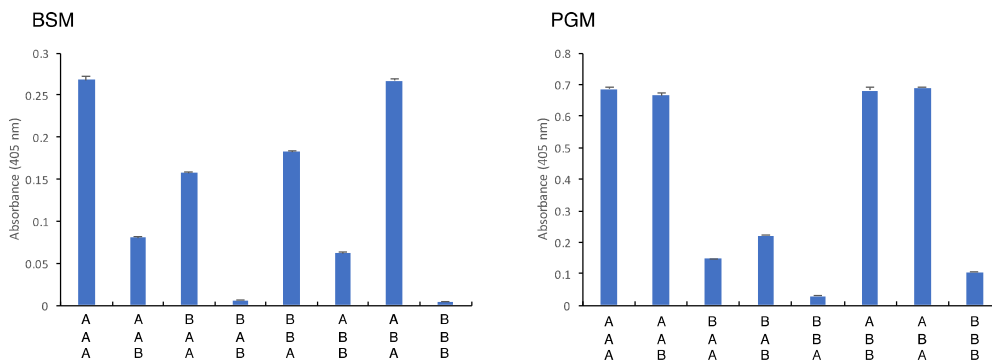


図4 A, B キメラ HA とムチンの結合

HA1 及び HA3 は糖鎖結合活性を持つことが知られている。その結合活性を消失させた変異体を作成し、ムチンとの相互作用を解析した結果、HA1 糖鎖結合変異体でムチンとの相互作用が消失した。この結果から、HA (特に HA1) の糖鎖認識の違いが A 型と B 型神経毒素複合体のムチンとの相互作用の違い、すなわち腸管吸収の違いに関与していることが考えられた。

HA の粘膜ワクチンへの応用 (抗原と HA の局在解析)

我々は過去に抗原 (OVA) を HA と共にマウスへ経鼻投与することにより、OVA 特異的な抗体産生誘導が増強されることを見出している。今回、HA と OVA を混合し、経鼻投与した際の局在を解析した。その結果、HA と OVA が M 細胞マーカーである GP2 陽性細胞に局在している様子が一部観察された。また、腸管内において HA と OVA が共局在し M 細胞から取り込まれている様子も確認された。今後、より効率よく抗原を取り込ませ抗原特異的免疫応答を誘導するために抗原 (OVA 等) と HA を連結させた組換えタンパク質を発現する系を構築する予定である。また、M 細胞特異的な A 型 HA、上皮全体から吸収される B 型 HA、さらにはムチンや上皮との相互作用を変化させた変異型 HA を作成し、それぞれの担体としての効果を比較解析することにより、より効果的な粘膜ワクチンの開発へ繋げたい。

< 引用文献 >

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 ( 共通 )

Sakaguchi G. Clostridium botulinum toxins. Pharmacol Ther 1982, 19:165.

Matsumura T, Sugawara Y, Yutani M, Amatsu S, Yagita H, Kohda T, Fukuoka S, Nakamura Y, Fukuda S, Hase K, Ohno H, Fujinaga Y. Botulinum toxin A complex exploits intestinal M cells to enter the host and exert neurotoxicity. Nat Commun. 2015, 6:6255.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 Matsumura T, Amatsu S, Misaki R, Yutani M, Du A, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Fully Human Monoclonal Antibodies Effectively Neutralizing Botulinum Neurotoxin Serotype B.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins (Basel)	6. 最初と最後の頁 302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins12050302.	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 Matsumura T, Fujinaga Y.	4. 巻 132
2. 論文標題 Functional Analysis of Botulinum Hemagglutinin (HA).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 191-200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0430-4_20.	査読の有無 無
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.	4. 巻 74
2. 論文標題 [Mechanism of intestinal absorption of botulinum neurotoxin complex].	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nihon Saikingaku Zasshi.	6. 最初と最後の頁 167-175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3412/jsb.74.167. Review. Japanese.	査読の有無 無
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 Iwata Y, Satou K, Furuichi K, Yoneda I, Matsumura T, et al.	4. 巻 91
2. 論文標題 Collagen adhesion gene is associated with bloodstream infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 22-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijid.2019.11.003. Epub 2019 Nov 15.	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 森本 ちよの、阿松 翔、北村 真悠、松村 拓大、藤永 由佳子
2. 発表標題 み換えボツリヌス毒素複合体の作製と腸管吸収におけるHAの機能解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 伸英、北村 真悠、齋藤 和輝、油谷 雅広、阿松 翔、松村 拓大、藤永 由佳子
2. 発表標題 ボツリヌス菌が産生するメンブレンベシクルに対する宿主応答の解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村 真悠、松村 拓大、阿松 翔、油谷 雅広、小林 伸英、藤永 由佳子
2. 発表標題 B型ボツリヌス毒素を中和するヒト型モノクローナル抗体の作用機序の解明
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 伸英、松村 拓大、油谷 雅広、阿松 翔、藤永 由佳子
2. 発表標題 ボツリヌス菌が産生するメンブレンベシクルによる宿主調節機構の解析.
3. 学会等名 第34回日本バイオフィルム学会、第57回日本細菌学会中部支部総会 合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村 拓大
2. 発表標題 乳児ボツリヌス症と乳児突然死症候群 (SIDS) との関連性
3. 学会等名 第 90 回日本感染症学会西日本地方学術集会、第 63 回日本感染症学会中日本地方学術集会、第 68 回日本化学療法学会西日本支部総会 合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村 拓大, 阿松 翔, 油谷 雅広, 藤永 由佳子
2. 発表標題 乳児ボツリヌス症と乳児突然死症候群 (SIDS) との関連性
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小林 伸英, 松村 拓大, 油谷 雅広, 阿松 翔, 藤永 由佳子
2. 発表標題 ボツリヌス菌が産生する膜小胞と宿主の相互作用の解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Takuhiro Matsumura, Sho Amatsu, Masahiro Yutani, Yukako Fujinaga
2. 発表標題 HUMAN DERIVED MONOCLONAL ANTIBODIES EFFECTIVELY NEUTRALIZING BOTULINUM NEUROTOXIN
3. 学会等名 TOXINS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 阿松翔, 松村拓大, 油谷雅広, 藤永由佳子
2. 発表標題 E-cadherin機能阻害活性を維持した最小化ボツリヌス菌由来ヘマグルチニンの開発
3. 学会等名 第92回細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsumura T, Amatsu S, Yutani M, Sugawara Y, Kohda T, Misaki R, Fujiyama K, Ikuta K, Fujinaga Y
2. 発表標題 Therapeutic and preventive effect of fully human monoclonal antibodies against type B botulinum intoxication
3. 学会等名 Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿松翔, 松村拓大, 油谷雅広, 藤永由佳子
2. 発表標題 B型ボツリヌス毒素複合体を構成するHA成分の多価性が上皮細胞間バリア破壊活性に与える影響
3. 学会等名 第55回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿松翔, 松村拓大, 油谷雅広, 藤永由佳子
2. 発表標題 E-cadherin機能阻害活性を維持した最小化ボツリヌス菌ヘマグルチニン由来物質の開発
3. 学会等名 第65回トキシシンポジウム
4. 発表年 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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------