

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17895

研究課題名（和文）黄色ブドウ球菌毒素は経皮感作による食物アレルギーに関与するか。

研究課題名（英文）Staphylococcus aureus toxin contributes to the development of food allergy after epicutaneous sensitization?

研究代表者

内田 志野 (Uchida, Shino)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：30838438

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）：マウスモデルの解析により、皮膚に黄色ブドウ球菌毒素のデルタトキシンが存在すると経皮感作とその後の食物アレルギーの発症が促進されることが明らかになった。皮膚にデルタトキシンが存在するとケラチノサイトが複数のサイトカインを産生し、その中の一つのサイトカインが皮膚の食物抗原を取り込む樹状細胞の所属リンパ節への遊走を促進し、食物抗原特異的なIgE産生を強く誘導した。従って、その後の食物抗原の摂取により、小腸マスト細胞が脱顆粒して食物アレルギーを引き起こすと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、アトピー性皮膚炎患者の皮膚に多い黄色ブドウ球菌毒素のデルタトキシンが経皮感作とそれに付随する食物アレルギーの発症を強く促進することが病態メカニズムとともに明らかになった。これらの研究成果は、増加の一途をたどる国民病である食物アレルギーの病態解明とともに病態に基づく予防・治療法の開発につながる可能性があり、学術的意義と社会的意義有すと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We used murine models of food allergy following epicutaneous sensitization and demonstrated that Staphylococcus aureus-derived delta-toxin in skin promoted epicutaneous sensitization to food allergen and food allergic responses after the intake of food allergen. Our results suggested that delta-toxin in the skin caused the release of several cytokines from keratinocytes, one of which strongly induced the translocation of food allergen-loaded dendritic cells to the draining lymph node and the production of food allergen-specific IgE, resulting in intestinal mast cell degranulation-mediated food allergic responses following the intake of food allergen.

研究分野：アレルギー・免疫学

キーワード：食物アレルギー 経皮感作 黄色ブドウ球菌毒素

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは増加の一途をたどる国民病であり、病態解明と画期的な予防・治療法の開発が期待されている。多くの食物アレルギーの発症には食物抗原(卵、牛乳など)に対する特異的IgEが関与する。食物抗原に対するIgEの産生に始まり、IgEが全身(腸管を含む)のマスト細胞の高親和性IgE受容体に結合すると感作が成立する。次に、食物抗原を摂取すると抗原はIgEに結合してマスト細胞の高親和性IgE受容体を架橋刺激する。活性化した腸管マスト細胞はケミカルメディエーターを放出して腹痛・下痢などの消化器症状を引き起こす。皮膚や呼吸器症状を伴う場合があり、重症例では血圧低下によるアナフィラキシーショックとなる。このように食物アレルギーのエフェクター相の理解は進んだ。他方、感作メカニズムには不明な点が多いが、最近、食物アレルギーにおける経皮感作の重要性が注目されている。マウスに卵白アルブミン(OVA)だけの経口投与を続けても食物アレルギーを誘導できない。OVAと(アジュバントである)Alumを腹腔投与して感作した後にOVAを経口投与すると食物アレルギーを誘導できる。このモデルマウスの解析はエフェクター相の解明に大きく貢献した。他方、剃毛後にtape-strippingしたマウスの皮膚にOVAだけを塗布することで経皮感作による食物アレルギーを誘導できると報告されたが、申請者はこの方法で必ずしも強い食物アレルギーを誘導できないことを経験した。従って、経皮感作による食物アレルギーを強く誘導するには何らかの生理的なアジュバントが必要であると考えた。また、アトピー性皮膚炎と食物アレルギーに相関があることや黄色ブドウ球菌毒素であるdelta-toxinはマスト細胞の活性化を介してアトピー性皮膚炎を増悪させることなどの報告に鑑み、食物アレルギーを発症させる皮膚感作には黄色ブドウ球菌毒素、特にdelta-toxinが重要な役割を演じる可能性を考えた。申請者は、研究課題の革心をなす学術的「問い」として「食物アレルギーにおける経皮感作はどのように誘導されるか?」を掲げ、この問いに対する答えに迫るべく本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アトピー性皮膚炎の増悪に寄与する黄色ブドウ球菌毒素のdelta-toxinが経皮感作を増強して食物アレルギーを強く誘導するかを検証することである。最終的な目標は、研究課題の革心をなす学術的「問い」である「食物アレルギーにおける経皮感作はどのように誘導されるか?」の答えに迫ることである。申請者は、食物アレルギーに関する過去の知見と自身の研究結果を踏まえて、「皮膚の黄色ブドウ球菌が産生するdelta-toxinが皮膚感作を強く誘導して食物アレルギーを発症させる」と仮説を立てた。本研究の学術的独自性はその仮説の立証に挑む点にある。

2. 研究の方法

(1) 野生型マウス(BALB/c)の剃毛した背部をtape-strippingした後、OVAのみ、あるいは、OVA + delta-toxinを2週間塗布した。塗布終了時の背部皮膚を採取して、各種染色により皮膚炎の程度を評価した。血液を採取して血清中のOVA特異的IgE量をELISAで測定した。また、塗布終了2週間後から、OVAを隔日で計6回経胃管投与した。その間、食物アレルギー症状(下痢など)を観察した。最終投与後に小腸を採取して、各種染色により小腸のマスト細胞数などを測定した。また、血清中のOVA特異的IgE量をELISAで測定した。最終投与後に腸間膜リンパ節を採取し、腸間膜リンパ節細胞をOVAで刺激したときのTh2サイトカイン(IL-4やIL-13など)量をELISAで測定した。

(2) 野生型マウス(BALB/c)の除毛した(tape-strippingしない)腹部に、OVAのみ、あるいは、OVA + delta-toxinを1週間に1回(計6回)塗布した。塗布終了時の腹部皮膚を採取して、各種染色により皮膚炎の程度を評価した。血液を採取して血清中のOVA特異的IgE量をELISAで測定した。また、塗布終了1週間後から、OVAを隔日で計6回経胃管投与した。その間、食物アレルギー症状(下痢など)を観察した。最終投与後に小腸を採取して、各種染色により小腸のマスト細胞数などを測定した。また、血清中のOVA特異的IgE量をELISAで測定した。最終投与後に腸間膜リンパ節を採取し、腸間膜リンパ節細胞をOVAで刺激したときのTh2サイトカイン量をELISAで測定した。同様の実験をマスト細胞欠損マウスでも実施した。

(3) 野生型マウス(BALB/c)の除毛した腹部(tape-strippingしない)に、ラベル化したOVA(AF643-OVA)のみ、あるいは、AF643-OVA + delta-toxinを1週間に1回(計2回)塗布した。塗布終了24時間後あるいは96時間後の腋下リンパ節を採取した。フローサイトメトリーを利用して、塗布終了24時間後の腋下リンパ節内の(AF643-OVAを取り込んだ)樹状細胞数を測定した。また、塗布終了96時間後の腋下リンパ節細胞をOVAで刺激したときのTh2サイトカイン量をELISAで測定した。同様の実験をマスト細胞欠損マウスでも実施した。

(4) マウス由来のケラチノサイトをdelta-toxinで刺激したとき培養液中に放出される各種サイ

トカイン量をELISAで測定した。

(5) (4)で同定されたサイトカインの中和抗体をマウスの腹腔に投与して、(2)及び(3)の実験を行った。サイトカインの中和抗体の投与が及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスの剃毛した背部をtape-strippingした後、OVAのみ、あるいは、OVA + delta-toxin を2週間塗布した後の背部皮膚の組織所見では、後者のマウスの表皮・真皮の肥厚や炎症細胞浸潤が強かった。OVAのみを塗布されたマウスと比較して、OVA + delta-toxinを塗布されたマウスの血清中のOVA特異的IgEはより高値を示した。その後、OVAを経胃管投与したとき、どちらのマウスでも食物アレルギー症状の下痢が徐々に出現した。しかし、OVAのみを塗布されたマウスと比較して、OVA + delta-toxinを塗布されたマウスの下痢の出現は早く、その頻度も多かった。また、OVAのみを塗布されたマウスと比較して、OVA + delta-toxinを塗布されたマウスの小腸マスト細胞数は多かった。マウスの腸間膜リンパ節細胞をOVAで刺激したときのTh2サイトカイン量も、OVAのみを塗布されたマウスの場合と比較してOVA + delta-toxinを塗布されたマウスでより多かった。これらの結果は、tape-strippingした皮膚にdelta-toxinが存在すると食物抗原(OVA)の感作が強まり、その後の食物抗原摂取による食物アレルギーの発症が促進されることを示唆した。他方、tape-strippingのみで皮膚からIL-33が放出されて、そのIL-33が小腸の免疫細胞に作用して食物アレルギーの発症が促進されると報告された。従って、皮膚に存在するdelta-toxinが食物アレルギーの発症に及ぼす作用を明確にするために、tape-strippingを実施しないマウスモデルの解析が必要であると考えられた。

(2) 野生型マウスの除毛した(tape-strippingしない)腹部にOVAのみ、あるいは、OVA + delta-toxin の塗布を継続した場合、OVAのみの塗布では皮膚の炎症所見はほとんど認められなかった。OVA + delta-toxinを塗布した場合には、わずかな表皮・真皮の肥厚や炎症細胞浸潤が認められたが、tape-strippingが行われた場合と比較すると軽微であった。OVAのみを塗布されたマウスでは血清中のOVA特異的IgE値の上昇は認められなかったが、OVA + delta-toxinを塗布されたマウスでは血清中のOVA特異的IgE値の上昇が確認された。その後、OVAを経胃管投与したとき、OVA + delta-toxinを塗布されたマウスだけで食物アレルギー症状(下痢)の出現や小腸マスト細胞の増加が認められた。また、腸間膜リンパ節細胞をOVAで刺激したときのTh2サイトカイン量もOVA + delta-toxinを塗布されたマウスで多かった。一方、マスト細胞欠損マウスでも野生型マウスと同様にOVA + delta-toxin の塗布によるOVA特異的IgE値の上昇が確認された。しかし、その後のOVAの経胃管投与による食物アレルギーは発症しなかった。これらの結果は、tape-strippingをしなくても皮膚にdelta-toxinが存在するだけで食物抗原(OVA)の感作とその後の(食物抗原摂取による)食物アレルギーが誘導されることを示唆した。また、マスト細胞は、皮膚のdelta-toxinの存在による感作(OVA特異的IgEの産生)に関与しないが、食物抗原摂取による食物アレルギーの発症には不可欠であることが確認された。

(3) AF643-OVAのみ、あるいは、AF643-OVA + delta-toxin の最終塗布24時間後の腋下(所属)リンパ節を解析した結果、後者の場合のみ、AF643-OVAを取り込み所属リンパ節へ移動した樹状細胞が著しく多いことが確認された。また、後者の場合のみ、最終塗布96時間後の腋下リンパ節細胞をOVAで刺激したときのTh2サイトカインの産生が確認された。これらの結果から、tape-strippingをしなくても皮膚にdelta-toxinが存在するだけで、食物抗原(OVA)を取り込んだ皮膚の樹状細胞の所属リンパ節への遊走が促進されると考えられた。また、マスト細胞は(皮膚のdelta-toxinの存在による)樹状細胞の所属リンパ節への移動やTh2誘導に影響しないことが確認された。

(4) マウス由来のケラチノサイトをdelta-toxinで刺激したとき、ケラチノサイトの細胞死は確認されなかった。他方、培養上清中のIL-33量の増加は認められなかった。しかし、複数のサイトカイン量の増加が確認された。これらの結果は、delta-toxinが何らかの免疫受容体を介して複数のサイトカイン産生を誘導することを示唆した。

(5) (4)で同定された一つのサイトカインの中和抗体をマウスに投与した結果、皮膚にdelta-toxinが存在するときに認められる樹状細胞の所属リンパ節への移動やOVA特異的IgEの産生が抑制された。これらの結果から、(4)で同定された一つのサイトカインは、皮膚にdelta-toxinが存在することで強く誘導されるOVAの経皮感作と(その後のOVA経胃管投与による)食物アレルギーの発症において不可欠な働きをすることを考えられた。

(6) (1)-(5)の結果を総合すると、次のような機序が想定される。皮膚にdelta-toxinが存在すると、tape-strippingをしなくても皮膚のケラチノサイトに作用して複数のサイトカイン産生が誘導される。この中の一つのサイトカインは皮膚でOVAを取り込んだ樹状細胞の所属リンパ節への遊走を促進する。その結果、Th2/Tfh誘導が促進されてOVA特異的IgE産生が強く誘導される。その後のOVA摂取はIgEと抗原による小腸マスト細胞の脱顆粒を引き起こし、小腸マスト細胞の

増加とともに食物アレルギー症状を強く誘導する。一方、経皮感作（OVA特異的IgE産生）までの過程に皮膚のマスト細胞やIL-33は大きく関与しないことが示唆された。delta-toxinはマスト細胞を直接脱顆粒させることが報告されているが、tape-strippingがないでdelta-toxinを塗布した場合、delta-toxinは真皮のマスト細胞を直接活性化できないと考えられた。アトピー性皮膚炎を発症して引っ掻き行動が認められる場合には、delta-toxinは真皮のマスト細胞を直接活性化して炎症を増悪させると考えられる。しかし、アトピー性皮膚炎の発症前で皮膚にdelta-toxinが存在するだけでも、樹状細胞の活性化を介して経皮感作が促進されることが示された。今後、ケラチノサイトに発現するdelta-toxinの受容体を明らかにして、皮膚のdelta-toxinによる経皮感作とその後の食物アレルギー発症の機序を解明する予定である。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 内田志野、伊沢久未、安藤智暁、貝谷綾子、北浦次郎	4. 巻 74
2. 論文標題 CD300fは食物アレルギーの治療標的となりうる	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 科学評論社、臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 398-405
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 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 貝谷綾子、伊沢久未、内田志野、亀井杏菜、前原明絵、安藤智暁、北浦次郎	4. 巻 75
2. 論文標題 CD300f分子とアレルギー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 科学評論社、臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 218-225
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 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 Uchida S, Izawa K, Ando T, Yamada H, Uchida K, Negishi N, Kaitani A, Maehara A, Nagamine M, Kamei A, Takamori A, Maeda K, Nakano N, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Nagahara A, Watanabe S, Kitaura J	4. 巻 75
2. 論文標題 CD300f is a potential therapeutic target for the treatment of food allerg	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 471-474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.14034	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 Izawa K, Kaitani A, Ando T, Maehara A, Nagamine M, Yamada H, Ando T, Ide T, Matsuzawa M, Okamoto Y, Yin E, Fukase S, Wang H, Kamei A, Uchida S, Keiko M, Nakano N, Uchida K, Tamura N, Ikeda K, Ebihara N, Shimizu T, Voehringer D, Roers A, Ogawa H, Okumura K, Kitaura J	4. 巻 140
2. 論文標題 Differential lipid recognition by mouse versus human CD300f, inhibiting passive cutaneous anaphylaxis, depends on a single amino acid substitution in its immunoglobulin-like domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol	6. 最初と最後の頁 710-713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2019.08.43	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 該当する

〔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 Anna Kamei, Shino Uchida, Hiromichi Yamada, Kumi Izawa, Tomoaki Ando, Naoko Negishi, Akie Maehara, Ayako Kaitani, Yoko Okamoto, Nobuhiro Nakano, Ko Okumura, Jiro Kitaura
2. 発表標題 An inhibitory receptor CD300f inhibits the pathogenesis of OVA-induced food allergy in mice
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Anna Kamei, Hiromichi Yamada, Kumi Izawa, Tomoaki Ando, Ayako Kaitani, Akie Maehara, Hexing Wang, Koji Tokushige, Shino Uchida, Nobuhiro Nakano, Ko Okumura, Jiro Kitaura
2. 発表標題 Staphylococcus aureus d-toxin in skin promotes the development of food allergy following epicutaneous sensitization
3. 学会等名 第50回日本免疫学会
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
---------	---------