

ニッポンハム食の未来財団 2022 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	経皮感作による食物アレルギー発症の新規病態機序の解明
フリガナ	アンドウ トモアキ
代表者名	安藤 智暁
所属機関 (機関名) (役職名)	順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター
本助成金による 発表論文, 学会発表	Frontiers in Immunology (Front Immunol)に論文投稿中 (in revision) であり、論文が受理され次第、ニッポンハム食の未来財団へ報告する。

研究結果要約

食物アレルギーは食物抗原に対する特異的 IgE の産生 (感作) に始まる。近年、経皮感作の重要性が示されている。また、黄色ブドウ球菌毒素 δ -toxin は感作に関与する可能性が指摘されている。一方、これまでの経皮感作モデルで行われてきた皮膚の **tape-stripping** はそれ自体、腸管の免疫系に影響を及ぼすので、**tape-stripping** を使用しないモデルの解析が必要である。本研究の目的は、**tape-stripping** を使用しないマウスモデルを利用し、皮膚における黄色ブドウ球菌毒素の存在が食物アレルギーに与える影響を明確にすることである。マウスの皮膚に δ -toxin の存在下・非存在下で卵白アルブミン(OVA)を塗布した後、OVA を経胃管投与すると、 δ -toxin が存在する場合だけ、OVA 特異的 IgE 値の上昇とともに食物アレルギーが発症した。 δ -toxin はケラチノサイトに作用して IL-1 α の産生を促し、IL-1 α 依存的な皮膚の樹状細胞の活性化 (OVA の取り込みと所属リンパ節への移動) を介して、感作とその後の食物アレルギーを誘導することが明らかになった。この結果は、皮膚に黄色ブドウ球菌毒素 δ -toxin が存在するだけで、食物抗原に対する感作が誘導されることを示した。従って、本研究成果は、食物アレルギーに対する画期的な予防法の開発につながる可能性を秘めており、大きな意義を有する。

研究目的

食物アレルギーは増加の一途をたどる即時型アレルギー疾患である。多くの食物アレルギーの発症は食物抗原に対する特異的 IgE の産生（感作）に始まる。近年、食物アレルギーにおける経皮感作の重要性が指摘されているが⁵、その分子機序は十分に解明されていない。一方、アトピー性皮膚炎と食物アレルギーの発症が関連すること³、食物アレルギーの感作と黄色ブドウ球菌が関連することが示された⁴。さらに、複数の黄色ブドウ球菌毒素（ δ -toxin（別名：phenol soluble modulins (PSM γ ）や PSM α など）が皮膚炎や感作に関与する可能性が指摘されている。しかし、皮膚の黄色ブドウ球菌毒素が経皮感作及び感作後の食物アレルギーにどのような影響を与えるかは統合的に理解されていない。これまで経皮感作のマウスモデルでは、マウスの皮膚を tape-stripping して皮膚バリアを破壊してから処置が行われてきた。しかし、皮膚の tape-stripping だけで放出される IL-33 が腸管の ILC2-tuft 細胞の活性化を介して腸管のマスト細胞を増加させると報告された⁵。従って、皮膚の黄色ブドウ球菌毒素の作用を明確にするためには、tape-stripping しないで塗布する方法を取り入れて解析する必要があると考えられた。

取り組む課題（問題）は、黄色ブドウ球菌毒素に着目して、経皮感作による食物アレルギーの病態を解明することである。

本助成研究の目的は、経皮感作（tape-stripping を使用しない方法）による食物アレルギーのマウスモデルを構築して、皮膚における黄色ブドウ球菌毒素の存在が感作及びその後の食物アレルギー発症にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることである。特に、抗原特異的 IgE の産生亢進と小腸マスト細胞増加に着目して解析を進める。また、皮膚－腸管免疫系のクロストークを明らかにして、経皮感作による食物アレルギーの鍵となる免疫細胞とサイトカインシグナルの解明を目指す。最終的な目標は、経皮感作による食物アレルギーの病態機序に基づき、食物アレルギーに対する画期的な予防・治療法を開発することである。

本助成研究の意義は、食物アレルギーの発症における皮膚の黄色ブドウ球菌毒素の役割が解明され、食物アレルギーに対する新たな予防法・治療法の開発が期待される点にある。

研究計画及び研究手法

① マウス (BALB/c) に対して経皮感作を行う

剃毛後に tape-stripping しない背部に OVA と黄色ブドウ球菌毒素 (δ -toxin や PSM α 3 など) を塗布 (1 週間間隔で計 4-6 回) する。

② 感作終了時の血液・背部皮膚・腋窩・腸間膜リンパ節を採取する。

皮膚組織の各種染色により皮膚炎の程度を評価する (表皮・真皮の肥厚、角層の剥離、炎症細胞浸潤など)。

血液や各種組織から細胞分離を行い、各種血球系細胞 (T 細胞・B 細胞・樹状細胞・マスト細胞・ILC2 など) の比率を測定する (flow cytometry)。

血清や各種組織から抽出したタンパク中の炎症性メディエーター <Th2 サイトカイン(IL-4・IL-5・IL-13 など)・IL-1 α ・IL-1 β ・IL-18・IL-33・TSLP 及び MCPT-1 など> 量、血清中の免疫グロブリン (IgE、IgG1 など) 量や OVA 特異的免疫グロブリン量 (IgE、IgG1 など) を測定する (ELISA)。

各種組織から RNA を抽出して、炎症性メディエーター量を測定する (real-time PCR)。

リンパ節を OVA で再刺激したときに産生される Th2 サイトカイン量を測定する (ELISA)。

③ 感作終了時の小腸 (空腸・回腸) を採取する。

各種染色により マスト細胞数などを測定 する。粘膜上皮・粘膜固有層の各種血球系細胞 (マスト細胞・MMC9・ILC2・樹状細胞・T 細胞など) の比率を測定する。組織から RNA を抽出して、各種炎症性メディエーター量を測定する。

④ 経皮感作時にラベル化した OVA (OVA-AF647) を使用して、経時的な皮膚・リンパ節の樹状細胞における AF647 陽性率を解析する (flow cytometry)。

⑤ マウスのケラチノサイトを黄色ブドウ球菌毒素で刺激する。

放出される各種サイトカインのタンパク量を測定する (ELISA)。産生される各種サイトカインの RNA 量を測定する (real-time PCR)。

- ⑥ 野生型マウス (BALB/c) を経皮感作 (①) した後、OVA を経胃管投与 (2 日間隔で計 5-8 回) する。

食物アレルギー症状 (下痢など) を観察する。最終投与後に、皮膚・血液・腸管・リンパ節を採取して、②-④と同様の実験を行う。

- ⑦ マスト細胞欠損や遺伝子改変 (ST2 欠損など) マウスを使用して⑥と同様の実験を行う。

- ⑧ 野生型マウスの経皮感作後の食物アレルギーモデルにおいて、各種サイトカインシグナルを阻害する分子 (IL-1 α 抗体など) を前投与して、②③④⑥と同様の実験を行う。

上記の実験 (①-⑧) を有機的に展開する。

マウスモデルにおいて、黄色ブドウ球菌毒素の存在が皮膚・腸管の免疫動態 (マスト細胞など)、h2 誘導、B 細胞の抗原特異的 IgE 産生などをどのように制御して、食物アレルギーを誘導するかを明らかにする。

結果と考察

(1) : ①⑥

BALB/c マウスの腹部を剃毛後、tape-stripping をしないで、OVA のみ、あるいは、OVA と黄色ブドウ球菌毒素 (δ -toxin や PSM α 3) を塗布 (週 1 回で計 6 回) し、その後、OVA を経胃管投与した。その結果、OVA と δ -toxin を塗布した場合、食物アレルギー症状の下痢が早期に高頻度に認められた。OVA のみを塗布した場合には、下痢症状はほとんど認められなかった (図 1)。また、OVA のみを塗布した場合と比較して OVA と δ -toxin を塗布した場合、OVA の経胃管 (最終) 投与後の血清 OVA 特異的 IgE 値や MCPT-1 (粘膜型マスト細胞の活性化マーカー) 値は有意に高く、空腸マスト細胞数も多かった (図 2)。また、空腸組織の Th2 サイトカイン (IL-4・IL-13 など) や MCPT-1

の RNA 発現量も有意に高かった。これらの結果は、tape-stripping を施さなくても皮膚に δ -toxin が存在すると、Th2/Tfh 誘導による経皮感作とその後の食物アレルギーが誘導されることを示した。他方、OVA と PSM α 3 を塗布した場合にも OVA の経胃管投与による下痢が低頻度で認められたが、OVA と δ -toxin を塗布した場合と比較して、血清 OVA 特異的 IgE 値は低く、空腸マスト細胞数は少なかった。従って、以後、OVA と δ -toxin を塗布するモデルを中心に解析を進めた。

図 1

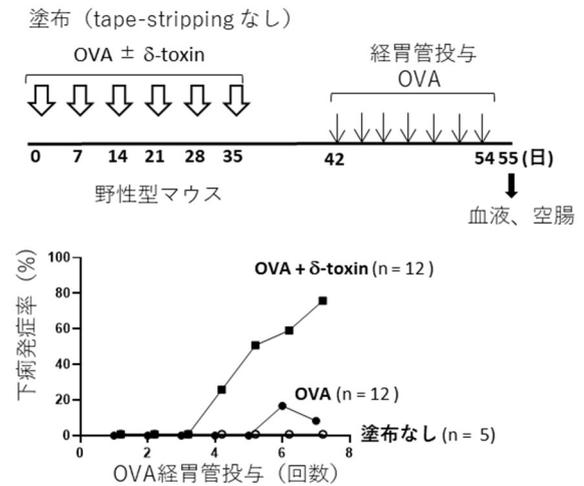
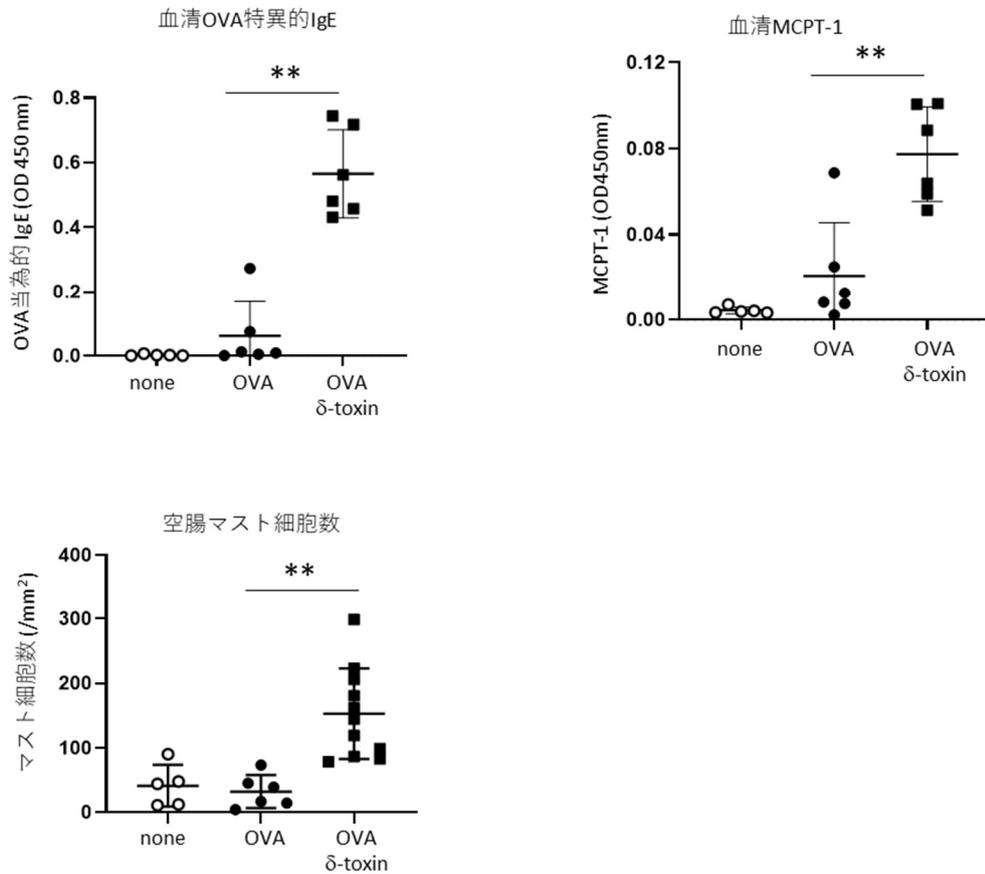


図 2



(2) : ①⑦

野生型とマスト細胞欠損 (*Kit^{W-sh/W-sh}*) マウスに対して、同様の実験を行った。その結果、マスト細胞欠損マウスでは食物アレルギー症状 (下痢) が全く認められなかった。しかし、血清 OVA 特異的 IgE 値はマスト細胞欠損により影響を受けなかった (図3)。つまり、マスト細胞は食物アレルギー症状の発症には不可欠であるが、経皮感作には関与しないと考えられた。次に、野生型と ST2(IL-33 受容体)欠損マウスに対して、同様の実験を行った。その結果、ST2 欠損は、食物アレルギー症状 (下痢) 及び血清 OVA 特異的 IgE 値に影響しなかった (図4)。つまり、このモデルでは、IL-33/ST2 シグナルが経皮感作及び食物アレルギー症状に関与しないことが示された。

図3

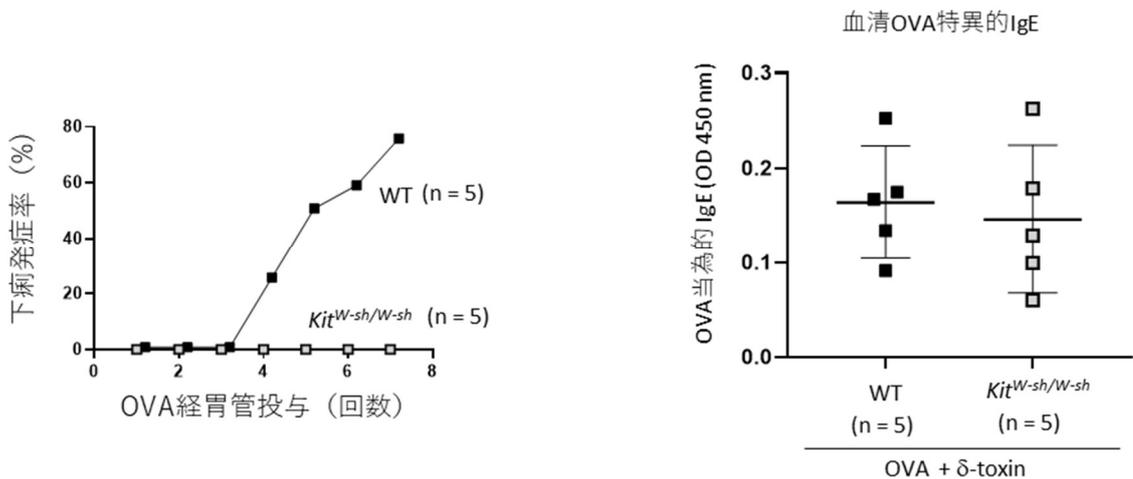
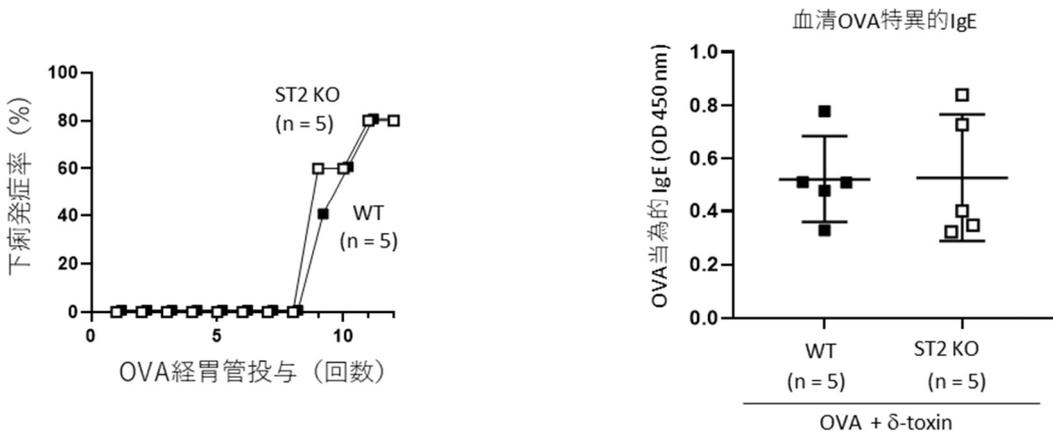


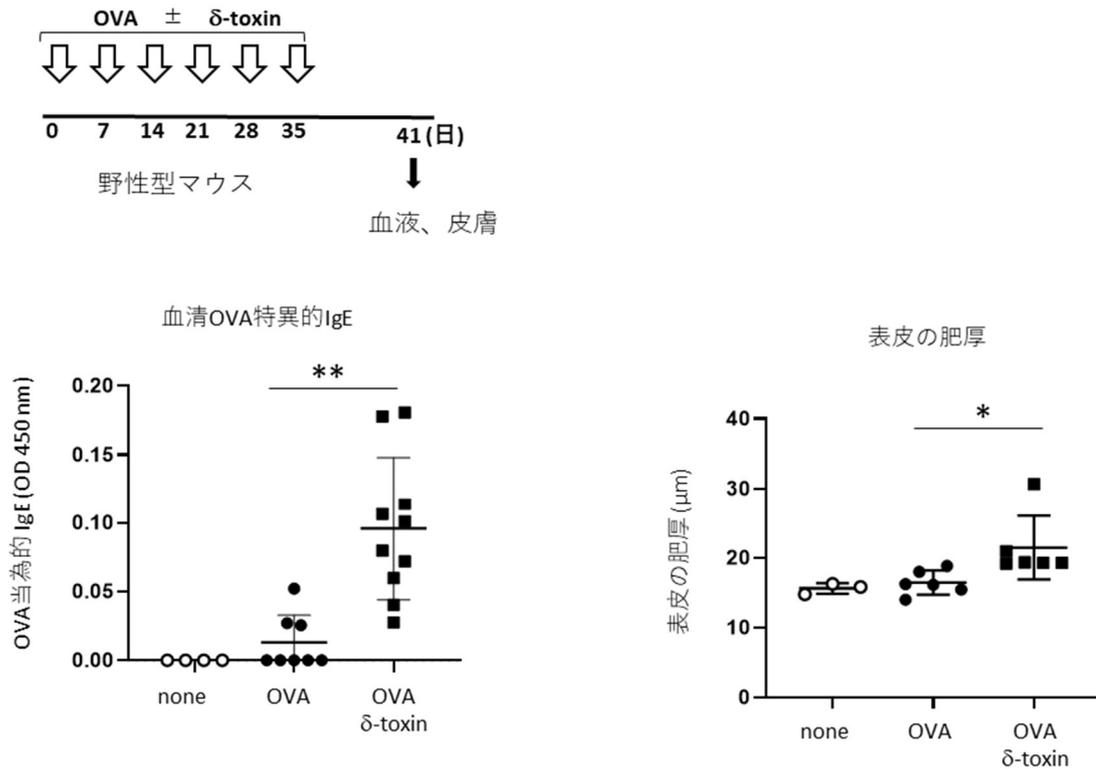
図4



(3):① - ④

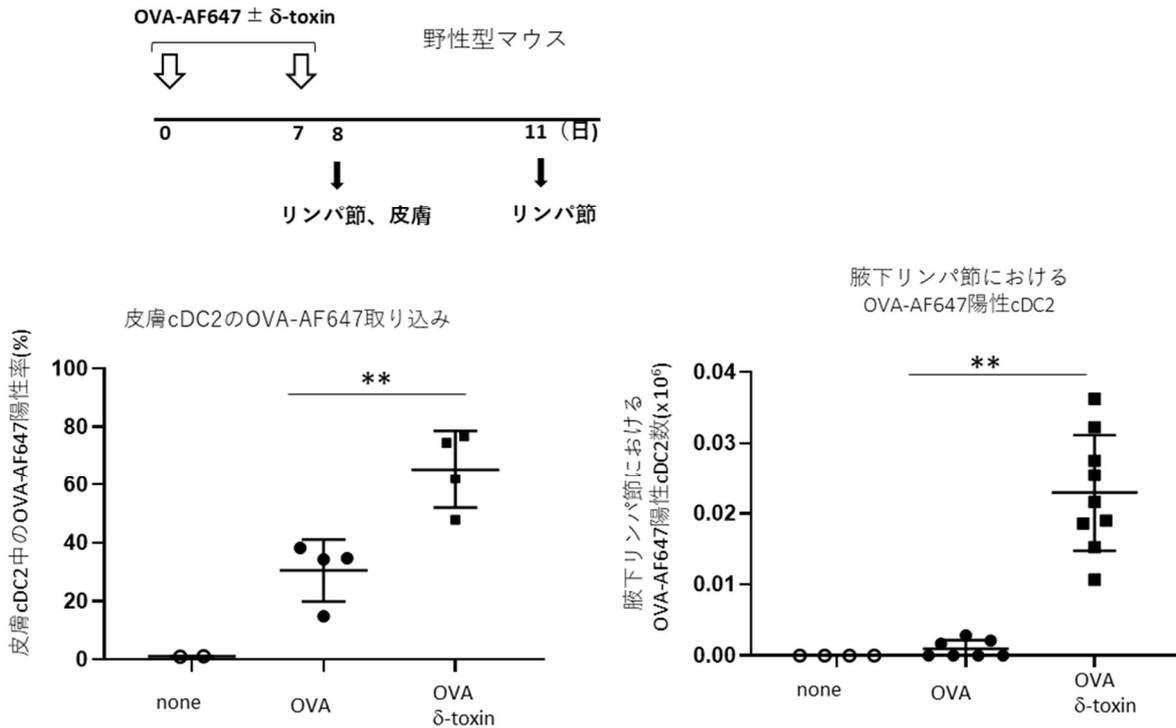
次に、OVA と δ -toxin を塗布した (OVA の経胃管投与前) のマウスを解析した。この時点で、OVA と δ -toxin を塗布したマウスの血清 OVA 特異的 IgE は高値を示し、皮膚では軽度の mast 細胞数増加と表皮肥厚が認められた (図 5)。一方、空腸の mast 細胞数の増加は認められなかった。

図 5



さらに、OVA-AF647 のみ、あるいは、OVA-AF647 と δ -toxin を塗布 (週 1 回、計 2 回) し、皮膚及び腋下リンパ節における樹状細胞の conventional dendritic cell 2 (cDC2) を解析した。その結果、 δ -toxin が存在すると、皮膚の cDC2 における OVA-AF647 の取り込み率と腋下リンパ節の OVA-AF647 陽性 cDC2 数が有意に増加することが判明した (図 6)。また、腋下リンパ節細胞を OVA で再刺激したときの Th2 サイトカイン (IL-4 と IL-13) の産生量が有意に多いことが示された。これらの結果から、皮膚に δ -toxin が存在すると、皮膚の cDC2 が活性化 (抗原の取り込みと所属リンパ節への移動が亢進) し、Th2/Tfh 誘導による抗原感作が成立すると考えられた。

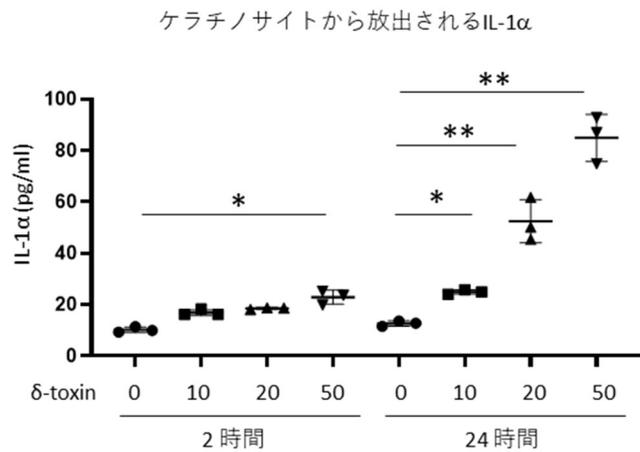
図6 塗布 (tape-stripping なし)



(4) : ⑤

このモデルでδ-toxin を塗布する場合、最初にδ-toxin が作用する細胞は表皮のケラチノサイトであると想定されたので、δ-toxin をマウス由来ケラチノサイトに添加した。その結果、δ-toxin はケラチノサイトから IL-1αの放出を誘導した(図7)。また、δ-toxin はケラチノサイトの IL-1αの RNA 発

図7



現量を軽度上昇させることを確認した。しかし、δ-toxin の受容体である FPR ファミリー分子の RNA 発現量は検出感度以下であった。他方、IL-1α, IL-18, IL-25, IL-33 の放出は検出されなかった。培養上清中に TSLP は検出されたが、δ-toxin の添加により増加しなかった。また、δ-toxin はケラチノサイトに細胞死を誘導したが、その程度は PSMα3 より有意に弱かった。

これらの結果は、 δ -toxin がケラチノサイトに作用して IL-1 α の放出を誘導することを示した。

(5): ① - ④⑥⑧

次に、皮膚に存在する δ -toxin による経皮感作及びその後の食物アレルギーの誘導における IL-1 α の関与を明らかにするための実験を行った。OVA のみ、あるいは、OVA と δ -toxin を塗布（週 1 回、計 2 回）した後の皮膚組織を解析した結果、 δ -toxin は皮膚におけるタンパクレベルの IL-1 α 量を増加させることが明らかになった（図 8）。そこで、OVA-AF647 と δ -toxin を塗布（週 1 回、計 2 回）する実験系で、抗 IL-1 α 抗体あるいはコントロール抗体の前投与が皮膚及び腋下リンパ節における cDC2 の活性化に及ぼす影響を解析した。その結果、抗 IL-1 α 抗体の前投与は皮膚の cDC2 における OVA-AF647 の取り込み率と腋下リンパ節の OVA-AF647 陽性 cDC2 数を有意に低下させた（図 9）。さらに、OVA-AF647 と δ -toxin を塗布（週 1 回、計 6 回）する実験系で抗 IL-1 α 抗体あるいはコントロール抗体を前投与した後、OVA を経胃管投与して食物アレルギー症状を解析した。その結果、抗 IL-1 α 抗体の前投与は δ -toxin の存在下で誘導される食物アレルギー症状（下痢）を完全に消失させた（図 10）。 δ -toxin の存在下で認められる表皮の肥厚も強く抑制された。さらに、抗 IL-1 α 抗体の前投与は、 δ -toxin の存在下で認められる血清 OVA 特異的 IgE 値や MCPT-1 値の上昇や空腸マスト細胞数の増加を著しく低下させた（図 11）。これらの結果は、皮膚に δ -toxin が存在すると、局所で産生される IL-1 α が皮膚の cDC2 活性化を介して OVA 特異的 IgE 産生を促し、その後の食物アレルギーを誘導する可能性を強く示唆した。

図 8

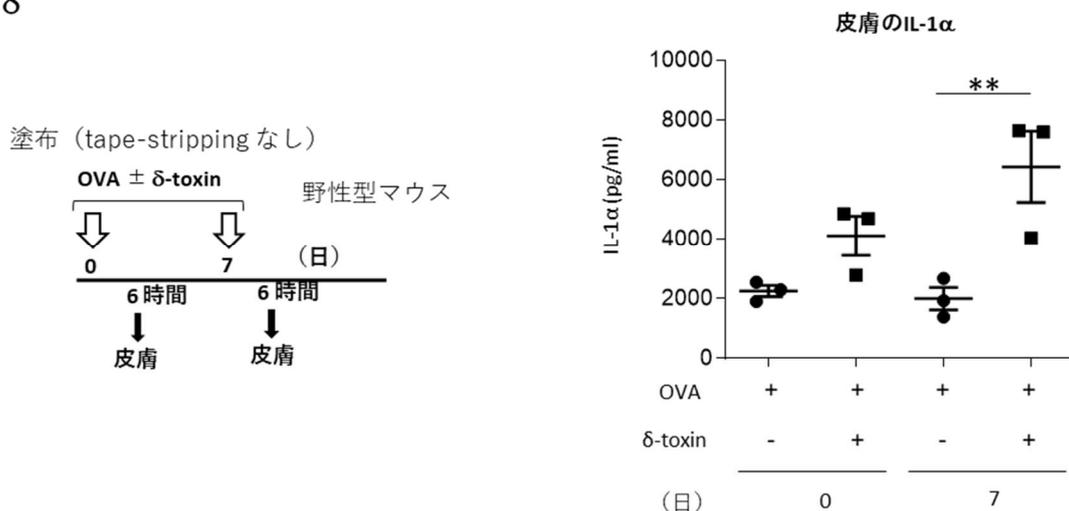


図9

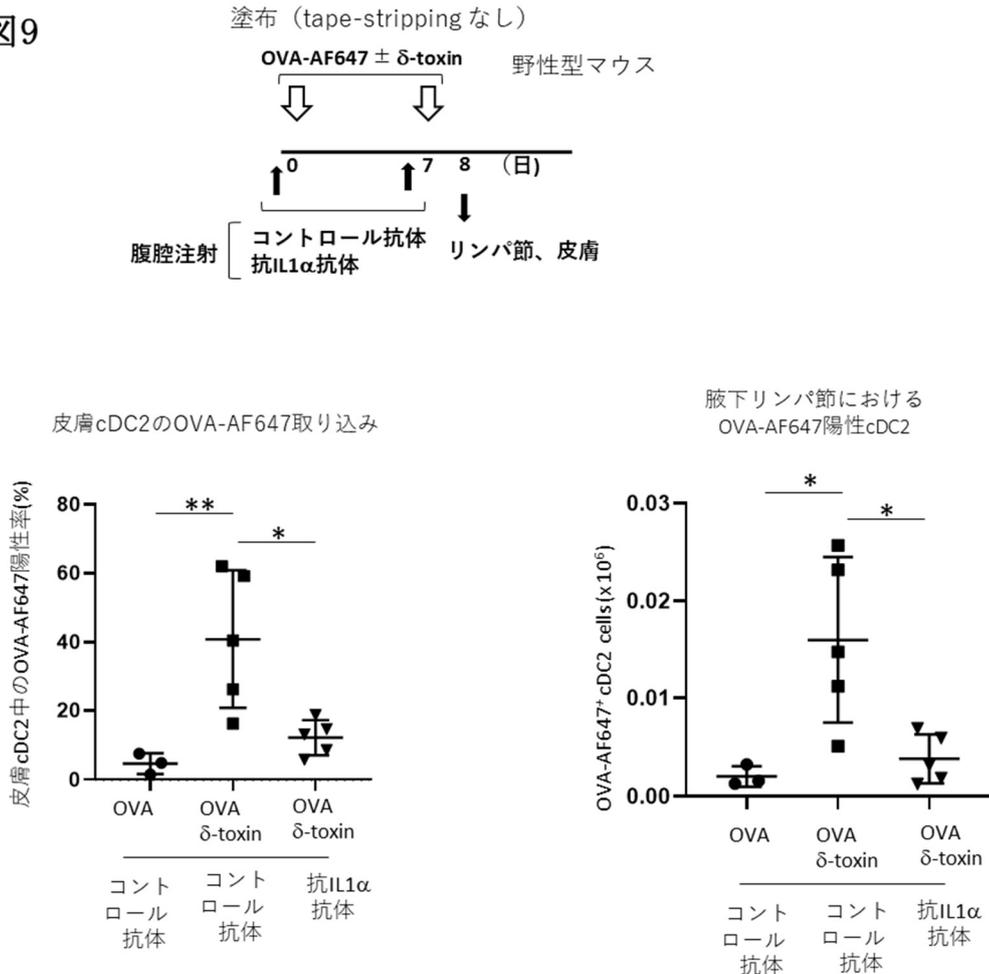


図10

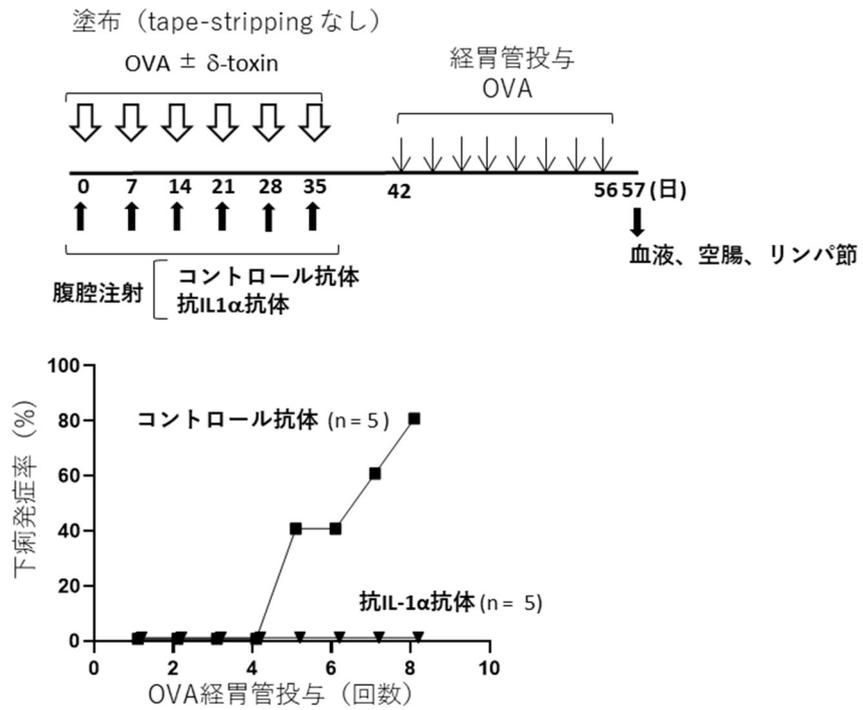
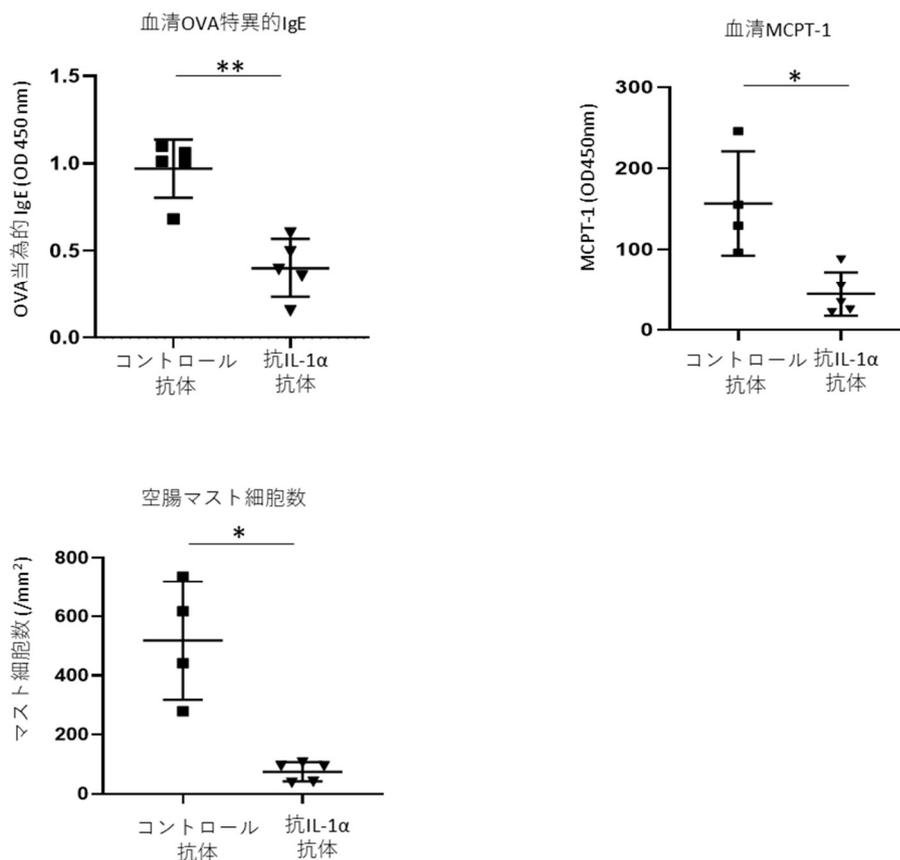


図11



(6) まとめと考察

従来の経皮感作モデルでは **tape-stripping** を施してから抗原塗布が行われてきた。これは、アトピー性皮膚炎で認められる引っ掻き行動を模倣したモデルと言えるかもしれない。一方、皮膚の **tape-stripping** だけで局所に **IL-33** が放出され、その **IL-33** は遠隔の腸管免疫系に影響を及ぼすことが報告されたように⁵、**tape-stripping** を利用するモデルの解析には注意を要する。今回、**tape-stripping** を行わずに食物抗原と黄色ブドウ球菌毒素を塗布することによって、感作における黄色ブドウ球菌毒素の作用を明確にすることができたと考えられる。このモデルは、皮膚に黄色ブドウ球菌毒素が存在するがアトピー性皮膚炎が発症する前の段階を模倣しているかもしれない。いずれにせよ、このモデルの解析から、皮膚に黄色ブドウ球菌毒素 δ -toxin が存在すると食物抗原に対する経皮感作が成立し、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が示された。さらに、 δ -toxin は表皮のケラチノサイトに作用して **IL-1 α** の産生を促し、この **IL-1 α** が皮膚の **cDC2** 活性化（食物抗原の取り込み及び所属リンパ節への移動の亢進）を介して食物抗原特異的 **IgE** 産生を

誘導し、食物アレルギーの発症に寄与することが明らかになった。このように、食物アレルギー発症機序における皮膚の黄色ブドウ球菌毒素 δ -toxin の役割が明確になり、所期の結果が得られたと考えられる。

δ -toxin は主にケラチノサイトの細胞死を介して IL-1 α の放出を誘導していると考えられたが、ケラチノサイトに未知の δ -toxin 受容体が存在するか否か、また、放出された IL-1 α がオートクラインに作用して IL-1 α の産生を増強するかは、今後の研究課題である。また、PSM α 3 はケラチノサイトにより強い細胞死を誘導するが、このマウスモデルでは PSM α 3 による感作やその後の食物アレルギーの誘導は弱かった。これらの結果を考慮すると、PSM α 3 によりケラチノサイトから放出される他の damage-associated molecular patterns (DAMPs)などが感作を負に制御している可能性がある。今後、皮膚に存在する黄色ブドウ球菌毒素の δ -toxin と PSM α 3 が食物アレルギーの発症に及ぼす作用の違いを解析する必要があると考えられた。

現在、本研究成果をまとめて、Frontiers in Immunology (Front Immunol)に論文投稿中であり、近日中に改訂論文を投稿する予定である。また、本年度の複数の学会（日本アレルギー学会など）で本研究成果を発表する予定である。

今後の研究活動について

本研究の結果から、tape-stripping を施さない皮膚であっても黄色ブドウ球菌毒素 δ -toxin が存在すると、食物抗原の経皮感作とその後の食物アレルギーが誘導される可能性が示された。アトピー性皮膚炎の発症前であっても、皮膚に黄色ブドウ球菌毒素 δ -toxin が存在することの危険性が示された。従って、正常な皮膚やアトピー性皮膚炎の皮膚に存在する黄色ブドウ球菌とともに毒素（ δ -toxin など）を定量化して、食物アレルギー発症との因果関係を解析する研究が必要になると考えられる。また、 δ -toxin がケラチノサイトから IL-1 α の放出させる分子機序（IL-1 α の放出は細胞死を介する機序だけか？未知の δ -toxin 受容体は存在しないか？）を解明する必要がある。さらに、黄色ブドウ球菌毒素 PSM α 3 はより強い細胞死を誘導するが、PSM α 3 による経皮感作と食物アレルギーの誘導能が δ -toxin より弱いのはなぜか？ここに大きな疑問が残っている。今後の研究活動でこの

謎に迫る研究を行いたいと考えている。強い細胞死は多様な大量の DAMPs の放出を誘導すると想定されるが、DAMPs の中には経皮感作を負に制御する分子も存在するかもしれない。ケラチノサイトから放出される可溶性分子、また、その分子により他の免疫細胞が放出する可溶性分子、それらの相互作用を解析して、全貌を明らかにしたいと考えている。また IL-1 α の作用を阻害する薬剤（抗体を含む）は食物アレルギーの予防に寄与する可能性があり、その効果を種々のマウスモデルで検証する予定である。

参考文献

- 1) Lack G, Fox D, Northstone K, Golding J; Avon Longitudinal Study of Parents and Children Study Team. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N Engl J Med.* 2003 Mar;348(11):977-85.
- 2) Tordesillas L, Berin MC, Sampson HA. Immunology of Food Allergy. *Immunity.* 2017 Jul;47(1):32-50.
- 3) Tsakok T, Marrs T, Mohsin M, Baron S, du Toit G, Till S, Flohr C. Does atopic dermatitis cause food allergy? A systematic review. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Apr;137(4):1071-8.
- 4) Tsilochristou O, du Toit G, Sayre PH, Roberts G, Lawson K, Sever ML, Bahnson HT, Radulovic S, Basting M, Plaut M, Lack G; Immune Tolerance Network Learning Early About Peanut Allergy Study Team. Association of *Staphylococcus aureus* colonization with food allergy occurs independently of eczema severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Aug;144(2):494-503.
- 5) Leyva-Castillo JM, Galand C, Kam C, Burton O, Gurish M, Musser MA, Goldsmith JD, Hait E, Nurko S, Brombacher F, Dong C, Finkelman FD, Lee RT, Ziegler S, Chiu I, Austen KF, Geha RS. Mechanical Skin Injury Promotes Food Anaphylaxis by Driving Intestinal Mast Cell Expansion. *Immunity.* 2019 May 21;50(5):1262-1275.e4.

以上