

平成30年6月27日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19123

研究課題名(和文) ボツリヌス神経毒素複合体と腸管免疫系細胞との相互作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of the interaction of botulinum neurotoxin complex with intestinal immune cells

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ボツリヌス食中毒はボツリヌス神経毒素複合体を経口的に摂取することにより発症する。我々はこれまでに、中毒発症に必須な過程であるにも関わらず不明であった血清型A1型神経毒素複合体の腸管吸収機構を明らかにした。本研究において、我々は血清型B1型神経毒素複合体がA1型とは異なる機構で腸管から宿主内へ侵入することを発見した。さらにA1型、B1型いずれの神経毒素複合体も腸管上皮直下のsub-epithelial dome (SED)において免疫細胞と共局在していた。これらの結果から、腸管免疫細胞はA1型およびB1型神経毒素の血中への移行に影響しており、ボツリヌス食中毒の発症に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Food-borne botulism is caused by ingestion of botulinum neurotoxin (BoNT) complexes which composed of BoNT and one or more neurotoxin-associated proteins (NAPs). We have uncovered the site(s) and mechanism of intestinal absorption of type A1 BoNT complex, heretofore largely unknown, which is essential for the onset of food-borne botulism. In this study, we found that type B1 BoNT complex invades into the host from intestine by different mechanisms from type A1. Furthermore, we observed that both type A and type B BoNT complex interact with immune cells which are located in sub-epithelial dome (SED). These results suggest that intestinal immune cells influence the entry of type A1 or type B BoNT into the blood stream and are involved in the onset of food-borne botulism.

研究分野：細菌学

キーワード：ボツリヌス 神経毒素複合体 腸管吸収 M細胞 免疫細胞

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との複合体として産生され、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。1970年代から1980年代にかけ阪口らは、無毒成分には神経毒素を消化液による分解から保護する作用があることを報告した。また、本研究代表者らの研究室より、無毒成分の一種である hemagglutinin (HA) が腸管上皮細胞膜上に存在する糖鎖と結合することが報告され、無毒成分の機能が発症に寄与していることが示唆されていた。しかし、実際の毒素の腸管吸収機構については詳細な検討がなされておらず、未知な点が多く残されていた。

我々は、ヒト腸管上皮細胞由来株をトランスウェルで培養し、これをヒト腸管上皮細胞バリアの *in vitro* のモデル系として用い、神経毒素複合体の腸管上皮細胞バリア通過機構を解析した。この解析から、無毒成分 HA に可逆的な腸管上皮細胞間バリア破壊活性があることを発見した(1)。さらに HA がバリア破壊を引き起こす際のターゲットが細胞間接着分子 E-cadherin であることを明らかにした(2)。次に我々はマウス結紮腸管ループ法を用いて、実際の生体内 (*in vivo*) での血清型 A 型神経毒素複合体の吸収機構を解析した。この解析から、高い経口毒性を持ち、中毒の発症に大きく寄与していると考えられる神経毒素複合体 (L-PTC) がパイエル板を覆う濾胞被覆上皮 (follicle-associated epithelium: FAE) に存在する M 細胞に局在していることを発見した(3)。また、M 細胞の発現を抑えたマウスでは経口投与された毒素への感受性が著しく低下することを確認し、M 細胞が主要な侵入門戸であることを明らかにした。さらに L-PTC (HA) の受容体が M 細胞上に存在する glycoprotein 2 (GP2) であり、HA と GP2 との結合が取り込みに重要であることも明らかにした。この結果から、発症に必須な過程であるにも関わらず、長年不明であった神経毒素の腸管吸収機構が世界に先駆けて明らかとなった。しかし、A 型以外の血清型毒素の吸収機構は未だ不明である。

一方で、腸管上皮直下の sub-epithelial dome (SED) には樹状細胞やマクロファージ、リンパ球等の免疫細胞が存在しており、毒素の血中への移行に影響することが考えられる。しかし、神経毒素複合体と免疫細胞との相互作用についても未だに解析がなされていない。

2. 研究の目的

血清型 A 型と同様にヒトに中毒を引き起こ

す B 型神経毒素複合体の腸管吸収機構を明らかにする。さらに腸管上皮を超えた SED に存在する免疫細胞との相互作用について解析し、腸管吸収における免疫細胞の役割について明らかにする。

3. 研究の方法

神経毒素、神経毒素複合体および無毒成分複合体は、A 型は 62A 株、B 型は Okra 株の培養上清より精製した。また HA 複合体はサブコンポーネント (HA1、HA2、HA3) を組換えタンパク質として発現し、再構成することにより得た。

生体内における腸管吸収機構は、マウス結紮腸管ループ法および種々のマーカーとの蛍光免疫染色により解析した。SED における神経毒素複合体と免疫細胞との局在も同様に種々の免疫細胞マーカーを用いて解析した。

また毒素の腸管吸収における M 細胞の役割を解析するために、抗 RANKL 抗体をマウスへ投与し、M 細胞枯渇マウスを作成した。

4. 研究成果

血清型 B 型ボツリヌス毒素は A 型と同様にヒトに中毒を引き起こすことが知られているが、その腸管吸収機構は未だ不明である。本研究においてその吸収機構について解析した。

まず、マウスを用いて神経毒素複合体 (L-PTC) の毒性を比較した結果、腹腔内投与の場合顕著な差はないが、経口投与の場合、B 型 L-PTC は A 型と比較して数十倍高い毒性を示した。この結果より、経口毒性の差は腸管吸収に依存していることが示唆された。B 型 L-PTC のマウス腸管内局在を解析した結果、M 細胞特異的に局在する A 型とは異なり、絨毛上皮 (VE) や FAE に広く局在していた (図 1)。

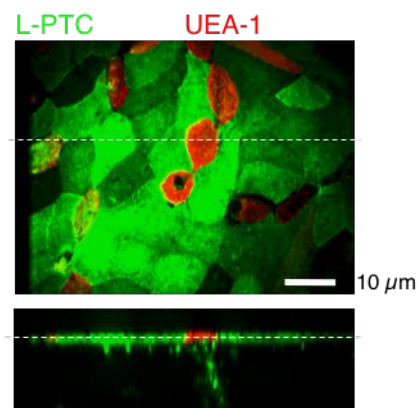


図 1 FAE における B 型神経毒素複合体の局在

また FAE の M 細胞 (UEA-1+細胞) において、基底膜側へ積極的に輸送されていた (図 1)。複合体中に HA を含まない神経毒素複合体 (M-PTC) ではこれらの細胞へ結合しなかったことから、

細胞との相互作用には HA が必要であることも明らかとなった。細胞との相互作用に必要な HA サブコンポーネントを決定するために、それぞれの組換えタンパク質を作製し、腸管内局在を解析した。その結果、HA1 は単独で吸収上皮細胞へ結合したが、細胞内への取り込みは非常に弱いものであった。また HA2 と HA3 はほとんど結合しなかった。次に HA2+3 および HA1+2+3 の HA 複合体を再構成し解析した結果、HA2+3 の局在は非常に弱かったが、HA1+2+3 は吸収上皮細胞および M 細胞から取り込まれており、L-PTC と同様の局在を示した。一方で、我々は A 型 L-PTC において、HA の糖鎖結合活性が M 細胞への相互作用に必須であることを明らかにしている(3)。B 型 HA も糖鎖結合活性を持つため、この活性が細胞との相互作用に関与している可能性が考えられた。糖鎖結合活性を消失させたミュータントを作製し、そのミュータントを含めた HA を再構成し解析した結果、局在は著しく減少した。これらの結果より、B 型 L-PTC は HA の糖鎖結合活性を介して、吸収上皮細胞や M 細胞上に存在する糖鎖を認識し、細胞内へ取り込まれていることが明らかとなった。

M 細胞からの B 型 L-PTC の取り込みおよび基底膜側への輸送は吸収上皮細胞と比較して顕著であった(図 1)。そのため M 細胞からの取り込みが食中毒の発症に大きく寄与している可能性が考えられた。M 細胞の分化に重要なサイトカインである RANKL に対する抗体を投与することにより M 細胞枯渇マウスを作製し、コントロール IgG 投与マウスと共に毒性を比較解析した。その結果、M 細胞枯渇マウスでは経口投与した B 型 L-PTC に対する感受性(致死率)が低下した。それに対し、腹腔内に投与した場合、二群間で毒性に大きな差は認められなかった。

以上の結果から、B 型神経毒素複合体、L-PTC は VE および FAE において吸収上皮細胞や M 細胞から侵入し、腸管上皮細胞バリアを突破することが明らかとなった。またそれらの細胞との相互作用には HA の持つ糖鎖結合活性が重要であることも明らかとなった。さらに M 細胞枯渇マウス(抗 RANKL 抗体処理マウス)を用いた解析から、M 細胞は B 型 L-PTC が中毒を発症させる際の重要な侵入門戸の一つであることが明らかとなった。

一方で、腸管上皮直下の SED には樹状細胞やマクロファージ、リンパ球等の免疫細胞が存在しており、毒素の血中への移行に影響することが考えられる。A 型 L-PTC は M 細胞を介して腸管上皮細胞バリアを突破した後、一

部が CD11c+細胞内へ取り込まれている様子が確認されている。SED における B 型 L-PTC と CD11c+細胞の共局在を解析した結果、B 型 L-PTC も一部が CD11c+細胞内へ取り込まれていた。さらに A 型 B 型いずれも無毒成分のみで同様の局在が確認された(図 2)ことから、L-PTC と免疫細胞(CD11c+細胞)との相互作用には複合体中の無毒成分が関与していることが示唆され、血清型 A 型および B 型 BoNT の血中への移行に免疫細胞が影響していることが考えられた。

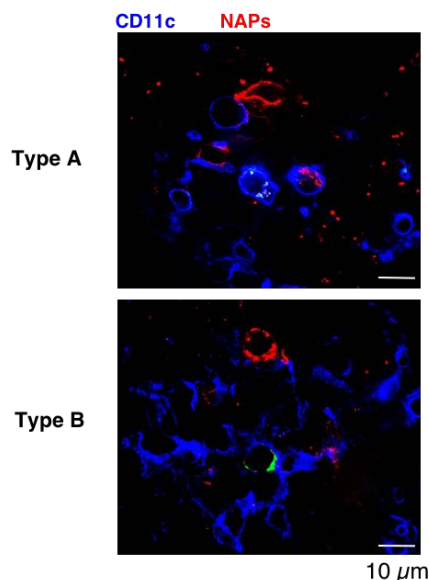


図2 SEDにおけるA型およびB型無毒成分とCD11c+細胞との共局在

< 引用文献 >

1. Matsumura T., *et al.* The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. *Cell. Microbiol.*10(2);355-364 (2008)
2. Sugawara Y., *et al.* Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. *J. Cell. Biol.* 189:691-700 (2010)
3. Matsumura T., *et al.* Botulinum toxin A complex exploits intestinal M cells to enter the host and exert neurotoxicity. *Nat. Commun.* 6:6255-6264 (2015)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Amatsu S, Matsumura T, Yutani M, Fujinaga Y. Multivalency effects of hemagglutinin component of type B botulinum neurotoxin complex on epithelial barrier disruption. *Microbiol Immunol.* 62:80-89 (2018) 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Takuhiro Matsumura et al., Intestinal absorption mechanism of type B1 botulinum progenitor toxin produced by strain Okra. Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC), October 22-25th, 2017, California
2. 松村 拓大 他、血清型 A 型および B 型ボツリヌス毒素の腸管吸収機構、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月 19 日～3 月 21 日、仙台
3. 松村 拓大 他、血清型 A 型ボツリヌス神経毒素複合体の宿主体内侵入機構、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日～12 月 02 日、横浜

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホ ム ペ ー ジ :
<https://www.kanazawa-u-med-bacteriol.net>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者 ()