

経皮感作卵アレルギー発症に及ぼす 黄色ブドウ球菌由来メンブレンベシクルの影響

静岡県立大学食品栄養科学部・助教 島村 裕子

■ 緒 言

食物アレルギーは、経口摂取により生じると考えられてきたが、近年、食物が皮膚に接触することでアレルゲンの感作が成立するという経皮感作が発生機序の主流になりつつあり¹⁾、このような食物アレルギーの多くは、乳児期にアトピー性皮膚炎(AD)として発症する。実際に全ての子どもの寝具から、ダニアレルゲンよりも高濃度の鶏卵アレルゲンが検出されたことが報告されている²⁾。さらに、AD患者の皮膚では黄色ブドウ球菌が増加し、黄色ブドウ球菌由来膜小胞(membrane vesicles; MVs)によりAD症状が誘導されることが報告されている³⁾。また、生後12～60ヶ月時での黄色ブドウ球菌の保菌は、鶏卵白IgEの高値に関連し、卵アレルギーを発症する可能性が高かったことから、卵アレルギーの発症に黄色ブドウ球菌が関連していることが示唆されている⁴⁾。しかし、経皮感作卵アレルギーの発症機序は不明な点が多く、その根本的な予防法は確立していない。そこで、本研究では、経皮感作卵アレルギーの発症機序の解明を目的に、黄色ブドウ球菌の増殖および病原因子発現に対する鶏卵アレルゲンの影響および鶏卵アレルゲン存在下で培養した黄色ブドウ球菌由来MVsの内包成分の変化と好塩基球の炎症惹起について解析した。将来的には、卵アレルギーの発症に関与する黄色ブドウ球菌中の要因を見出すことにより、新しい抑制メカニズムによる経皮感作卵アレルギーの抑制法の開発を目指す。

■ 方 法

鶏卵アレルゲンとして、オボアルブミン(OVA)(終濃度:1.5、3.0、4.5、6.5、7.5および15 mM)を添加したBHI培地において*S. aureus* No.29を37℃で24時間静置培養し、660 nmにおける吸光度(OD₆₆₀)を測定した。また、培養上清中の毒素(staphylococcal enterotoxin A; SEA)産生量をWestern blotを用いて定量した。さらに、培養6時間後の菌体よりtotal RNAを抽出し、Real-time RT-PCRを用いて、病原因子関連遺伝子(*sea*、RNAIII、*icaA* および *hly*)発現量に及ぼす影響について解析した。

OVA溶液(終濃度15 mM)を添加した培地に*S. aureus* No.29を接種し、37℃、110 rpmで20時間振盪培養した。培養液を4,000 rpm、15分間で遠心分離後、菌体ペレットを除去した。上清を0.2 μm フィルターでろ過し、さらにAmicon Ultra(Merck)を用いて、4,000 rpm、30分間で遠心分離し、100 kDaで限外ろ過した。100 kDa カットオフ(>100 kDa)の濃縮液および100 kDa以下のろ液(<100 kDa)を専用チューブに加え、超遠心機を用いて48,600 rpm、3時間、4℃で超遠心分離し、上清を除去した。PBS 50 μLで懸濁したものを黄色ブドウ球菌由来MVsとし、タンパク質量を測定後、使用時まで-20℃で保存した。OVAがMVsの性状に及ぼす影響について、粒子径(動的光散乱法、透過型電子顕微鏡(TEM)解析)、毒素内包量(Western blot)を指標に解析した。また、SDS-PAGEおよびnano-LC-MS/MSを用いて、OVA暴露により変動する膜小胞中タンパク質を同定した。さらに、OVA(終濃度15 mM)含む培地で*S. aureus*を培養して調製したMVsをRBL-2H3細胞に暴露し、アレルギー関連遺伝子(HDC、FcεR1α、TNF-αおよびIL-4)の発現量の変動について検討した。統計処理は、平均値および標準誤差を算出し、Microsoft Excel 2016を用いてDunnett検定により統計学的有意差検定を行った。なお、有意水準は5%とし、両側検定で実施した。

■ 結 果

黄色ブドウ球菌の増殖に対するOVAの影響について調べた。その結果、1.5、4.5、7.5および15 mMのOVA溶液の暴露により、*S. aureus* No.29(No.29株)の増殖が認められた(Fig. 1(A))。また、黄色ブドウ球菌の病原因子発現に対するOVAの影響について調べたところ、終濃度7.5および15 mMのOVAの添加により、SEAの産生量が有意に増加した(Fig. 1(B))。また、終濃度15 mMのOVAの添加により、SEA遺伝子(*sea*)、クオラムセンシング制御遺伝子であるRNAIII、その下流遺伝子である*hly* および *icaA* の発現量が増加した(Fig. 2)。

次に、黄色ブドウ球菌由来MVsの性状に及ぼすOVAの影響について検討した。その結果、滅菌水を加えて調製したMVsと比較して、OVAを加えて調製したMVsは、粒子径が拡大し(Fig. 3)、ま

た、MVs 中の SEA 含有量は有意に増加した (Fig. 4(A))。OVA 暴露により変動する黄色ブドウ球菌由来 MVs 中のタンパク質 (Fig. 4(B)) を同定したところ、発現が増強したタンパク質として、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (ornithine carbamoyltransferase)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 1 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1)、アルコールデヒドロゲナーゼ (alcohol dehydrogenase)、L-乳酸デヒドロゲナーゼ 2 (L-lactate dehydrogenase 2)、D-乳酸デヒドロゲナーゼ (D-lactate dehydrogenase) などが含まれていた。OVA を含む培地で培養して得られた MVs を RBL-2H3 細胞に暴露したところ、アレルギー関連遺伝子である HDC、FcεR1α および TNF-α の発現量の増加が認められた (Fig. 5)。

■ 考 察

食物アレルギーの多くは、乳児期に AD として発症し、AD 患者の皮膚では黄色ブドウ球菌が増加し、本菌により放出される MVs により AD 症状が誘導されることが報告されている。さらに、卵アレルギーの発症に黄色ブドウ球菌が関連していることも示唆されている。本研究では、経皮感作卵アレルギーの発症機序の解明を目的に、黄色ブドウ球菌の増殖および病原因子発現に対する鶏卵アレルギーの影響および鶏卵アレルギー存在下で培養した黄色ブドウ球菌由来 MVs の内包成分の変化と好塩基球の炎症惹起について検討した。

その結果、滅菌水を添加した Control と比較して、終濃度 6.5、7.5 および 15 mM の OVA を暴露した黄色ブドウ球菌の増殖が促進し、*sea* の発現量が有意に増加した (Fig. 1)。SEA 遺伝子は、テンペレートファージファミリーによって運ばれている^{5,6)}ことから、OVA は、黄色ブドウ球菌の SEA ファージを誘発している可能性が示唆された。また、終濃度 15 mM の OVA の添加により、クオラムセンシング (QS) 制御遺伝子である RNAIII およびその下流遺伝子であり、溶血毒素に関連した *hly* の発現量が有意に増加した。さらに、RNAIII の下流遺伝子であり、バイオフィーム形成関連遺伝子の *icaA* は発現量が増加する傾向が認められた (Fig. 2)。黄色ブドウ球菌の毒性因子の多くは、QS 機構による *agr* 制御系により発現が制御されている。*agr* 制御系は、菌体密度依存的な遺伝子調節機構であり、auto inducer peptide (AIP) と呼ばれるシグナル分子を認識することにより、この系が機能する。*agr* 制御系は 4 つのタンパク質遺伝子 (*agrBDCA*) と RNAII および RNAIII と呼ばれる制御 RNA (small RNA) により構成され、*hld* 等の多くの毒性因子の発現を制御している⁷⁾。RNAIII 遺伝子は、*agr* 制御系遺伝子群の発現を調節していることから、OVA が QS 機構を促進している可能性が考えられた。

黄色ブドウ球菌由来 MVs の粒子径に及ぼす OVA の影響について調べたところ、滅菌水を加えて採取した MVs と比較して、OVA (15 mM) を加えて採取した MVs では、粒子径が拡大した (Fig. 3)。また、黄色ブドウ球菌由来 MVs の毒素内包量に及ぼす OVA の影響について調べたところ、OVA (終濃度 15 mM) の添加により、MVs 中の SEA 含有量は有意に増加した (Fig. 4(A))。これらの結果より、MVs の粒子径が拡大することにより、MVs 中の SEA 含有量が増加する可能性が示唆された。OVA 暴露により変動する黄色ブドウ球菌由来 MVs 中のタンパク質を明らかにするために SDS-PAGE を行った。その結果、OVA を添加せずに培養した No.29 株由来の MVs (Fig. 4(B): Lane 1) と比較して、OVA を添加して培養した MVs では、35 ~ 40 kDa 付近のバンドが増強した (Fig. 4(B): Lane 2)。そこで、OVA の暴露により、発現が増強した No.29 株由来 MVs 中のタンパク質について、nano LC-MS/MS 分析を用いて同定した。その結果、OVA の暴露により、ornithine carbamoyltransferase、lactate dehydrogenase など、バイオフィーム形成時に発現量が増加するタンパク質が同定された。これらの結果より、OVA の暴露により、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成が増強されている可能性が示唆された。また、OVA を含む培地で培養して得られた MVs を RBL-2H3 細胞に暴露したところ、アレルギー関連遺伝子である HDC、FcεR1α および TNF-α の発現量の増加が認められた。これらの結果より、OVA は、黄色ブドウ球菌由来 MVs 中のアレルギー症状の増悪に関わる物質の内包量を増加させる可能性が示唆された。

■ 要 約

本研究では、経皮感作卵アレルギーの発症機序の解明を目的に黄色ブドウ球菌の増殖および病原因子発現に対する鶏卵アレルギーの影響および鶏卵アレルギー存在下で培養した黄色ブドウ球菌由来 MVs の内包成分の変化と好塩基球の炎症惹起について解析した。OVA (7.5、15 mM) を黄色ブドウ球菌に暴露したところ、SEA 産生量および病原因子関連遺伝子発現量が有意に増加した。OVA を添加した培地で黄色ブドウ球菌を培養して調製した MVs では、粒子径の拡大、SEA 含有量の増加および ornithine carbamoyltransferase など、バイオフィーム形成時に発現量が増加するタンパク質の増加が認

められた。また、OVA を含む培地で培養して調製した MVs を RBL-2H3 細胞に暴露したところ、アレルギー関連遺伝子の発現量が有意に増加した。

本研究では、黄色ブドウ球菌の増殖と病原因子発現およびその MVs が誘導する炎症の発現に対する OVA の影響について解析し、OVA は、黄色ブドウ球菌の病原性を増強することを明らかにした。本研究の成果および今後の更なる研究により、新しい抑制メカニズムによる経皮感作卵アレルギーの抑制法の開発が期待される。

■ 文 献

- 1) Flohr C., Perkin M., Logan K., Marrs T., Radulovic S., Campbell L., MacCallum S., Irwin McLean W., Lack G.: Atopic dermatitis and disease severity are the main risk factors for food sensitization in exclusively breastfed infants. *J. Invest. Dermatol.*, 134:345-350(2014).
- 2) Kitazawa H., Yamamoto-Hanada K., Saito-Abe M., Ayabe T., Mezawa H., Ishitsuka K., Konishi M., Nakayama SF., Michikawa T., Senju A., Tsuji M., Kusuvara K., Sanefuji M., Ohga S., Oda M., Mitsubuchi H., Katoh T., Ikegami A., Mise N., Matsumoto K., Saito H., Ohya Y.: Egg antigen was more abundant than mite antigen in children's bedding: Findings of the pilot study of the Japan Environment and Children's Study (JECS). *Allergol. Int.*, 68(3):391-393(2019).
- 3) Hong S., Kim M., Lee E., Kim J., Kim Y., Jeon S., Yang J., Lee B., Pyun B., Gho Y., Kim Y.: Extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* induce atopic dermatitis-like skin inflammation. *Allergy*, 66(3):351-359(2011).
- 4) Tsilochristou O., Toit G., Sayre P., Roberts G., Lawson K., Sever M., Bahnson H., Radulovic S., Basting M., Plaut M., Lack G.: Association of *Staphylococcus aureus* colonization with food allergy occurs independently of eczema severity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 144(2):494-503(2019).
- 5) Betley MJ., Mekalanos JJ.: Staphylococcal enterotoxin A is encoded by a phage. *Science*, 229:185-187(1985).
- 6) Coleman DC., Sullivan DJ., Russel RJ., Arbuthnott JP., Carey BF., Pomeroy HM.: *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of β -lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *Microbiol.*, 135(6):1679-1697(1989).
- 7) Morinaga N., Iwamaru Y., Yahiro K., Tagashira M.: Differential activities of plant polyphenols on the binding and internalization of cholera toxin in vero cells. *J. Biol. Chem.*, 280:23303-23309(2005).

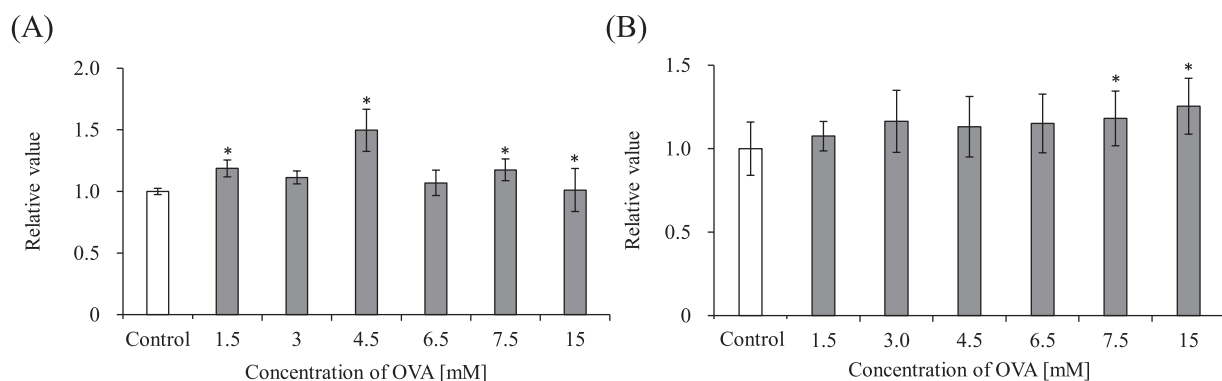


Fig. 1: 黄色ブドウ球菌の増殖および毒素産生に対する OVA の影響
 (A) 黄色ブドウ球菌の増殖に対する OVA の影響、(B) 黄色ブドウ球菌の毒素産生に対する OVA の影響。Control (滅菌水) の値を 1 とした時の相対値で示した。誤差範囲は標準偏差を示す。
 * $p < 0.05$ vs. Control (n=3)

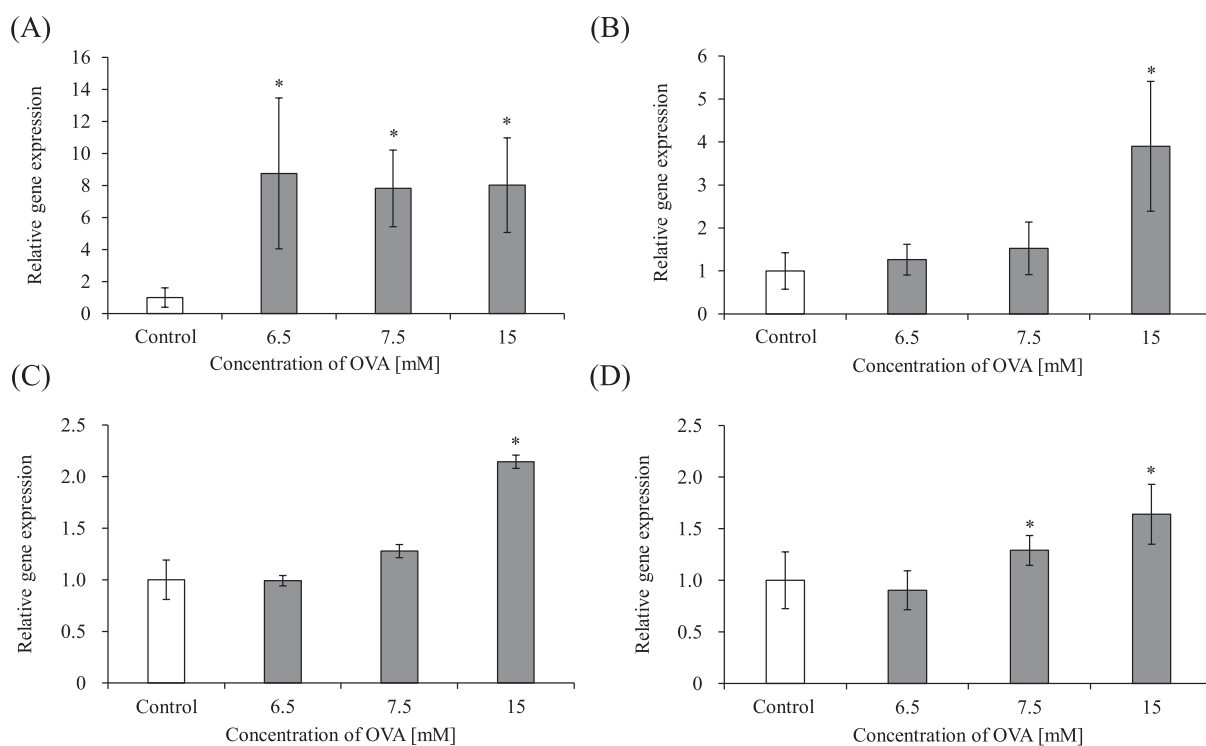


Fig. 2: 黄色ブドウ球菌の病原因子発現に対する OVA の影響
 (A) *sea*、(B) *RNAlII*、(C) *hlb*、(D) *icaA*。Control (滅菌水) の値を 1 とした時の相対値で示した。誤差範囲は標準偏差を示す。* $p < 0.05$ vs. Control (n=3)

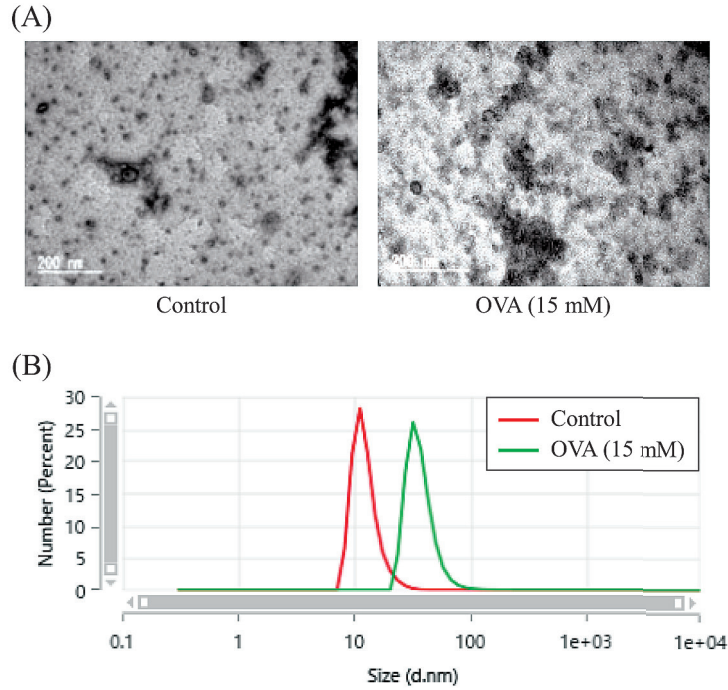


Fig. 3: 黄色ブドウ球菌由来膜小胞(MVs)に対する OVA の影響
 (A)透過型電子顕微鏡を用いた黄色ブドウ球菌由来 MVs の画像解析、
 (B)黄色ブドウ球菌由来膜小胞の粒子径に及ぼす OVA の影響

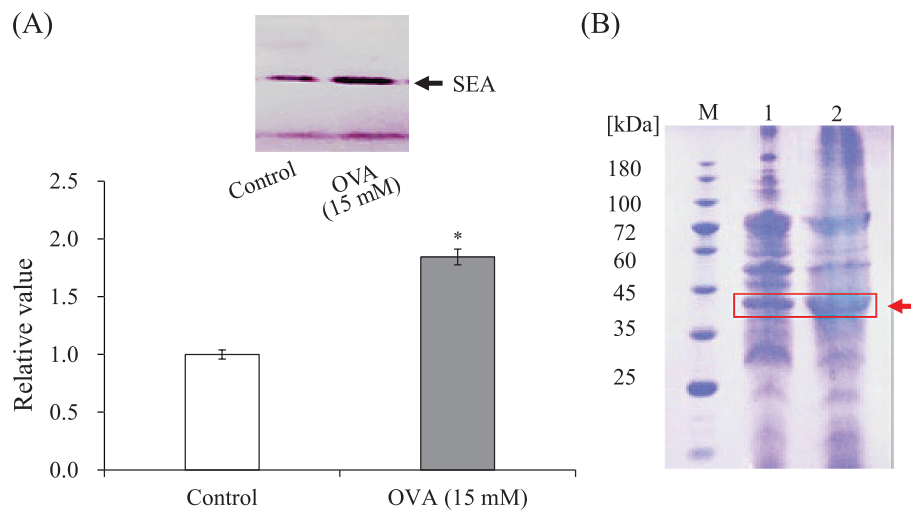


Fig. 4: 黄色ブドウ球菌由来膜小胞(MVs)のタンパク質含有量に及ぼす OVA の影響
 (A)黄色ブドウ球菌由来 MVs の SEA タンパク質含有量に及ぼす OVA の影響。Control における SEA 含有量を 1 として相対値で示した。誤差範囲は標準偏差を示す。* $p < 0.05$ vs. Control ($n=3$)。
 (B)黄色ブドウ球菌由来 MVs の内包タンパク質に対する OVA 暴露の影響。Lane M:分子量マーカー、Lane 1:OVA 未添加の No.29 株由来 MVs、Lane 2:OVA を添加して培養した No.29 株由来 MVs。矢印で示したバンドを nano LC-MS/MS 分析に供した。

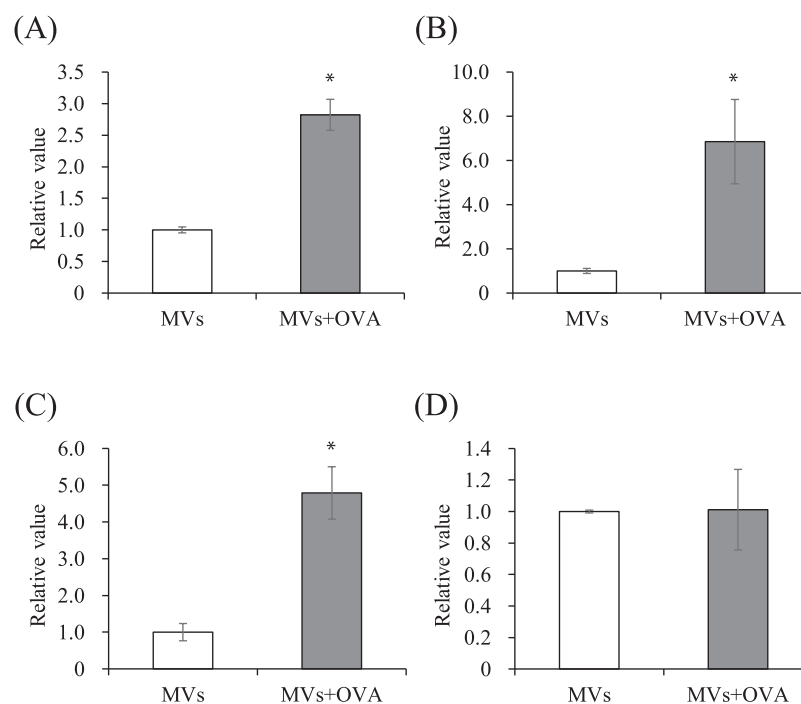


Fig. 5: 黄色ブドウ球菌由来膜小胞(MVs)により誘導される RBL-2H3 細胞のアレルギー関連遺伝子発現に及ぼす OVA の影響

(A)HDC、(B) $\text{Fc}\epsilon\text{R1}\alpha$ 、(C) $\text{TNF-}\alpha$ 、(D)IL-4。MVs:OVA を含まない培地で黄色ブドウ球菌を培養して得られた MVs、MVs+OVA:OVA を含む培地で黄色ブドウ球菌を培養して得られた MVs。

* $p < 0.05$ vs. MVs (n=3)