

ボツリヌス神経毒素複合体の体内侵入機構

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-12-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: FUJINAGA, Yukako メールアドレス: 所属: |
| URL | https://doi.org/10.24517/00049296 |

【研究紹介】

ボツリヌス神経毒素複合体の体内侵入機構
Intestinal absorption mechanism of botulinum neurotoxin complex

金沢大学医薬保健研究域 医学系 細菌学
藤 永 由 佳 子

はじめに

ボツリヌス神経毒素 (分子量約150k)は、極めて生物活性 (毒性) の高い細菌毒素である。本毒素はヒトを含む様々な動物に神経麻痺による致死性の高い中毒を引き起こす。食品などに混入した本毒素が経口摂取された場合、本毒素は主に小腸から体内に取り込まれ、血行性に末梢神経に到達して、食餌性ボツリヌス症を引き起こす。本症の発症には、神経毒素が活性を保持したまま消化管から吸収されることが必須であるが、大きなタンパク分子である本毒素が宿主の消化管から体内に侵入する機構は不明であった。近年我々は、本毒素は結合している無毒成分を介して、主に腸管のMicrofold (M) 細胞から体内に取り込まれることを、一過性M細胞欠失マウスを用いて明らかにした。さらにM細胞上の受容体としてGlycoprotein 2 (GP2)が、本症の発症に大きく関与していることを明らかにした。本稿では、ボツリヌス毒素が腸管粘膜の防御を巧みに突破し生体内に侵入する機構、および最近我々が進めている無毒成分HAを利用した応用研究について紹介したい。

1. ボツリヌス神経毒素複合体の構造と機能

ボツリヌス神経毒素 (A~G型の血清型に分類) は、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) 及び類縁である*C. butyricum*, *C. baratii*によって産生されるタンパク質毒素である。本神経毒素は、生体内において主にコリン作動性末梢神経に作用しアセチルコリンの放出を抑制する。その結果、ヒトや動物に運動神経麻痺による呼吸失調を主症状とする致死性の高い重篤な中毒を引き起こす。本毒素は常に無毒成分 (non-toxic neurotoxin-associated proteins, NAPs) との複合体 (progenitor toxin complex, PTC) として産生される。無毒成分には赤血球凝集活性のないnon-toxic non-HA (NTNHA) と赤血球凝集活性を持つhemagglutinin (HA) があり、HAは異なる3つのサブコンポーネントHA1, HA2, HA3から構成されている。ボツリヌス神経毒素複合体は、神経毒素およびNTNHAで構成されるM-PTCとM-PTCにHAが結合したL-PTCが存在する (図1)。

ボツリヌス神経毒素複合体の経口毒性は、神経毒素 < M-PTC < L-PTCと、分子量が大きくなると強くなること

が以前から知られており、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が報告されている。また、我々は、L-PTC中のHAが腸管上皮細胞膜上に存在する糖鎖と結合すること、HAは細胞間バリアを破壊する活性があり、そのターゲット分子がアドヘレンスジャンクションタンパク質、E-cadherinであることを報告した¹⁾²⁾。これらの無毒成分の機能がボツリヌス神経毒素複合体の持つ高い経口毒性に寄与していると考えられている。

2. ボツリヌス神経毒素複合体の体内侵入機構

我々は、生体内におけるボツリヌス神経毒素複合体の吸収部位の特定を目的とし、ヒトに中毒を引き起こすA1型ボツリヌス神経毒素複合体の腸管内での局在をマウス結紮腸管ループ法により解析した。その結果、経口毒性が高く、中毒発症に大きく寄与していると考えられるL-PTCはパイエル板を覆う濾胞被覆上皮 (follicle-associated epithelium: FAE) に強く局在していた (図2)。この結果から我々は、FAEに存在するM細胞に着目した。M細胞は管腔内に存在する抗原を取り込み基底膜側へ運ぶトランスサイトシスと呼ばれる輸送機構が発達しており、抗原を免疫細胞へ受け渡し、抗原特異的な免疫応答を誘導させる役割を担っている。マウスのM細胞マーカー (UEA-1) とL-PTCとの共局在を解析した結果、L-PTCはM細胞から取り込まれ、基底膜側へ移行していた。またL-PTCとM細胞との相互作用にはHAが必要であることが明らかとなった³⁾。

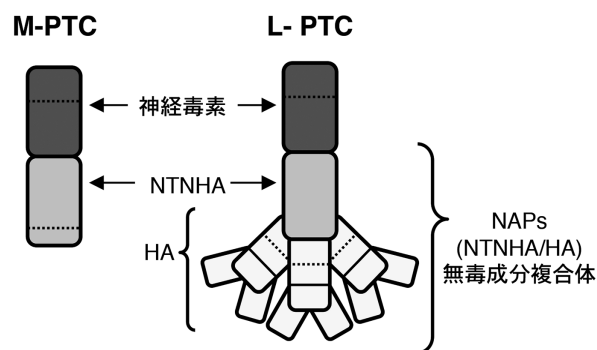


図1. ボツリヌス神経毒素複合体

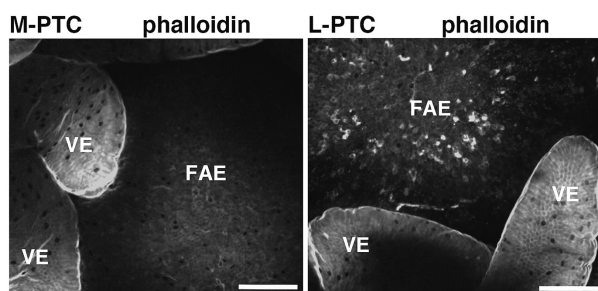


図2. マウス腸管内での神経毒素複合体の局在
M-PTCの局在は確認できず、L-PTCが特異的にFAE (M細胞)に局在していることがわかる。VE: 絨毛上皮, FAE: リンパ濾胞上皮, scale bar: 100 μ m

次に我々はM細胞を一過性に欠損させたマウスを作製し、食中毒発症におけるM細胞の役割について解析した。Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) に対する抗体をマウスに投与することによりM細胞の発現を抑え、L-PTCの局在を解析した結果、抗RANKL抗体投与マウスではコントロールIgG投与マウスと比較してM細胞の数が著しく減少し、それに伴いL-PTCの局在も減少していた。さらに、抗RANKL抗体投与マウスでは経口投与されたL-PTCへの感受性が顕著に低下していた。これらの結果から、M細胞はL-PTCが食中毒を発症させるための主要な侵入門戸であることが明らかとなった³⁾。

さらに我々は、M細胞上の機能的な受容体として報告されているいくつかの分子のFc融合タンパク質を作製し、L-PTCとの結合を解析した。その結果、GP2がHAを介してL-PTCと強く結合することが明らかとなった。さらにGP2はM細胞内でL-PTCと共局在しており、GP2がL-PTCの受容体としてM細胞上で機能していることが示唆された。そこで我々は、GP2ノックアウトマウス (*Gp2*^{-/-}マウス) を用いてL-PTCの腸管吸収におけるGP2の役割について解析した。その結果、*Gp2*^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較してL-PTCのM細胞への局在が減少し、また経口投与されたL-PTCに対する感受性が低下していた。これらの結果から、L-PTCはHAを介してGP2と結合し、M細胞から取り込まれていることが明らかとなった³⁾。GP2はヒトのM細胞上でも発現しており、L-PTCはヒトGP2とも強く結合することから、ヒトのボツリヌス食中毒においても、その発症にGP2およびM細胞が関与していることが示唆される。

3. 無毒成分HAを利用した応用研究への展開

これまでの解析から、HAはM細胞へ特異的に到達する機能があることが明らかとなった。我々はこの機構を粘膜ワクチン (M細胞標的輸送担体) へ応用できないかと考えている。免疫誘導組織を覆う上皮に存在するM細胞から取り込まれるHAは副作用も少なく、効率的に免疫応答を誘導できる有効なワクチン抗原輸送担体となり得る。我々は、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。

さらに我々は、HAの持つE-cadherin機能阻害活性を人工多能性幹細胞 (iPS細胞) 培養に用いることを検討している。iPS細胞の維持・増幅培養において未分化状態から逸脱した細胞が偶発的に発生すると、未分化細胞の増殖が抑制される。HAを利用することにより、コロニー中に発生した脱未分化細胞を除去し、未分化状態を維持することができる⁴⁾。現在、本用途に最適な改良型HAの開発を進めている。

おわりに

本稿では我々が進めているボツリヌス菌の病原性に関する研究の一端を紹介した。ボツリヌス食中毒の発症においてボツリヌス神経毒素の腸管吸収は必須な過程であるにも関わらず、その詳細な機構については長らく不明であった。本研究からボツリヌス神経毒素複合体はM細胞の機能を利用することにより、腸管上皮細胞バリアを突破する巧妙な体内侵入機構を持つことが明らかとなった。また、我々は無毒成分HAが糖鎖結合、E-cadherin機能阻害、M細胞特異的輸送等様々な作用を持つ多機能分子であることを明らかにし、その機能を利用した応用研究を行っている。

文 献

- 1) Fujinaga Y, Sugawara Y, Matsumura T. Uptake of botulinum neurotoxin in the intestine. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 364:45-59.
- 2) Sugawara Y, Matsumura T, Takegahara Y, et al. Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. *J Cell Biol* 2010;189:691.
- 3) Matsumura T, Sugawara Y, Yutani M, et al. Botulinum toxin A complex exploits intestinal M cells to enter the host and exert neurotoxicity. *Nat Commun* 2015;6:6255.
- 4) Kim MH, Sugawara Y, Fujinaga Y, et al. Botulinum hemagglutinin-mediated selective removal of cells deviating from the undifferentiated state in hiPS colonies. *Sci Rep* 2017;7:93