

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 19 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19099

研究課題名(和文) ウエルシュ菌 毒素の好中球分化抑制による宿主免疫回避機構の解明

研究課題名(英文) Clostridium perfringens alpha-toxin-induced impairment of innate immunity by inhibiting granulopoiesis

研究代表者

竹原 正也 (Takehara, Masaya)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：40742705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：宿主は、細菌感染に対して好中球の産生を亢進し対抗するが、一部の細菌感染は致死的である。我々は、ウエルシュ菌が感染したマウスや、毒素を投与したマウスでは成熟好中球が減少することを発見した。また、本菌の感染は末梢の成熟好中球を減少させた。骨髄細胞を毒素で処理すると、脂質ラフトが変化し、好中球の分化が抑制された。脂質ラフトの阻害剤を処理した骨髄細胞では、好中球の分化が抑制され、脂質ラフトの阻害が毒素による好中球の分化抑制に関与することが示唆された。以上の結果より、ウエルシュ菌毒素は好中球の分化を阻害し宿主免疫を障害する、本菌の新しい免疫回避機構が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Granulopoiesis is accelerated to suppress bacteria during infection, but some bacteria can still cause life-threatening infections. The mechanism behind this remains unclear. In this study, we found that mature neutrophils in bone marrow cells (BMCs) were decreased in Clostridium perfringens-infected and virulence factor α -toxin-injected mice. C. perfringens infection interfered with the replenishment of mature neutrophils into peripheral circulation. Treatment of BMCs with α -toxin (phospholipase C) blocked neutrophil differentiation accompanied by modification of lipid rafts. Since treatment with methyl- β -cyclodextrin, a lipid raft-disrupting agent, impaired neutrophil differentiation, the alteration of lipid rafts by α -toxin might be involved in the impairment of granulopoiesis. These results suggest that C. perfringens α -toxin impairs neutrophil differentiation, which provides new insight to understand how pathogenic bacteria evade the host immune system.

研究分野：細菌学

キーワード：毒素 エフェクター 免疫回避 好中球 分化

1. 研究開始当初の背景

A型ウエルシュ菌は、創傷感染して重篤な疾患であるガス壊疽を引き起こす病原細菌である。2008年の中国・四川大地震では、実に35000人もの被災者がガス壊疽感染症を発症した。本邦においても大規模な震災が懸念されており、ガス壊疽への対策と予防は急務な問題である。本感染症は外傷を受けてわずか数時間で発症し、局所の筋組織壊死が引き起こされる。そして、病巣は急速に拡大し、抗菌薬の投与で制御できない敗血症が惹起され、48時間以内に患者が急死するといった劇的な経過をたどる。このように、A型ウエルシュ菌によるガス壊疽は非常に予後の悪い感染症であるが、感染メカニズムが不明であるため、本感染症に対する有効な治療戦略は見出されていない。

2. 研究の目的

A型ウエルシュ菌によるガス壊疽は急速に進行することから、私は、本菌が宿主からの免疫を回避している可能性を考えた。そこで、このようなウエルシュ菌の免疫系からの回避機構を解明し、新たな治療戦略を提唱することを本研究の目的とし、本菌の感染や、産生された α 毒素による宿主の自然免疫の変化、主に好中球の産生変化について検討した。

3. 研究の方法

1) ウエルシュ菌(野生株や α 毒素欠損株)をC57BL/6マウスのお尻骨格筋に投与し、ウエルシュ菌感染モデルマウス(ガス壊疽モデル)を作製した。本菌を感染させたマウスの骨格筋を採取し細胞懸濁液を調製した後に、これに含まれる好中球数を、抗Ly-6G抗体(好中球に特異的に反応)を用いたフローサイトメトリー法により定量し、感染部位への好中球の集積を測定した。また、体内より好中球を特異的に除去する抗Ly-6G抗体を投与したマウスに本菌を感染させ、感染した大腿筋の懸濁液を調製し、これに含まれるウエルシュ菌の生菌数をコロニーカウント法で測定し、ウエルシュ菌に対する好中球の役割を検討した。

2) マウス大腿骨より骨髓細胞を採取し、これに α 毒素を添加しインキュベーションした。その後の骨髓細胞は、蛍光標識された抗CD11b抗体、抗Ly-6G/Ly-6C(Gr-1)抗体、抗CD117(c-Kit)抗体で適宜染色し、フローサイトメーターを用いた解析により、骨髓細胞に含まれる骨髓芽球(c-Kit⁺/Gr-1^{low}/CD11b⁺)、桿状核球(c-Kit⁺/Gr-1^{low}/CD11b⁺)、及び分葉核球(Gr-1^{high}/CD11b⁺)を定量し、 α 毒素がそれぞれの細胞に与える影響を評価した。

α 毒素は、スフィンゴミエリナーゼ活性やホスホリパーゼC活性を有している。そこで、酵素活性を示さない変異型 α 毒素(H148G)の好中球に対する作用を、上述の方法により

検討した。野生型 α 毒素と変異型 α 毒素の好中球に対する作用の比較から、本毒素の酵素活性の役割を考察した。

3) 野生型及び α 毒素欠損型ウエルシュ菌感染モデルマウスより採取した骨髓細胞に含まれる骨髓芽球、桿状核球、及び分葉核球をそれぞれ定量し、骨髓中での好中球の分化に与える影響を解析した。両者の比較から、ウエルシュ菌感染時の骨髓細胞の変化や α 毒素の役割を検討した。また、 α 毒素を静脈内投与したマウスより骨髓細胞を採取し、 α 毒素が骨髓内で好中球の分化に与える影響を解析した。

4) 骨髓細胞を、脂質ラフトの構成因子であるGM1ガングリオシド(GM1)に特異的に結合する蛍光標識Cholera toxin B subunit(CTB)で染色し、骨髓芽球、桿状核球、及び分葉核球でのGM1発現をフローサイトメトリー法により測定した。また、 α 毒素処理やウエルシュ菌感染による好中球でのGM1の発現変化を測定した。さらに、脂質ラフトの阻害剤であるMethyl- β -cyclodextrin(M β CD)で処理した骨髓好中球の分化の程度を、CD11b及びGr-1の発現を指標に測定した。

4. 研究成果

1) 野生株に感染した骨格筋では、 α 毒素欠損株に感染した骨格筋と比較して、Ly-6G⁺の好中球数が優位に少なかった。また、このときの生菌数をコロニーカウント法で測定すると、 α 毒素欠損株は野生株と比較して感染部位での生菌数が顕著に少なかった。これらの結果より、 α 毒素欠損株の排除に好中球が関与し、野生株では、産生された α 毒素が好中球による自然免疫を障害することが示唆された。そこで、体内より好中球を特異的に除去する抗Ly-6G抗体を投与したマウスに本菌を感染させ、大腿筋の懸濁液に含まれるウエルシュ菌の生菌数を測定し、ウエルシュ菌に対する自然免疫における好中球の役割を検討した。その結果、野生株に感染した骨格筋では、コントロール抗体投与群と抗Ly-6G抗体投与群で同程度の生菌数が検出され、 α 毒素欠損株に感染したマウスでは、抗Ly-6G抗体の投与により生菌数が顕著に増加することが分かった。すなわち、本来は好中球がウエルシュ菌の排除に関与するものの、本菌の産生する α 毒素が好中球による自然免疫機能を障害することが判明した。

2) マウス大腿骨より骨髓細胞を採取し、これを α 毒素で24時間処理し、種々の好中球を定量したところ、 α 毒素処理により、分葉核球が顕著に減少することが分かった。一方、 α 毒素は骨髓芽球や桿状核球には影響しなかった。この結果は、 α 毒素処理した細胞のギムザ染色像でも確認された。次に、酵素活性を

示さない変異型 α 毒素 (H148G) を用いて同様の検討を行ったところ、H148G は分葉核球を減少させないことが分かった。これらの結果より、 α 毒素は酵素活性依存的に分葉核球を特異的に減少させることが判明した。

3) 野生型のウエルシュ菌に感染したマウスより採取した骨髄細胞には骨髄芽球や桿状核球はコントロールマウスと同程度含まれていたが、分葉核球が顕著に減少していた。また、 α 毒素欠損型ウエルシュ菌に感染したマウスでは、この分葉核球の減少は抑制されていた。さらに、 α 毒素を静脈内投与したマウスより骨髄細胞を採取し、 α 毒素が骨髄内で好中球の分化に与える影響を検討したところ、本毒素の投与マウスでは分葉核球が顕著に減少することが分かった。これらの結果より、ウエルシュ菌より産生された α 毒素が骨髄で好中球の分化を抑制し、分葉核球を減少させることが明らかとなった。

4) 骨髄細胞を、脂質ラフトの構成因子である GM1 ガングリオシド (GM1) に特異的に結合する蛍光標識 Cholera toxin B subunit (CTB) で染色し、骨髄芽球、桿状核球、及び分葉核球での GM1 発現をフローサイトメトリー法により測定すると、好中球の分化に伴って GM1 の発現量が減少することが分かった。この結果は、好中球の分化に脂質ラフトが関与することを示唆している。また、 α 毒素処理やウエルシュ菌感染による好中球での GM1 の発現変化を測定した結果、 α 毒素処理やウエルシュ菌感染により好中球での GM1 発現が顕著に増加することが分かった。さらに、脂質ラフトの阻害剤である M β CD で処理した骨髄好中球の分化の程度を測定すると、M β CD が好中球の分化を阻害することが判明した。以上の結果より、正常な骨髄細胞では脂質ラフトが好中球の分化に対して何らかの機能的な役割を果たしているのに対して、ウエルシュ菌が感染した宿主内では、産生された α 毒素が好中球の脂質ラフトを障害し、好中球の分化が抑制されることが示唆された。

今回、ウエルシュ菌感染時に、 α 毒素がエフェクターとして働いて骨髄好中球の分化を抑制し、宿主免疫系に障害を与える新しい免疫回避機構の存在を明らかにした。この機構は、本感染症の急速な進行を促進すると考えられる。この新しい宿主免疫回避機構の発見により、ウエルシュ菌感染症に対する新規な治療戦略の開発への応用が期待される。

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9件)

永浜政博、大窪晶子、木内祥仁、小林敬子、

宮本和明、竹原正也、櫻井純、*Clostridium perfringens* TpeL Induces Formation of Stress Fibers via Activation of RhoA-ROCK Signaling Pathway、*Biol. Pharm. Bull.*誌、査読有、38 巻、2015、732-739
DOI:10.1248/bpb.b14-00842

宮本和明、清家総史、高岸照久、奥井健介、小田真隆、竹原正也、永浜政博、Identification of the replication region in pBCNF5603, a bacteriocin-encoding plasmid, in the enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strain F5603、*BMC Microbiol.*誌、査読有、15 巻、2015、118
DOI: 10.1186/s12866-015-0443-3

永浜政博、清家総史、白井秀典、高岸照久、小林敬子、竹原正也、櫻井純、Role of P2X7 receptor in *Clostridium perfringens* beta-toxin- mediated cellular injury、*Biochim. Biophys. Acta.*誌、査読有、1850 巻、2015、2159-2167
DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.08.011

清家総史、宮本和明、小林敬子、竹原正也、永浜政博、*Clostridium perfringens* Delta-Toxin Induces Rapid Cell Necrosis、*PLoS One* 誌、査読有、11 巻、2016、e0147957
DOI: 10.1371/journal.pone.0147957

竹原正也、高岸照久、清家総史、大谷郁、小林敬子、宮本和明、清水徹、永浜政博、*Clostridium perfringens* α -Toxin Impairs Innate Immunity via Inhibition of Neutrophil Differentiation、*Sci. Rep.*誌、査読有、6 巻、2016、28192
DOI: 10.1038/srep28192

高岸照久、小田真隆、竹原正也、小林敬子、永浜政博、Oligomer formation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin is induced by activation of neutral sphingomyelinase、*Biochim. Biophys. Acta.*誌、査読有、1858 巻、2016、2681-2688
DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.07.009

竹原正也、高岸照久、清家総史、大石恭平、藤原誉野、宮本和明、小林敬子、永浜政博、*Clostridium perfringens* α -Toxin Impairs Lipid Raft Integrity in Neutrophils、*Biol. Pharm. Bull.*誌、査読有、39 巻、2016、1694-1700

清家総史、竹原正也、小林敬子、永浜政博、Role of pannexin 1 in *Clostridium perfringens* beta-toxin- caused cell death、*Biochim. Biophys. Acta.*誌、査読有、1858

巻、2016、3150-3156
DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.10.003

永浜政博、竹原正也、高岸照久、清家総史、宮本和明、小林敬子、Cellular Uptake of *Clostridium botulinum* C2 Toxin Requires Acid Sphingomyelinase Activity、Infect. Immun.誌、査読有、85巻、2017、e00966-16
DOI: 10.1128/IAI.00966-16

[学会発表](計10件)

竹原正也、高岸照久、小林敬子、永浜政博、ウエルシュ菌α毒素は好中球の分化抑制により自然免疫系に障害を与える、第88回日本細菌学会総会、岐阜市(2015年3月26日～3月28日)

竹原正也、高岸照久、清家総史、小林敬子、永浜政博、ウエルシュ菌α毒素は好中球の分化を抑制することで宿主免疫を障害する、第27回微生物シンポジウム、岡山市(2015年9月4日～9月5日)

竹原正也、高岸照久、清家総史、小林敬子、永浜政博、ウエルシュ菌α毒素の好中球産生障害による宿主感染機構、第68回日本細菌学会中国・四国支部総会、岡山市(2015年10月3日～10月4日)

竹原正也、高岸照久、清家総史、小林敬子、永浜政博、ウエルシュ菌α毒素を用いた新規宿主免疫回避機構の解明、第54回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、高知市(2015年10月31日～11月1日)

竹原正也、高岸照久、大石恭平、宮本和明、小林敬子、永浜政博、ウエルシュ菌α毒素の好中球分化抑制による自然免疫系の障害、第89回日本細菌学会総会、大阪市(2016年3月23日～3月25日)

竹原正也、高岸照久、清家総史、宮本和明、小林敬子、永浜政博、ウエルシュ菌α毒素を用いた新規宿主免疫回避機構の解明、第63回トキシシンポジウム、天童市(2016年7月14日～7月16日)

竹原正也、高岸照久、清家総史、宮本和明、小林敬子、永浜政博、ウエルシュ菌α毒素による好中球分化抑制と脂質ラフト障害との関連、第69回日本細菌学会中国・四国支部総会、高松市(2016年10月15日～10月16日)

竹原正也、高岸照久、清家総史、小林敬子、永浜政博、ウエルシュ菌α毒素による好中球分化抑制機構の解明、第55回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国

四国支部学術大会、岡山市(2016年11月5日～11月6日)

竹原正也、細菌感染に対する生体の好中球産生亢進を介した防御機構とその破綻、第69回日本細菌学会関西支部総会、大阪市(2016年11月19日)(招待講演)

竹原正也、永浜政博、ウエルシュ菌α毒素による新しい宿主免疫回避機構、第90回日本細菌学会総会、仙台市(2017年3月19日～3月21日)(招待講演)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab09/hyoushi.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹原 正也 (TAKEHARA, Masaya)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号: 40742705

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

永浜 政博 (NAGAHAMA, Masahiro)

小林 敬子 (KOBAYASHI, Keiko)