

令和元年6月18日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08794

研究課題名(和文) ウエルシュ菌 毒素のP2X7受容体を介した病原性発現機構の解析

研究課題名(英文) Role of P2X7 receptor on C. perfringens beta-toxin-induced pathogenesis

研究代表者

永浜 政博 (Masahiro, Nagahama)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：40164462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：壊疽性腸炎の原因であるC型ウエルシュ菌 毒素が、宿主細胞のP2X7受容体に作用して毒性を発現することを世界で初めて見出した。本毒素の病原メカニズムと治療応用への研究基盤を確立した。1) 細胞障害メカニズムの解析：毒素は、感受性細胞のP2X7受容体に作用後、ATP遊離に關与するパネキシン分子を介して、細胞に障害を与える。2) 腸管に対する作用：マウス回腸ループテストで本毒素は腸管組織の破壊を誘導し、これには、P2X7受容体が關与することを明らかにした。3) 治療薬の開発：毒素のマウス致死活性と腸管障害作用は、P2X7受容体阻害剤であるBBGの投与で抑制され、治療薬の候補となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの壊疽性腸炎の原因であるC型ウエルシュ菌 毒素は、日本においては豚などの家畜に感染し、経済的な損失が懸念されている。本毒素の作用メカニズムが解明されれば、本菌による感染症の克服につながる。本研究では、毒素の細胞障害作用や腸管障害作用を検討し、ATPの受容体の1つであるP2X7受容体に本毒素が作用して、障害を引き起こすことを明らかにした。さらに、P2X7受容体の阻害薬が、本毒素の作用を抑制することが判明した。以上より、本感染症の治療薬に候補が見出され、今後の応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：For the first time, we have found that  $\beta$ -toxin produced by Clostridium perfringens type C, which is the cause of necrotizing enteritis, acts on the P2X7 receptor of host cells to develop toxicity. In this study, we clarified the pathogenesis of the toxin, and established the research base to expand to therapeutic application of this infection. 1) Cytotoxic mechanism of  $\beta$ -toxin: After acting on the P2X7 receptor of host cells, it was found that  $\beta$ -toxin damages the cell via the pannexin 1 involved in ATP release. 2)  $\beta$ -toxin-induced Intestinal injury: In the mouse ileal loop test, the toxin induced disruption of intestinal tissue, which revealed that the P2X7 receptor is involved. 3) Development of therapeutic agents for the toxin: It was found that the mouse lethal activity and enteric injury of  $\beta$ -toxin are suppressed by administration of BBG, which is a P2X7 receptor inhibitor, to be candidates for therapeutic agents.

研究分野：細菌学

キーワード：ウエルシュ菌 毒素 P2X7受容体 病原性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

C型ウエルシュ菌が産生する毒素は、致死、壊死活性を有し、本菌による壊疽性腸炎の原因と考えられている(*Toxins*, 7, 396 (2015)). 国内外で毒素の病原性解明の検討はこれまでほとんどなく、本毒素がP2X<sub>7</sub>受容体に作用して病原性を発現する機構の解明は、新規なプロジェクトで、本菌感染症を理解する上に大変、重要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、壊疽性腸炎の原因であるC型ウエルシュ菌毒素の病原性発現機構の解明を行う。毒素は免疫細胞や腸管細胞などに対して障害を示すが、病原性との関連は不明である。最近、我々は、毒素の受容体がP2X<sub>7</sub>受容体であることを報告した(*Biochim. Biophys. Acta* 1850, 2159 (2015)). 本研究では、毒素のP2X<sub>7</sub>受容体を介する細胞レベルでの障害作用や*in vivo*での毒素の病理組織学的検討、そして、毒素の構造からのアプローチなどから、毒素のP2X<sub>7</sub>受容体を介する病原性発現機構の分子メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

- 1) 毒素の細胞障害メカニズム：毒素は、細胞のP2X<sub>7</sub>受容体に作用して、どのような分子を介して免疫系細胞に障害を与えるのかを検討する。我々は、予備実験で、本毒素がカスパーゼ1を活性化することを明らかにしているため、本毒素が、いずれのインフラマゾーム経路を活性化して、細胞障害や炎症を誘導するかを細胞レベルで明らかにする。
- 2) 毒素の作用におけるPannexin1の役割：P2X<sub>7</sub>受容体と細胞膜上で共役した状態で存在しATPの遊離に参与するPannexin1(Pan1)を介する病原性発現機構の分子メカニズムを解明するため、Pan1阻害剤やPan1のsiRNAによるノックダウン細胞での毒素の作用に対する効果、毒素との共同在を免疫染色で検討する。
- 3) 毒素の腸管上皮細胞に対する障害作用：毒素は壊疽性腸炎の原因で、本毒素をマウス腸管に投与すると、著しい出血と腸管上皮細胞の脱落が観察される。一方、P2X<sub>7</sub>受容体は腸管上皮細胞に豊富に存在するので、毒素の局在、そして、タイトジャンクションの変化を免疫染色法で検討する。また、Caco-2細胞を使用して本毒素の上皮バリアに対する作用を解明する。
- 4) 毒素に対する治療薬の探索：毒素の細胞毒性は、P2X<sub>7</sub>受容体の阻害剤で強く抑制された。そこで、本毒素によるマウス致死や腸管障害にこれらの阻害剤が有効であるかどうかを検討する。さらに、インフラマゾーム経路の阻害剤の効果を検討する。以上より、本毒素の作用を抑制する治療薬の候補を探索する。

### 4. 研究成果

- 1) 細胞毒性メカニズムの1つとして、本毒素がカスパーゼ1を活性化することを明らかにした。さらに、本毒素の作用は、カスパーゼ1阻害剤で抑制された。すなわち、本毒素が、インフラマゾーム経路を活性化して、細胞障害や炎症を誘導する可能性を明らかにした。今後、本毒素の作用とインフラマゾーム経路の関連を詳細に検討する。
- 2) 毒素の*in vivo*での作用を解明するため、毒素によるマウス腸管の病理組織の評価した。毒素をマウス回腸ループに投与して、腸管上皮の病理組織学的変化を調べると、腸管上皮に脱落や出血が、投与量に依存して認められた。更に、免疫蛍光法で本毒素の腸管上皮細胞への結合とP2X<sub>7</sub>受容体の局在を観察すると、両者の腸管上皮表面での共同在が認められた。
- 3) P2X<sub>7</sub>受容体と細胞膜上で共役した状態で存在しATPの遊離に参与するPannexin1(Pan1)を介する病原性発現機構の分子メカニズムを解明した。毒素がPan1を介して細胞障害を与える機構を明らかにした。毒素の作用におけるPan1の影響を検討するため、Pan1阻害剤であるカルベノキソロン(CBX)の効果調べると、本毒素の細胞障害作用は、CBXの存在下で抑制された。次に、Pan1siRNAによるPan1のノックダウン細胞では、毒素の細胞毒性は弱くなり、また、オリゴマーが抑制された。毒素は、THP-1細胞に作用させると、一過性のATP遊離を引き起こし、この作用は、CBX存在下やPan1のノックダウン細胞では認められなかった。さらに、ATPスカベンジャーであるアピラーゼやヘキソキナーゼに存在下では、本毒素の作用が抑制され、毒素にPan1を介するATP遊離が本毒素の毒性発現に参与することが判明した。さらに、遊離したATPの役割を明らかにするため、少量のATPを培地に外添加すると、毒素の細胞毒性と細胞でのオリゴマー形成が増強された。以上から、毒素は、Pan1を介して毒性を発現することが判明した<sup>1)</sup>。
- 4) 毒素をヒト腸管由来細胞であるCaco-2細胞に作用させると、本毒素は細胞膜上でオリゴマーとなりポアを形成して、初期には細胞膜のBlebb形成が認められ、その後、細胞膜破壊が認められた。すなわち、本毒素は、腸管細胞に障害を示すことが明らかとなった。そこで、Caco-2細胞の上皮バリア機能に対する毒素の作用を検討するため、Caco-2細胞の本毒素を添加して膜電気抵抗値(TEER)を測定した。その結果、毒素処理後、6時間まで測定したが、TEERの変化は認められなかった。さらに、タイトジャンクション(TJ)分子であるoccludinやclaudinの変化を観察すると、本毒素処理してもこれらのタンパク質の変化は確認できなかった。すなわち、毒素は、腸管上皮のバリア機能には影響を与えず、腸管上皮細胞を破壊することに障害を示すことが判明した。
- 5) 毒素の治療薬の開発を検討するため、P2X<sub>7</sub>受容体阻害剤ブリリアントブルーG(BBG)は、予備実験では毒素のマウス致死活性を抑制した。そこで、毒素のマウス回腸ループの障害作用に対するBBGの効果を検討すると、本毒素による腸管障害作用はBBGで抑制された。以

上より、BBG は、本毒素の腸管毒性の抑制することから、本菌による感染症の効果的な治療薬となることが判明した<sup>2)</sup>。

本研究から、ヒトや動物の壊疽性腸炎の原因であるC型ウエルシュ菌毒素<sup>3)</sup>の病原性発現機構の解明が明らかになった。今後の本感染症解明や治療への応用に大きな貢献があると考えられる。

#### <引用文献>

1. Seike S, Takehara M, Kobayashi K, Nagahama M, Role of pannexin 1 in *Clostridium perfringens* beta-toxin-caused cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 3150-3156 (2016)
2. Nagahama M, Seike S, Shirai H, Takagishi T, Kobayashi K, Takehara M, Sakurai J, Role of P2X7 receptor in *Clostridium perfringens* beta-toxin-mediated cellular injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 2159-2167 (2015)
3. Nagahama M, Ochi S, Oda M, Miyamoto K, Takehara M, Kobayashi K, Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Toxins* 7, 396-406 (2015)

#### 5 . 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 13 件)

- 1) Seike S, Takehara M, Takagishi T, Miyamoto K, Kobayashi K, Nagahama M, Delta-toxin from *Clostridium perfringens* perturbs intestinal epithelial barrier function in Caco-2 cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1860(2), 428-433 (2018) 査読有
- 2) Zeniya S, Kuwahara H, Daizo K, Watari K, Kondoh M, Yoshida-Tanaka K, Kaburagi H, Asada K, Nagata T, Nagahama M, Yagi K, Yokota T, Angubindin-1 opens the blood-brain barrier in vivo for delivery of antisense oligonucleotide to the central nervous system. *J. Control Release* 283, 126-134 (2018) 査読有
- 3) Nagahama M, Takehara M, Miyamoto K, Ishidoh K, Kobayashi K, Acid sphingomyelinase promotes cellular internalization of *Clostridium perfringens* iota-toxin. *Toxins* 10(5), 290 (2018) 査読有
- 4) Nagahama M, Takehara M, Takagishi T, Seike S, Miyamoto K, Kobayashi K, Cellular uptake of *Clostridium botulinum* C2 toxin requires acid sphingomyelinase activity. *Infect. Immun.* 85(4), e00966-16 (2017) 査読有
- 5) Takehara M, Seike S, Takagishi T, Kobayashi K, Nagahama M, Peptidoglycan accelerates granulopoiesis through a TLR2- and MyD88-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 487(2), 419-425 (2017) 査読有
- 6) Krug SM, Hayaishi T, Iguchi D, Watari A, Takahashi A, Fromm M, Nagahama M, Takeda H, Okada Y, Sawasaki T, Doi T, Yagi K, Kondoh M Angubindin-1, a novel paracellular absorption enhancer acting at the tricellular tight junction. *J. Control Release* 260, 1-11 (2017) 査読有
- 7) Takagishi T, Takehara M, Seike S, Miyamoto K, Kobayashi K, Nagahama M, *Clostridium perfringens* alpha-toxin impairs erythropoiesis by inhibition of erythroid differentiation. *Sci. Rep.* 7, 5217 (2017) 査読有
- 8) Takehara M, Takagishi T, Seike S, Oda M, Sakaguchi Y, Hisatsune J, Ochi S, Kobayashi K, Nagahama M, Cellular entry of *Clostridium perfringens* iota-toxin and *Clostridium botulinum* C2 toxin. *Toxins* 9(8), 247 (2017) 査読有
- 9) Seike S, Miyamoto K, Kobayashi K, Takehara M, Nagahama M, *Clostridium perfringens* delta-toxin induces rapid cell necrosis. *PLoS one* 11(1), e0147957 (2016) 査読有
- 10) Takehara M, Takagishi T, Seike S, Ohtani K, Kobayashi K, Miyamoto K, Shimizu T, Nagahama M, *Clostridium perfringens* alpha-toxin impairs innate immunity via inhibition of neutrophil differentiation. *Sci. Rep.* 6, 28192 (2016) 査読有
- 11) Takagishi T, Oda M, Takehara M, Kobayashi K, Nagahama M, Oligomer formation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin is induced by activation of neutral sphingomyelinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1858(11), 2681-2688 (2016) 査読有
- 12) Takehara M, Takagishi T, Seike S, Oishi K, Fujihara Y, Miyamoto K, Kobayashi K, Nagahama M, *Clostridium perfringens* alpha-toxin impairs lipid raft integrity in neutrophils. *Biol. Pharm. Bull.* 39(10), 1694-1700 (2016) 査読有
- 13) Seike S, Takehara M, Kobayashi K, Nagahama M, Role of pannexin 1 in *Clostridium perfringens* beta-toxin-caused cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1858(12), 3150-3156 (2016) 査読有

##### [学会発表](計 5 件)

- 1) 第 69 回日本細菌学会中国・四国支部総会(高松市)平成 28 年 10 月 15-16 日 ウエルシュ菌 β 毒素の毒性発現における Pannexin-1 の役割の検討, 清家総史, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 2) 第 90 回日本細菌学会総会(仙台市)平成 29 年 3 月 19-21 日 ウエルシュ菌 δ 毒素の腸管上皮細胞に対する作用, 清家総史, 宮本和明, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博

- 3) 第 91 回日本細菌学会総会(博多)平成 30 年 3 月 27-29 日 ウエルシュ菌 β 毒素の腸管病原性の検討,山崎次郎, 清家総史, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 4) 第 91 回日本細菌学会総会(博多)平成 30 年 3 月 27-29 日 ウエルシュ菌 δ 毒素による ADAM10 活性化の検討, 吉村真央, 清家総史, 宮本和明, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 5) 第 57 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(米子市)平成 30 年 11 月 10-11 日 ウエルシュ菌 β 毒素の腸管病原性の検討, 鳥海将輝, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博

〔図書〕(計 1 件)

永浜政博 他、東京化学同人、日本薬学会編、スタンダード薬学シリーズ II-4, 生物系薬学 III. 生体防御と微生物、代表的な細菌毒素について説明できる pp178-181 2016 年発行

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：竹原正也、小林敬子

ローマ字氏名：Masaya Takehara, Keiko Kobayashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。