

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07129

研究課題名(和文) ウエルシュ菌 毒素による好中球分化抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of neutrophil differentiation suppression mechanism by *Clostridium perfringens* alpha-toxin

研究代表者

竹原 正也 (Takehara, Masaya)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：40742705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウエルシュ菌は毒素を産生し、好中球の分化を抑制して宿主免疫を障害するが、その機構は不明であった。本研究では、毒素が好中球の分化に関する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の産生には影響せず、G-CSF受容体の発現を好中球で低下させ、G-CSFを介した細胞分化シグナルを阻害することを見出した。また、毒素によるG-CSF受容体の発現低下は、本毒素によるセラミド産生の増加が原因であることが判明した。さらに、毒素は宿主の免疫反応を過剰に活性化して、宿主の細胞や臓器を広く障害することが分かった。このように、毒素は様々な機構で宿主の免疫を攪乱し、ウエルシュ菌の感染拡大に関与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で示した毒素の好中球分化に対する影響に着目した研究は世界的にも前例がほとんど無く、学術的にも極めて独創性が高いと考えられる。また、本研究で実施した研究手法は、さまざまな病原細菌の研究に応用可能で、発症や進行の機構が不明な細菌感染症の進行メカニズムの解明に寄与する可能性がある。このように、本研究の成果は、細菌感染症に対する新規な研究領域を開拓し、発症機序解明や治療に大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Clostridium perfringens produces  $\alpha$ -toxin, suppresses neutrophil differentiation and impairs host immunity, but the mechanism is still unknown. In this study, we found that  $\alpha$ -toxin does not affect the production of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), which is involved in neutrophil differentiation, reduces G-CSF receptor expression in neutrophils, leading to inhibition of CSF-mediated cell differentiation signals. In addition, it was found that the decrease in G-CSF receptor expression was caused by the increase in ceramide production caused by  $\alpha$ -toxin. Furthermore, it was found that  $\alpha$ -toxin excessively activates the host immune responses and widely damages the host cells and organs. Thus,  $\alpha$ -toxin is thought to disrupt host immunity by various mechanisms and contribute to the spread of Clostridium perfringens infection.

研究分野：細菌学

キーワード：ウエルシュ菌 毒素 宿主免疫 好中球 細胞免疫

## 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り、本感染症に対する有効な治療戦略は見出されていなかった。最近、我々は、本菌が産生する $\alpha$ 毒素が好中球の分化を抑制し、宿主免疫を障害することで本菌の感染拡大が引き起こされることを発見した。しかしながら、その詳細な機構は不明であり、研究のさらなる進展が期待されていた。

## 2. 研究の目的

一般に、好中球の分化は顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) により厳密に制御されていることから、私は、 $\alpha$ 毒素が G-CSF を介したシグナル伝達に影響して好中球の分化を抑制する可能性を考えた。そこで、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、 $\alpha$ 毒素による G-CSF の産生変化や G-CSF 受容体の発現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 $\alpha$ 毒素欠損株)を C57BL/6 マウスの下肢骨格筋に投与し、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。その後、本菌を感染させたマウスの静脈血を採取し、これに含まれる G-CSF の濃度を ELISA 法で定量した。

2) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を精製ペプチドグリカン (PGN) や $\alpha$ 毒素で処理し、*G-csf* mRNA 発現量の変化をリアルタイム RT-PCR 法で、G-CSF の培地中への放出を ELISA 法で定量した。また、 $\alpha$ 毒素処理した HUVEC の細胞懸濁液を調製し、イムノプロット法により、MAP キナーゼ経路の活性化を測定した。さらに、同様の検討により、種々の MAP キナーゼ阻害剤が G-CSF の産生に与える影響を検討した。

3) C57BL/6 マウスより骨髓細胞を採取し、PE 標識抗 Ly-6G 抗体により好中球を標識した。その後、標識された好中球を EasySep PE positive selection kit を用いて純化し、骨髓好中球を得た。骨髓好中球は、 $\alpha$ 毒素やリコンビナント G-CSF、合成セラミドなどで 24 時間処理し、生細胞数を Cell counting kit-8 を用いて測定した。また、 $\alpha$ 毒素処理した骨髓好中球で、抗セラミド抗体を用いた細胞免疫染色法により、セラミドの産生を測定した。

4)  $\alpha$ 毒素や合成セラミドで処理した骨髓好中球の細胞懸濁液を調製し、イムノプロット法により、G-CSF 受容体の発現を測定した。また、 $\alpha$ 毒素や合成セラミドで処理した骨髓好中球での G-CSF 受容体の細胞内局在を、抗 G-CSF 受容体抗体を用いた細胞免疫染色法により観察した。

5) 骨髓好中球を $\alpha$ 毒素で 1 時間処理し、細胞の粗抽出液を調製した。その後、RNA を精製し、DNA マイクロアレイに供した。

6) リポポリサッカライド (LPS) を投与した C57BL/6 マウスに $\alpha$ 毒素を同時投与し、敗血症の重症度をマウスの生存率を指標に評価した。また、これらのマウスより末梢血を採取し、血中のグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) をトランスアミナーゼ CII-テストワコーを用いて、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) を ELISA 法でそれぞれ定量した。

7) ガス壊疽モデルにリコンビナント G-CSF 製剤であるフィルグラスチムを投与し、ガス壊疽の進行を評価し、ガス壊疽に対するフィルグラスチム投与の有効性を検証した。ガス壊疽の進行は、筋肉の組織切片での筋管直径の計測や、血中のクレアチンキナーゼ活性の測定により評価した。

## 4. 研究成果

ガス壊疽モデルマウスでは、コントロールマウスと比較して G-CSF の産生が顕著に亢進した。また、野生株と $\alpha$ 毒素欠損株を比較すると、予想に反し、野生株感染マウスの方が血中の G-CSF 濃度が高かった。これらの結果は、 $\alpha$ 毒素が G-CSF の産生を亢進することを示している。そこで、精製した $\alpha$ 毒素をマウスに投与し、血中の G-CSF 量を定量すると、 $\alpha$ 毒素は単独では G-CSF の産生に影響しなかった。一方、 $\alpha$ 毒素を PGN と同時投与したマウスでは、 $\alpha$ 毒素依存的に G-CSF の産生が顕著に亢進した。これまで、生体の血管内皮細胞が G-CSF を産生することが報告されていた。そこで、HUVEC を $\alpha$ 毒素や PGN で処理し G-CSF の産生を測定すると、 $\alpha$ 毒素は単独では G-CSF の産生に影響しなかつ

たが、PGN による G-CSF の産生を $\alpha$ 毒素が亢進した。一般に、PGN は生体の Toll 様受容体 2 (TLR2) に認識され、これが活性化されると MAP キナーゼ経路が活性化され、G-CSF の発現が亢進されることが知られている。そこで、PGN と $\alpha$ 毒素で処理した HUVEC で MAP キナーゼ経路の活性化を測定するため、Erk1/2、Mek1/2、Jnk、p38 などのリン酸化をイムノプロット法で定量すると、 $\alpha$ 毒素は PGN の存在下で Mek1/2 や Jnk のリン酸化を顕著に亢進し、MAP キナーゼ経路を活性化することが判明した。また、PGN と $\alpha$ 毒素で処理した HUVEC では、G-csf mRNA 発現量が顕著に増加した。さらに、PGN と $\alpha$ 毒素で処理した HUVEC に Jnk 阻害剤 (JNK-IN-8、SP600125) を共処理すると、G-CSF の産生や G-csf mRNA 発現が顕著に抑制された。以上の結果は、PGN による TLR2 の活性化を $\alpha$ 毒素がさらに亢進することを示唆している。すなわち、ウエルシュ菌が感染した宿主では G-CSF の産生は阻害されず、 $\alpha$ 毒素は G-CSF の産生量の変化とは別の機構で好中球の分化を抑制することが分かった。

次に、好中球の G-CSF 受容体に対する $\alpha$ 毒素の影響について検討した。純化したマウス骨髄好中球をリコンビナント G-CSF で処理すると、24 時間後に細胞数が顕著に増加した。これに対し、 $\alpha$ 毒素と G-CSF を好中球に同時処理すると、G-CSF による好中球の増殖促進作用が抑制された。また、 $\alpha$ 毒素を処理した骨髄好中球での G-CSF 受容体の発現をイムノプロット法で定量すると、本毒素は G-CSF 受容体の発現を顕著に低下させた。さらに、 $\alpha$ 毒素を処理した骨髄好中球で G-CSF 受容体の細胞内局在を細胞免疫染色法により観察すると、本毒素は G-CSF 受容体の内在化を導くことが判明した。一方、 $\alpha$ 毒素を処理した骨髄好中球での遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイで網羅的に測定すると、本毒はほとんどの遺伝子の発現に影響しなかった。以上の結果は、 $\alpha$ 毒素が G-CSF 受容体の内在化を導くことで同受容体の分解を促進し、好中球が G-CSF 非感受性となることで細胞分化が阻害されることを示唆している。

これまでに、 $\alpha$ 毒素はスフィンゴミエリナーゼ活性により標的細胞の細胞膜でセラミドの産生を亢進することが報告されている。そこで、 $\alpha$ 毒素処理した骨髄好中球でのセラミド産生を細胞免疫染色法により測定すると、本毒素は骨髄好中球の細胞膜でセラミドの産生を促進した。また、骨髄好中球を合成セラミド (C<sub>2</sub>-セラミド) や G-CSF で共処理し細胞数を定量すると、合成セラミドは G-CSF による好中球の増殖促進作用を抑制した。さらに、C<sub>2</sub>-セラミドは G-CSF 受容体の発現を顕著に低下させた。これらの結果は、 $\alpha$ 毒素がセラミドの産生亢進を介して G-CSF 受容体の発現を低下させることを示唆している。

上述のように、 $\alpha$ 毒素が TLR2 の活性化を誘導することから、本毒素が TLRs の過剰な活性に起因する敗血症の進行に影響することが推察された。そこで、敗血症を誘導する代表的な内毒素である LPS を投与したマウスに、 $\alpha$ 毒素を同時投与し、敗血症の重症度を評価した。LPS や $\alpha$ 毒素を単独で投与したマウスでは、ほとんどのマウスが 2 週間生存したのに対し、LPS と $\alpha$ 毒素を同時投与したマウスは数日で全数が死亡した。また、LPS と $\alpha$ 毒素を同時投与したマウスは、それぞれを単独で投与したマウスやコントロールマウスと比較して血中の GOT 活性や IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ が顕著に増加した。さらに、TLR4 ノックアウトマウスを用いた検討より、これらの $\alpha$ 毒素の作用は TLR4 依存的であることが判明した。以上の結果は、 $\alpha$ 毒素が TLR の過剰な活性化を導くことで全身性の組織障害を促進し、敗血症を悪化させることを示唆している。

最後に、ガス壊疽モデルにリコンビナント G-CSF 製剤であるフィルグラスチムを投与し、ガス壊疽の進行を評価し、ガス壊疽に対するフィルグラスチム投与の有効性を検証した。G-CSF は筋肉組織を様々な障害から保護することが報告されている。ガス壊疽の進行を、筋肉組織での筋管直径や、血中のクレアチンキナーゼ活性により評価すると、フィルグラスチムはガス壊疽の重症度に全く影響しなかった。この結果は、 $\alpha$ 毒素が骨髄好中球で G-CSF 受容体の分解を誘導する上述の結果と符合し、ガス壊疽に対して異なる観点で治療法を開発する必要があると考えられる。新規なガス壊疽の治療方法の開発について、今後の研究の進展が期待される。

以上より、 $\alpha$ 毒素は極めて巧妙な機構で宿主を攻撃することが明らかとなった。また、本菌による自然免疫克服機構を解析することは、新たな病原細菌の感染メカニズムの解明や治療薬の開発にも有効であると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takehara Masaya, Sonobe Yuuta, Bandou Hiroto, Kobayashi Keiko, Nagahama Masahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Granulocyte Colony-Stimulating Factor Does Not Influence Clostridium Perfringens -Toxin-Induced Myonecrosis in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 509 ~ 509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins11090509	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takehara Masaya, Seike Soshi, Sonobe Yuuta, Bandou Hiroto, Yokoyama Saki, Takagishi Teruhisa, Miyamoto Kazuaki, Kobayashi Keiko, Nagahama Masahiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Clostridium perfringens -toxin impairs granulocyte colony-stimulating factor receptor-mediated granulocyte production while triggering septic shock	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0280-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takehara Masaya	4. 巻 138
2. 論文標題 Host Defense against Bacterial Infection and Bacterial Toxin-induced Impairment of Innate Immunity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1249 ~ 1253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.18-00102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 ウエルシュ菌 毒素による宿主免疫応答の活性化
3. 学会等名 第66回トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 ウエルシュ菌 毒素による宿主免疫応答の攪乱
3. 学会等名 第31回微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 ウエルシュ菌 毒素による血管内皮細胞の障害
3. 学会等名 第72回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 ウエルシュ菌 毒素による宿主免疫攪乱の分子機構
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 ウエルシュ菌 毒素による好中球の産生抑制機構の解明
3. 学会等名 第65回トキシシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 Toll様受容体を介した宿主の免疫反応に対するウエルシュ菌 毒素の影響
3. 学会等名 第71回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 ウエルシュ菌 毒素によるToll様受容体を介した宿主免疫の攪乱
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	永浜 政博  (Nagahama Masahiro)  (40164462)	徳島文理大学・薬学部・教授   (36102)	
研究 分担者	小林 敬子  (Kobayashi Keiko)  (90170315)	徳島文理大学・薬学部・助教   (36102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------