

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：24403
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K06387
研究課題名(和文) 鶏壊死性腸炎発症に関わるウエルシュ菌が産生する病原因子の病原性発現機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of pathogenicities of virulence factors produced by *Clostridium perfringens* involved in the pathogenesis of chicken necrotic enteritis.

研究代表者
向本 雅郁 (MUKAMOTO, Masafumi)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：80231629
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)：鶏壊死性腸炎発症鶏より分離したG型ウエルシュ菌は鶏肝癌由来細胞株(LMH)と共培養したときのみNetB遺伝子(netb)の発現が誘導された。cpaやtypical-cpb2はラット小腸上皮細胞株IEC-6との共培養においても同程度の発現誘導がみられた。LMHおよびIEC-6とG型菌との混合培養の結果、LMHよりIEC-6の方がG型菌との反応によって炎症性サイトカイン産生が強く誘起された。G型菌は動物種特異的なNetB産生誘導だけでなく、腸管特異的な炎症性サイトカインを誘起することで、鶏壊死性腸炎発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鶏壊死性腸炎は世界中で多大な被害を及ぼしている感染症であるにもかかわらず、効果的なワクチンはなく、その発症メカニズムも明らかとなっていない。主要な病原因子はウエルシュ菌が産生するNetBであることが最近明らかとなった。NetB遺伝子保有菌は家きんからしか検出されず、NetBは鳥類の細胞に対して非常に感受性が高い。さらに、鶏壊死性腸炎分離株からは定型および非定型 2毒素遺伝子を保有する株も我々の研究により見つかり、鶏壊死性腸炎発症には様々な毒素が関わり合っていると考えられている。本研究により様々な病原因子の役割が明らかとなれば、鶏壊死性腸炎制御の一助となると考えている。

研究成果の概要(英文)：Clostridium perfringens type G isolated from chickens with necrotizing enteritis induced expression of the NetB gene (netb) only when co-cultured with a chicken hepatocarcinoma-derived cell line (LMH). cpa and typical-cpb2 were induced to the same extent in co-culture with a rat small intestinal epithelial cell line IEC-6. When LMH or IEC-6 was cocultured with C. perfringens type G, IEC-6 induced stronger production of inflammatory cytokines than LMH. It is suggested from these results that C. perfringens type G may be involved in the pathogenesis of chicken necrotizing enterocolitis not only by inducing species-specific NetB production but also by inducing intestinal tract-specific inflammatory cytokines.

研究分野：獣医感染症学特にクロストリジウム属菌が産生する毒素の家畜・家きんに対する病原性発現機構の解析

キーワード：壊死性腸炎 ウエルシュ菌 毒素 サイトカイン 小腸上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

ウエルシュ菌は、通常、盲腸内に多く存在するが、飼育環境や給与飼料等の影響による腸内細菌叢の攪乱が誘因となって小腸内で増殖することで本病を発生させる。ガス壊疽菌特有のガス充満により小腸内が膨張するとともに、本菌から産生される毒素・酵素により腸粘膜に壊死がおこり、偽膜形成や脱落により腸壁は菲薄化する。過去30年以上にわたって、鶏壊死性腸炎の病原因子はウエルシュ菌から産生されるα毒素(phospholipase C)であると考えられてきた。しかし、2008年に壊死性腸炎分離菌から新規の蛋白毒素が発見され、NetBと命名され¹⁾、現在ではNetBが鶏壊死性腸炎の必須の病原因子であると考えられている²⁾。2018年、Uzalらによって新たな遺伝子型別が提唱された(表1)³⁾。NetB遺伝子(*netb*)はウエルシュ菌G型菌のみが保有しており、保有菌のほとんどは鶏の糞便や飼料および飼育環境より分離され、他の動物種からはほとんど分離されていない。1997年に壊疽性腸炎発症豚からの分離株よりβ2毒素が発見され、2012年にはβ2毒素遺伝子(*cpb2*)と相同性が70%である第2の遺伝子が牛壊死性腸炎分離株から発見され非定型β2毒素と名付けられた⁴⁾。鶏壊死性腸炎発症鶏からの分離菌における非定型*cpb2*の保有率は他の家畜と比較して非常に高く鶏壊死性腸炎の新たな病原因子である可能性が示唆されている。我が国において、腸炎発症鶏、健常鶏に関わらず糞便中から容易に*netb*および非定型*cpb2*保有菌が分離できることから、これらの毒素遺伝子保有菌は全国的に浸潤していると思われる。鶏壊死性腸炎発症と産生毒素の機能や毒力および毒素間での関連性を明らかにすることによって本病の発症機序を解明したい。

表1. ウエルシュ菌の毒素型と毒素産生性

	α毒素	β毒素	ε毒素	ι毒素	CPE	NetB
A型	+	-	-	-	-	-
B型	+	+	+	-	-	-
C型	+	+	-	-	+/-	-
D型	+	-	+	-	+/-	-
E型	+	-	-	+	+/-	-
F型	+	-	-	-	+	-
G型	+	-	-	-	-	+

2. 研究の目的

本研究ではこれまでのNetBによる病原性発現機構についての研究成果をさらに発展させ、鶏壊死性腸炎の発症に関わるα毒素、NetB、β2毒素の役割を明確にするために、壊死性腸炎発症鶏からの分離菌を用いて、腸管上皮細胞やニワトリ由来細胞との接触時における各毒素の発現・毒力および相関性について遺伝子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 使用菌株・細胞株

ウエルシュ菌は、当研究室保管株のうち、壊死性腸炎発症鶏由来2株(CNEOP003、CNEOP004)、壊死性腸炎発症牛由来1株(CP-23)を使用した。これらが産生する毒素の組み合わせは異なり、α毒素および非定型β2毒素は3菌株すべてで、定型β2毒素はCNEOP003のみで、NetBはCNEOP004のみで産生される(表2)。細胞は、マウスマクロファージ由来RAW264.7、ラット小腸上皮由来IEC-6および鶏肝癌由来LMHを使用した。

表2. 使用した3菌株の分離動物、菌型、および保有毒素遺伝子の比較

使用菌株	分離動物	菌型	<i>cpa</i>	<i>conc-cpb2</i>	<i>atyp-cpb2</i>	<i>netB</i>
CNEOP003	鶏	A	+	+	+	-
CNEOP004	鶏	G	+	-	+	+
CP-23	牛	A	+	-	+	-

すべてで、定型β2毒素はCNEOP003のみで、NetBはCNEOP004のみで産生される(表2)。細胞は、マウスマクロファージ由来RAW264.7、ラット小腸上皮由来IEC-6および鶏肝癌由来LMHを使用した。

2) 混合培養時のRT-qPCR

37℃で12時間培養後の菌および細胞ペレットをMulti-beads Shocker (YASUI KIKAI)を用いて粉碎後、RNAを抽出しcDNAを合成した。Real-time PCRによる解析は、QuantStudio 3 Real-Time PCR Systemにより40サイクルの増幅反応で行った。

3) ニワトリ初代小腸上皮細胞の培養

17日齢の発育鶏卵より小腸を取り出し、細切後collagenase type I Aで消化した。上清を回収し、DMEM/Ham's F12 15 mLにInsulin (10 mg/mL)7.5 μL、FCS 375 μL、heparin (10 mg/mL SIGMA) 150 μL、Epidermal Growth Factor (EGF) (2 μg/mL gibco) 150 μLを加えた培地を、加え、non-coated 25 cm² flask (IWAKI)に播種して、37℃、5% CO₂条件下で2時間培養後、非接着細胞を回収し、collagen-coated 12 wellプレートに播種した。細胞の状態を経時的に観察し、培地の洗浄・交換を行った。

4. 研究成果

1) BHI 培地で培養時の毒素遺伝子の発現量

α 毒素および非定型 β 2 毒素は 3 菌株すべてが産生する (表 2)。cpa の発現量は、CNEOP003 で CNEOP004 の 8.7 倍、CP-23 の 10.0 倍と、他の菌株と比較して有意に高かった (0.05 < P) (図 1-b)。atyp-cpb2 の発現量は、CP-23 で CNEOP003 の 3.2 倍、CNEOP004 の 4.5 倍と、他の菌株と比較して有意に高かった (0.01 < P) (図 3-d)。NetB および定型 β 2 毒素は、それぞれ CNEOP004、CNEOP003 のみが産生する (表 2)。netB および conc-cpb2 の発現量を確認したところ、毒素産生と一致して、それぞれ CNEOP004、CNEOP003 のみで発現が認められた (図 1-a, c)。

2) 共培養時における毒素遺伝子の発現

① netB の発現量

CNEOP004 では、LMH との共培養時にのみ netB の発現がみられた。netB は接触時の方が発現量は高く、非接触時の 4.5 倍であった (図 2)。

② cpa および atyp-cpb2 の発現

cpa および atyp-cpb2 は LMH との共培養において、接触の有無および菌株間で発現量に有意な差は認められなかった (図 3-a, 図 4-a)。IEC-6 との共培養においては、菌株間では発現量に差はみられなかったが、接触時と比較して非接触時の方が発現量は高かった (図 3-b, 図 4-b)。atyp-cpb2 では CNEOP003 および CNEOP004 において、接触時と非接触時の間で有意差がみられた (CNEOP003: P < 0.01, CNEOP004: P < 0.05) (図 4-b)。RAW264.7 との共培養では発現がほとんど認められなかった (図 3-c, 図 4-c)。

3) IEC-6 および LMH と G 型菌の混合培養時におけるサイトカインの発現

qPCR の結果を Ct 値ごとに表 3 および表 4 に示した。炎症性サイトカインである IL-1b、IL-6、TNF-α は、高濃度 (1.5 x 10⁷ cfu/mL) の G 型菌と反応、あるいは長時間反応させることによって発現量は上昇する傾向が認められ、LMH では IEC-6 よりも短い 6 時間で IL-6 と TNF-α で発現の有意な増加がみられた (p < 0.05) (表 3)。一方で、LMH では IL-1b の発現量は、G 型菌との反応によって変動していないということが示された (表 3)。

抗炎症性サイトカインである IL-10 と TGF-β に関しては、IEC-6 では菌濃度や反応時間に応じた発現量の変化は認められなかった (表 3) が、LMH では高濃度 (1.5 x 10⁷ cfu/mL)、長時間 (12 時間) の反応で有意に増加していたことに加え、TGF-β は 1.5 x 10⁵ cfu/mL の濃度でも有意な発現量上昇が認められた (表 4)。

なお今回、1.5 x 10³ cfu/mL の G 型菌と混合培養して同様にサイトカイン発現分析を行ったが、いずれのサイトカインに関しても有意差が認められなかったため、結果には示していない。

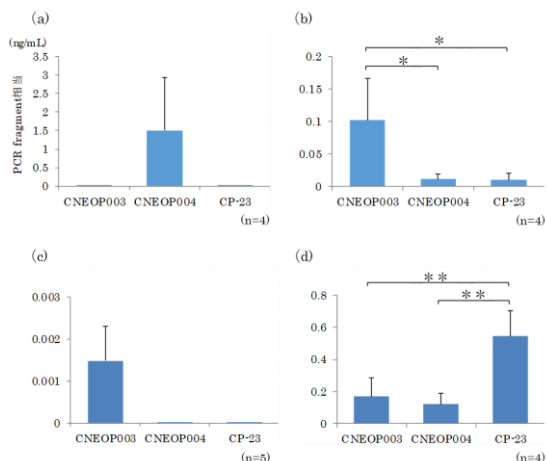


図 1. BHI 培地での培養時における各毒素遺伝子 mRNA の発現 (a) netB, (b) cpa, (c) conc-cpb2, (d) atyp-cpb2 (* : P < 0.05, ** : P < 0.01)

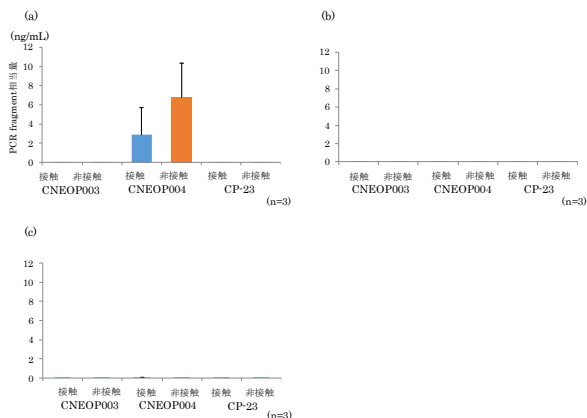


図 2. PCR fragment 相当量に換算した共培養時における各菌株の netB の mRNA 発現量の比較 (a) LMH, (b) IEC-6, (c) RAW264.7

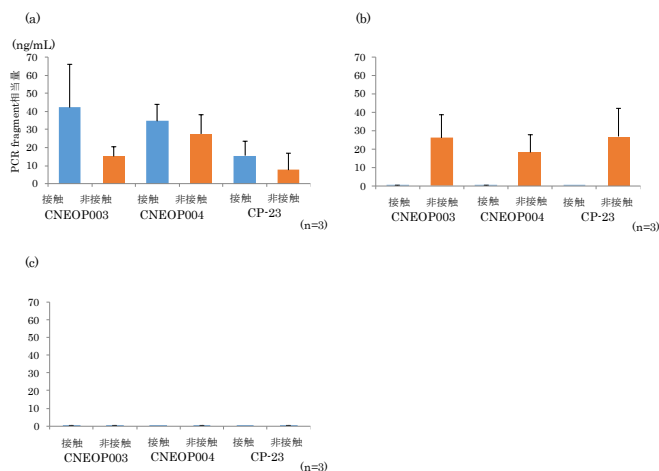


図 3. PCR fragment 相当量に換算した共培養時における cpa の mRNA 発現量の比較 (a) LMH, (b) IEC-6, (c) RAW264.7

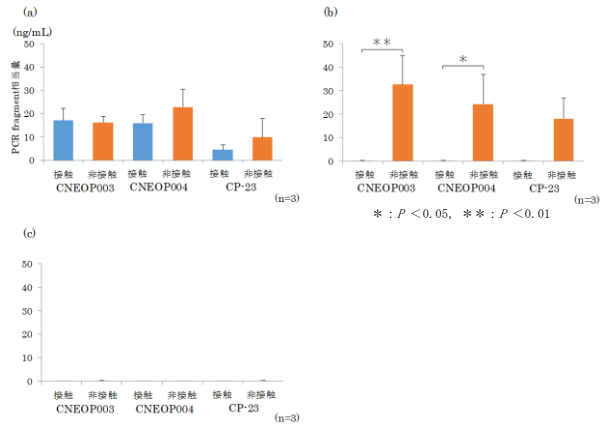


図4. PCR fragment相当量に換算した共培養時における *atyp-cpb2* のmRNA発現量の比較
(a) LMH, (b) IEC-6, (c) RAW264.7

表3. IEC-6 と G 型菌の混合培養時におけるサイトカイン発現

G 型菌濃度: 1.5×10^7 cfu/mL

β -actinで標準化						
	cellのみ			6h reaction		
IL-1b	1.872	1.875	1.871	1.828	1.852	1.893
IL-6	2.000	2.062	2.045	1.936	1.960	1.951 *
TNF- α	1.833	1.820	1.861	1.647	1.593	1.640 *
IL-10	2.165	2.154	2.186	2.135	2.058	2.110
TGF- β	1.330	1.327	1.366	1.369	1.325	1.326

Ct値						
	cellのみ			6h reaction		
IL-1b	29.573	29.660	29.012	28.674	29.478	29.760
IL-6	31.598	32.621	31.714	30.378	31.198	30.663
TNF- α	28.968	28.800	28.864	25.836	25.345	25.778
IL-10	34.205	34.080	33.890	33.496	32.749	33.161
TGF- β	21.016	20.995	21.180	21.480	21.088	20.848
β -actin	15.801	15.821	15.507	15.687	15.914	15.719

G 型菌濃度: 1.5×10^5 cfu/mL

β -actinで標準化						
	cellのみ			6h reaction		
IL-1b	2.035	1.781	1.751	1.734	1.752	1.573
IL-6	2.160	1.690	1.750	1.598	1.591	1.550
TNF- α	1.933	1.773	1.695	1.530	1.417	1.327 *
IL-10	2.151	2.118	1.882	1.850	1.832	1.559 *
TGF- β	1.398	1.28	1.312	1.414	1.344	1.274

Ct値						
	cellのみ			6h reaction		
IL-1b	32.636	34.807	33.053	32.843	34.880	37.225
IL-6	34.571	33.027	33.002	30.278	31.687	36.665
TNF- α	31.011	34.636	31.984	28.981	28.213	31.390
IL-10	34.504	41.391	35.516	35.035	36.480	36.894
TGF- β	22.432	25.006	24.753	26.787	26.761	30.139
β -actin	16.041	19.539	18.873	18.942	19.912	23.660

* $p < 0.05$

表4. LMH と G 型菌の混合培養時におけるサイトカイン発現

G 型菌濃度: 1.5×10^7 cfu/mL

β -actinで標準化						
	cellのみ			6h reaction		
IL-1b	1.867	1.889	1.963	—	—	—
IL-6	2.206	2.082	2.241	1.405	1.377	1.750 *
TNF-a	1.409	1.433	1.468	1.243	1.169	1.292 *
IL-10	1.677	1.602	1.642	1.287	1.196	1.307 *
TGF-b	1.903	1.854	2.022	1.494	1.492	1.405 *

Ct値						
	cellのみ			6h reaction		
IL-1b	30.240	31.401	30.925	40<	40<	40<
IL-6	35.729	34.607	35.296	35.306	36.267	43.326
TNF-a	22.824	23.824	23.114	31.229	30.787	31.982
IL-10	27.150	26.631	25.866	32.340	31.502	32.354
TGF-b	30.813	30.818	31.844	37.531	39.289	34.784
b-actin	16.193	16.622	15.750	25.125	26.337	24.763

* $p < 0.05$

4) 鶏腸管上皮細胞の分離、初代培養

分離・培養した腸管細胞を位相差顕微鏡下で観察した結果、明確に上皮様形態の細胞が確認できる一方で、紡錘形の線維芽細胞の混入が多くみられた。そのため、分離及び培養に関して様々な条件検討を行ったが、分離率は最も良くて上皮細胞：線維芽細胞=5：5であった(図5)。なお、線維芽細胞は単体で散在して存在しているのに対して、上皮様細胞は各細胞が密に接着していた。この状態でサイトカイン発現を qPCR で測定しても上皮細胞だけではなく線維芽細胞から分泌されるサイトカインも検出してしまうため、サイトカイン誘導分析は実施しなかった。

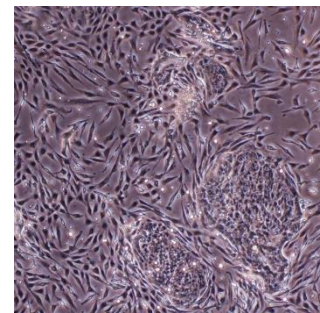


図5. 位相差顕微鏡下での腸管由来上皮細胞
(矢印: 上皮用細胞、矢頭: 線維芽細胞)

参考文献

- 1) Keyburn, A.L. et al., *Infect. Immunol.* 74:6496-6500 (2006)
- 2) Smyth, J.A. et al., *Vet. Microbiol.* 146:76-84(2010)
- 3) Uzal, F.A. et al., *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 339-344 (1997)
- 4) Keyburn, A.L. et al., *PLoS Pathog.* 4: e26 (2008)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akm Azharul Islam, Mitsuki Nakatani, Takayuki Nakajima, Tomoko Kohda, Masafumi Mukamoto	4. 巻 83
2. 論文標題 The cytotoxicity and molecular mechanisms of the Clostridium perfringens NetB toxin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 187-194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.20-0623	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	萬野 絵美 (MANNO Emi)		
研究協力者	稲垣 昂樹 (INAGAKI Kouki)		

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
---------	---------