

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07505

研究課題名(和文) ウエルシュ菌 毒素の腸管病原性発現機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of Clostridium perfringens beta-toxin-induced enterotoxicity

研究代表者

永浜 政博 (Nagahama, Masahiro)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：C型ウエルシュ菌の毒素は、本菌による壊疽性腸炎の主要な病原因子である。我々は、毒素の腸管病原性について検討した。毒素は、ヒト血管内皮細胞に作用させると細胞死を起こした。毒素は、その細胞で7量体のオリゴマーを形成し、細胞膜を破壊した。次に、毒素は、マウス回腸に投与すると、腸管組織の障害を起こした。以上から、本毒素は、腸管の血管内皮細胞に対して障害を起こし、腸管病原性を発現している可能性が推察される。P2X7阻害剤は、本毒素による致死活性や腸管毒性を抑制した。すなわち、P2X7阻害剤は、毒素の治療薬となることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウエルシュ菌の毒素は、当グループが、世界で初めて精製に成功した。また、世界的に抗精製毒素抗体を有する唯一の研究室である。従って、当グループは、これまで、毒素の病原メカニズムについて世界をリードしてきた。本研究では、毒素の病原性を、ヒト血管内皮細胞を用いて、細胞毒性のメカニズムを解明した。さらに、in vivoでの感染実験を実施し、毒素は、マウス回腸に障害を与えることを明らかにした。さらに、本研究により、毒素の致死活性と腸管病原性は、P2X7阻害剤で抑制された。以上より、本研究は、世界に先駆けて、本感染症の病原性発現機構の解明と治療薬開発の基盤を確立できたと確信している。

研究成果の概要(英文)：The β -toxin of Clostridium perfringens type C is a major pathogenic factor of enterotoxemia caused by this bacterium. We investigated the enteropathogenicity of β -toxin. β -toxin caused cell death when it acted on human vascular endothelial cells. β -toxin formed heptameric oligomers on the cell membranes and disrupted the cell membrane. Next, β -toxin caused intestinal tissue damage when administered to the mouse ileum. From the above, it is inferred that this toxin may cause damage to vascular endothelial cells in the intestinal tract and exhibit enteropathogenicity. A P2X7 inhibitor suppressed the lethal activity and intestinal toxicity of this toxin. Thus, P2X7 inhibitors can be used as therapeutic agents for toxins.

研究分野：細菌学

キーワード：ウエルシュ菌 毒素 腸管病原性 ポア形成毒素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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β毒素は、本菌による壊疽性腸炎の主要な病原因子であるが、その病原性については明らかにされていない。申請者は本毒素の病原性解明のため、β毒素の精製を世界で初めて行った。その後、申請者は、本毒素は感受性細胞の脂質ラフトでポアを形成し、さらに、本毒素の宿主受容体が、P2X7受容体であることを報告した。申請者のこれまでのβ毒素に関わる研究経緯より、β毒素の病原性発現機構を解明してC型ウエルシュ菌の感染現象をより深く解明する着想に至った。本プロジェクトでは、本菌による壊疽性腸炎の克服を目指し多方面から解析を行う。

2. 研究の目的

申請者は、壊疽性腸炎の原因であるC型ウエルシュ菌β毒素が、感受性細胞のP2X7受容体を認識して結合し毒性を発現することを世界で初めて明らかにした。本研究では、本毒素の腸管病原性発現機構を明らかにし、本感染症克服に役立つ知見を得る。実施した研究項目は、1)β毒素のヒト血管内皮細胞に対する障害作用、2)β毒素の腸管由来細胞に対する毒性と腸管病原性の解析、3)感染症に対する治療薬の開発である。

3. 研究の方法

1) 培養したヒト血管内皮細胞(HUVEC)にβ毒素を作用させ、細胞死や毒素の結合をウエスタンブロット方で解析した。β毒素によるHUVECのアクチンやVE-カドヘリンの変化は共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

2) β毒素の腸管由来Caco-2細胞に対する毒性とオリゴマー形成を検討した。結紮マウス回腸ループに本毒素を投与し、病理組織学的変化を観察した。

3) β毒素のマウス致死活性や腸管病原性に対するP2X7受容体阻害剤の効果を検討した。

4. 研究成果

ウエルシュ菌β毒素の病原性の解明を行なった。本毒素は、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)に対して細胞毒性を示すことから、本毒素は、腸管の血管内皮細胞に対して障害を起している可能性が推察された。そこで、HUVECに対する作用を詳細に検討した。β毒素をHUVECに作用させると細胞のbleb形成や細胞死が認められ、本毒素は、HUVECの細胞膜上で7量体のオリゴマーを形成した。すなわち、このオリゴマーによって形成されるポアにより、細胞内からの水分の流入により細胞死が誘導されることが考えられる。さらに、β毒素は、HUVECのアクチンやVE-カドヘリン量を変化させ、減少させることが判明した。以上より、本毒素は、HUVECのアクチンやVE-カドヘリンに影響を与え、細胞障害を示すことが明らかとなった。

β毒素の腸管病原性を検討するため、本毒素を結紮マウス回腸ループに投与し、病理組織学的変化を観察した。その結果、β毒素を投与した回腸は、時間と投与量に依存して絨毛の脱落が認められ、本毒素は、腸管病原性を示すことが明らかとなった。次に、腸管由来Caco-2細胞に対する本毒素の障害作用を検討すると、本毒素処理により、Caco-2細胞のbleb形成と細胞の破壊が観察された。この障害時に、Caco-2細胞への本毒素の結合を検討すると、毒素は細胞膜に結合後、7量体のオリゴマーを形成することが明らかとなった。以上から、β毒素は、腸管上皮細胞に結合後、オリゴマーを形成し、細胞膜上で形成されたポアからの水分の流入により、細

胞を破壊し、腸管組織の絨毛の脱落を誘導することが明らかとなった。

本感染症の治療薬の発見の手がかりを得るため、 β 毒素の細胞毒性を抑制する薬物の検討を行った。 β 毒素のTHP-1細胞に対する細胞毒性は、P2X7受容体阻害剤であるプリリアントブルーG(BBG)で抑制された。さらに、BBGは、本毒素によるマウス致死活性や腸管毒性を抑制した。すなわち、P2X7受容体阻害剤は毒素の治療薬として有用であることが判明した。以上の結果から、本毒素の毒性はP2X7受容体阻害剤で抑制されることから、今後、この阻害剤を使用して、本菌をマウスに感染後の、感染症の拡大を抑制するかどうか検討する。BBG以外にも、複数の特異的P2X7受容体阻害剤が存在し、個々の阻害剤で、その有効性や副作用などを検討し、治療薬の候補として最適な阻害剤を選択する。

以上、ウエルシュ菌 β 毒素の腸管病原性を明らかにする目的で、血管内皮細胞HUVECに対して本毒素は、細胞毒性を示し、この結果は、本毒素による腸管組織の破壊は、腸管細胞に対する直接の障害作用に加え、腸管血管内皮にも障害を与え生じている可能性が考えられる。さらに、本毒素の病原性の抑制にP2X7受容体阻害剤が有効であることが判明した。今回の研究成果は、今後の β 毒素の腸管病原性メカニズムの解明に大きく貢献するものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Seike S, Takehara M, Kobayashi K, Nagahama M	4. 巻 5
2. 論文標題 Critical residues of Clostridium perfringens delta-toxin for oligomerization and receptor binding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 66-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.5.3_66	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 M, Kobayashi K, Nagahama M	4. 巻 1864
2. 論文標題 Clostridium perfringens alpha-toxin up-regulates plasma membrane CD11b expression on murine neutrophils by changing intracellular localization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta -Biomembranes-	6. 最初と最後の頁 184054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2022.184054	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 -
1. 著者名 Kohya R, Murai T, Taguchi Y, Sawai K, Takehara M, Nagahama M, Itaya K, Koike Y, Endo A, Ono Y, Nagasaka A, Nishikawa S, Nakamura M	4. 巻 2022
2. 論文標題 An autopsy case of rapidly aggravated Clostridium perfringens septicemia with colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Case Reports in Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 ID1071582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2022/1071582	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 Nagahama M, Kobayashi K, Takehara M	4. 巻 11
2. 論文標題 Toll-like receptor 4 protects against Clostridium perfringens infection in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Cell. Infect. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 633440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.633440	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 Nagahama M, Kobayashi K, Ochi S, Takehara M	4. 巻 13
2. 論文標題 Internalization of Clostridium botulinum C2 toxin is regulated by cathepsin B released from lysosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins13040272	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 Nagahama M, Kobayashi K, Takehara M	4. 巻 13
2. 論文標題 Cathepsin release from lysosomes promotes endocytosis of Clostridium perfringens iota-toxin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins13100721	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 Nagahama M, Seike S, Ochi S, Kobayashi K, Takehara M	4. 巻 12
2. 論文標題 Clostridium perfringens epsilon-toxin impairs the barrier function in MDCK cell monolayers in a Ca ²⁺ -dependent manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12050286.	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 M, Bandou H, Kobayashi K, Nagahama M	4. 巻 65
2. 論文標題 Clostridium perfringens alpha-toxin specifically induces endothelial cell death by promoting ceramide-mediated apoptosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 102262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anaerobe.2020.102262.	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 -

1. 著者名 Nagahama M, Kobayashi K, Takehara M	4. 巻 3
2. 論文標題 The inhibitory effect of cholera toxin B subunit on Clostridium perfringens iota-toxin-induced cytotoxicity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 146-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.3.4_146	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 M, Kobayashi K, Nagahama M	4. 巻 65
2. 論文標題 Clostridium perfringens alpha-toxin inhibits myogenic differentiation of C2C12 myoblasts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 102265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anaerobe.2020.102265.	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15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 A型ウエルシュ菌感染時のToll様受容体4の役割
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡ももこ、竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 ボツリヌス菌C2毒素の初期細胞内侵入過程
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堤綾乃、竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 ウエルシュ菌デルタ毒素の作用発現に關与するアミノ酸残基の検索
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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 毒素は好中球でCD11b抗原の発現を増加させる
3. 学会等名 第75回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 A型ウエルシュ菌の病原性発現機構の解明
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊勢晴香、弘田和、小林敬子、竹原正也、永浜政博
2. 発表標題 ウエルシュ菌 毒素の細胞毒性に対するp38MAPKとJNKの役割
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南山 優、竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 Toll様受容体4はウエルシュ菌感染に対して生体を防御する
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 A型ウエルシュ菌感染時のToll様受容体4の役割
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡ももこ、竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 ボツリヌス菌C2毒素の初期細胞内侵入過程
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堤綾乃、竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 ウエルシュ菌デルタ毒素の作用発現に關与するアミノ酸残基の検索
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹原正也、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 A 型ウエルシュ菌の病原性発現機構に関する研究
3. 学会等名 第73回 日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永浜政博、和田ほのか、清家総史、小林敬子、竹原正也
2. 発表標題 ウエルシュ菌 毒素の生物学的活性におけるアミノ酸残基の役割
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹原正也、竹内美穂、小林敬子、永浜政博
2. 発表標題 ウエルシュ菌 毒素はC2C12細胞の筋分化を抑制する
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林敬子、岡 杏奈、竹原正也、永浜政博
2. 発表標題 ボツリヌス菌C2毒素の細胞内への取り込みはプロテアーゼ活性を必要とする
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小松優真、服部良一、中島勝幸、中川治、堅田笑里、山本普樹、山根滉生、竹原正也、永浜政博、田中好幸
2. 発表標題 改変ジフテリア毒素による薬剤送達技術の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島文理大学 薬学部 微生物学教室 http://http://p.bunri-u.ac.jp/lab09/hyoushi.htm 徳島文理大学 薬学部 微生物学教室 http://p.bunri-u.ac.jp/lab09/hyoushi.htm
--

6. 研究組織						
<table border="1"> <thead> <tr> <th>氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)</th> <th>所属研究機関・部局・職 (機関番号)</th> <th>備考</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	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			
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				

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