

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17462

研究課題名(和文)ボツリヌス菌が産生する膜小胞の病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of the interaction between host and Clostridium botulinum derived membrane vesicles.

研究代表者

小林 伸英 (Kobayashi, Nobuhide)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：30712799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の分泌する膜小胞(MV)は宿主に様々な影響を及ぼす。本研究ではボツリヌス菌 *C. botulinum* および近縁の *C. sporogenes*、共生細菌である *C. scindens* からMVを単離し、哺乳類細胞への影響を解析した。これらクロストリジウム属由来MVはいずれも、MyD88/TRIF、TLR1/2/4、dynaminおよびPI3K依存的に自然免疫応答を誘導した。個々のMVに対する応答性は細胞株の種類によって大きく異なっており、菌種・菌株による強弱の傾向は見られなかった。また、MVの細胞内取り込みはアクチン重合阻害により抑制されたが、MVの取り込み阻害はサイトカイン誘導を抑制しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ボツリヌス菌の毒素以外の菌体成分が宿主に及ぼす影響は不明であったが、本研究により初めてボツリヌス菌由来MVが自然免疫応答を誘導することを明らかにした。また、複数のクロストリジウム属菌株由来のMVに対する自然免疫応答に共通して重要な受容体および下流のシグナル因子を明らかにした。細菌MVはグラム陰性菌でよく研究されているが、グラム陽性菌、特に嫌気性で扱いにくいクロストリジウム属菌のMVの研究は少なく、本研究で得られた複数のクロストリジウム属菌由来のMVを比較解析した結果は、今後のMV研究およびクロストリジウム属菌研究における基盤的知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：Recent studies provided insights into the role of bacterial membrane vesicles (MVs) produced by some bacterial species in host immunity and pathology. We herein examined and compared the cellular effects of MVs isolated from four strains of *Clostridium botulinum* with those of closely related *Clostridium sporogenes* and two strains of the symbiont *Clostridium scindens*. MVs derived from all strains induced inflammatory cytokine expression in intestinal epithelial and macrophage cell lines. Cytokine expression was dependent on MyD88 and TRIF, essential adaptors for TLRs, and TLR1/2/4. The inhibition of actin polymerization impeded the uptake of MVs in RAW264.7 cells, however, did not reduce the induction of cytokine expression. On the other hand, the inhibition of dynamin or PI3K suppressed the induction of cytokine expression by MVs, suggesting the importance of these factors downstream of TLR signaling.

研究分野：細菌学

キーワード：ボツリヌス菌 膜小胞 membrane vesicle クロストリジウム属

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は土中に芽胞の状態で広く存在し、嫌気性条件下で発芽・増殖し、ボツリヌス毒素を産生する。ボツリヌス毒素は末梢神経シナプスにおける神経伝達物質の放出を阻害する作用を持ち、ボツリヌス毒素を含む食品を経口摂取したヒトなどの動物は、運動神経麻痺を主症状とするボツリヌス中毒症 (食餌性ボツリヌス症) を発症する。また、乳児や抗生物質により腸内細菌叢が攪乱された成人が芽胞を含む食品を摂取すると、腸管内でボツリヌス菌が発芽・増殖し、腸管ボツリヌス症 (それぞれ乳児ボツリヌス症、成人腸管定着性ボツリヌス症) を発症する。腸管ボツリヌス症では多数の生菌が腸内に存在し、また、毒素が含まれる食品にも菌体の残渣が含まれている。しかしながら、既存の研究ではボツリヌス毒素のみに着目しており、他の菌体成分が宿主にどのような影響を及ぼすかについては全く明らかになっていない。

近年、細菌が分泌する膜小胞 (membrane vesicle: MV) が、細菌毒素の運搬や宿主の免疫系の調節に重要な役割を果たすことが明らかになってきている。例えば、腸管出血性大腸菌が産生する MV は腸上皮細胞株のミトコンドリアに溶血毒素を輸送し、膜透過性の亢進によりアポトーシスを誘導する (Bielaszewska, M. et al. *PLoS Pathogens*. **9**(12), e1003797. 2013)。また、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 由来の MV はマクロファージ様細胞株に炎症性サイトカインの発現を誘導する (Obana, N. et al. *Infection and Immunity*. **85**(5), e00096-17. 2017)。対照的に、ヒト腸内常在菌である *Bacteroides fragilis* が産生する MV は樹状細胞に IL-10 の発現を誘導し、大腸炎を抑制する (Shen, Y. et al. *Cell host & microbe*. **12**(4), 509-20. 2012)。すなわち、産生する細菌によって MV が宿主に及ぼす影響は異なっており、MV に含まれる因子がそれらを決定していると考えられる。しかしながら、クロストリジウム属菌の MV に関する報告は少なく、ボツリヌス菌については研究がなされていなかった。

2. 研究の目的

複数の研究により細菌由来 MV が宿主の病態に影響することが報告されていることから、ボツリヌス菌も MV を産生し、宿主への感染・定着やボツリヌス症の病態に何らかの役割を果たしているとの仮説を立てた。本研究では、ボツリヌス菌が産生する MV の宿主に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ボツリヌス菌のうちグループ I より 3 株 (*C. botulinum* type A 62A, 7103, type B Okra)、グループ II より 1 株 (*C. botulinum* type E Iwanai) の培養上清から密度勾配遠心分離によって MV を単離した。比較対象として、グループ I ボツリヌス菌に近縁だがヒト腸管内に生息する *C. sporogenes* ATCC7955、宿主に有益なクロストリジウム属菌とされる *C. scindens* 2 株(ATCC35704, VPI12708) から MV を得た。MV は電子顕微鏡および粒子径解析により精製度および性状を確認し、哺乳類培養細胞に添加してその影響を解析した。

4. 研究成果

まず、精製した MV をマウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 およびヒト腸上皮細胞株である Caco-2 に添加したところ、いずれの菌株においても細胞障害性は確認できなかった。次に、MV を添加した RAW264.7、Caco-2 およびマウス腸上皮細胞株 CMT-93 における炎症性サイトカインの遺伝子発現を解析したところ、全ての菌株が異なる強さで発現を誘導した。炎症誘導能は細胞の種類によって異なっており、例えば *C. botulinum* type A 62A 由来 MV の IL6 の発現誘導は RAW264.7 では供与株中で最も弱かったのに対し、Caco-2 においては最も強かった。MV によるサイトカイン誘導は TLR シグナルに必須のアダプター分子である MyD88/TRIF の二重欠損 BMDM では大きく減弱することから、クロストリジウム属由来の MV は TLR リガンドを含有すると考えられた。ただし、MyD88/TRIF 二重欠損細胞でも微弱なサイトカイン誘導が認められ、予備的な検討では NOD1 または NOD2 の阻害剤でもサイトカイン誘導が阻害されたことから、TLR 以外の受容体によっても MV が認識されていると考えられる。個別の TLR については TLR1/2 の阻害剤である CuCPT22、TLR4 の阻害剤である TAK242 によりサイトカイン誘導が阻害されたことから、これらのリガンド、すなわちペプチドグリカンやリポタイコ酸といった細胞壁成分をリガンドとして MV は含有していると考えられる。TLR7 や TLR9 といった核酸を認識する TLR については未検討であるが、一般的に MV は DNA や RNA を含むことからクロストリジウム属由来の MV の認識に関与している可能性があり、その他の TLR も含めて今後の検討課題である。また、MV はサイトカインの他に、抗菌ペプチドである *Reg3g* 及び *Reg3b* の発現を初代培養した小腸上皮細胞に MyD88/TRIF 依存的に誘導した。このことから、MV は腸管における抗菌ペプチドの産生に関与していることが示唆された。

当初、MV に対する自然免疫応答は病原体と共生細菌で異なるのではないかと期待していた

が、MV に対する応答性は菌種・菌株によって特定の傾向がある訳ではなく、むしろ添加する細胞の種類によって大きく異なることが明らかとなった。その理由として、細胞によって発現するパターン認識受容体の種類が異なっており、MV が含有するリガンドの種類や量も菌種・菌株によって異なると考えられることから、その組み合わせによって個々の細胞の応答性が決定すると考えられる。

MV の細胞内取り込みについては多様な経路が報告されているが、クロストリジウム属菌由来 MV については報告がない。C. botulinum type E Iwanai、C. sporogenes ATCC7955、C. scindens VPI12708 の3株について、FITC で標識した MV の RAW264.7 における取り込みを解析したところ、アクチン重合の阻害剤である cytochalasin D により顕著に取り込みが抑制された。一方で、ダイナミン依存的エンドサイトーシスの阻害剤である dynasore、カベオラ依存的エンドサイトーシスを阻害する filipin III、マクロピノサイトーシスなどに重要な PI3K の活性を阻害する LY294002 では MV の取り込みは阻害されなかった。このことから、クロストリジウム属菌由来 MV はアクチン重合依存的な膜変形を伴う貪食作用(ファゴサイトーシス)によって RAW264.7 に取り込まれると考えられた。意外にも、cytochalasin D によって MV の取り込みを阻害してもサイトカイン誘導にはほとんど影響がなかった。一方、取り込みには影響が見られなかった dynasore および LY294002 処理により顕著に MV によるサイトカイン誘導が抑制された。TLR はリガンドに結合後、ダイナミン依存的エンドサイトーシスによりエンドソームに取り込まれることがその後のシグナル伝達に重要であり、TLR2 の下流においては PI3K-Akt シグナルが炎症性サイトカインの発現を亢進することが報告されていることから、dynasore および LY294002 は TLR の下流において自然免疫応答を阻害したものと考えられる。

ボツリヌス菌 MV の *in vivo* における生理機能を明らかにするために、MV の経口投与がマウスに及ぼす影響を解析した。まず MV そのものがボツリヌス毒素の送達に寄与する可能性を考え、C. botulinum type E Iwanai 由来の MV をマウスに経口投与したところ、MV 単体ではボツリヌス症を発症させなかった。一方で、MV を同時投与または経時的に事前投与することで、精製ボツリヌス毒素(M 毒素)の経口毒性を高めることが明らかとなった(図1)。また、MV を経時的に投与したマウスでは、経口投与した蛍光標識デキストランの血中移行に指標される腸管透過性の亢進が見られた。このことから、ボツリヌス菌 MV は腸管バリア機能を低下させると考えられた。MV が直接的に上皮細胞に及ぼす影響を解析するため、単層培養した腸管上皮細胞株に MV を添加したが、頂端膜側、基底膜側のいずれに添加した場合でも経上皮電気抵抗値に指標されるバリア機能の低下は見られなかった。一方で、単層培養した腸管上皮細胞株の基底膜側でマクロファージ細胞株を共培養したところ、基底膜側に MV を添加した場合のみ、バリア機能の低下が見られた。以上の結果から、ボツリヌス菌 MV は腸管上皮細胞のバリア機能を直接破壊するのではなく、免疫細胞を介した間接的な作用であることが示唆された。

本研究により、ボツリヌス菌 MV は自然免疫誘導能を持つとともに、*in vivo* でボツリヌス毒素の経口毒性を促進する作用を持つことを明らかにした。これらの作用を介してボツリヌス菌 MV は病態に寄与することが示唆される。今後、マウス感染モデルにおいて MV 低産生株などを用いることで、ボツリヌス菌感染時における MV の生理的意義を明らかにできると考えられる。

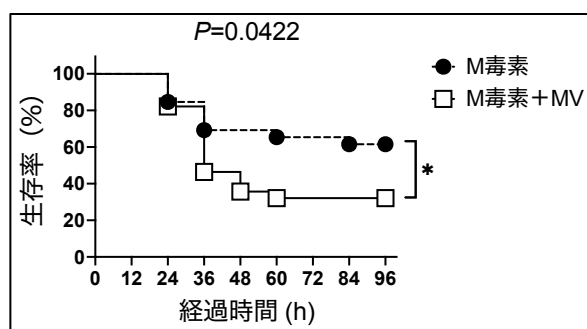


図1. ボツリヌス毒素(M 毒素) とボツリヌス菌由来 MV との同時経口投与はマウスの生存率を低下させる. BALB/c. n=26, Log-rank (Mantel-Cox) test.

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 1件）

1. 著者名 Kobayashi Nobuhide, Abe Kimihiro, Akagi Sachiyo, Kitamura Mayu, Shiraishi Yoshitake, Yamaguchi Aki, Yutani Masahiro, Amatsu Sho, Matsumura Takuhiro, Nomura Nobuhiko, Ozaki Noriyuki, Obana Nozomu, Fujinaga Yukako	4. 巻 13
2. 論文標題 Membrane Vesicles Derived From Clostridium botulinum and Related Clostridial Species Induce Innate Immune Responses via MyD88/TRIF Signaling in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 720308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.720308	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林伸英
2. 発表標題 ポツリヌス菌が産生するメンブレンベシクルに対する宿主応答の解析
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 小林伸英
2. 発表標題 ポツリヌス菌が産生するメンブレンベシクルによる宿主調節機構の解析
3. 学会等名 第34回日本バイオフィルム学会学術集会・第57回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nobuhide Kobayashi
2. 発表標題 Analysis of host response against membrane vesicles derived from Clostridium botulinum.
3. 学会等名 57th Annual IBRCC Meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林伸英
2. 発表標題 ポツリヌス菌および関連するクロストリジウム属細菌が産生するメンブレンベシクルに対する炎症応答の解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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