

令和元年5月22日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08770

研究課題名(和文) 腸管出血性大腸菌重症化阻止薬の作用機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of inhibition of Shiga-toxigenic Escherichia coli SubAB cytotoxicity by steroids and diacylglycerol analogues

研究代表者

八尋 錦之助 (YAHIRO, KINNOSUKE)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：80345024

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)：LEE-negative STECは、志賀毒素2型(Stx2)だけでなく、Subtilase cytotoxin (SubAB)を保有している。SubABは、ER内に存在する蛋白質BiPを切断し、ERにストレスによりアポトーシスを誘導する。今回、Stx2, SubABの細胞毒性を阻害する薬剤の検索を行い、その毒素阻害機構の解析した。臨床またはトリアル中の薬剤の中で、SubABの細胞障害性を阻害する薬剤として、PKC活性化剤がSubABやStx2による細胞死を抑制した。また、ステロイド剤が、ステロイド受容体を介して抗細胞死抵抗蛋白質Bcl-xLの発現増強を促し、SubABによる細胞死を阻害した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原細菌を対象にした感染症治療は、抗生剤を用いたものが多く、耐性菌の出現は今日でも大きな治療上の問題となっている。EHECは抗生剤による溶菌は強毒な毒素の放出が伴うなどの問題も多い。我々はドラッグリポジショニングにより、Stx2, SubABの細胞毒性を阻害する薬剤の検索を行い、その毒素阻害機構の解析を行った。本手法は、既に他の病態で利用されている薬剤に、抗毒素活性がある可能性を示唆する物である。本研究によって、毒素の細胞内侵入・輸送・致死機構を特異的に阻害する薬剤の基本構造、作用が理解されれば、有効な薬剤の構造を基本として、より効果の高い、副作用の低い薬剤の開発・臨床応用の立案に役立つ。

研究成果の概要(英文)：Shiga toxigenic Escherichia coli (STEC) are responsible for a worldwide foodborne disease, which is characterized by severe bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome. Subtilase cytotoxin (SubAB) is a novel AB5 toxin, which is produced by LEE-negative STEC. Cleavage of the BiP protein by SubAB induces endoplasmic reticulum stress, followed by induction of cytotoxicity in vitro or lethal severe hemorrhagic inflammation in mice. Here we found that steroids and diacylglycerol (DAG) analogues inhibited SubAB cytotoxicity. Steroid-induced Bcl-xL expression was a key step in the inhibition of SubAB cytotoxicity. Bcl-xL knockdown increased SubAB-induced apoptosis in steroid-treated HeLa cells, whereas SubAB-induced cytotoxicity was suppressed in Bcl-xL overexpressing cells. While, DAG analogues suppressed SubAB activity independent of Bcl-xL expression at early time points. We show the mechanism by which steroids and DAG analogues protect cells against SubAB produced by LEE-negative STEC.

研究分野：細菌学

キーワード：ドラッグリポジショニング 小胞体ストレス 細胞死 ステロイド PKC活性化剤

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

1. 研究開始当初の背景

細菌感染症に対する治療は、抗菌薬によるものが主である。しかし、昨今、世界的に多くの薬剤耐性菌が蔓延しており、難治性の重症化に至る傾向が認められる。また、これら抗菌薬の使用が更なる耐性菌の出現を助長することが危惧されている。

O157 型に代表される腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、経口感染により腸管に達し、定着・増殖に伴う毒素 (志賀毒素、サブチラーゼ毒素等) 産生により、急性の下痢症を惹起する。腹痛、血性下痢を伴う出血性腸炎を引き起こし、重症化した場合には、溶血性尿毒症症候群 (HUS) 脳症等の病態を引き起こす。小児や老人が重症化した場合には死に至るケースも多く認められる。最近では、非典型的な EHEC (O157 型以外) 感染による重症化例が世界的に増加傾向にある。本菌による病態発症の主要な病原因子は、志賀毒素やサブチラーゼ毒素であり、いずれも宿主細胞の蛋白質合成を阻害することで細胞死や臓器機能障害を引き起こしていることが判明しているものの、未だに重篤な EHEC 感染症に対する統一された治療法が確立されていない。これまでの臨床報告では、EHEC 感染症における脳症は予後不良であることが共通認識されている。これらに対する注目すべき治療法として、2011 年富山で発生した EHEC O111 集団感染の際に行われたステロイドパルス療法と血漿交換療法は高い治療効果を示していた。即ち、脳症を発症した患者において、この治療が行われた患者の生存率は非常に高く、予後も良好であったと報告されている。しかし、その治療効果を示した詳細な作用の仕組みは不明なままである。

2. 研究の目的

細菌感染症における感染と病態発現は主に、感染細菌が産生する病原因子 (毒素) が大きな役割を担っている。EHEC の場合、志賀毒素やサブチラーゼ毒素等が主要な病原因子であり、今日でも、これらの毒素をターゲットとした治療法確立のための基礎研究が盛んに行われている。即ち、毒素にアフィニティーを持つポリフェノール等の天然物や合成化合物を用いた毒作用の中和、生物製剤としての中和抗体の開発、毒素の結合を競争的に阻害する糖脂質類の探索などである。しかし、いずれも臨床応用までには至っていない。また、EHEC は死滅・溶菌する際に大量の毒素を放出する結果となることから、抗菌薬を用いた治療法には多くの問題が議論されている。申請者はサブチラーゼ毒素を用いた細胞侵入機構機構の解析 (Nagasawa et al., 2014)、致死機構の解析 (Yahiro et al., 2014) を研究する過程で、一般的に臨床で用いられているステロイド剤や抗炎症剤、PKC 活性化剤の一部に毒素活性を著しく阻害するものを見出した。即ち、我々は、菌体や毒素に直接作用するのではなく、宿主の生体反応に変化を与える薬剤を患者に投与させることで毒素活性を無効化し、病態の重症化を抑えることができるという考えに至った。そこで本研究では、頻発する EHEC 感染症の重症化に対するドラックリポジショニングを利用した抗生剤に依存しない臨床応用可能な、新たな治療法の確立を目指し、志賀毒素 2 型、サブチラーゼ毒素を阻害する薬剤を見出した、その阻害機構を分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) SubAB の精製

大腸菌で発現させた His-Tag SubAB と、酵素活性中心アミノ酸を置換した変異体 mSubA (S272A)B を Ni-NTA カラムにより精製して実験に用いた。

(2) siRNA の遺伝子導入

HeLa 細胞を用い、種々の siRNA とコントロール (NC) siRNA を Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) により遺伝子導入し、48 時間後、標的蛋白質の発現を Western blotting により確認した。

(3) 免疫染色

HeLa 細胞を SubAB (0.2 mg/ml) で一定時間処理した後、4% PFA で固定する。ヤギ血清でブロッキングした後、各種抗体で反応させる。次に、蛍光標識した 2 次抗体と反応させた後、共焦点顕微鏡観察により解析した。

(4) 免疫沈降法

構造変化した Bax/Bak を免疫沈降法により検出する。HeLa 細胞を SubAB あるいは mSubAB で一定時間処理した後、細胞を回収した。細胞を 2% CHAPS を含む細胞可溶性溶液で処理し、遠心後、上清を回収した。この上清に抗 Bax 抗体 (clone3, BD) あるいは抗 Bak 抗体 (Ab-2, Calbiochem) を添加し、構造変化した Bax/Bak の免疫沈降を行った。

(5) ウェスタンブロット法

種々の細胞を阻害剤、活性化剤存在下、SubAB で処理した。1×SDS サンプルバッファーで可溶化し、熱変性した後、SDS-PAGE した。PVDF 膜に転写し、5% スキムミルクを含むバッファーでブロッキングした。Immunoshot バッファー中で、一次抗体と反応させた。洗浄後、二次抗体と反応させ、ECL で検出した。

(6) subAB/stx2 遺伝子破壊 STEC 株の作成

STEC O113:H21 株の subAB 遺伝子、stx2 遺伝子を破壊するため、kanamycin 耐性遺伝子を挿入した。

(7) マウス腸管オルガノイドの樹立

マウスの腸管からクリプトを採取した後、マトリゲル中に埋め込み、IntestiCult Organoid Growth Medium (Mouse) (STEM CELL) を用いて培養した。

(8) qRT-PCR

HeLa 細胞を種々の薬剤と SubAB (200 ng/ml) で一定時間処理した後、ISOGEN II を用いて、RNA を回収した。PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio) を用いて、cDNA を合成した。KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を使用し、Bcl ファミリータンパク質の mRNA の発現量を解析した。

(9) マイクロアレイ解析

SubAB 処理した HeLa 細胞から、mRNA と、エキソソームから miRNA を精製、回収し 3D マイクロアレイ (TOYOBO) にて解析した。

4. 研究成果

PKC 活性化剤は SubAB の細胞致死活性を阻害する

SubAB による SG 形成誘導機構の解析を行った際、PKC 活性化剤である PMA が SG 形成阻害するだけでなく、アポトーシスマーカーである PARP の切断も抑制することを見いだした。そこで、我々は、臨床で使用、或いはトリアル中の薬剤 (PKC 活性化能を持つ) の中に、SubAB の細胞障害性を阻害する活性がある可能性を考え、検索を行った。

検索の結果、臨床薬剤として 3 種類の PKC 活性化剤 [bryostatin 1 (Bry1), ingenol-3-angelate (I3AG), Prostratin] を選択し、これら薬剤の SubAB に対する阻害活性の有無を調べた。結果、Bry1, I3AG は、PMA と同様に SubAB による PARP の切断を抑制した。一方、Prostratin には阻害活性を持たなかった。

SubAB による PERK のリン酸化、eIF2 α のリン酸化は、Bry1, I3AG では阻害されないことから、PKC の活性化は PERK/eIF2 α の下流に位置し、SubAB の活性を阻害していると推察された。

次に、Bry1 や I3AG による PKC の活性化が、本当に SubAB の活性阻害に関与するか確認するため、PKC 阻害剤 (Bisindolylmaleimide I, Go6973, Go6983) を共添加し、PARP の切断が回復するか調べた。結果、Bisindolylmaleimide II (BisII), Go6983 添加により、Bry1 による PARP 切断阻害活性を抑制した。更に、SubAB による Bak/Bax の構造変化は、Bry1 により抑制されたが、BisII 共存下では、Bry1 の活性を阻害した。この結果は、PKC の活性化が SubAB のアポトーシス阻害に関与していることを示唆していた。

ステロイドによる SubAB 活性阻害

ステロイドパルス療法が EHEC 感染による重症化阻止に効果があるかもしれないとの報告があることから、種々のステロイドを用いて毒素活性抑制効果を調べた。

今回用いた 3 種類のステロイドは、どれも数 μ M で、SubAB による PARP の切断を阻害した。一方、非ステロイド剤 (NSAID) は阻害活性を示さなかった。

次に、どのようにステロイドが、SubAB 活性を阻害するのか、その機構を調べた。結果、ステロイドにより抗アポトーシスに働く Bcl ファミリータンパク質 Bcl-xL の発現が mRNA レベル、タンパク質レベルで亢進することが明らかになった。

Bcl-xL の発現亢進が毒素活性阻害に関与しているか明らかにするため、Bcl-xL 過剰発現細胞、Bcl-xL 発現抑制細胞を用いて調べた。結果、Bcl-xL 過剰発現細胞では、SubAB による PARP の切断、細胞致死活性が阻害された。一方、Bcl-xL 発現抑制細胞では、SubAB 活性が亢進した。

更に、ステロイド受容体阻害剤 RU486 を用いて、細胞内のステロイド受容体を介したシグナル伝達が Bcl-xL 発現亢進に関与しているか調べた。ステロイドにより亢進した Bcl-xL 発現は RU486 処理により抑制され、SubAB による PARP 切断も復活した。以上の結果は、ステロイド受容体を介したシグナルが毒素活性を阻害することを示唆している。

ERK の活性化が SubAB 活性を阻害する

PKC 活性化剤やステロイドによる活性阻害に関与するシグナル伝達分子を明らかにするため、種々の阻害剤を用いて、シグナル伝達機構を解析した。

我々は、ERK の阻害剤 U0126 存在下、SubAB による PARP の切断が、著明に亢進する一方、JNK, p38 の阻害剤は影響しないことを見いだした。そこで、本研究で使用した薬剤の ERK に与える影響を解析した。

SubAB による PARP の切断を阻害する PKC 活性化剤 (Bry1, I3AG) の添加は、ベースレベルから ERK のリン酸化を亢進した。ERK 阻害剤を共存させると、PKC 活性化剤による ERK のリン酸化が抑制され、且つ、PARP の切断が復活した。

ステロイド剤の添加は、SubAB による ERK のリン酸化亢進、Bcl-xL の発現増加による PARP の切断抑制が認められた。ERK 阻害剤を共存下では、ステロイドによる ERK のリン酸化抑制、Bcl-xL の発現阻害により、PARP の切断が復活した。以上の結果は、ステロイドによる ERK の過剰な活性化が Bcl-xL の発現亢進し、SubAB の活性阻害に寄与していると考えられた。

マウスを用いた阻害剤の活性評価

4 週齢の BALB/c マウスに SubAB を腹腔投与する前に、ステロイドを投与した。更に毒素投与後、2 回ステロイドを追加で投与し、72 時間後に腸管の状態を確認した。結果、SubAB による腸管出血をステロイドは阻害しなかった。また、マウス腸管オルガノイド、MEF 細胞でも同様にステロイド、PKC 活性化剤は SubAB の致死活性を阻害しなかった。この結果は、マウスとヒ

トの薬剤に対する感受性の違いが反映していると推察された。

マイクロアレイ解析

SubAB 処理した細胞から回収した RNA をマイクロアレイにて解析した。結果、これまで報告のあった ER ストレスで上昇する遺伝子 CHOP 等以外に炎症マーカーとなる遺伝子、抗菌活性を有する遺伝子等が新たに見出すことができた。

現在、これら遺伝子の細胞障害性に及ぼす影響を解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Yahiro, K., Nagasawa, S., Ichimura, K., Takeuchi, H., Ogura, K., Tsutsuki, H., Shimizu, T., Iyoda, S., Ohnishi, M., Iwase, H., Moss, J., Noda, M. Mechanism of inhibition of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* SubAB cytotoxicity by steroids and diacylglycerol analogues. *Cell Death Discov* 4, 22. (2018) (査読有)
2. Ogura, K., Terasaki, Y., Miyoshi-Akiyama, T., Terasaki, M., Moss, J., Noda, M., and Yahiro, K. *Vibrio cholerae* Cholix Toxin- Induced HepG2 Cell Death is Enhanced by Tumor Necrosis Factor-Alpha Through ROS and Intracellular Signal-Regulated Kinases. *Toxicol Sci* 156, 455-468. (2017) (査読有)
3. Kyaw, K., Harada, A., Ichimaru, H., Kawagoe, T., Yahiro, K., Morimura, S., Ono, K, Tsutsuki, H., Sawa, T., Niidome, T. Silver Nanoparticles as Potential Antibiofilm Agents Against Human Pathogenic Bacteria. *Chemistry Letter* 46, 594-596. (2017) (査読有)
4. Ichimura, K., Shimizu, T*, Matsumoto, A., Hirai, S., Yokoyama, E., Takeuchi, H., Yahiro, K., and Noda, M. Nitric oxide-enhanced Shiga toxin production was regulated by Fur and RecA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Microbiologyopen* 6 : e461. doi: 10.1002/mbo3.461 (2017). (査読有)
5. 八尋錦之助, Shelley Strack. 「5' 非翻訳領域からの翻訳が統合的ストレス応答に適応する」 *Science: Japanese Scientists in Science* 2016: 19 (2017) (査読無)
6. 中野政之、八尋錦之助 「Award Report 上原 H. Pylori 賞-優秀賞-宿主受容体 RPTP を介した VacA の新たな機能」 *日本ヘリコバクター学会誌* 1 月号.18 (2): 28-31. (2017) (査読無)
7. 八尋錦之助, 野田 公俊 「腸管出血性大腸菌感染の現状と病原性」 *化学療法の領域* 4 月号 32(4):70-76. (2016) (査読無)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Yahiro, K., S. Nagasawa, K. Ichimura, H. Takeuchi, K. Ogura, H. Tsutsuki, T. Shimizu, S. Iyoda, T. Shimizu, M. Ohnishi, H. Iwase, and M. Noda 「Mechanism of inhibition of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* SubAB cytotoxicity by steroids and diacylglycerol analogues」U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 21st International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel Meeting) (ハノイ、ベトナム) 2019 年 2 月 26-3 月 1 日
2. 八尋錦之助, 永澤明佳、小倉康平、清水健、津々木博康、伊豫田淳、大西真、野田公俊 「LEE-negative STEC の産生する Subtilase cytotoxin (SubAB) の毒性阻害薬の検索と阻害機序の解明」第 91 回日本細菌学会総会 (福岡) 2018 年 3 月 27~29 日
3. 津々木博康、張田力、八尋錦之助, 小野勝彦、伊豫田淳、勢戸和子、大西真、野田公俊、赤池孝章、澤智裕 「マウス感染モデルを用いた腸管出血性大腸菌毒素 Subtilase cytotoxin の機能解析」第 91 回日本細菌学会総会 (福岡) 2018 年 3 月 27~29 日
4. 八尋錦之助, 永澤明佳、小倉康平、清水健、津々木博康、伊豫田淳、大西真 「LEE-negative STEC の産生する Subtilase cytotoxin の毒性阻害薬の検索と阻害機構の解明」第 22 回腸管出血性大腸菌研究会 (東京) 2018 年 11 月 8-9 日
5. 八尋錦之助, 小倉康平、寺崎泰弘、佐藤守、宮城聡、山崎栄樹 「Cholix による細胞致死機構に関する Cholix 新規結合タンパク質の同定と機能解析」第 65 回トキシシンポジウム (金沢) 2018 年 7 月 11-13 日
6. 八尋錦之助 「ピロリ菌の病原因子」日本ヘリコバクター学会第二回教育講演・基礎 (東京) 2018 年 3 月 10 日
7. 原田彩花、津々木博康、張田力、Aeju Lee、八尋錦之助, 澤智裕、新留琢郎 「PLGA ナノ粒子を用いた抗炎症毒素の細胞内送達の効率化抗炎症毒素の細胞内送達を可能にした PLGA ナノ粒子」第 55 階化学関連支部合同九州大会 (北九州) 2018 年 6 月 30 日
8. 八尋錦之助 「細菌毒素が引き起こす多様な宿主応答分子機構: ピロリ菌や病原性大腸菌の話題を中心に」真菌マンスリーセミナー (千葉) 2017 年 7 月 25 日
9. 八尋錦之助, 市村公敏、竹内裕紀、永澤明佳、小倉康平、津々木博康、伊豫田淳、大西真、野田 公俊 「LEE-negative STEC の産生する Subtilase cytotoxin (SubAB) の毒性阻害薬の検索と阻害機構の解析」第 64 回トキシシンポジウム (兵庫) 2017 年 7 月 10-12 日

10. 八尋錦之助「腸管出血性大腸菌感染症における毒素研究」第 90 回日本細菌学会(宮城)
2017 年 3 月 19-21 日

〔図書〕(計 0 件)

〔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：<https://www.chiba-bacteria.jp/>

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：小倉 康平

ローマ字氏名：OGURA, Kohei

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。