

令和元年6月13日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08793

研究課題名(和文) E型ウエルシュ菌イオタ毒素の細胞障害機構の解析と治療薬の開発

研究課題名(英文) Analysis of the cytopathic mechanism of Clostridium perfringens type E iota toxin and development of therapeutic agents

研究代表者

小林 敬子 (Kobayashi, Keiko)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：90170315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、イオタ毒素の作用機構を明らかにし、本菌感染症の治療薬を開発することである。イオタ毒素のIbは、リポタンパク質受容体で、細胞バリア機能に重要なLSRに結合して作用することを明らかにした。本毒素の細胞侵入は、初期にリソソームのエキソサイトーシスを惹起して、酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASMase)を細胞外に遊離させる。ASMaseが、細胞膜外側のスフィンゴミエリンを分解してセラミド(Cer)が生成する。Cerの蓄積は膜の陥入を誘導してエンドサイトーシスが惹起され、細胞内に侵入することが判明した。イオタ毒素の作用機構の解明から、毒素の作用を阻害する治療薬の開発が可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腸性中毒症の原因である、E型ウエルシュ菌イオタ毒素の病原性発現機構を解明した。学術的意義としては、本毒素の細胞内侵入において宿主細胞のASMase遊離により、細胞膜外側にセラミドが蓄積し、エンドサイトーシスで侵入する。すなわち、このメカニズムは、宿主細胞がもつ膜修復機構を利用して侵入することが初めて明らかとなった。社会的意義として、本菌は、動物(主に家畜)腸性中毒症の原因菌であることから、本感染症の治療には、ASMase阻害剤やエンドサイトーシス阻害剤が治療薬として今後応用が期待されることがあげられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the mechanism of action of iota toxin and to develop a treatment for this infection. Iota toxin Ib has been shown to act by binding to LSR, which is a lipoprotein receptor and important for cell barrier function. Cellular entry of the toxin initially causes lysosomal exocytosis to release acid sphingomyelinase (ASMase) extracellularly. ASMase degrades sphingomyelin outside the cell membrane to form ceramide (Cer). It was found that accumulation of Cer induces membrane invagination to induce endocytosis and the toxin enters into cells. Elucidation of the mechanism of action of iota toxin enables the development of therapeutic agents that inhibit the action of the toxin.

研究分野：医歯薬学

キーワード：E型ウエルシュ菌 イオタ毒素 エンドサイトーシス 二成分毒素 ADP - リボシル化 腸性中毒症

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

1. 研究開始当初の背景

ウエルシュ菌のイオタ毒素は、腸性中毒症の原因で、イオタ a 成分 (Ia) とイオタ b 成分 (Ib) の二成分から成る毒素で、両者の共存下で致死や細胞毒性などを示す。Ia は NAD⁺ を水解して G-アクチンを ADP-リボシル化し、Ib は細胞への Ia の侵入に関与する。国内外でイオタ毒素の感染メカニズムを検討しているグループはなく、本毒素の作用メカニズム解明と治療薬の開発は、新規なプロジェクトである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腸性中毒症の原因であるイオタ毒素の細胞障害作用と病原性発現機構を解明することである。本毒素は細胞内に侵入後、アクチンを ADP-リボシル化して細胞障害を示すが、病原性との関連は不明である。本研究では、イオタ毒素の受容体の役割、細胞レベルでの障害機構、in vivo でのイオタ毒素の病理組織学的解析、治療薬の開発を行う。さらに、二成分毒素の作用機構解明にも大きく寄与する。

3. 研究の方法

イオタ毒素の毒性メカニズムの解析と治療薬の開発のため、以下の方法を行った。

(1) 腸管上皮バリア破壊作用： 培養腸管由来細胞 (Caco-2 細胞) の上皮バリアを破壊する作用を見出している。LSR はトリセルラージャンクション (TCJ) に豊富に存在するので、毒素の Caco-2 細胞上皮バリア破壊に対する LSR の役割を検討する。また、TCJ に存在するクローディンや ZO-1 の毒素作用後の変化を観察する。

(2) 細胞毒性メカニズム： Ib 処理細胞のリン酸化タンパクアレイの結果より、特に Hsp90 と EGFR のシグナルが特異的に活性化されていた。これらの活性化分子を介したシグナル伝達系が Ib による毒性発現に関与するかどうかを Hsp90 や EGFR の挙動から詳細に解析する。リン脂質代謝の測定は、毒素処理した細胞からリン脂質を抽出後、GE ヘルスケアのイメージ解析システムにより分析する。イオタ毒素の細胞内への侵入は蛍光抗体法により共焦点レーザー顕微鏡 (ニコン社) やフローサイトメーター (コールター社) を用いて解析する。

(3) マウス回腸ループに対する作用： イオタ毒素をマウス回腸ループに投与して病理組織学的変化を観察する。免疫組織染色により、腸管粘膜表面のいずれの部位に毒素が結合しているか、または、粘膜上皮内に侵入後、いずれの部位に集積するかを明らかにする。さらに、毒素のパイエル板の M 細胞に対する作用などを明らかにする。

4. 研究成果

腸性中毒症の原因である E 型ウエルシュ菌のイオタ毒素の細胞障害作用のメカニズムを検討してきた。

本研究では、本毒素の細胞レベルでの検討を行った。Ib が細胞膜のレセプターに結合後、オリゴマーを形成し、これに Ia が結合して細胞内に侵入する。Ib の受容体として、Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) が報告されている。LSR は、N 末側 (270 残基) が細胞膜に露出した膜一回貫通型の受容体である。そこで、Ib が LSR の N 末側のいずれの領域に結合するかを明らかにするため、LSR の N 末側を削除した変異体を、LSR を発現していない細胞で発現させ、Ib の結合を観察した。その結果、Ib は、LSR の N 末側 25 残基と結合することが判明した。さらに、siRNA で LSR をノックダウンした細胞では、Ib の結合作用が認められなかった。次に、イオタ毒素のエンドサイトーシスの初期を明らかにするため、エンドサイトーシスの初期に関与する酵素であるスフィンゴミエリナーゼ (ASMase) の役割を検討した。その結果、ASMase 阻害剤や ASMase のノックダウンで、毒素の作用が抑制された。以上よりイオタ毒素は、LSR の N 末側 25 残基に結合し、エンドサイトーシス時に ASMase を活性化して侵入することが判明した。

本研究では、LSR と相互作用して細胞の結合に関与する Ib の C ドメイン (D4) の役割を検討した。D4 は、大腸菌で組換え体にして発現させ精製した。D4 は、Wild-type Ib と同様、細胞に結

合し、さらに、D4は、Ia+Ibによる細胞毒性を強く抑制した。すなわち、IbのC末ドメインは、LSRへの結合に関与し、本毒素のエンドサイトーシスの惹起に関与することが判明した。一方、D4は、トリセルラージャンクションに存在するLSRに作用して障害を示すことから、Ibの毒性の本態であると考えられる。

イオタ毒素の腸管に対する影響を検討するため、回腸の病理組織標本を作成して観察すると、イオタ毒素の処理量に依存して、回腸ループでの液体貯留が毒素量依存的に増加した。腸管由来Caco2細胞の上皮バリアに対する影響を検討すると、イオタ毒素をトランズウエルで3週間培養したCaco2細胞に作用させると、本毒素は、この細胞のLSRに結合して、上皮バリアを破壊することが、経上皮電気抵抗値の測定より明らかとなった。この時、イオタ毒素処理後のタイトジャンクションタンパクであるZO-1やクローディンの変化は認められなかったが、細胞骨格を形成するF-アクチンの減少が認められた。次にマウス回腸ループに対するイオタ毒素の作用を検討すると本毒素3時間処理で回腸の絨毛の破壊が観察された。

以上より、イオタ毒素は、腸管上皮のLSRに作用して、バリア機能を破壊し、腸管障害を示すことが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- 1) Clostridium perfringens alpha-toxin impairs granulocyte colony-stimulating factor receptor-mediated granulocyte production while triggering septic shock. M. Takehara, S. Seike, Y. Sonobe, H. Bandou, S. Yokoyama, T. Takagishi, K. Miyamoto, K. Kobayashi, M. Nagahama. Commun. Biol. 2,45 (2019) DOI: 10.1038/s42003-019-0280-2. [査読あり]
- 2) Acid sphingomyelinase promotes cellular internalization of Clostridium perfringens iota-toxin. M. Nagahama, M. Takehara, K. Miyamoto, K. Ishidoh, K. Kobayashi Toxins 10(5), E209 (2018) DOI:10.3390/toxins10050209. [査読あり]
- 3) Interaction of Clostridium perfringens iota-toxin and lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR). M. Nagahama, M. Takehara, K. Kobayashi Toxins 10(10), E405 (2018) DOI:10.3390/toxins10100405. [査読あり]
- 4) Delta-toxin from Clostridium perfringens perturbs intestinal epithelial barrier function in Caco-2 cell monolayers. S. Seike, M. Takehara, T. Takagishi, K. Miyamoto, K. Kobayashi, M. Nagahama. Biochim Biophys Acta 1860(2), 428-433 (2018) DOI:10.1016/j.bbame.2017.10.003. [査読あり]
- 5) Clostridium perfringens alpha-toxin impairs erythropoiesis by inhibition of erythroid differentiation. M. Nagahama T. Takagishi, M. Takehara, S. Seike, K. Miyamoto, K. Kobayashi, M. Nagahama. Sci Rep 7, 5217 (2017) DOI: 10.1038/s41598-017-05567-8. [査読あり]
- 6) Peptidoglycan accelerates granulopoiesis through a TLR2- and MyD88-dependent pathway. Takehara M, Seike S, Takagishi T, Kobayashi K, Nagahama M. Biochem Biophys Res Commun 487(2), 419-425 (2017) DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.077. [査読あり]
- 7) Cellular uptake of Clostridium botulinum C2 toxin requires acid sphingomyelinase activity. M. Nagahama, M. Takehara, T. Takagishi, S. Seike, K. Miyamoto, K. Kobayashi. Infect. Immun. 85, e00966-16 (2017). DOI: 10.3390/toxins9080247. [査読あり]
- 8) Role of pannexin 1 in Clostridium perfringens beta-toxin-caused cell death. S. Seike, M. Takehara, K. Kobayashi, M. Nagahama. Biochim. Biophys. Acta, 1858, (12), 3150-3156 (2016). DOI: 10.1016/j.bbame.2016.10.003. [査読あり]
- 9) Oligomer formation of Clostridium perfringens epsilon-toxin is induced by activation of neutral sphingomyelinase. T. Takagishi, M. Oda, M. Takehara, K. Kobayashi, M. Nagahama.

Biochim. Biophys. Acta, 1858, (11), 2681-2688 (2016). DOI: 10.1248/bpb.b16-00444.

[査読あり]

10) Oligomer formation of Clostridium perfringens epsilon-toxin is induced by activation of neutral sphingomyelinase. T. Takagishi, M. Oda, M. Takehara, K. Kobayashi, M. Nagahama. Biochim. Biophys. Acta, 1858, (11), 2681-2688 (2016). DOI:10.1016/j.bbamem.2016.07.009.

[査読あり]

11) Clostridium perfringens epsilon-toxin impairs innate immunity via inhibition of neutrophil differentiation. M. Takehara, T. Takagishi, S. Seike, K. Ohtani, K. Kobayashi, K. Miyamoto, T. Shimizu, M. Nagahama. Sci. Rep., 6, 28192 (2016). DOI: 10.1038/srep28192.

[査読あり]

12) Clostridium perfringens delta-toxin induces rapid cell necrosis. Seike S, Miyamoto K, Kobayashi K, Takehara M, Nagahama M. PLoS one 11, e0147957 (2016). DOI:10.1371/journal.pone.0147957. [査読あり]

13) Cellular entry of Clostridium perfringens iota-toxin and Clostridium botulinum C2 toxin. Takehara M, Takagishi T, Seike S, Oda M, Sakaguchi Y, Hisatsune J, Ochi S, Kobayashi K, Nagahama M. Toxins 9(8), 247 (2017) Review DOI: 10.3390/toxins9080247.

[査読あり]

[学会発表] (計 30 件)

- 1) 日本薬学会第 139 年会 (千葉市) 2019 年 3 月 20-23 日、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、竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 2) 第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (米子市) 2018 年 11 月 10-11 日、ウエルシュ菌 毒素の腸管病原性の検討、鳥海将輝、竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 3) 第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (米子市) 2018 年 11 月 10-11 日、ウエルシュ菌 毒素による赤芽球の分化抑制と貧血の関係、園部祐太, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 4) 第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (米子市) 2018 年 11 月 10-11 日、Peptidoglycan による好中球の産生亢進機構、横山咲, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 5) 第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (米子市) 2018 年 11 月 10-11 日、ボツリヌス菌 C2 毒素の初期細胞内侵入の検討、金城貴文, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 6) 第 71 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (松山市) 2018 年 10 月 6-7 日、Toll 様受容体を介した宿主免疫反応に対するウエルシュ菌 毒素の影響、竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 7) 第 65 回トキシシンポジウム (金沢市) 2018 年 7 月 11-13 日、ウエルシュ菌 毒素による好中球の産生抑制機構の解明、竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 8) 日本薬学会第 138 年会 (金沢市) 2018 年 3 月 25-28 日、細菌感染による Toll-like receptor 2 活性化を介した好中球産生の亢進、竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 9) 第 91 回日本細菌学会総会 (福岡市) 2018 年 3 月 27-29 日、ウエルシュ菌 毒素による ADAM10 活性化の検討、吉村真央, 清家総史, 宮本和明, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 10) 第 91 回日本細菌学会総会 (福岡市) 2018 年 3 月 27-29 日、ウエルシュ菌 毒素の腸管病原性の検討、山崎次郎, 清家総史, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 11) 第 91 回日本細菌学会総会 (福岡市) 2018 年 3 月 27-29 日、ウエルシュ菌 毒素の細胞毒性における酸性スフィンゴミエリナーゼの役割、中川愛梨, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 12) 第 91 回日本細菌学会総会 (福岡市) 2018 年 3 月 27-29 日、ウエルシュ菌イオタ毒素 Ib 成分の LSR への結合、林大悟, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 13) 第 91 回日本細菌学会総会 (福岡市) 2018 年 3 月 27-29 日、Toll-like receptor 2 の活性化による好中球産生の亢進、高田知和, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 14) 第 91 回日本細菌学会総会 (福岡市) 2018 年 3 月 27-29 日、ウエルシュ菌 毒素による赤芽球の分化抑制、竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 15) 第 64 回毒素シンポジウム (兵庫県有馬温泉) 2017 年 7 月 10-12 日、細菌感染に対する宿主の免疫調節とウエルシュ菌の免疫回避機構、竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 16) 第 29 回微生物シンポジウム (広島県呉市) 2017 年 8 月 29-30 日、ウエルシュ菌 毒素による好中球の分化障害と感染の進行、竹原正也, 小林敬子, 永浜政博
- 17) 第 29 回微生物シンポジウム (広島県呉市) 2017 年 8 月 29-30 日、ボツリヌス菌 C2 毒素

の細胞内侵入における酸性スフィンゴミエリナーゼの役割、濱中颯人、竹原正也、清家総史、小林敬子、永浜政博

- 18) 第70回日本細菌学会中国・四国支部総会(東広島市) 2017年10月14-15日、ウエルシュ菌 毒素は赤芽球の分化を抑制する、竹原正也、小林敬子、永浜政博
- 19) 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会(徳島市) 2017年10月21-22日、ボツリヌス菌 C2 毒素の細胞内侵入における初期過程の解析、金城貴文、竹原正也、小林敬子、永浜政博
- 20) 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会(徳島市) 2017年10月21-22日、ウエルシュ菌 毒素は脂質ラフトに作用して好中球の分化を抑制する、園部祐太、竹原正也、小林敬子、永浜政博
- 21) ConBio2017・2017年度生命科学系学会合同年次大会(神戸市) 2017年12月6-9日、ボツリヌス菌 C2 毒素の細胞内侵入と酸性スフィンゴミエリナーゼの関係、永浜政博、竹原正也、小林敬子
- 22) 第90回日本細菌学会総会(仙台市) 2017年3月19-21日、ウエルシュ菌 毒素の細胞毒性に対する P2X7 レセプターの役割、並川恵、清家総史、竹原正也、小林敬子、永浜政博
- 23) 第90回日本細菌学会総会(仙台市) 2017年3月19-21日、ウエルシュ菌 毒素の腸管上皮細胞に対する作用、清家総史、宮本和明、竹原正也、小林敬子、永浜政博
- 24) 第90回日本細菌学会総会(仙台市) 2017年3月19-21日、ウエルシュ菌 毒素による脂質ラフトを介した好中球分化の新規制御機構、藤原誉野、竹原正也、清家総史、小林敬子、永浜政博
- 25) 第90回日本細菌学会総会(仙台市) 2017年3月19-21日、ウエルシュ菌 毒素のオリゴマー形成における脂質代謝の役割、林英里、小田真隆、竹原正也、小林敬子、永浜政博
- 26) 第90回日本細菌学会総会(仙台市) 2017年3月19-21日、ウエルシュ菌 毒素の腸管上皮細胞に対する作用、清家総史、宮本和明、竹原正也、小林敬子、永浜政博
- 27) 第55回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会(岡山市) 2016年11月5-6日、ウエルシュ菌 毒素による好中球分化抑制避機構の解明、竹原正也、高岸照久、清家総史、小林敬子、永浜政博
- 28) 第69回日本細菌学会中国・四国支部総会(高松市) 2016年10月15,16日、ウエルシュ菌 毒素の毒性発現における Pannexin-1 の役割の検討、清家総史、竹原正也、小林敬子、永浜政博
- 29) 第69回日本細菌学会中国・四国支部総会(高松市) 2016年10月15,16日、ウエルシュ菌 毒素による好中球分化抑制と脂質ラフト障害との関連、竹原正也、高岸照久、清家総史、宮本和明、小林敬子、永浜政博
- 30) 第63回毒素シンポジウム(山形県天童市) 2016年7月14-16日、ウエルシュ菌 毒素を用いた新規宿主免疫回避機構の解明、竹原正也、高岸照久、清家総史、宮本和明、小林敬子、永浜政博

〔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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：永浜 政博

ローマ字氏名：(NAGAHAMA, masahiro)

所属研究機関名：徳島文理大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 40164462

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。