

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790431

研究課題名（和文） ウエルシュ菌 α 毒素による IL-8 分泌メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanism for the release of IL-8 from A549 cells treated with alpha-toxin.

研究代表者

小田真隆 (ODA MASATAKA)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：00412403

研究成果の概要（和文）：ガス壊疽の主要な病原因子である α 毒素の受容体探索、及び毒素によるサイトカイン遊離機構について解析を行い、 α 毒素は、チロシンキナーゼ関連受容体の TrkA を活性化していることを世界で初めて明らかにすることができた。また、本毒素による炎症性サイトカイン(IL-8 や TNF α)の遊離に TrkA 受容体の下流に存在する ERK1/2 \rightarrow NF- κ B 経路がサイトカインの発現に密接に関与し、さらに p38 MAPK がサイトカインの mRNA の安定化に重要な働きを演じていることも明らかとなった。これらの研究結果は、 α 毒素による炎症に対する新たな治療戦略につながるものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：A characteristic feature of gas gangrene with *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) is the absence of neutrophils within the infected area and the massive accumulation of neutrophils on the vascular endothelium at the margins. Intravenous injection of *C. perfringens* alpha-toxin into mice resulted in accumulation of neutrophils on the vascular endothelium in lung and liver, and release of GRO/KC. Alpha-toxin triggered activation of signal transduction pathways causing mRNA expression and production of IL-8, which activates migration and binding of neutrophils, in A549 cells. K252a, a tyrosine kinase A (TrkA) inhibitor, and siRNA for TrkA inhibited the toxin-induced phosphorylation of TrkA and production of IL-8. In addition, K252a inhibited the toxin-induced phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK. PD98059, an ERK1/2 inhibitor, depressed phosphorylation of ERK1/2 and nuclear translocation of NF- κ B p65, but SB203580, a p38 MAPK inhibitor, did not. On the other hand, PD98059 and SB203580 suppressed the toxin-induced production of IL-8. Treatment of the cells with PD98059 resulted in inhibition of IL-8 mRNA expression induced by the toxin and that with SB203580 led to a decrease in the stabilization of IL-8 mRNA. These results suggest that alpha-toxin induces production of IL-8 through the activation of two separate pathways, the ERK1/2/NF- κ B and p38 MAPK pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

A型ウエルシュ菌感染症は、世界各地で認められ、最近では、中国四川大地震においてウエルシュ菌によるガス壊疽感染症患者の報告が相次いだ。A型ウエルシュ菌によるガス壊疽感染症は、外傷や手術後わずか数時間で発症し、好中球の浸潤を伴わない拡張性の創傷部局所の筋組織壊死を引き起こす。本感染症による病巣拡大は急速で、適切な抗生物質の投与下にも関わらず1時間に数センチメートルの速さで広がり、敗血症やショックを引き起こし、48時間以内に急死してしまう症例も多い。この急速に拡大する筋組織傷害にはウエルシュ菌の産生する α 毒素が密接に関与し、本毒素が感染組織中心部への好中球浸潤を阻害していると推察され、現在まで様々な研究が行われてきた。 α 毒素の好中球浸潤阻害に対する作用には、血管内皮接着分子の活性化による好中球の血管内皮細胞への接着亢進作用や血小板 gpIIbIIIa の活性化による血小板と白血球の複合体形成作用などの関連性が報告されている。また、申請者は、 α 毒素による好中球活性化メカニズムについて解析を行い、本毒素がウサギ好中球に作用すると1)細胞膜に存在する TrkA 受容体を活性化後 PI3K、PDK1 のリン酸化を惹起すること、さらに、2)百日咳毒素感受性 G タンパク質 (Gi) を介するリン脂質代謝系の亢進が引き起こされ、ジアシルグリセロールの産生が亢進することを明らかにした。従って、これら両経路の活性化により PKC θ 、さらに、ERK1/2 のリン酸化が亢進され、活性酸素産生が惹起されると報告してきた (Ochi S and Oda M et al. *Microbiology* (2003)、Oda M and Ochi S et al. *Infect Immun* (2006))。1996年、Bryant と Stevens は、 α 毒素をヒト臍帯静脈内皮細胞に作用させると、好中球の走化性亢進を誘導し、さらに、白血球の血管内皮細胞への接着及び、好中球機能活性化を亢進する IL-8 の遊離も誘導すると報告した (Bryant AE, Stevens DL *Infect immun* (1996))。加えて、IL-8 の遊離は、Toll-like-receptor (TLR)、特に TLR4 を介したシグナル伝達経路の活性化により惹起されると数多く報告されている。しかしながら、申請者は、TLR4 を欠損したヒト腎臓ガン由来細胞 (HEK293 細胞) やヒト肺ガン由来細胞 (A549) に α 毒素を作用させると顕著に IL-8 遊離が引き起こされることを見出している。そこで、本研究においては、ウエルシュ菌 α 毒素による IL-8 遊離メカニズムの解明を行う。

2. 研究の目的

(1)ウエルシュ菌 α 毒素による A549 細胞からの IL-8 遊離に関与する毒素受容体を解明する。(2) α 毒素による IL-8 遊離に関与する細胞内シグナル伝達系を明らかにする。(3) α 毒素処理細胞内における IL-8 遺伝子発現制御について解明する。(4) IL-8 の細胞質から細胞膜への移行メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) A549 細胞からの遊離 IL-8 の測定法

A549 細胞と種々の濃度の α 毒素を 37°C、5% CO₂ 条件下でインキュベーション後、その培養上清 100 μ L を 10,000 rpm、5 分間、室温で遠心し、上清 50 μ L をサンプルとした。各サンプル中の IL-8 遊離量を Human IL-8 ELISA kit を用い測定した。

(2) リン酸化タンパク質の測定法

A549 細胞を α 毒素で種々の時間処理後、リン酸化タンパク質の特異的抗体を用いウエスタンブロットング解析した。

(3) TrkA ノックダウン細胞の構築

A549 細胞に 200 nM の TrkA に対する siTrkA を遺伝子導入装置 (amaxa) で導入し、3 日間 5% CO₂ 存在下で培養した。

(4) ラベル α 毒素の作製、及び検出

Cy3 ラベリングキット (Invitrogen) で α 毒素をラベル化し、細胞への結合量などについて解析した。TrkA と α 毒素の共局在に関する解析は、共焦点レーザー顕微鏡で行い、 α 毒素の細胞膜への結合量に関しては、BIOREVO (Keyence) で解析した。

(5) NF- κ B の活性化と核内移行

α 毒素処理細胞内の NF- κ B の活性化は、そのリン酸化を指標とし、リン酸化特異的抗体を用いて解析した。さらに、NF- κ B の核内移行に関しては、抗 NF- κ B 抗体と核染色剤の SYTO16 を用いて蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(6) IL-8 mRNA の発現解析

α 毒素処理細胞より全 RNA を FastPure (TAKARA) で抽出後、逆転写反応により cDNA を作製した。その後、RT-PCR 法により IL-8 特異的プライマーを用いて IL-8 mRNA の発現量を解析した。ハウスキーピング遺伝子として β -アクチンを用いた。さらに、mRNA の安定性に関する実験では、転写阻害剤であるアクチノマイシン D (5 mg/ml)を用いた。

4. 研究成果

(1) α 毒素処理マウスにおける好中球の集積

α 毒素(100 ng/mouse)をマウスの尾静脈より投与し、3 時間後の各臓器における好中球の集積を解析した結果、肺、肝臓、腎臓に顕著な集積が認められた。また、その集積は、CXC ケモカインの一種である GRO/KC 抗体(ヒトの IL-8 に相当するケモカインの抗体)の前投与で有意に阻害された。そこで、 α 毒素によるケモカイン遊離と炎症症状に密接な関係があると考え、本毒素によるケモカイン(IL-8) 遊離機構をヒト肺線ガン由来細胞株(A549 細胞)を用いて解析した。

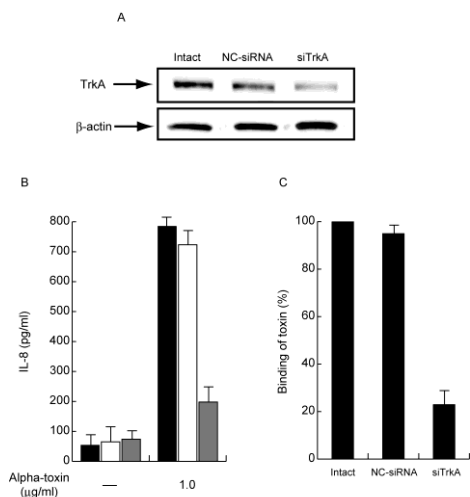
(2) α 毒素処理 A549 細胞からの IL-8 遊離

A549 細胞を α 毒素(1.0 μ g/ml)で処理した結果、投与後 5 時間をピークとして IL-8 の遊離が上昇し、その後、減少した。また、 α 毒素の酵素活性を失活させた H148G 処理では、まったく IL-8 の遊離が認められなかったことから、毒素の酵素活性が IL-8 遊離に密接に関与していることが判明した。

(3) α 毒素による IL-8 遊離と TrkA 受容体の関係

我々は、これまでに α 毒素による活性酸素産生に TrkA 受容体が密接に関与することを報告してきた(Oda et al., *Infect Immun*, 2006)。そこで、TrkA 受容体をノックダウンさせた A549 細胞を α 毒素処理した結果、毒素による IL-8 遊離、及び毒素の結合が抑制された(図 1)。

図 1



A : TrkA 受容体のノックダウン確認

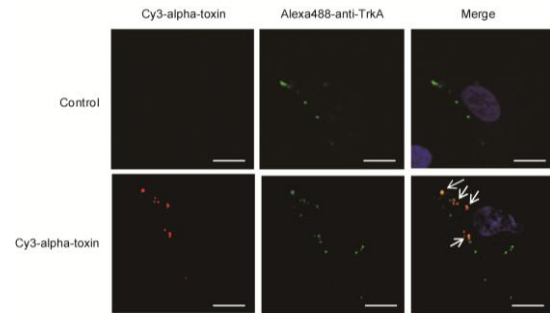
B : α 毒素による IL-8 の遊離、黒 ; インタクト細胞、白 ; ネガティブコントロール siRNA 処理細胞、灰 ; TrkA ノックダウン細胞

C : α 毒素の A549 細胞への結合

(4) α 毒素と TrkA 受容体の局在

α 毒素が A549 細胞膜上で TrkA と共局在するか、Cy3 でラベルした α 毒素と Alexa488 でラベルした抗 TrkA 抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、2 種類の蛍光の約 70% が共局在していることが判明した(図 2)。

図 2

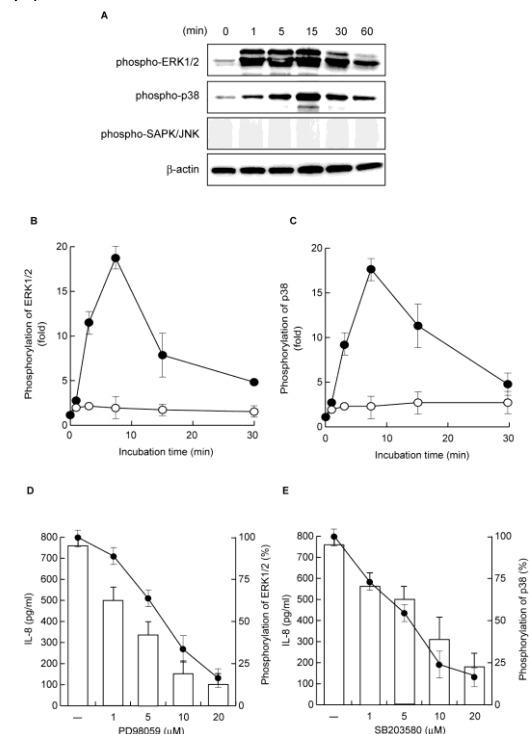


赤 ; Cy3 α 毒素、緑 ; Alexa488-抗 TrkA 抗体

(5) α 毒素処理細胞からの IL-8 遊離と MAPK カスケードの関係

A549 細胞を α 毒素処理した結果、ERK1/2、及び p38MAPK のリン酸化は観察されたが、SAPK/JNK のリン酸化はほとんど観察されなかった(図 3A)。また、各々のリン酸化は、TrkA 阻害剤の K252a 処理により阻害された(図 3B、3C)。さらに、毒素による IL-8 の遊離は、ERK1/2 カスケード阻害剤(PD98059)、及び p38MAPK カスケード阻害剤(SB203580)の処理濃度に依存して阻害され、加えて、ERK1/2、及び p38 のリン酸化も同様の挙動で阻害された(図 3D、3E)。

図 3

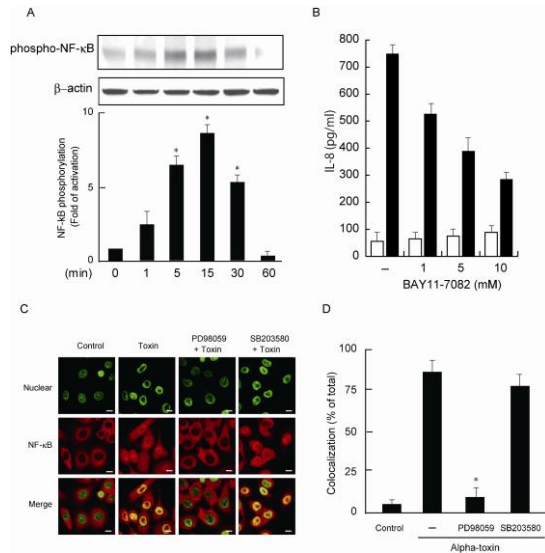


A : MAPK カスケードのリン酸化
 B : ERK1/2 と p38 のリン酸化に対する K252a の影響、● ; control、○ ; K252a 処理細胞
 C : IL-8 遊離に対する MAPK カスケード阻害剤の影響、● ; IL-8、□ ; ERK1/2、及び p38 のリン酸化

(6) α 毒素による IL-8 遊離と NF- κ B の関係

次に、 α 毒素による IL-8 の遊離とサイトカイン・ケモカインの発現に密接に関与すると報告されている NF- κ B の関係について解析した。その結果、A549 細胞を α 毒素処理すると NF- κ B のリン酸化が認められ、そのリン酸化は約 15 分でピークとなった (図 4A)。また、NF- κ B の活性を阻害する BAY11-7082 で細胞を処理した結果、毒素による IL-8 遊離が処理濃度に依存して抑制された (図 4B)。NF- κ B は、活性化すると核内に移行し、ケモカイン等の転写活性を増強することが報告されている。そこで、NF- κ B の核内移行と MAPK カスケードの関係について解析するため、PD98059 と SB203580 を用いて解析した。その結果、 α 毒素処理細胞における NF- κ B の核内移行は、PD98059 処理により著しく抑制されたが、SB203580 処理ではそのような効果は認められなかった (図 4C,4D)。

図 4

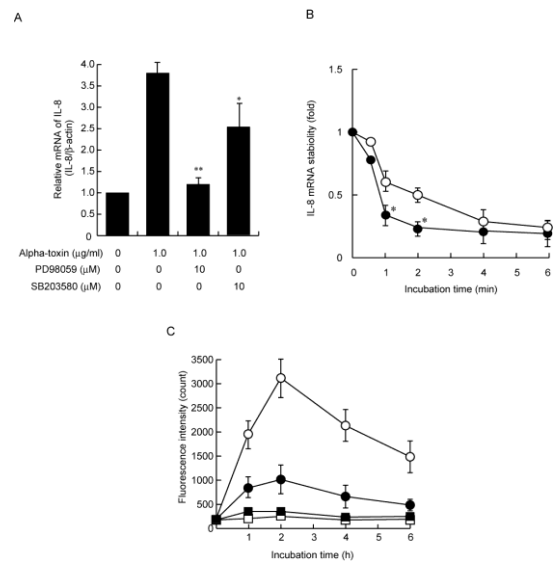


A : NF- κ B のリン酸化
 B : IL-8 遊離に対する BAY11-7082 の影響
 □ ; 毒素なし、■ ; 毒素あり
 C、D : NF- κ B の核内移行に対する PD98059 と SB203580 の効果

(7) α 毒素処理細胞における IL-8mRNA 発現と MAPK との関係

α 毒素処理 A549 細胞内における IL-8mRNA の発現亢進作用は、PD98059 処理によりコントロールレベルまで減少したが、SB203580 処理ではそのような減少がほとんど認められなかった (図 5A)。従って、ERK1/2 は、NF- κ B を活性化後、IL-8mRNA 発現亢進していることが判明した。次に、p38MAPK と IL-8 の関係について解析した結果、毒素処理によって活性亢進した p38MAPK は、発現亢進した IL-8mRNA の安定化に密接に関与していることが明らかとなった (図 5B)。次に、 α 毒素処理細胞内に遊離する IL-8 を蛍光抗体法により測定した結果、毒素処理後 2 時間をピークとして細胞内 IL-8 の遊離が認められ、その後、減少した。この減少は、細胞外への IL-8 の遊離によるものと考えられる。また、毒素処理による IL-8 の細胞内への遊離は、PD98059 での前処理でコントロールレベルまで抑制され、SB203580 処理では、阻害剤未処理細胞と比較して約 20~30%まで抑制された (図 5C)。

図 5



A : IL-8mRNA 発現に対する PD98059 と SB203580 の効果
 B : IL-8mRNA の安定性に対する p38 の効果、○ ; SB 処理なし、● ; SB 処理
 C : 細胞内 IL-8 の遊離に対する PD98059 と SB203580 の効果、○ ; α 毒素、● ; SB 処理+ α 毒素、■ ; PD 処理+ α 毒素、□ ; control

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- 1) Oda M, Hashimoto M, Takahashi M, Ohmae Y, Seike S, Kato R, Fujita A, Tsuge H, Nagahama M, Ochi S, Sasahara T, Hayashi S, Hirai Y, Sakurai J
Role of Sphingomyelinase in Infectious Diseases Caused by *Bacillus cereus*
PLoS one (2012) 掲載確定、査読：有
- 2) Oda M, New insight from basic research of *Clostridium perfringens* alpha-toxin
Nippon Rinsho (2012) 掲載確定、査読：有
- 3) Oda M, Takahashi M, Tsuge H, Nagahama M, Sakurai J
Role of side-edge site of sphingomyelinase from *Bacillus cereus*
Biochem Biophys Res Commun (2012) 掲載確定、査読：有
- 4) Imagawa H, Saijo H, Yamaguchi H, Maekawa K, Kurisaki T, Yamamoto H, Nishizawa M, Oda M, Kabura M, Nagahama M, Sakurai J, Kubo M, Nakai M, Makino K, Ogata M, Takahashi H, Fukuyama Y
Syntheses of Structurally-simplified and Fluorescently-labeled Neovibsanin Derivatives and Analysis of their Neurite Outgrowth Activity in PC12 cells.
Bioorg. Med. Chem. Lett 22, 2089-2093 (2012) 査読：有
- 5) Nagahama M, Umezaki M, Oda M, Kobayashi K, Tone S, Suda T, Ishidoh K, and Sakurai J
Clostridium perfringens iota-b induces rapid cell necrosis.
Infect Immun (2011) 79, 4353-4360 査読：有
- 6) Nagahama M, Itohayashi Y, Hara H, Higashihara M, Fukatani Y, Takagishi T, Oda M, Kobayashi K, Nakagawa I, Sakurai J
Cellular vacuolation induced by *Clostridium perfringens* epsilon-toxin
FEBS J (2011) 278, 3395-3407 査読：有
- 7) Oda M
Molecular mechanism of bacterial sphingomyelinase C.
Nippon Saikingaku Zasshi (2011) 66, 159-167 査読：有
- 8) Oda M, Saito Y, Morimune Y, Nagahama M, Sakurai J
Induction of neurite-outgrowth in PC12 cells by alpha-toxin from *Clostridium perfringens*
Biochem Biophys Res Commun (2011) 411, 241-246 査読：有
- 9) Nagahama M, Ohkubo A, Oda M, Kobayashi K, Amimoto K, Miyamoto K, Sakurai J
Clostridium perfringens TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins
Infect Immun (2011) 79, 905-910 査読：有
- 10) Imagawa H, Oda M, Takemoto T, Yamauchi R, Yoshikawa T, Yamamoto H, Nishizawa M, Takahashi H, Hashimoto M, Yabiku K, Nagahama M, Sakurai J
Synthesis and evaluation of novel phosphate ester analogs as neutral sphingomyelinase inhibitors
Bioorg Med Chem Lett (2010) 20, 3868-3871 査読：有
- 11) Oda M, Takahashi M, Matsuno T, Uoo K, Nagahama M, Sakurai J, ,
Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase
BBA - Biomembranes (2010) 1798, 1073-1080 査読：有
- 12) Ishidoh K, Kamemura N, Imagawa T, Oda M, Sakurai J, Katunuma N
Quinolate phosphoribosyl transferase, a key enzyme in de novo NAD⁺ synthesis, suppresses spontaneous cell death by inhibiting overproduction of active-caspase-3.
BBA - Molecular Cell Research (2010) 1803, 527-533 査読：有
- 13) Sakurai J, Nagahama M, Oda M, Tsuge H, Kobayashi K
Clostridium perfringens Iota-Toxin: Structure and Function
Toxins (2009) 1, 208-228 Open access 査読：有
- 14) Nagahama M, Hagiyaama T, Kojima T, Aoyanagi K, Takahashi C, Oda M, Sakaguchi Y, Oguma K, Sakurai J
Binding and internalization of *Clostridium botulinum* C2 toxin
Infect Immun (2009) 77, 5139-5148 査読：有
- 15) Tumurkhuu G, Koide N, Dagvadorj J, Noman A, Khuda I, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Oda M, Nagahama M, Sakurai J, Yokochi T
The inhibition of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by *Clostridium perfringens* alpha-toxin and its relation to alpha-toxin-induced intracellular ceramide generation
Int J Med Microb (2009) 299, 554-562 査読：有
- 16) Oda M
Structure and function of sphingomyelinase

Yakugaku Zasshi (2009) 129, 1233-1238
査読：有

〔学会発表〕(計 76 件)

- 1) 小田真隆、The role of ganglioside GM1 as receptor of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. 第 85 回日本細菌学会総会 平成 24 年 3 月 27 日、長崎
- 2) 小田真隆、セレウス菌感染拡大におけるスフィンゴミエリナーゼの関係、文科省戦略的研究基盤形成支援事業 第 7 回研究発表会、平成 23 年 12 月 22 日、徳島
- 3) 小田真隆、「毒生物はなぜ生み出されたのか?」: 二面的多様性とベノミクス日本生化学会、9 月 21 日、京都、指名講演
- 4) 小田真隆、Effect of erythromycin on biological activities induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin、IUMS 第 84 回日本細菌学会総会 平成 23 年 9 月 9 日、北海道
- 5) 小田真隆、ウエルシュ菌 α 毒素のガングリオシド認識ドメインの同定、第 58 回トキシシンポジウム、平成 23 年 7 月 7 日、栃木
- 6) 小田真隆、ウエルシュ菌 α 毒素と TrkA/GM1 との相互作用、日本薬学会 第 131 年会、平成 23 年 3 月 29 日、静岡
- 7) 小田真隆、文科省戦略的研究基盤形成支援事業 第 4 回研究発表会、平成 22 年 12 月 22 日、徳島
セレウス菌スフィンゴミエリナーゼによる赤血球膜破壊作用
- 8) 小田真隆、細菌の感染拡大とスフィンゴミエリナーゼ、第 57 回トキシシンポジウム、平成 22 年 7 月 15 日、長浜
- 9) 小田真隆、Effect of metal ions on sphingomyelin phosphodiesterase activity in neutral sphingomyelinase from *Bacillus cereus*、第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2010)、平成 22 年 6 月 25 日、徳島
- 10) 小田真隆、セレウス菌感染症に対するスフィンゴミエリナーゼの役割、第 83 回日本細菌学会総会、平成 22 年 3 月 28 日、横浜
- 11) 小田真隆、*Bacillus cereus* 感染症におけるスフィンゴミエリナーゼの役割、第 56 回トキシシンポジウム、平成 21 年 8 月 27 日、岐阜
- 12) M. Oda、Pathway of *Clostridium perfringens* alpha-toxin-mediated IL-8 release from A549 cells、The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity、平成 21 年 9 月 9 日、淡路島
- 13) 小田真隆、細菌由来スフィンゴミエリナーゼ阻害剤の開発、文科省戦略的研究基盤形成支援事業 第 3 回研究発表会、平

成 21 年 12 月 19 日、徳島

- 14) 小田真隆、セレウス菌感染症とスフィンゴミエリナーゼの関係、文科省戦略的研究基盤形成支援事業 第 2 回研究発表会、平成 21 年 7 月 4 日、徳島

〔図書〕(計 3 件)

- 1) Nagahama M, Oda M, Kobayashi K
Glycosylating toxin of *Clostridium perfringens*
InTech -Glycosylation- (2012) in press
- 2) Oda M, Nagahama M, Kobayashi K, Sakurai J
Role of tyrosine kinase A receptor (TrkA) on pathogenicity of *Clostridium perfringens* alpha-toxin.
InTech -Phosphorylation- (2012) in press
- 3) Sakurai J, Oda M
Effect of macrolide antibiotics on biological activities induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin
InTech Gangrene (2011) open access

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：トレハロース化合物、その製造方法、及び該化合物を含有する医薬
発明者：小田真隆、西沢麦夫、今川洋、山本博文、櫻井純
権利者：大塚化学株式会社
種類：国際特許
番号：PCT/JP2009/005650
出願年月日：2009 年 10 月 27
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab09/hyoushi.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

氏名：小田 真隆 (Oda Masataka)

所属研究機関：徳島文理大学・薬学部・微生物学教室

職名：講師

研究者番号：00412403

研究者番号：

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし