

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07033

研究課題名（和文）ウエルシュ菌 毒素による宿主免疫攪乱機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of host immune disturbance mechanism by Clostridium perfringens alpha-toxin

研究代表者

竹原 正也（Takehara, Masaya）

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：40742705

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）：本研究では、ウエルシュ菌感染による敗血症性ショック誘導メカニズムを明らかにすることを目的として、ウエルシュ菌感染に対するToll様受容体4（TLR4）の役割の解明、DNAマイクロアレイを用いた網羅的な毒素の作用機構の解明、毒素によるTLR4活性化メカニズムの解明などについて検討した。その結果、ウエルシュ菌の感染によって、宿主では炎症関連遺伝子や、毛細血管の保護や再生に關与する遺伝子の発現が増加すること、また、毒素が宿主で好氣的なエネルギー産生機構に關与する遺伝子群の発現を誘導することを見出した。さらに、毒素及び毒素は協調的に作用してTLR4を活性化することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で示したA型ウエルシュ菌と宿主との相互作用に着目した研究は世界的にも前例がほとんど無く、学術的にも極めて独創性が高いと考えられる。また、本研究で実施した研究手法は、さまざまな病原細菌の研究に応用可能で、発症や進行の機構が不明な細菌感染症の進行メカニズムの解明に寄与する可能性がある。このように、本研究の成果は、細菌感染症に対する新規な研究領域を開拓し、発症機序解明や治療に大きく貢献するものと期待する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the mechanism of septic shock induced by Clostridium perfringens infection and the role of Toll-like receptor 4 (TLR4) in Clostridium perfringens infection, comprehensively detect the host-toxin interaction using DNA microarray, and investigate the elucidation of the mechanism of TLR4 activation by alpha-toxin. As the results, it was demonstrated that infection with Clostridium perfringens increases the expression of inflammation-related genes and genes involved in capillary protection and regeneration in the host, and that alpha-toxin increases genes involved in the aerobic energy production. Furthermore, theta toxin and alpha toxin were found to act cooperatively to activate TLR4.

研究分野：細菌学

キーワード：ウエルシュ菌 細菌毒素 宿主免疫 Toll様受容体

## 1. 研究開始当初の背景

A 型ウエルシュ菌は、創傷感染して重篤な疾患であるガス壊疽（致死率はエボラ出血熱に匹敵する 70%）を引き起こす。本感染症のアウトブレイクは、しばしば報告され、2008 年の中国・四川大地震では、実に 35000 人ものガス壊疽患者が報告され、本邦においても大規模な震災時に発症が懸念されている。本感染症は外傷を受けてわずか数時間で発症し、局所の筋組織壊死が急速に拡大し、敗血症性ショックに陥り患者が短期間で死亡する。しかしながら、この発症メカニズムは不明で有効な治療戦略は見出されていない。このように、本感染症への対策は急務な課題である。これまでに我々は、A 型ウエルシュ菌の主要な病原因子である $\alpha$ 毒素が、LPS による敗血症性ショックを著しく亢進し、本毒素が敗血症性ショックの発症に関与することを世界で初めて発見した。しかしながら、その詳細な機構は不明であり、研究のさらなる進展が期待されていた。

## 2. 研究の目的

ウエルシュ菌感染により敗血症性ショックが誘導される機構に関して、我々は、本菌が産生する $\alpha$ 毒素が TLR4 を過剰に活性化して宿主免疫を暴走させ、敗血症性ショックを誘導する可能性を報告していた。本研究の目的は、 $\alpha$ 毒素による敗血症性ショックの誘導機構の解明を行い、本感染症の有効で新規な治療戦略を見出すことである。この目的を達成するため、本研究では、ウエルシュ菌感染に対する TLR4 の役割、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な $\alpha$ 毒素の作用機構の解明、 $\alpha$ 毒素による TLR4 活性化メカニズム、ウエルシュ菌感染に対する TLR4 阻害剤の治療効果などについて検討を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の(1)から(4)の方法で研究を実施した。

### (1) ウエルシュ菌感染に対する TLR4 の役割の検討

先行研究では、マウスを用いた実験で、 $\alpha$ 毒素が TLR4 アゴニストである LPS による敗血症を悪化させた。一般に、TLR4 はグラム陰性菌の LPS を認識して宿主の防御に働くが、この受容体の過剰な活性化はサイトカインストームを惹起し、敗血症性ショックの原因となる。一方、グラム陽性菌であるウエルシュ菌感染に対する TLR4 の役割や、本菌による敗血症性ショックへの TLR4 の関与は不明であった。そこで、ウエルシュ菌感染に対する TLR4 の役割を明らかにするため、C3H/HeN マウス (野生型 TLR4) や C3H/HeJ マウス (機能欠損の変異型 TLR4) にウエルシュ菌を筋肉内投与し、マウスの生存率、炎症性サイトカインの産生量、ガス壊疽の進行度を比較し、ウエルシュ菌感染に対する TLR4 の役割について検討した。

### (2) DNA マイクロアレイを用いた網羅的な $\alpha$ 毒素の作用機構の解明

C3H/HeN マウスや C3H/HeJ マウスに野生型の A 型ウエルシュ菌、または、 $\alpha$ 毒素遺伝子を遺伝子操作で欠損した $\alpha$ 毒素欠損株を感染させ、感染部位での宿主の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。

### (3) $\alpha$ 毒素による TLR4 活性化メカニズムの解明

先行研究により、ウエルシュ菌 $\theta$ 毒素が TLR4 のアゴニストであることが報告されていた。 $\alpha$ 毒素が TLR4 の過剰な活性化を誘導する機構を解明するため、TLR4 を発現するヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を $\theta$ 毒素及び $\alpha$ 毒素で共処理し、様々なサイトカインの産生増加を ELISA 法で定量した。

### (4) ウエルシュ菌感染に対する TLR4 阻害剤の治療効果

$\alpha$ 毒素による TLR4 の過剰な活性化が、ウエルシュ菌感染時の敗血症性ショックを誘導すると考えられ、TLR4 阻害剤が本菌による敗血症性ショックを抑制する有効な治療薬として期待される。そこで、 $\theta$ 毒素及び $\alpha$ 毒素で共処理した HUVECs に TLR4 阻害剤 (TAK-242 や TLR4-IN-C34 など) を添加し、炎症性サイトカインの産生量を測定し、ウエルシュ菌が産生する外毒素による TLR4 の活性化に対する阻害剤の効果を検討した。ウエルシュ菌感染に対する TLR4 阻害剤の治療効果について考察した。

## 4. 研究成果

ウエルシュ菌感染後にマウスの生存を観察すると、C3H/HeN マウスと比較して C3H/HeJ マウスの生存率が優位に低く、ウエルシュ菌感染に対する感受性が亢進した (図 1)。また、感染モデルマウスの大腿筋では、C3H/HeN マウスと比較して C3H/HeJ マウスでの生菌数が高く、筋組織の傷害も強かった。次に、感染モデルマウスの大腿筋での G-CSF の産生を定量すると、C3H/HeN マウスではウエルシュ菌の感染に依存して G-CSF が顕著に増加したが、C3H/HeJ マ

ウスではその増加は限定的であった。また、C3H/HeN マウスではウエルシュ菌の感染に依存して脾臓の好中球数が顕著に増加したのに対し、C3H/HeJ マウスではその増加は限定的であった。以上の結果より、TLR4 はウエルシュ菌感染時に G-CSF の産生を亢進して好中球の産生を促進し、自然免疫を強化すると考えられる。すなわち、TLR4 は宿主の免疫を強化してウエルシュ菌を排除し、宿主の生体防御に関与することが判明した。

上記の実験で、ウエルシュ菌感染に対して TLR4 が宿主防御に働くことが確認されたため、本菌感染時には TLR4 が活性化され、この活性化が過剰になると敗血症性ショックが惹起されると推察された。また、先行研究では、 $\alpha$ 毒素は LPS による敗血症を悪化させることが報告されていた。そこで、 $\alpha$ 毒素による TLR4 の活性化を *in vivo* で確認し、さらに本毒素の作用機構を解明するため、C3H/HeN マウスや C3H/HeJ マウスに野生型の A 型ウエルシュ菌、または、 $\alpha$ 毒素遺伝子を遺伝子操作で欠損した  $\alpha$ 毒素欠損株を感染させ、感染部位での宿主の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。野生型の A 型ウエルシュ菌に感染したマウスでは、未感染のコントロールと比較して、Interleukin 1 beta、C-X-C motif chemokine ligand 1 (Cxcl1)、Cxcl2、S100 calcium binding protein A9 など、炎症に関連する遺伝子の発現増加が多数認められた (図 2)。また、興味深いことに、血管新生や血管内皮細胞の機能に関与する Cysteine-rich angiogenic inducer 61 や Apolipoprotein L domain containing 1 の発現増加が認められた。これまでに、 $\alpha$ 毒素が血管内皮細胞を傷害することが報告されており、これらの遺伝子の発現増加は、血管内皮細胞の傷害に対する宿主の防御機構である可能性が考えられる。また、Gene set enrichment analysis (GSEA) では、本菌に感染したマウスで脂肪酸の代謝に関与する遺伝子群の発現が減少することが判明した。さらに、野生株と  $\alpha$ 毒素欠損株との比較では、野生株で骨格筋の分化に関与する Myogenin や、ストレスにตอบสนองして細胞を保護する Heat shock protein beta-1 などの発現増加が認められた。これらの遺伝子の発現増加は、 $\alpha$ 毒素による筋組織の破壊に対する宿主の防御機構となっている可能性が考えられる。また、これらのマウスでの GSEA

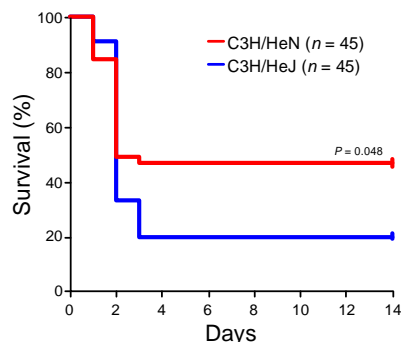


図1. TLR4がウエルシュ菌感染後の生存率に与える影響

では、野生株感染マウスでミトコンドリア関連遺伝子群や ATP 合成に関連する遺伝子群の発現増加が認められた。これまでに、 $\alpha$ 毒素が末梢の循環障害を引き起こし、虚血を誘導することが報告されており、これらの遺伝子の発現増加は、虚血やこれに続く ATP 産生の低下に対する宿主の防御機構となっている可能性が考えられる。このように、本研究では、A 型ウエルシュ菌の感染に対する様々な宿主応答が発見され、網羅的に  $\alpha$ 毒素の作用機構について検討することができた。

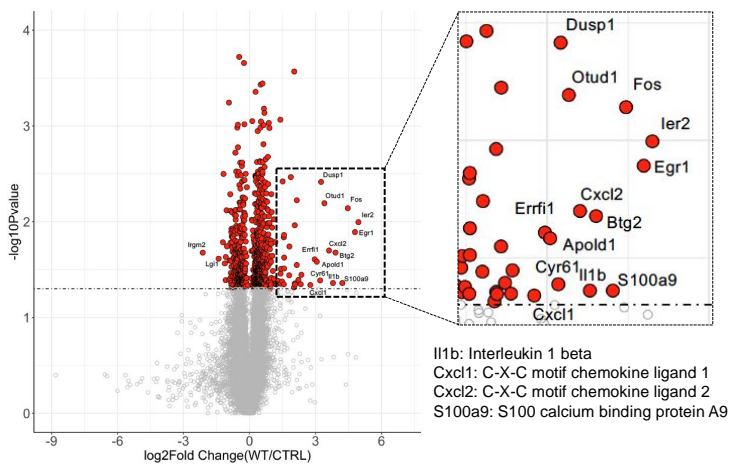


図2. ウエルシュ菌感染による炎症関連遺伝子の発現増加

$\alpha$ 毒素による TLR4 活性化メカニズムの解明では、HUVECs を  $\theta$ 毒素及び  $\alpha$ 毒素で共処理すると、様々なサイトカインの産生が増加し、これらの毒素が協調的に作用して TLR4 を活性化することが判明した。一方、ウエルシュ菌感染に対する TLR4 阻害剤の効果を検討すると、一般的な TLR4 阻害剤 (TAK-242 や TLR4-IN-C34) は、 $\theta$ 毒素や  $\alpha$ 毒素による TLR4 の活性化を抑制せず、治療効果は認められなかった。

以上より、 $\alpha$ 毒素は極めて巧妙な機構で炎症を誘導し、本菌による感染症を進行させることが明らかとなった。一方で、本研究では、本菌によるガス壊疽に有効な治療薬シーズの発見には至らず、今後の検討課題とする必要がある。また、本菌による感染症の進行機構を解析することは、新たな病原細菌の感染メカニズムの解明や治療薬の開発にも有効であると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takehara Masaya, Kobayashi Keiko, Nagahama Masahiro	4. 巻 1864
2. 論文標題 Clostridium perfringens -toxin up-regulates plasma membrane CD11b expression on murine neutrophils by changing intracellular localization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 184054 ~ 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 TAKEHARA Masaya	4. 巻 76
2. 論文標題 Study on the interaction between Clostridium perfringens and the host	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nippon Saikingaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 149 ~ 160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3412/jsb.76.149	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 Masaya, Kobayashi Keiko, Nagahama Masahiro	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 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1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 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 ウエルシュ菌 毒素によるCD11b抗原の発現増加
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023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回日本細菌学会中四国支部総会（招待講演）
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

〔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
研究 分担 者	永浜 政博  (Nagahama Masahiro)  (40164462)	徳島文理大学・薬学部・教授    (36102)	

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