

論文内容の要旨

論文題目 *Clostridium difficile* 関連疾患におけるフラジェリンの役割について

指導教員 四柳宏准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

吉野友祐

序文：

Clostridium difficile は嫌気性グラム陰性桿菌であり、病原性が高く、また芽胞を形成するため自然環境に強く、そのためしばしば院内感染の原因菌となることが知られている。症状としては経度の下痢症から死にいたるまで多岐にわたり、近年では発生件数は増加傾向であり、また同時に重症度・致死率とも上昇していることが報告されている。アウトブレイクも世界各地から多数報告されるようになっており、臨床上重要な病原体となっている。この *C. difficile* 関連疾患 (*Clostridium difficile* associated disease: CDAD) の原因物質として、トキシン A・トキシン B という 2 種類の毒素が知られており、これに加え近年認められた弱

毒の毒素であるバイナリートキシンに対して、多くの研究がなされてきた。しかしながらその他に病原因子についての研究は殆どされていないのが現状であった。

一方、*C. difficile* の感染の主座である大腸において、自然免疫で重要な役割を果たす受容体として Toll like receptor (TLR) 5 が知られている。TLR とは、病原体関連分子パターン (pathogen associated molecule patterns: PAMPs) を認識して自然免疫を活性化するシグナル伝達レセプターである。この中で、大腸腸管上皮細胞には TLR5 が多く発現しており、一般に細菌感染において多くの役割を担うとされる TLR2 や TLR4 は殆ど発現していないことが知られている。TLR5 は細菌が移動などのために有する鞭毛の一構成成分、鞭毛線維の単量体であるフラジェリンを認識し、細胞内シグナルとして NF-kappaB 活性化、Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) 活性化をきたし、結果炎症性サイトカイン産生を促す。特に、発現分布として腸管上皮の管腔側には殆どなく、一方で血管側に多く発現していることが知られ、そのため菌体の上皮下侵入を機転に炎症が引き起こされると考えられている。これまで *Salmonella typhimurium* を始めとしたいくつかの菌で、このフラジェリンが局所の炎症を引き起こし、病原因子として働く可能性があることが証明されている。

今回、私は *C. difficile* が鞭毛を有することに着目し、鞭毛の一構成成分である

C. difficile のフラジェリンが局所の炎症を引き起こし、結果これらのトキシン以外の病原因子となりうるかどうかについて検証を行った。また、既知の病原因子であるトキシンとの関係性についても実験を行った。

方法：

・フラジェリンの抽出

フラジェリンの抽出として、*C. difficile* を液体培地で 48 時間培養後、vortex による 2 分間の強力震盪、低速遠心分離による菌体の除去、上澄み液の高速遠心分離による鞭毛蛋白の回収、その後 70 20 分加熱による単量化を行った。抽出の確認には 12% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE 施行し、ゲルを CBB 染色した。

・実験に使用する細胞系の確立

実験に使用する細胞として、HEK293T 細胞（ヒト胎児性腎細胞）、HT29 細胞・Caco-2 細胞（ヒト大腸上皮細胞）を用いた。HEK293T 細胞ではリポフェクションによりヒト TLR5 ベクターを遺伝子導入し TLR5 を強制発現させた細胞系（HEK293T-TLR5）を樹立した。HT29・Caco-2 細胞は自然に TLR5 が発現しているとされており、HEK293T-TLR5 とあわせ、それぞれで SDS-PAGE、ウェスタンブロット法で TLR5 の発現を確認した。Caco-2 細胞では免疫染色により

TLR5 発現の分布を確認した。また、Caco-2 細胞の特徴として、半透膜上に 3 週間程度培養することで細胞間にタイトジャンクションが作成され一層の上皮膜（腸管上皮モデル）となる機能に着目し、専用チャンバー内の半透膜上に 21 日間培養し、膜間の電気抵抗（膜電気抵抗）が 400 cm^2 を越えた腸管上皮モデルを作成し実験に用いた。この腸管上皮モデルでは上側が管腔側、下側が血管側となることが知られている。

・刺激実験の方法

これらの細胞を用い、培養液にフラジェリンあるいはトキシン B、あるいはフラジェリン・トキシン B 両方を投与する刺激実験をおこなった。*C. difficile* フラジェリンの刺激実験では、ポジティブコントロールとして *S. typhimurium* のフラジェリンを同時に使用した。刺激実験では TLR5 の関与を確認するため、HEK293T-TLR5 では TLR5 発現のないコントロールとしてエンプティベクターを遺伝子導入した HEK293T 細胞（HEK293T-mcs）準備し、また HT29 細胞や Caco-2 細胞を用いた実験では、TLR5 中和抗体を用い、TLR5 を中和することでフラジェリン反応性が低下することを確認し、TLR5 関与の証明とした。Dual luciferase Assay 法で、刺激後細胞を溶解し、その溶解液を用いて NF-kappaB の活性を計測した。ELISA 法で、刺激後に培養液を回収しサンプルとして IL-8 あるいは CCL20 といった炎症性サイトカインの産生量を計測した。MAPK 活性化

の確認では刺激後細胞を溶解し、その溶解液を用いて SDA-PAGE・ウエスタンプロット法により p38 のリン酸化や ERK のリン酸化を確認した。TLR5 発現変化については、トキシン B 刺激後、Caco-2 細胞を免疫染色し TLR5 の発現分布の変化を、また同時に刺激後細胞を溶解し、その溶解液を用いて SDS-PAGE・ウエスタンプロット法により TLR5 発現量変化を確認した。

・単層破壊実験の方法

先述の Caco-2 による腸管上皮モデルに、管腔側（膜の上側）からトキシン B を投与し、時間経過による膜電気抵抗や細胞形態の変化を確認した。

結果：

まず、*C. difficile* からフラジェリンの抽出を行い、12% ポリアクリルアミドゲルを使用し SDS-PAGE 後 CBB でゲルを染色し抽出を確認、これを用いて実験を行った。HEK293T 細胞に遺伝子導入にて TLR5 を強制発現させた系（HEK293T-TLR5）や自然に TLR5 が発現している大腸上皮細胞系の HT29 細胞や Caco-2 細胞を準備、TLR5 発現を SDS-PAGE・ウエスタンプロット法、一部免疫染色により確認後、抽出したフラジェリンを用い刺激実験をおこなった。HEK293T-TLR5 を用いて抽出した *C. difficile* フラジェリン刺激により TLR5 を介し NF-kappaB が活性化されることを Dual Luciferase Assay で確認した。HT29 細

胞、Caco-2 細胞を用い *C. difficile* フラジェリン刺激により TLR5 を介し炎症性サイトカインである IL-8・CCL20 が産生されること ELISA 法で確認した。Caco-2 細胞へ *C. difficile* フラジェリン刺激を加えることで、TLR5 を介し、細胞内シグナリングとして MAPK 活性化、特に p38 のリン酸化が起こることを SDS-PAGE・ウエスタンブロット法で確認した。更に Caco-2 腸管上皮モデルを用い、血管側に *C. difficile* フラジェリンを刺激することで、同側に CCL20 が産生されることを ELISA 法で確認した。

次に、CDAD における既知の病原因子であるトキシン B と前述の Caco-2 により作成された腸管上皮モデルを用いて CDAD モデルとし、この CDAD モデルでのフラジェリンの働きについて検証を行った。まず、腸管上皮モデルに管腔側よりトキシン B 刺激を加えることで、腸管上皮モデルの破綻が引き起こされることを、光学顕微鏡による細胞形態変化（円形化）の確認や腸管上皮モデルの膜電気抵抗低下を確認することで証明した。ついで、CDAD モデルとして腸管上皮モデルにトキシン B と、先に抽出した *C. difficile* フラジェリンを血管側に加え、炎症性サイトカイン CCL20 がトキシン B・フラジェリンの同時刺激ではフラジェリン単独あるいはトキシン B 単独刺激よりも著明に多く産生されることを証明した。またトキシン B を Caco-2 細胞へ刺激することにより、TLR5 発現量が増加し、また細胞内シグナルとして MAPK 活性化、特に ERK のリン酸化が認め

られることを確認した。

結論：

まず *C. difficile* のフラジェリンが *S. typhimurium* のフラジェリンと同様に TLR5 を介し、NF-kappaB 活性化、MAPK 活性化、炎症性サイトカインである IL-8 や CCL20 産生を促進する機能を有することを証明した。この結果は、*C. difficile* フラジェリンが局所の炎症を引き起こすことを示していた。また、CDAD モデルとしてトキシン B を使用した実験では、トキシン B による腸管上皮の破綻が引き起こされることを証明し、結果としてトキシン B の作用によりフラジェリンが管腔側から血管側へ到達可能となり TLR5 へ刺激可能となることを間接的に証明した。またフラジェリン・トキシン B の同時刺激により各々単独投与と比較し Caco-2 細胞でより多量の炎症性サイトカイン CCL20 が産生された。トキシン B 刺激は Caco-2 細胞で TLR5 の発現量を増加させることが確認され、これが結果としてフラジェリンの反応性増加させ、またトキシン B とフラジェリンの同時刺激による炎症性サイトカイン産生亢進に寄与していると予想された。これらトキシン B を使用した実験の結果は、CDAD において *C. difficile* のフラジェリンが CDAD 発症の因子として機能している可能性を更に高めるものであった。本研究の結果から、CDAD メカニズムとしてフラジェリン-TLR5 の自然免

疫機構が働いている可能性が示され、これをコントロールすることが、新たな治療法となりうると考えられた。