

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 吉野 友祐

本研究は *Clostridium difficile* 関連疾患 (*Clostridium difficile* associated disease: CDAD) において、発症に関連する新たな原因物質として、鞭毛の一構成成分であるフラジェリンの働きを明らかにするため、CDAD 発症の主座である大腸の腸管上皮細胞である Caco-2 細胞・HT29 細胞やフラジェリンが結合する受容体である Toll-like receptor 5 (TLR5) を遺伝子導入にて強制発現させた HEK293T 細胞を用い、又一部では CDAD の既知の病原因子であるトキシン B も同時に使用し、フラジェリン刺激による TLR5 を介したシグナル活性等の有無を検証したものであり、下記の結果を得ている。

1 . *C. difficile* を液体培地嫌気環境下で 48 時間培養後、液体培地ごと強力震盪し、5000G の低速で遠心分離、上澄みの培養液を 25000G の高速遠心分離を行いその沈殿物を PBS へ溶解、70度 20分過熱することで *C. difficile* のフラジェリンの抽出を行った。以前に Delmee らの鞭毛を用いた実験に際し行った抽出法に、分離前の強力震盪や分離後の加熱といった調整を加えており、この新たな手法により効率的にフラジェリン採取が可能となった。

2 . 採取した *C. difficile* フラジェリンを用い TLR5 を強制発現させた HEK293T 細胞へ刺激を加えることで、Dual luciferase assay により、この *C. difficile* フラジェリンが TLR5 を介して NF-kappaB を活性化させることが確認された。また、Caco-2 細胞・HT29 細胞へ同様に *C. difficile* フラジェリン刺激を加えることで、SDS-PAGE ウェスタンブロット法によりフラジェリン刺激に伴う TLR5 を介した MAPK 活性化、特に p38 のリン酸化が確認され、また ELISA 法により、*C. difficile* フラジェリン刺激による TLR5 を介した炎症性サイトカインである IL-8・CCL20 産生促進が確認された。

3 . 実際のヒト大腸腸管上皮細胞では、フラジェリンの刺激部位である TLR5 は血管側にもみ発現していることが分かっている。この事実から、生体でのフラジェリンの働きを調べる必要があった。Caco-2 細胞固有の機能として、半透膜上で培養を行うことで細胞間にタイトジャンクションが作られ、単層上皮へと変化するといふいわゆる腸管上皮モデル化機能を利用し、腸管上皮モデルを作成した。このモデルを用い、腸管上皮モデルの血管側へ *C. difficile* フラジェリン刺激を行ったところ、腸管上皮モデルにおいても通常の細胞条件と同様に、炎症性サイトカイン CCL20 産生促進が認められた。これは生体における腸管上皮においても、*C. difficile* フラジェリンが血管側の TLR5 へ刺激可能であることを示唆するものであった。

4 . CDAD における既知の病原因子であるトキシン B を用い、前述の Caco-2 細胞により作成された腸管上皮モデルが、トキシン B 刺激により破壊されることを、膜電気抵抗の変

化や細胞形態の肉眼的変化により確認した。この結果は、トキシン B の作用により腸管上皮が破綻し、結果として *C. difficile* のフラジェリンが腸管上皮の管腔側から血管側へと侵入することが可能となり、結果、腸管上皮血管側にのみ存在する TLR5 を刺激することが可能となることを間接的に示していた。

5 . トキシン B 存在下で *C. difficile* フラジェリン刺激を Caco-2 細胞へ加えることで、炎症性サイトカイン CCL20 産生が、フラジェリン単独刺激と比較し、相乗的に増加することが ELISA 法により確認された。

6 . トキシン B 刺激により、Caco-2 細胞において、フラジェリン結合受容体である TLR5 の発現が明らかに増加していることが、SDS-PAGE ウェスタンブロット法を用いて確認された。この事実から、トキシン B 刺激により TLR5 発現が増し、結果フラジェリンに対する感受性が高まり、トキシン B 存在下で *C. difficile* フラジェリンの刺激による CCL20 産生が相乗的に高まったものと予想された。

本論文は、未知であった *C. difficile* フラジェリンの TLR5 のリガンドとしての働きを示した初めてのものであり、既知の病原体であるトキシン B と協調しその働きを高めるという結果もあわせ、CDAD 発症メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。