

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16231

研究課題名(和文) クロストリジウムディフィシル腸炎における T 細胞非依存的産生される腸管 IgA の役割

研究課題名(英文) Role of T cell-independent production of intestinal IgA in *Clostridioides difficile* enteritis

研究代表者

吉野 友祐 (Yoshino, Yusuke)

帝京大学・医学部・病院准教授

研究者番号：60624509

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)：本研究により、まず *C. difficile* 自体が腸管上皮や単球/マクロファージ系細胞から B 細胞活性化因子産生を促すことはなかった。一方で、*C. difficile* の主な病原因子であるトキシン B はグラム陰性桿菌の鞭毛の一分成分であるフラジェリンと協調し、腸管上皮細胞から効率よく CCL-20 などの炎症性サイトカイン産生を促進した。また、トキシン B は単球/マクロファージ系細胞へ働きかけ、インターフェロンガンマ刺激により導かれる BAFF 産生を飛躍的に亢進させる機能を有していることが分かった。トキシン B は、従来の機能である粘膜の破綻・局所炎症活性だけでなく、免疫反応を調整する機能を有することが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、*Clostridioides difficile* の病原因子として、最も重要と考えられているトキシン B に免疫反応を活性化する機能を有していることを新たに見出した。*C. difficile* 感染症は院内感染の一つとして知られ、重篤になれば死に至る可能性のある疾患である一方で、再発も多く、治療にしばしば難渋する。病原性についてはいまだ不明な部分も多く、その結果コントロールが難しくなっているものと考えられている。今回、トキシン B の新たな機能を見出したが、この結果は *C. difficile* の病原性解明の一助になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study showed that *C. difficile* and its components could not lead to the production of B-cell activating factors from the intestinal epithelium and monocytes/macrophages. On the other hand, toxin B, the main virulence factor of *C. difficile* coordinated with flagellin, one of components of flagellum from bacteria and lead the efficient production of inflammatory cytokines like CCL-20. In addition, toxin B acted on monocyte/macrophage lineage cells and increased the production of B-cell activating factor via the stimulation of interferon-gamma. This study proved that Toxin B could regulate the immune response as well as its traditional function of mucosal disruption and local inflammatory activity.

研究分野：感染症

キーワード：Clostridioides difficile トキシン B BAFF 免疫調整 病原性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

*Clostridioides difficile* はしばしばヒトにおいて抗菌薬関連下痢症・腸炎の原因となる嫌気性菌である。*C. difficile* の感染部位は腸管であり、その症状は軽度の下痢症から中毒性巨大結腸症など多岐にわたり、死にいたることもある[1]。主な病原因子はトキシン A/B と考えられている。特にトキシン B が病原性として高いと考えられ、Rho の不活性化から粘膜バリアの破綻を来すこと、そして局所に炎症を導くことが主な機能と考えられているが、未だ機能については不明な点も多い。

一方、感染の主座である腸管粘膜における免疫機能に目を向けると、粘膜に分泌される大量の IgA が多くの病原体に対する防御機構として働くと考えられている。IgA は B 細胞がクラススイッチをきたし、IgA 分泌型の形質細胞に分化し、病原体などの刺激を受け分泌される。B 細胞の分化・IgA 産生形質細胞へのクラススイッチには、従来ヘルパー T 細胞からのサイトカイン刺激が必要だと考えられてきた。近年、腸管粘膜においては、T 細胞非依存型 IgA 産生経路が存在することが示されている。粘膜下樹状細胞や腸管上皮粘膜細胞などが腸管内に常在する微生物やその構成成分、すなわちフラジェリン等の刺激を受け、まず B 細胞活性化因子 (B cell activating factor of TNF family; BAFF) a proliferation-inducing ligand (APRIL) を産生し、B 細胞を効率的に IgA 産生形質細胞へとクラススイッチさせ、引き続いて大量の IgA を粘膜下に分泌すると考えられている。

しかしながら、*C. difficile* と腸管粘膜免疫・IgA との関連については、臨床研究・基礎研究ともに報告は少ない。細胞レベルでの実験で IgA が *C. difficile* の腸管接着に際し抑制的に働くという基礎研究はあるが、その他の明確な報告は無い[2]。

## 2. 研究の目的

臨床および基礎の両面からの包括的な研究により、*C. difficile* 感染症成立および発症後の病態における BAFF/APRIL 活性および腸管粘膜分泌型 IgA の関与の有無を明らかにすることを当初目的とした。特に基礎的な評価を中心に、*C. difficile* と BAFF・APRIL 活性との関連を、特に *C. difficile* 感染症の主な病原因子であるトキシン B とフラジェリンを中心に評価を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 臨床研究について

対象患者及び非感染コントロールにおいて、各々糞便中の IgA 量測定 (外部業者委託: テクノスルガラボ株式会社) 血清 BAFF/APRIL 測定を行い (ELISA 法) で確認し、CDI と IgA 値・BAFF/APRIL 活性との関連を評価を行う予定とした。

### 基礎研究について

細胞レベルで、*C. difficile* により腸管において BAFF/APRIL 活性が導かれるかを検証した。BAFF/APRIL 産生系には主に上皮細胞と粘膜下樹状細胞が関わりとされており、その 2 者で検証した。

腸管上皮細胞として Caco-2 細胞を用いた。特に Caco-2 細胞は半透膜上に培養することで極性を有した腸管上皮シートを作成し、実験に用いた。また腸管粘膜下樹状細胞としてヒト単球 THP-1 細胞を用いた。

刺激物質として、*C. difficile* 菌体及び市販のトキシン A およびトキシン B、また我々が以前の研究で抽出したフラジェリンを用いた。また、これまで TLR5 のリガンドとして多く研究された *Salmonella typhimurium* のフラジェリンも購入し、同様に用いた。

- 1) マクロファージ・単球系細胞の誘導因子として Macrophage Inflammatory Protein-3 (CCL20) の産生について、各々の腸管上皮細胞に上記の刺激物質を投与し、IL-8 及び CCL-20 産生について ELISA 法を用いて評価した。また、産生メカニズムについて、TLR5 中和抗体の使用による産生量の変化や Western blot 法による MAPK の活性変化により評価を行った。
- 2) 各細胞へ上述の刺激物質により刺激を行い、その後各々刺激後培養液を用いた ELISA 法や細胞溶解液を用いた SDS-PAGE・ウェスタンブロット法及び RT-PCR 法で BAFF・APRIL 産生亢進を検証した。
- 3) BAFF 産生が証明されている THP-1 細胞における IFN- $\gamma$  BAFF 産生系において、各刺激物質が影響を及ぼすかについて、同様に刺激後の培養液を用いた ELISA 法や細胞溶解液を用いた SDS-PAGE・ウェスタンブロット法で BAFF 産生の変化、メカニズムについて評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### 臨床研究について

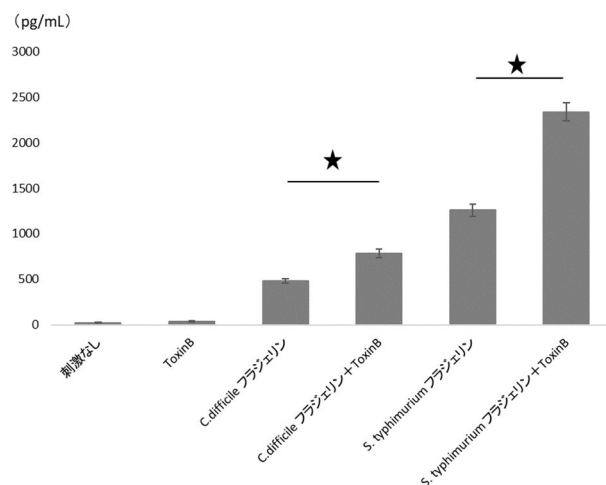
本大学の倫理委員会より承認を受け（承認番号：帝倫 17-113）、コントロールとなる入院患者の便採取及び IgA 計測は 4 名施行したが以後、検体搬送に関するリスクや、研究開始以前に院内で小規模のアウトブレイクを複数回認めたとにより、現在患者検体の採取は研究者の判断により中止している。

##### 基礎研究について

フラジェリンによる CCL-20 (Macrophage Inflammatory Protein-3) の産生は *C. difficile* トキシン B によって増強される。

Caco-2 細胞にトキシン B (0.10  $\mu$ g/ml)、*C. difficile* フラジェリン (1mg/ml)、*S. typhimurium* フラジェリン (100ng/ml) を管腔側より投与し、24 時間後血管側のメディウムを回収し、CCL-20 産生量を測定した。

結果として、トキシン B 単独では CCL-20 は産生されず、一方フラジェリンは CCL-20 産生を更新、またトキシン B と合わせて刺激することにより、CCL-20 産生が飛躍的に増加することが確認された。また、増加については *C.*



*difficile*フラジェリンだけでなく、*S. typhimurium*フラジェリンでより多く産生されている。この結果は、腸内に存在する常在菌と協調し、*C.difficile*トキシン B が免疫反応を強く惹起する可能性が示唆された。

(★は有意差あり)

また、これらの反応は TLR5 の中和抗体を用いることで抑制され、結果としてトキシン B はフラジェリン-TLR5 シグナルを増強する作用があることが判明した。

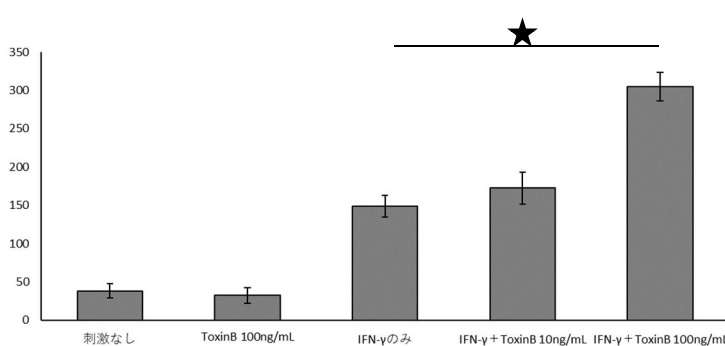
CCL-20 で示された結果と同様の結果が IL-8 産生においても確認された。

***C difficile* 構成成分では腸管上皮細胞および THP-1 細胞から BAFF/APRIL 産生は導かれない。**

一方で、Caco-2 細胞および HT-29 細胞へ菌体自身及び各コンポーネント及び、その組み合わせを同様にいき、72 時間の刺激を行ったが、BAFF および APRIL の産生は、RT-PCR および ELISA 法にて認めなかった。

**THP-1 細胞において IFN- $\gamma$  刺激により導かれる BAFF 産生は *C. difficile* トキシン B によって亢進される**

次いで、単球系細胞から BAFF 産生を導くことが証明されている IFN- $\gamma$  をリガンドとして用い、トキシン B および *C. difficile* フラジェリンが THP-1 細胞からの BAFF 産生メカニズムに影響を及ぼすかどうかについて、評価を行った。

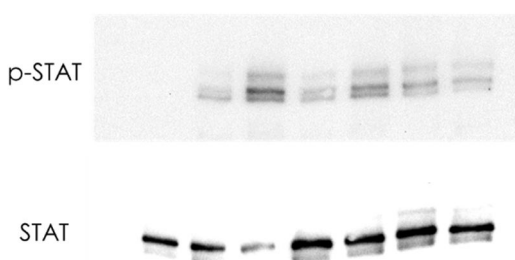


結果として、フラジェリンは IFN- $\gamma$  刺激による BAFF 産生に影響を及ぼさなかったが、一方でトキシン B は IFN- $\gamma$  刺激による BAFF 産生を亢進することが証明された。

そのメカニズムとして、

	0		30min		1h		3h	
ToxinB	-	+	-	+	-	+	-	+

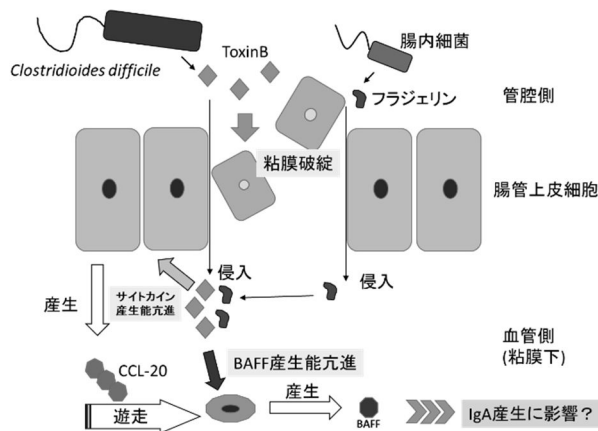
IFN- $\gamma$  の刺激に伴い導かれる JAK-STAT シグナルを増強させることが確認された。



TpxinB 0.10  $\mu$ g/mの有無により IFN- $\gamma$  刺激による STAT のリン酸化が、30分・1時間の刺激時間で増強していることがわかる。

## 結論

*C. difficile* は腸管上皮においてフラジェリン刺激による IL-8 及び CCL-20 の産生を亢進し、また一方で単球系細胞から IFN- $\gamma$  刺激によって導かれる BAFF 産生の亢進ももたらすことが判明した。これらの結果から、*C. difficile* トキシン B は、粘膜免疫を調整する作用を有することが分かった。



今回判明した事実から予測されるトキシン B の機能について図に示す。

BAFF は当初は IgA 産生亢進をもたらす key factor と考えられていたが、近年 Hashiguchi らによって、腸管において BAFF 産生は寧ろ IgA 産生低下をもたらし、粘膜免疫の機能を低下させる可能性が示されている [3]。この結果からは、*C. difficile* トキシン B は、免疫調整の結果 IgA 産生をむしろ低下させ、*C. difficile* の腸管への定着を促進し、感染成立を促す機能がある可能性が考えられた。

### 今後の展望

今回 *C. difficile* と腸管分泌 IgA との関連については十分な評価が困難であったが、一方で *C. difficile* トキシン B に免疫調整能があることを確認した。今後、この新たなトキシン B の機能に着目し、*C. difficile* の病原性の解明を継続する方針である。

### 引用文献

- 1) Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. N Engl J Med. 2002;346(5):334-339. doi:10.1056/NEJMc011603
- 2) Senoh M, Iwaki M, Yamamoto A, Kato H, Fukuda T, Shibayama K. Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to human intestinal cells after treatment with serum and intestinal fluid isolated from mice immunized with nontoxigenic *C. difficile* membrane fraction. Microb Pathog. 2015;81:1-5. doi:10.1016/j.micpath.2015.03.001
- 3) Hashiguchi M, Kashiwakura Y, Kanno Y, Kojima H, Kobata T. Tumor necrosis factor superfamily member (TNFSF) 13 (APRIL) and TNFSF13B (BAFF) downregulate homeostatic immunoglobulin production in the intestines. Cell Immunol. 2018;323:41-48. doi:10.1016/j.cellimm.2017.10.009

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Kitazawa Takatoshi, Seo Kazunori, Yoshino Yusuke, Asako Kurumi, Kikuchi Hirotooshi, Kono Hajime, Ota Yasuo	4. 巻 25
2. 論文標題 Efficacies of atovaquone, pentamidine, and trimethoprim/sulfamethoxazole for the prevention of <i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia in patients with connective tissue diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 351 ~ 354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.01.005">https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.01.005</a>	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 Yoshino Yusuke, Koga Ichiro, Kitazawa Takatoshi, Sakurai Keita, Oba Hiroshi, Matsuda Hiroshi, Furui Shigeru, Ota Yasuo	4. 巻 52
2. 論文標題 Cerebral blood flow in young and middle-aged people living with HIV	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 75 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1677939">https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1677939</a>	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 Yoshino Yusuke, Seo Kazunori, Kitazawa Takatoshi, Ota Yasuo	4. 巻 17
2. 論文標題 Serum Levels of Fibroblast Growth Factor 23 in People Living with HIV	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current HIV Research	6. 最初と最後の頁 198 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.2174/1570162X17666190903231203">https://doi.org/10.2174/1570162X17666190903231203</a>	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 Wakabayashi Yoshitaka, Yoshino Yusuke, Seo Kazunori, Koga Ichiro, Kitazawa Takatoshi, Ota Yasuo	4. 巻 9(6)
2. 論文標題 Inhibition of osteoblast differentiation by ritonavir	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 491-496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2018.1154	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 Kitazawa T., Ishigaki S., Seo K., Yoshino Y., Ota Y.	4. 巻 28
2. 論文標題 Catheter-related bloodstream infection due to Rhodotorula mucilaginosa with normal serum (13)- -D-glucan level	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal de Mycologie Médicale	6. 最初と最後の頁 393 ~ 395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mycmed.2018.04.001	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 Yoshino Yusuke, Koga Ichiro, Misu Keita, Seo Kazunori, Kitazawa Takatoshi, Ota Yasuo	4. 巻 25
2. 論文標題 The prevalence of low serum free testosterone and the short-term effect of anti-retroviral therapy in male Japanese treatment-naïve HIV patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 318 ~ 321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2018.09.007	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 Yoshino Yusuke, Koga Ichiro, Misu Keita, Seo Kazunori, Kitazawa Takatoshi, Ota Yasuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Prevalence of Bone Loss and the Short-Term Effect of Anti-retroviral Therapy on Bone Mineral Density in Treatment-Naïve Male Japanese Patients with HIV	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Open AIDS Journal	6. 最初と最後の頁 12 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1874613601913010012	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 Yoshino Yusuke, Koga Ichiro, Seo Kazunori, Kitazawa Takatoshi, Ota Yasuo	4. 巻 33
2. 論文標題 Short Communication: The Clinical Value of Cystatin C as a Marker of Renal Function in HIV Patients Receiving Dolutegravir	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 AIDS Research and Human Retroviruses	6. 最初と最後の頁 1080 ~ 1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/AID.2017.0074	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 Yoshino Yusuke, Seo Kazunori, Koga Ichiro, Kitazawa Takatoshi, Ota Yasuo	4. 巻 49
2. 論文標題 Clinical efficacy of laninamivir and peramivir in patients with seasonal influenza: a randomized clinical trial	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 417 ~ 419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23744235.2016.1242773	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 吉野友祐、山本 藍、三須恵太、若林義賢、北沢貴利、太田康男
2. 発表標題 TDF/FTC から TAF/FTC へのスイッチが骨密度及び骨代謝マーカーに及ぼす影響
3. 学会等名 第33回 エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 吉野 友祐
2. 発表標題 HIV 感染症における現状の課題と最新治療アップデート
3. 学会等名 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 吉野友祐, 三須恵太, 北沢貴利, 太田康男
2. 発表標題 HIV 感染患者における血清 fibroblast growth factor (FGF) 23 値
3. 学会等名 第 93 回日本感染症学会総会学術講演会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年



1. 発表者名 Yusuke Yoshino, Ai Yamamoto, Keita Misu, Yoshitaka Wakabayashi, Takatoshi Kitazawa, Yasuo Ota
2. 発表標題 Evaluation of Clinical Course and Health-Related Quality-of-Life Following Treatment with Oseltamivir, Laninamivir and Baloxavir Marboxil in Adult Patients with Seasonal Influenza: Prospective Observational Study
3. 学会等名 IDweek 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Y. Yoshino, K. Misu, K. Seo, I. Koga, T. Kitazawa, Y. Ota
2. 発表標題 Low-Temperature Exposure Suppresses the Production of B Cell Activating Factor Via TLR3 in BEAS-2B Cells
3. 学会等名 ATS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 吉野 友祐, 三須 恵太, 妹尾 和憲, 古賀 一郎, 北沢 貴利, 太田 康男
2. 発表標題 日本人男性 HIV 未治療患者における性腺機能 低下の状況と抗レトロウイルス薬開始後の変化について
3. 学会等名 第92回 日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Yusuke yoshino, Keita Misu, Takatoshi Kitazawa, Yasuo Ota
2. 発表標題 Fibroblast Growth Factor 23, a Potential Risk Factor for Cardiovascular Diseases Is Associated with Abacavir/Lamivudine Use in HIV Patients.
3. 学会等名 ID week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 吉野友祐、三須恵太、北沢貴利、太田康男
2. 発表標題 ドルテグラビルを含む抗 HIV 療法へ の変更が骨密度・骨代謝マーカーに与え る影響について
3. 学会等名 第32回 日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Yusuke Yoshino, Keita Misu, Kazunori Seo, Ichiro Koga, Takatoshi Kitazawa, Yasuo Ota
2. 発表標題 The prevalence of bone loss and short term effect of anti-retroviral therapy on bone mineral density in male Japanese patients with HIV.
3. 学会等名 International Congress of Chemotherapy and Infection (ICC) 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Yusuke Yoshino, Keita Misu, Kazunori Seo, Ichiro Koga, Takatoshi Kitazawa, Yasuo Ota
2. 発表標題 The clinical value of cystatin C as a marker of renal function in HIV patients receiving dolutegravir
3. 学会等名 ID week 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 吉野友祐、古賀一郎、妹尾和憲、北沢貴利、太田康男
2. 発表標題 ペラミビル及びラニナミビルの季節性インフルエンザに対する臨床効果
3. 学会等名 第109回 日本内科学会総会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 吉野友祐、妹尾和憲、古賀一郎、北沢貴利、太田康男
2. 発表標題 ドルテグラビル使用 HIV 感染症患者における血清シスタチン C 測定の有用性
3. 学会等名 第31回日本エイズ学会
4. 発表年 2017年～2018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
--	---------------------------	-----------------------	----