

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 6 月 1 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591198

研究課題名（和文） C. difficile フラジエリンが感染成立に果たす役割の研究

研究代表者

太田 康男 (OTA YASUO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：80292936

研究成果の概要（和文）：

C. difficile は院内感染の主要な病原菌であり、しばしば病院内でアウトブレイクを引き起こす。しかしながら、*C. difficile* がどのように病気を引き起こすかは不明のままである。*C. difficile* は鞭毛タンパクのフラジエリンを有するが、*C. difficile* フラジエリンが発症に関する機序について解析を行った。腸管上皮細胞において、*C. difficile* フラジエリンは、TLR5 を介して NF- κ B や p38 MAPK を活性化した。また *C. difficile* フラジエリン刺激により TLR5 を介して炎症性サイトカイン IL-8 や CCL20 を産生した。さらに *C. difficile* のトキシン B と フラジエリンの両方で刺激を行うと、炎症性サイトカインの産生はさらに亢進した。以上から、*C. difficile* フラジエリンは、病態発症に重要な役割を演じていることが示された。

研究成果の概要（英文）：

C. difficile is an important pathogen of nosocomial infection, and outbreak of *C. difficile* associated diseases (CDAD) often occurs in hospitals. However, the pathogenesis of CDAD remains to be determined. We investigated whether *C. difficile* flagellin were involved in the pathogenesis of CDAD. *C. difficile* flagellin induced activation of NF- κ B and p38 mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) via TLR5, and also promoted productions of Interleukin-8 (IL-8) and CCL20 in intestinal epithelial cells via TLR5. Pretreatment with toxin B stimulation enhanced production of CCL20 induced by *C. difficile* flagellin by increasing expressions of TLR5 in intestinal epithelial cells. These results collectively indicated that *C. difficile* flagellin plays an important role in the pathogenesis of CDAD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 感染症内科学

キーワード：Clostridium difficile、フラジエリン、TLR5、トキシン B、下痢症

1. 研究開始当初の背景

Clostridium difficile は嫌気性グラム陰性桿菌であり、芽胞を形成するため自然環境に強く、また病原性が高いため、しばしば入

院患者において腸炎の原因となる。抗菌薬使用や、高齢者患者が発症のリスクファクターであり、症状も軽度の下痢症から偽膜性腸炎、中毒性巨大結腸症など多岐にわたり、死にい

たことが多い。*C. difficile* 関連疾患 (*Clostridium difficile* associated disease: CDAD) は、1990 年代前半と比較すると、1990 年代後半から近年にかけて増加傾向であり、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。2000 年に入り、カナダで *C. difficile* 感染の大規模なアウトブレイクが報告され、この際に採取された検体のうちの多くは、現在では強毒株として認められている BI/North American Pulsed Field type 1 (NAP 1) /PCR ribotype 027 という株であった。それ以降、複数の国で *C. difficile* 感染のアウトブレイクが報告されており、*C. difficile* は、臨床現場においてきわめて重要な病原体となっている。

CDAD 発症には、*C. difficile* が固有に持つトキシン A とトキシン B が病原因子として重要な役割を占めることがすでに知られている。しかしながら、これらのトキシンに加え、BI/NAP1/027 等の *C. difficile* の一部の株に認められるバイナリートキシンという毒素以外の *C. difficile* の発現物質については、CDAD 発症に関する基礎的研究はなされていない。

一方、初期免疫を引き起こし、また局所の炎症を制御するシグナル伝達レセプターの代表的なものに、Toll-like receptor (TLR) がある。ヒトでは 10 種類のサブファミリーがあり、それぞれが病原因子を認識する。認識後、主に MAPK や NF-kappaB を活性化させ、その結果、炎症性サイトカイン産生を促すことが知られている。*C. difficile* 感染の主座である大腸腸管上皮においては、TLR5 を多く発現しているが、このリガンドは細菌の鞭毛の構成成分であるフラジエリンである。実際に *Salmonella typhimurium*においては、このフラジエリンが感染成立に重要な役割を担っていることが報告されているおり、他のいくつかの菌種においても同様の事実が確認されている。しかしながら、*C. difficile* に発現するフラジエリンが、どのように病態発症に関与するかについての研究はほとんどなされていないのが現状であった。

2. 研究の目的

C. difficile トキシン A、トキシン B という毒素以外で CDAD 発症の原因物質となりうるタンパク質として、*C. difficile* フラジエリンに着目した。*C. difficile* フラジエリンが CDAD 発症に果たす役割を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

細胞とその培養方法

HT29 ヒト腸管上皮細胞(ATCC)、Caco-2 ヒト腸管上皮細胞(ATCC)、HEK293T 細胞(ATCC)を購入、それぞれ 37° C 5% CO₂ 環境下で培養した。極性を持たせない条件では、12 ウェルプレートで培養を行った。極性を持たせ単層化させる(上皮モデル形成)場合は、Caco-2 細胞を半透膜フィルター (BD Biosciences, #Cell Culture Insert) 上に 0.8*10⁶/cm² 濃度で撒き、同様の培養条件で 3 週間の培養を行った。単層化を確認するため、膜電気抵抗 (transepithelial electrical resistance (TEER)) を millicel ERS (Millipore) で計測、400 ohm*cm² を超えた時点で分化が完了し、一層の単層上皮が形成されたと判断した。

フラジエリンの抽出

S. typhimurium フラジエリンは InvivoGen より購入した。*C. difficile* フラジエリンは、以下の方法で抽出した。トキシンを産生しない *C. difficile* 株 (ATCC) を購入し、GAM ブイヨン液体培地を用い、嫌気的に 48 時間培養した。培養後に液体培地ごと Vortex mixer (The Vortex Manufacturing Co.) を用い 2 分間強力に震盪し、その後 5,000 x g、30 分間 4° C の条件下で遠心分離を行い、菌体を除去した。上澄み液をさらに 25,000 x g 1 時間 4° C で高速遠心分離し、ペレットを 2mlPBS (pH 7.4) で溶解した。溶解液に抽出した鞭毛成分を更に 70 °C 20 分間で加熱し、単量体(フラジエリン)へと変化させた。抽出した蛋白濃度は Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce Protein reagents) を用いて計測した。

SDS-PAGE ・ ウエスタンプロット法

10-12% (w/v) acrylamide ゲルを用いて SDS-PAGE を行った。ゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) により染色を行うか、ニトロセルロース膜への転写後、ウエスタンプロット法を行った。膜を 3% BSA を含むブロッキングバッファーで 1 時間ブロッキングを行い、その後 1 次抗体・2 次抗体で各々インキュベートし、引き続いて HRP をラベルした抗免疫グロブリン抗体を反応させた。一次抗体として、anti-p38 Ab (Santa Cruz Biotechnology)、anti-phospho-p38 (cell signaling)、anti-ERK1/2 Ab (Santa Cruz Biotechnology)、anti-phospho-ERK1/2 Ab (Santa Cruz Biotechnology) anti-TLR5 Ab (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。タンパク質のバンド検出には Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate を用い、化

学発光を行った。

HEK293T 細胞への遺伝子導入

FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science)を用いてリポフェクションによる遺伝子導入を行った。HEK293T 細胞を 12 well プレートに 4×10^4 cells/well で撒き、実験に用いる cDNA プラスミドを培養開始後 48 時間後に遺伝子導入した。

細胞刺激実験

HEK293T 細胞に TLR5 vector (InvivoGen) あるいは control vector (InvivoGen) を遺伝子導入し、48 時間後にフラジエリンを添加した。刺激時間は 6 時間とした。

HT-29・Caco-2 細胞では、培養開始後 48 時間以上経過し、95–100%コンフルエントの時点で、フラジエリンをそれぞれ培養液に各濃度で投与した。刺激時間はそれぞれ 5、16 時間とした。細胞表面に発現している TLR5 を中和するため、抗 TLR5 抗体 (InvivoGen) 10 ng/ml をフラジエリン刺激 1 時間前に投与、また中和抗体のコントロールとして human IgA (InvivoGen) 10ng/ml を用いた。

デュアルルシフェラーゼアッセイによる NF-kappaB 活性の検出

HEK293T 細胞を 12 ウェルプレートに 4.0×10^4 cells/well で培養し、48 時間後に FuGENE 6 transfection reagent を用い、NF-kappaB reporter plasmid expressing firefly luciferase 0.5 μ g (Stratagene)、active Renilla luciferase reporter plasmid (Promega) 0.05 μ g を、LR5 vector 0.05 μ g あるいは control vector 0.05 μ g と一緒に遺伝子導入した。遺伝子導入後 48 時間目にフラジエリン刺激を行った。Firefly luciferase と Renilla luciferase 活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) と Genelight55 luminometer (Microtech) を用いて計測した。Relative luciferase activity は firefly luciferase 活性と Renilla luciferase 活性との比率で示した。

IL-8、CCL20 の產生量の測定

フラジエリン刺激後、培養液を回収し、解析まで–80°Cで保存した。IL-8、CCL20 の產生量は ELISA 法を用いて測定した。IL-8 產生は Pierce Human IL-8 ELISA Kit (Thermo Scientific) を、CCL20 產生は Human CCL20 ELISA Kit (R and D systems) を用いた。

C. difficile トキシン刺激

C. difficile トキシン B を List Biological Laboratories, Inc より購入した。トキシン B を 0.25μ g/ml の濃度で各培養液に投与した。

統計処理

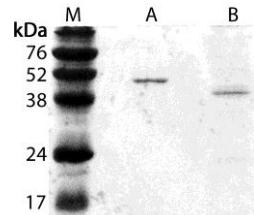
デュアルルシフェラーゼアッセイ、ELISA 法、SDS-PAGE ウエスタンプロット法での実験については、すべて 3 標本以上で、3 回以上の実験を行い、実験間で結果に一貫性があることを確認した。デュアルルシフェラーゼアッセイ、ELISA 法で導き出された数値としての結果は、n=3 とし、その平均値と標準誤差で示した。ELISA 法で検出した 2 標本の差については One-way ANOVA を行い、有意水準は 5%未満を有意とした。統計処理には SPSS software ver1.01 Windows を用いた。

4. 研究成果

フラジエリンの抽出

3.5×10^9 /cfu の *C. difficile* より 1mg のフラジエリン含有タンパク質を抽出した。抽出確認のため、SDS-PAGE を行い、ゲルを CBB-R250 で染色した。約 39kDa の単一な *C. difficile* フラジエリンのバンドを確認した (Fig. 1)。この結果は、過去の報告と合致していた。

Fig. 1

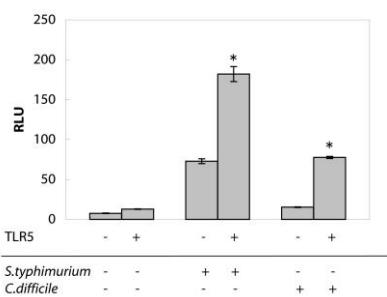


M はマーカー、A は *S. typhimurium* フラジエリン (約 50kDa)、B は抽出した *C. difficile* フラジエリン (約 39kDa) を示す。

C. difficile のフラジエリンは TLR5 を介して、NF-kappaB を活性化させる

TLR5 vector あるいは control vector を遺伝子導入した HEK293T 細胞を *C. difficile* フラジエリンで刺激した。その後デュアルルシフェラーゼアッセイを行った (Fig. 2)。TLR5 が遺伝子導入されていない HEK293T 細胞と比較し、TLR5 遺伝子導入された HEK293T 細胞において、*C. difficile* フラジエリン、*S. typhimurium* フラジエリン刺激により、NF-kappaB 活性が、有意に亢進した。この結果は、*C. difficile* フラジエリンは TLR5 を介して NF-kappaB を活性化させることを示している。

Fig. 2

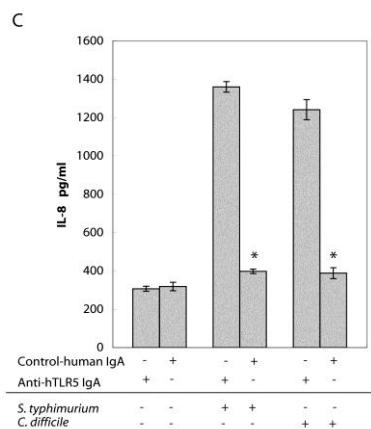
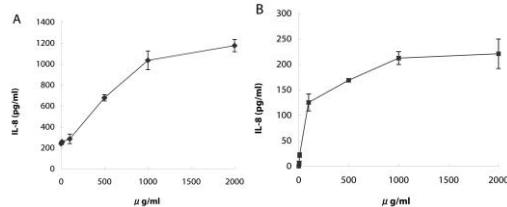


C. difficile フラジエリンは TLR5 を介して、腸管上皮細胞で IL-8 産生を促進する

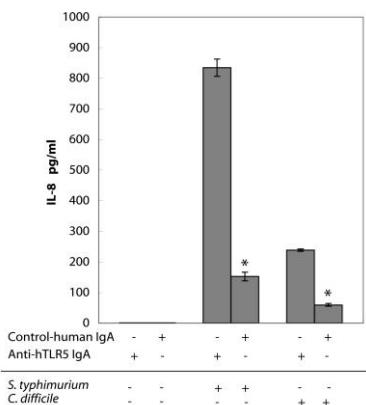
HT29 細胞 (Fig. 3A) Caco-2 細胞 (Fig. 3B) へ、各濃度の *C. difficile* フラジエリンで刺激を加え、IL-8 の産生を測定した。HT29 細胞および Caco-2 細胞において、*C. difficile* フラジエリン刺激により、濃度依存的に IL-8 産生が亢進することが確認された (Fig. 3A, B)。

次に HT29 細胞 (Fig. 3C) あるいは Caco-2 細胞 (Fig. 3D) に、TLR5 中和抗体、あるいはそのコントロール抗体を添加し TLR5 を中和後、*S. typhimurium* フラジエリン 100 ng/ml、*C. difficile* フラジエリン 1 mg/ml で刺激を加え、IL-8 産生量を比較検討した (Fig. 3C, D)。TLR5 を中和すると、*S. typhimurium* および *C. difficile* フラジエリンとともに IL-8 産生が有意に低下することが確認された。この結果は、*C. difficile* のフラジエリンが *S. typhimurium* のフラジエリンと同様に TLR5 を介して IL-8 産生を促していることを示している。

Fig. 3



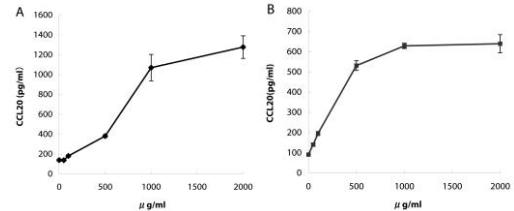
D

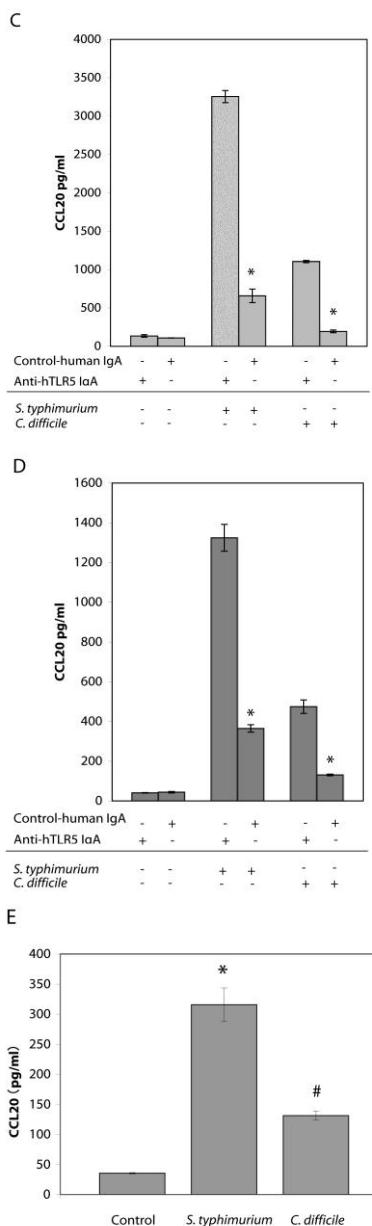


C. difficile フラジエリンは TLR5 を介して、腸管上皮細胞で CCL20 産生を促進する

IL-8 産生の実験と同様に、*C. difficile* フラジエリン刺激による CCL20 の産生を、HT29 細胞および Caco-2 細胞で検討し、濃度依存的に CCL20 産生が認められることを確認した (Fig. 4A, 4B)。また *C. difficile* フラジエリンが *S. typhimurium* フラジエリンと同様に TLR5 を介して CCL20 産生を促していることを示した (Fig. 4C, 4D)。さらに上皮化した Caco-2 細胞で、フラジエリンを下層側 (血管側) より添加することで、血管側へ CCL20 が産生されることを確認した (Fig. 4E)。この結果は、*C. difficile* フラジエリンが、単層化した腸管上皮細胞に作用し、活性化することを示している。

Fig. 4

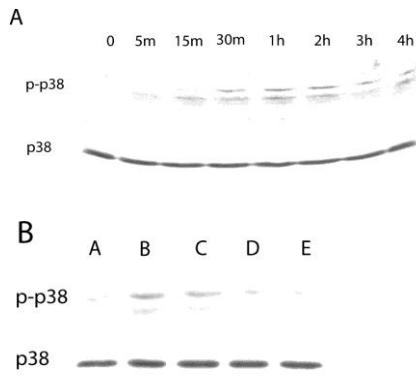




C. difficile フラジエリンは p38 を活性化する

腸管上皮細胞において、*C. difficile* フラジエリン刺激による MAPK の活性化を検討した。*C. difficile* フラジエリン刺激により、Caco-2 細胞において、p38 のリン酸化が確認された (Fig. 5A)。また *S. typhimurium* と同様に、フラジエリン刺激前に TLR5 中和抗体を投与すると、*C. difficile* フラジエリン刺激による p38 リン酸化が抑制されることが確認された (Fig. 5B)。これは、*C. difficile* フラジエリンは、TLR5 を介して p38 のリン酸化をもたらすことを示している。

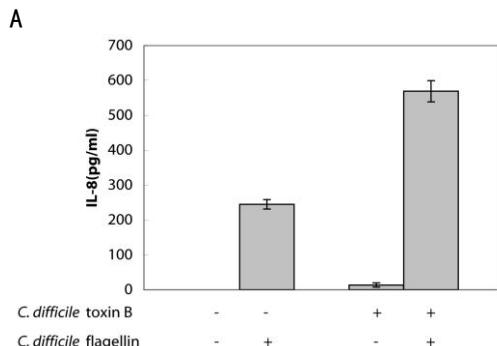
Fig. 5

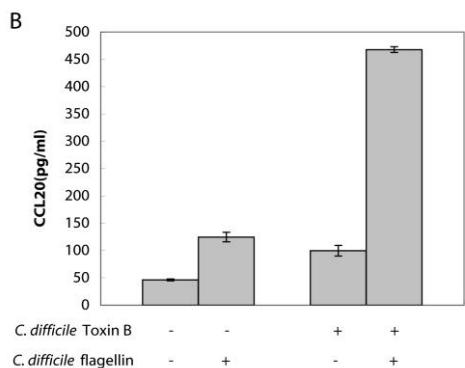


C. difficile トキシン B はフラジエリン刺激による CCL20 産生を促進する

トキシン B 存在下でのフラジエリン刺激によるサイトカイン産生に変化が生じるかを検証した (Fig. 6A, 6B)。Caco-2 細胞に 1 時間前にトキシン B を添加、1 時間経過後培地を交換し、*C. difficile* フラジエリン 1mg/ml を投与し、16 時間後に上清を回収、ELISA 法により IL-8・CCL20 産生量の計測を行った。Caco-2 細胞において、トキシン B 存在下では、フラジエリン刺激に伴う炎症性サイトカイン IL-8 および CCL20 の産生が、トキシン B あるいはフラジエリン単独刺激の際に比べて亢進することが確認された。次に、トキシン B とフラジエリンとが強調して、局所炎症を増強する理由を調べた。トキシン B 刺激により Caco-2 細胞で、刺激時間に従い、TLR5 発現が亢進することを証明した (Fig. 6C)。この結果より、トキシン B の刺激により、細胞での TLR5 発現が亢進し、その結果 TLR5 の感受性が増し、フラジエリン刺激によるサイトカイン産生が亢進したものと予想された。

Fig. 6





C 0 1h 3h



C. difficile フラジエリンは、TLR5 を介し、NF- κ B や p38 を活性化し、炎症性サイトカイン IL-8 や CCL20 産生が認められた。*C. difficile* トキシン B の存在下では、腸管上皮細胞において TLR5 発現が亢進することにより、*C. difficile* フラジエリン刺激による CCL20 産生が増加した。

以上の結果から、*C. difficile* フラジエリンは CDAD の発症に重要な働きを担っていることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- ①Yoshino Y, Kitazawa T, Kamimura M, Tatsuno K, Ota Y, Yotsuyanagi H, Pseudomonas putida bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature, J Infect Chemother, 査読有、17卷、2011、278-282
- ②太田康男、古賀一郎、わが国および帝京大学医学部附属病院における HIV 感染症例の現状、帝京医学雑誌、査読有、33卷、2010、219-224
- ③Yoshino Y, Kitazawa T, Tatsuno K, Ota Y, Koike K, Cryptococcal Pleuritis Containing a High Level of Adenosine Deaminase in a Patient with AIDS: A Case Report, Respiration, 査読有、79卷、2010、153-156
- ④Yamamura M, Makimura K, Fujisaki R, Satoh K, Kawakami S, Nishiya H, Ota Y, Polymerase chain reaction assay for specific identification of *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*), J Infect Chemother, 査読有、15卷、2009、

214-218

⑤Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y, An essential single amino acid of Toll-like receptor 4 that is pivotal for its signaltransduction and subcellular localization, J. Biol Chem, 査読有、284卷、2009、3513-3520

⑥Yamamura M, Makimura K, Ota Y, Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for Plasmodium falciparum combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and melting curve analysis, Jap. J. Infect. Dis, 査読有、62卷、2009、20-25

⑦Okada H, Kitazawa T, Harada S, Itoyama S, Hatakeyama S, Ota Y, Koike K, Combined treatment with oral kanamycin and parenteral antibiotics for a case of persistent bacteremia and intestinal carriage with *Campylobacter coli*, Intern Med, 査読有、47卷、2008、1363-1366

〔学会発表〕(計3件)

- ①Kamimura M, Delayed removal of catheter deteriorates clinical outcome in patients with catheter-related bloodstream infection due to coagulase-negative staphylococcus, 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 10-13, 2010, Vienna
- ②Kitazawa T, Changes in platelet sizes as indicators for clinical outcome of bacteremia, 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, The 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, May 16-19, 2009, Helsinki
- ③Kitazawa T, Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of vancomycin in patients with MRSA bacteremia, 13th International Congress on Infectious Diseases, June 19-22, 2008, Kuala Lumpur, Malaysia

6. 研究組織

(1)研究代表者

太田 康男 (OTA YASUO)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号: 80292936

(2)研究分担者

なし ()

(3)連携研究者

なし ()