

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591484

研究課題名(和文) C. difficile と腸管内常在菌による腸管上皮細胞活性化の制御

研究課題名(英文) Regulation of intestinal epithelial cell activation by C. difficile flagellin and intestinal commensal bacteria

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：腸管上皮細胞モデルとして確立した単層培養した腸管上皮細胞に、トキシンBとフラジェリンの両方で刺激を行うと、それぞれの単独刺激に比べ、これらのケモカインの産生が著明に増加した。このことから、C. difficileフラジェリンは、腸管上皮細胞の活性化に関与している可能性が示唆された。また共生細菌からの刺激としてMDPに着目し、16時間前にMDPで前刺激した細胞にフラジェリン刺激を加えると、フラジェリン単独刺激と比較してIL-8の産生量は有意に低下した。このことから、共生細菌からの恒常的な刺激により、C. difficileフラジェリンによる活性化を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the molecular mechanism of the pathogenesis of CDI, especially the role of C. difficile flagellin. We also examined interaction between C. difficile and the intestinal commensal bacteria on the pathogenesis of CDI. We first analyzed the effect of C. difficile toxin B on IL-8 and CCL20 production. Interestingly, stimulation with toxin B and flagellin induced significantly higher levels of IL-8 and CCL20 compared with individual stimulation. Next, we paid our attention to MDP as stimulant from commensal bacteria. Pretreatment with MDP especially 16 hours before flagellin stimulation lead to significant decrease of IL-8 production, indicating that the cells responded little to flagellin stimulation. These results imply that interaction between C. difficile and the intestinal commensal bacteria might regulate activation of intestinal cells by C. difficile flagellin stimulation.

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：C.difficile フラジェリン MDP CDI トランス

## 1. 研究開始当初の背景

*Clostridium difficile* (*C. difficile*)は、病院内で発生する下痢症において、もっとも頻度の高い起炎菌である。環境中に存在する病原性の *C. difficile* 経口感染が感染成立の主な原因と考えられており、*C. difficile* を獲得した症例に抗菌薬が投与されると、*C. difficile* が増殖し、発症すると推測されている。*C. difficile* の感染を制御するためには、抗菌薬の適正使用とともに、病院内での感染コントロールが重要であることは言うまでもない。その一方で、欧米を中心とした強毒株の流行に見られるように、厳密な感染コントロールを行っても *C. difficile* の(院内)感染は完全には制御できない。その理由として、*C. difficile* 感染症を発症していない *C. difficile* の保菌者(キャリア)が多く存在し、これらのキャリアが保有する *C. difficile* が環境中に定着し、新たな感染を成立させていることが考えられる。*C. difficile* 感染を制御するためには、*C. difficile* の腸管への定着を遮断し、無症候性の *C. difficile* キャリアを断つ必要がある。しかしながら、*C. difficile* が腸管へ定着する分子機序および腸管に定着し、免疫寛容(キャリア状態)を維持する分子機序については、ほとんど不明のままである。

*C. difficile* は、Rho GTPase である *tcdA* および *tcdB* という 2 つのトキシンを有し、これらが *C. difficile* 感染症の発症に重要と考えられている。ハムスターの感染モデルにおいて、*tcdA* および *tcdB* を産生しない株は、腸炎を発症しないことが示されている。またヒトの *C. difficile* の無症候性キャリアでは、血清中の *tcdA* 抗体が有意に高くなっていることが報告されている。以上から、*C. difficile* の免疫寛容を享受するためには、そのトキシンのコントロールが重要と考えられる。

一方、*C. difficile* の細胞表面に存在するタンパクの一つにフラジェリンがあるが、*C. difficile* に存在するフラジェリンの病態発症における役割は従来全く不明のままであった。我々は *C. difficile* のフラジェリンを単離し、腸管上皮細胞に発現する TLR5 を介して細胞を活性化すること、およびその活性化機序を解明した。しかしながら、*C. difficile* のフラジェリンがトキシンとどのように協調して、病態の発症に関与するのかは不明のままである。また、*C. difficile* と腸管内常在菌による腸管上皮細胞活性化および活性化抑制の分子機序についても、全く解明されていない。

## 2. 研究の目的

*C. difficile* と腸管内常在菌の共存状態での腸管上皮細胞活性化および活性化抑制の分子機序の解明を行うことを目的とする。

(1) *C. difficile* フラジェリンは、腸管上皮細胞に作用して、種々のサイトカイン、ケモカインを産生させ、腸管上皮細胞を活性化させるが、*C. difficile* トキシンとどのように協調して作用し、腸管上皮細胞の活性化を制御するのかは不明のままである。従って、本研究では、*C. difficile* フラジェリンとトキシンを腸管上皮細胞に作用させ、その活性化機序を解明する。

(2) 腸管内には、共生細菌をはじめとするきわめて多量の細菌が存在する。従って、*C. difficile* は常にこれらの細菌とのクロストークが存在し、また *C. difficile* の活性化も、これらの細菌により制御されていると推測される。従って、*C. difficile* と腸管内常在菌とが共存する条件下で、*C. difficile* による腸管上皮細胞の細胞障害性の有無を検討する。さらに、その細胞障害性に *C. difficile* フラジェリンがどのように関与するか、さらには細胞障害性の程度と *C. difficile* トキシンとの相関を明らかにすることを目的とする。

(3) *C. difficile* フラジェリンは TLR5 を介して認識される。腸管上皮細胞は、*C. difficile* 以外の細菌のフラジェリンによる TLR5 を介したシグナルを受けていると推測される。従って、*C. difficile* フラジェリンに着目し、TLR5 を介する腸管上皮細胞のホモトランス、腸管内常在菌とのクロストランスが、果たして誘導されるのか、またもし誘導される場合は、その分子機序を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 腸管上皮細胞である Caco-2 細胞は単層かつ密(コンフルエント)に培養することが可能である。Caco-2 細胞を単層かつ密(コンフルエント)に培養した条件下で、0.25  $\mu\text{g/ml}$  の *C. difficile* トキシン B、および 1.0  $\text{mg/ml}$  の *C. difficile* フラジェリンあるいはコントロールで刺激する。刺激後経時的に、電気抵抗である Transepithelial electrical resistance (TEER) を測定し、細胞障害性の程度を評価する。

(2) また(1)と同様の条件下に Caco-2 細胞を培養し、*C. difficile* トキシン B 単独、*C. difficile* フラジェリン単独、*C. difficile* トキシン B+ *C. difficile* フラジェリン、およびコントロールで Caco-2 細胞を刺激する。刺激後 16 時間後にケモカインである IL-8 および CCL20 の産生量を ELISA 法で測定し、活性化の程度を比較検討する。

(3) 腸管内に存在する細菌は、MDP を共通に発現している。そこで、共存する細菌からのシグナルの代表として、MDP に着目し、フラ

ジェリンとMDPがどのように腸管上皮細胞を活性化させるのかを検討した。第一に、フラジェリンとMDP(10 $\mu$ g/mL)を同時刺激した際の活性化の程度を、IL-8の産生量を指標にして、フラジェリン単独刺激の場合と同時刺激の場合を比較検討する。

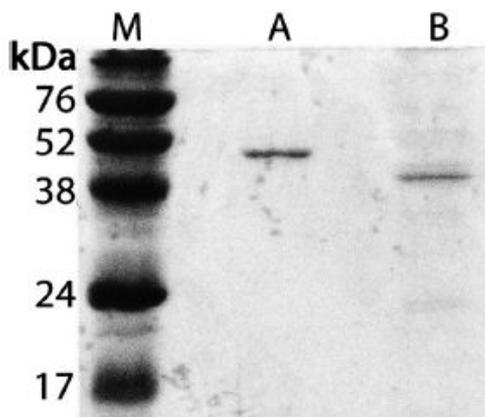
(4)(3)と同様の条件であるが、フラジェリンとMDPを異時刺激させた際の細胞の活性化の程度を検討する。腸管上皮細胞は常に大量の腸管内の細胞からの誌シグナルを受けていると考えられるため、MDP(10 $\mu$ g/mL)をフラジェリンよりも先行刺激した際のIL-8の産生量を活性化の指標として検討する。種々の時間でMDPを先行刺激させ、その後フラジェリンで刺激を行い、IL-8の産生量をELISA法で測定する。これらの実験によりIL-8の産生量低下、すなわちトレランスが認められた場合は、その分子機序の解明を試みる。すなわち、NF- $\kappa$ B活性化をルシフェラーゼアッセイで解析し、p38などのMAPKのリン酸化の程度はウエスタン・ブロット法などで比較検討する。またトレランスが認められた場合、MDPの細胞内受容体であるNOD2を介しているかどうかを検証する目的で、siRNAを用いてNOD2の発現を抑制し、この条件下で、MDPを先行刺激させ、その後*C. difficile*フラジェリンで刺激を行い、IL-8の産生量をELISA法で測定する。これにより、この経路がトレランスの発現に関与しているかどうかを検証する。

#### 4. 研究成果

(1)*C. difficile*を嫌気培養し、増殖させ、それを用いて*C. difficile*フラジェリンを単離した。図1に単離した*C. difficile*フラジェリンを電気泳動したものを示す。Aはコントロールとして、購入したサルモネラのフラジェリンを、Bは単離した*C. difficile*フラジェリンを示す。

(図1)

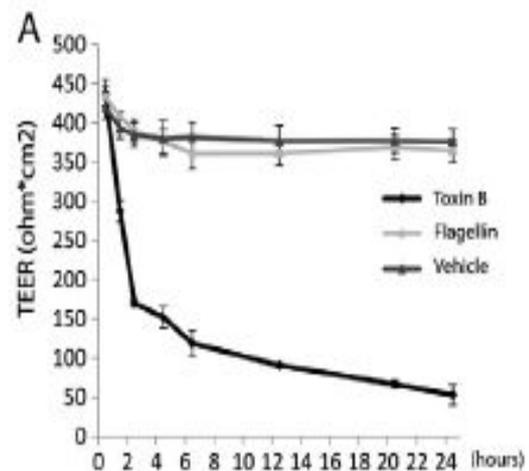
単離した*C. difficile*フラジェリン(B)  
(Aはコントロールとしてサルモネラのフラジェリンを示す。)



(2)*C. difficile*フラジェリンがCDIの発症にどのように関わるか、すなわち増悪因子なのか抑性因子なのかという点は完全に解明されていない。腸管上皮細胞モデルとして確立した、単層培養した腸管上皮細胞Caco-2細胞に、*C. difficile*トキシンであるtcdB、*C. difficile*フラジェリンあるいはコントロールで刺激を行い、経時的にTransepithelial electrical resistance (TEER)を測定した。*C. difficile*フラジェリン刺激では、コントロールと同様TEERの低下を認めなかったが、*C. difficile*トキシンB刺激では、TEERの低下、すなわち腸管上皮細胞のバリアーが破壊されたことが確認された(図2)。

(図2)

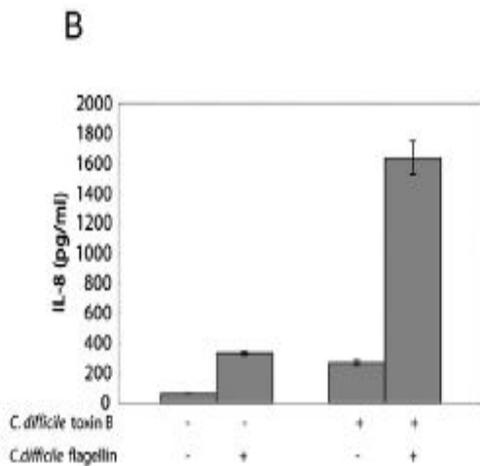
単層培養した腸管上皮細胞に*C. difficile*トキシン、*C. difficile*フラジェリンで刺激後のTEERの経時的变化



次に腸管上皮細胞モデルとして確立した、単層培養した腸管上皮細胞に*C. difficile*トキシンであるtcdBと*C. difficile*フラジェリンの両方あるいは単独で細胞を刺激し、ケモカインIL-8とCCL20の産生を検討した。tcdBあるいは*C. difficile*フラジェリンの単独刺激でも、コントロールに比べIL-8の産生量は亢進が認められた(図3)。tcdBと*C. difficile*フラジェリンの両方で刺激を行うと、それぞれの単独刺激に比べ、IL-8の産生が著明に増加した(図3)。

(図3)

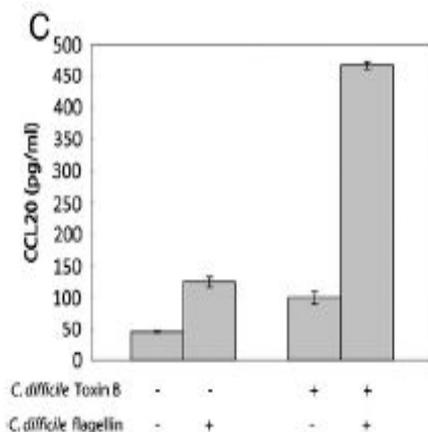
単層培養した腸管上皮細胞に*C. difficile*トキシン、*C. difficile*フラジェリンで刺激後のIL-8の産生量の比較検討



CCL20 の産生量についても全く同様であり、tcdB あるいは *C. difficile* フラジェリンの単独刺激でも、コントロールに比べ CCL20 の産生量は亢進が認められたが (図 4)、tcdB と *C. difficile* フラジェリンの両方で刺激を行うと、それぞれの単独刺激に比べ、CCL20 の産生が著明に増加した (図 4)。これらの結果は、*C. difficile* フラジェリンとトキシンは、協調して腸管上皮細胞の活性化に関与していることを示している。

(図 4)

単層培養した腸管上皮細胞に *C. difficile* トキシン、*C. difficile* フラジェリンで刺激後の CCL20 の産生量の比較検討



さらに腸管上皮細胞の TLR5 の発現量を減少させると、これらのケモカインの産生も減少した。従って、*C. difficile* フラジェリンは TLR5 を介して、CDI において少なくとも炎症の亢進、増悪に関与している可能性が推測された。

(3) 腸管内には大量の commensal bacteria (共生細菌) が存在し、これらからの刺激により、免疫寛容が引き起こされている可能性が推測される。Muramyl dipeptide(MDP)は、

Gram 陽性と Gram 陰性の両方の細菌を構成するペプチドグリカンであり、核内受容体 NOD2 を介して細胞を活性化することが知られている。そこで、共生細菌からの刺激として MDP に着目し、MDP により腸管上皮細胞などの細胞を前刺激し、その後フラジェリンで刺激を行った場合、細胞の活性化がどのように制御されるかについて検証を行った。

MDP (10  $\mu$ g/mL) とフラジェリンを同時刺激しても、フラジェリン単独刺激と比較して IL-8 の産生量は亢進しなかった。すなわち、MDP とフラジェリンの同時刺激は、細胞の活性化に影響を与えないと考えられた。

しかしながら、16 時間前に MDP で前刺激した細胞にフラジェリン刺激を加えると、フラジェリン単独刺激と比較して IL-8 の産生量は有意に低下した。すなわち、MDP の前刺激により、不応答の状況になっていると考えられた。またこのトレランスが誘導される条件下では、NF- $\kappa$ B 活性と p38 のリン酸化の抑性が認められた。従って、IL-8 の産生には主としてこれらの経路が関与していると推測された。さらに siRNA で NOD2 の発現を抑制し、同様な条件で細胞を刺激すると、IL-8 の産生量は元のレベルにまで回復した。このことから、このトレランスの発現には NOD2 が関与していると考えられた。

(まとめ)

*C. difficile* フラジェリンは、*C. difficile* トキシンと協調し、腸管上皮細胞の活性化に関与していると考えられた。その詳細な機序は不明であるが、*C. difficile* トキシンの作用により、粘膜バリアーの破綻が生じ、受容体である TLR5 に *C. difficile* フラジェリンがよりアクセスしやすくなるなどの可能性が推測される。

MDP の作用により、フラジェリン刺激に対する応答性が低下することが示された。このことは、抗菌薬の投与のない通常の状態では、CDI が発症しにくいことに関する機序の一つを説明していると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, Yotsuyanagi H, Ota Y. Clostridium difficile flagellin stimulates toll-like receptor 5, and toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5. Life Sci. 92:211-217: 2013. DOI:10.1016/j.lfs.2012.11.017

Kitazawa T, Yoshino Y, Koga I, Isono A, Yamamoto T, Kuyama Y, Ota Y. Incidence of Clostridium difficile-associated diarrhea in patients using proton pump inhibitors: A Japanese study. Open Journal of Gastroenterology, 3; 276-280: 2013.

DOI:10.4236/ojgas.2013.35047

〔学会発表〕(計 2 件)

Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, Yotsuyanagi H, Ota Y, Clostridium Difficile Flagellin Activates Intestinal Epithelial Cells via Toll-like Receptor 5, 13<sup>th</sup> International Union Microbiological Societies, Sep 6-16, 2011, Sapporo,

Kitazawa T, Yoshino Y, Yamamoto T, Kuyama Y, Ota Y, Does use of proton pump inhibitors increase incidence of

Clostridium difficile-associated diarrhea?: a Japanese study, The 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sep. 17-20, 2011, Chicago.

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