

中川知亮より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号乙第 2712 号

学位申請者 : なか がわ とも あき
 : 中 川 知 亮

学位審査論文 : Endogenous IL-17 as a factor determining the severity of
Clostridium difficile infection in mice

(クロストリジウムディフィシル感染症の重症度決定に関
わる内因性インターロイキン 17)

著 者 : Tomoaki Nakagawa, Nobuaki Mori, Chiaki Kajiwara, Soichiro Kimura,
Yoshikiyo Akasaka, Yoshikazu Ishii, Tsutomu Saji, Kazuhiro Tateda

公 表 誌 : Journal of Medical Microbiology 65 (8) 821-827, 2016

論文内容の要旨 :

【背景】 *Clostridium difficile* 感染症 (CDI) は、医療関連施設における感染症として欧米を中心に深刻な問題となっている。*C. difficile* はトキシン A、B、バイナリートキシンを産生することにより、宿主の腸管粘膜細胞を傷害し、強固な炎症反応を惹起する。CDI の病態において好中球は重要であり、臨床的に白血球増多症や感染局所に多数の好中球浸潤が認められるのが特徴である。好中球浸潤が宿主感染防御に寄与するという報告があるのに対し、過剰な好中球の活性化は粘膜傷害を増大させるとする報告もあり、未だ結論が出ていない。インターロイキン (IL)-17 は自然免疫と獲得免疫を橋渡しする炎症促進性サイトカインである。IL-17 ファミリーには 6 つのサブタイプがあり、IL-17A と IL-17F は最も研究されている。IL-17 は好中球遊走や抗菌ペプチド産生を促進して感染防御作用を担う一方、乾癬や炎症性腸疾患 (IBD) などの自己免疫炎症性疾患では制御されない持続的な IL-17 産生が、それらの病態に関連している。本研究では、CDI における IL-17 の役割について検討した。

【方法】 CDI マウスモデルを用いて、野生型 BALB/c (WT) マウスと同系統の IL-17A/F ダブルノックアウト (IL-17 KO) マウスに抗菌薬を含有した飲み水の投与および腹腔内注射を施した後、*C. difficile* BI/NAP1/027 株を 5.0×10^5 - 1.0×10^6 cfu の菌量で感染させた。感染後の生存率、体重減少率、下痢スコアリング (0 点 : 普通便、1 点 : 軟便、2 点 : 泥状便、3 点 : 水様便)、大腸の重量 (g) / 腸管長 (cm) 比率、腸管病理像、炎症性メディエーター産生、大腸粘膜に占める炎症細胞分画について比較した。

【結果】 *C. difficile* 感染から 3 日後に採取した WT と IL-17 KO マウスの便中菌数は両群ともおよそ 1,000 倍に増加していたが、

IL-17 KO マウスは WT マウスに比して生存率は有意に高く、体重減少率は軽度だった。すべての WT マウスが水様便を呈したのに対して、IL-17 KO マウスでは40%が呈したのみだった。また、大腸の重量/腸管長比率は WT マウスが IL-17 KO マウスに比して有意に高値だった。WT マウスの腸管肉眼像は IL-17 KO マウスと比較してより強い赤色を呈していた。これはうっ血、血管透過性亢進、微小出血によるものと考えられた。病理組織像では、WT マウスにおいて腸管粘膜細胞損傷、粘膜下浮腫、フィブリン合成、炎症細胞浸潤といった炎症性変化が一貫して IL-17 KO マウスよりも強く認められた。リアルタイム定量PCRで IL-1 β 、G-CSF、IL-6、CXCL2 の遺伝子発現レベルは IL-17 KO マウスで WT マウスよりも低い傾向があり、同様に ELISA ではこれらの炎症性メディエーターのタンパク産生は有意に低かった。非感染 WT マウスの IL-17 A 産生の平均は 0.47ng/ml、IL-17 F は 1.11ng/ml、感染 WT マウスでは IL-17 A 0.95ng/ml、IL-17 F 2.23ng/ml だった。フローサイトメトリーで大腸粘膜に存在する炎症細胞の割合を調べた所、マクロファージは WT マウスと IL-17 KO マウスで同程度だったが、好中球は WT マウスで IL-17 KO マウスに比して有意に多く存在した。

【考察】 今回の結果から、内因性 IL-17 は CDI の病態に関与し、IL-17 KO マウスは WT マウスよりも CDI に対する感受性が低いことが示された。IL-17 非存在下の CDI では、他の炎症性メディエーター産生と感染局所への好中球遊走が抑制され、そのために組織傷害が緩和されると考えられた。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2712 号	氏 名	中 川 知 亮
学位審査担当者	主 査	瓜 田 純 久
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	前 谷 容
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	岡 住 慎 一

学位審査論文の審査結果の要旨 :

抗菌薬の進歩により多くの感染症への対応が可能になってきたが、一方で *Clostridium difficile* 感染症 (CDI) のように臨床において新たな問題となる感染症への対応も求められている。その発症機序は細菌が増殖して腸管上皮細胞に傷害を与える場合と、免疫応答によって惹起される炎症によって傷害が進行する場合があります、とくにトキシンの病原性は後者によるものと考えられている。自然免疫と獲得免疫を橋渡しするのは CD4+細胞から分化する Th1, Th2, そして Th17、制御性 T 細胞があり、これらは転写因子やサイトカインの依存性が異なり、相互排他的に作用し、免疫応答を制御している。このなかで、Th17 細胞が産生する IL-17 は好中球遊走や抗菌ペプチド産生を促進して感染防御を担う一方、自己免疫疾患の発症や増悪に関連している。今回、野生型 BALB/c (WT) マウスと同系統の IL-17A/F ダブルノックアウト (IL-17 KO) マウスに *C. difficile* BI/NAP1/027 株を 5.0×10^5 - 1.0×10^6 cfu の菌量で感染させ、CDI における IL-17 の役割について検討した。抗菌薬を含有した飲み水の投与および腹腔内注射を施した後、経口的に感染させた *C. difficile* は 3 日後に 1,000 倍に増加していたが、IL-17 KO マウスは生存率は有意に高く (Fig1a)、水様便も 40% と少なく (Fig1b)、体重減少率は軽度であった (Fig1c)。また、大腸の重量/腸管長比率が有意に低値であり (Fig2a)、腸管肉眼像でもうっ血、血管透過性亢進、微小出血を示唆する赤色変化は軽度であった (Fig2b)。病理組織像でも腸管粘膜細胞損傷、粘膜下浮腫、フィブリン合成、炎症細胞浸潤といった炎症性変化が軽度であった (Fig2c)。リアルタイム定量 PCR で IL-1 β 、G-CSF、IL-6、CXCL2 の遺伝子発現レベルは IL-17 KO マウスで WT マウスよりも低い傾向があり (Fig3a)、ELISA ではこれらの炎症性メディエーターのタンパク産生は有意に低値であった (Fig3b)。大腸粘膜のマクロファージに差はなかったが、好中球は IL-17 KO マウスにおいて有意に減少していた (Fig4)。IL-17 が存在しない腸管での CDI では炎症性メディエーター産生と好中球遊走が抑制され、組織傷害が緩和されると考えられた。内因性 IL-17 は CDI の重症化に関与し、CDI 対策として新たな糸口となる可能性が示唆された。審査員から、腸管短縮と組織所見との関連性、腸管が短縮する機序、CDI の自然経過および死亡に至る機序、抗菌ペプチド発現量、IL-23 の関与、IL-17 を選択した理由、クローン病における IL-17 の役割の違い、マウスにヒト由来 CD を投与する手法やマウス系統差の影響、経口投与によって感染が成立した CDI モデルの意義、食餌摂取量や飲水量など、多くの質問が出されたが、それぞれ丁寧かつ的確に回答していた。CDI 重症化に関する IL-17 の役割を明らかにした価値ある論文であり、多くの価値ある議論を生み、さらなる研究発展に繋がる貴重な論文と審査員の意見は一致し、学位に相当すると結論し、審査会は終了した。