

# 東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Clostridioides difficile toxins enhanced the in vitro production of CXC chemokine ligand 2 and tumor necrosis factor via Toll like receptors in macrophages
別タイトル	Clostridioides difficile 毒素は、マクロファージにおいて、Toll 様受容体を介し、CXCL2 およびTNF の産生を増強する
作成者（著者）	マッキー(小西)弘恵
公開者	東邦大学
発行日	2022.03.16
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：前谷容 / タイトル：Clostridioides difficile toxins enhanced the in vitro production of CXC chemokine ligand 2 and tumor necrosis factor via Toll like receptors in macrophages /著者：Hiroe Konishi McKee, Chiaki Kajiwara, Tetsuo Yamaguchi, Yoshikazu Ishii, Norikazu Shimizu, Akira Ohara, Kazuhiro Tateda /掲載誌：Journal of Medical Microbiology /巻号・発行年等：70(4): 2021 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1028号
学位記番号	甲第707号
学位授与年月日	2022.03.16
学位授与機関	東邦大学
DOI	10.1099/jmm.0.001342
その他資源識別子	<a href="https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001342">https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001342</a>
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD52103574">https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD52103574</a>

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

マッキー (小西) 弘恵より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 707 号

学位申請者 : ま っ き ー      こ に し      ひ ろ      え  
マ ッ キ ー      (小西)      弘      恵

学位論文 : *Clostridioides difficile* toxins enhanced the *in vitro* production of CXCL2 chemokine ligand 2 and tumor necrosis factor- $\alpha$  via Toll-like receptors in macrophages

(*Clostridioides difficile* 毒素は、マクロファージにおいて、Toll 様受容体を介し、CXCL2 および TNF- $\alpha$  の産生を増強する)

著 者 : Hiroe Konishi McKee, Chiaki Kajiwara, Tetsuo Yamaguchi, Yoshikazu Ishii, Norikazu Shimizu, Akira Ohara, Kazuhiro Tateda

公 表 誌 : Journal of Medical Microbiology 70(4): 2021  
DOI: 10.1099/jmm.0.001342

論文内容の要旨 :

*Clostridioides difficile* (CD) は、下痢症や偽膜性腸炎のような、毒素による腸管炎症を引き起こす。小児においては保菌率が高く、毒素産生を認めても病原性は低いと言われていたが、近年とくに基礎疾患を有する小児の CD 感染症が問題となってきた。CD の毒素としては、トキシン A(TcdA)、トキシン B(TcdB)、第三のトキシンと呼ばれるバイナリートキシン(CDT)の3種類が知られている。CDT を産生する菌株では重症化が高くなることや、CDT が腸管上皮細胞への接着に関与することが判明しているものの、いまだに未解明な部分も多い。特にこの毒素が宿主免疫応答に対してどのような影響を与えるかについての報告数は少ない。今回、リコンビナント TcdA、TcdB、CDT を用いて、これらの CD 毒素がどのようにマクロファージに作用するかを調べた。

まず、RAW264.7 細胞(マウスのマクロファージ系培養細胞)における CD 毒素の影響を調べたところ、TcdA、TcdB、CDT をそれぞれ培養液中に添加すると、いずれの毒素においても用量依存性、時間依存性に CXCL2 および TNF- $\alpha$  の産生を増強することを確認した。一方で、DC2.4 細胞(マウスの樹状細胞系培養細胞)に同様の実験を行なったところ、いずれの毒素においても CXCL2

およびTNF- $\alpha$ の産生は増強しなかった。次に、この炎症性サイトカイン産生誘導が、リポ多糖(LPS)の混入による影響を受けていないことを確認するため、リポ多糖の拮抗阻害薬であるポリミキシン B を用いた実験を行なった。リポ多糖で刺激したRAW264.7細胞は、ポリミキシン B 添加によってCXCL2産生の著明な抑制を認めたが、TcdA、TcdB、CDT 添加ではポリミキシン B によるCXCL2産生への影響は認めなかった。

続いて、炎症性サイトカイン産生誘導に重要なアダプター分子である、MyD88 に対する阻害剤を用いた実験を行なった。RAW264.7細胞にMyD88阻害剤を添加することにより、毒素刺激後のCXCL2およびTNF- $\alpha$ の産生量が抑制されたことから、MyD88を介していることが示唆された。さらに、どの細胞表面受容体が毒素を認識するのかを調べるために、Toll様受容体2(TLR2)およびToll様受容体4(TLR4)に対する抗体を用いた実験を行なった。抗TLR2抗体、または抗TLR4抗体存在下で、CXCL2およびTNF- $\alpha$ 産生がそれぞれ濃度依存性に抑制されることを確認した。これらの結果から、RAW264.7細胞において、TLR2、またはTLR4とそれらのアダプター分子であるMyD88経路でCXCL2およびTNF- $\alpha$ が産生されることが示唆された。

最後に、TLR2プラスミド単独またはTLR4/MD2/CD14の3つのプラスミドを、リポフェクタミン試薬で導入したHEK293T細胞を用いた実験を行なった。TLR2プラスミドを導入したHEK293T細胞では、TcdA、TcdB、CDT 添加のいずれにおいてもIL-8(マウスCXCL2のホモログ)の産生は確認されなかったが、TLR4/MD2/CD14プラスミドを導入したHEK293T細胞では、TcdBまたはCDT刺激でIL-8の産生が確認された。これらの結果から、ヒトの細胞においては、毒素刺激後にTLR4経路でIL-8が産生されることが示唆された。

我々の結果は、CDTはTcdA、TcdBと同様に、TLR2またはTLR4を介して、マクロファージ由来するCXCL2およびTNF- $\alpha$ の産生を増強することを示しており、CDTが宿主免疫反応に影響する可能性を示唆した。CDTの作用や役割については研究段階である部分も多く、今回の実験結果が今後の病態解明に役立つと考えられた。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 707 号	氏 名	マッキー (小西) 弘 恵
学位審査担当者	主 査	前 谷 容
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	松 瀬 厚 人
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	三 上 哲 夫

学位論文の審査結果の要旨 :

*Clostridioides difficile* (CD) 感染症は、CD 毒素により薬剤性下痢や偽膜性腸炎等の腸管炎症を引き起こす。CD 毒素にはトキシン A(TcdA)、トキシン B(TcdB)、バイナリートキシン(CDT)の3種類があるが、中でも CDT は未解明な部分が多い。本研究では、CDT によるマクロファージへの作用について、TcdA、TcdB との違いを含め検討した。まず、RAW264.7 細胞培養液中に TcdA、TcdB、CDT を注入すると用量依存性、時間依存性に CXCL2 および TNF- $\alpha$  の産生が増加した。次に、RAW246.7 細胞において、TLR2、TLR4 中和抗体、MyD88 阻害剤投与下に CXCL2 および TNF- $\alpha$  の産生をみたところ、3 種のトキシン刺激の全てで抑制された。最後に、TLR2 プラスミドまたは TLR4/MD2/CD14 の3種プラスミドを導入した HEK(ヒト胎児腎細胞)293T 細胞を用いて IL-8 の産生誘導を見ると、TLR2 プラスミド導入 HEK293T 細胞では、トキシン添加で IL-8 産生がなかったのに対し、TLR4/MD2/CD14 プラスミド導入 HEK293T 細胞では、TcdB または CDT 添加で IL-8 の産生が確認された。以上の結果から、CDT は TcdA、TcdB と同様にマクロファージに作用し、炎症性サイトカインやケモカインの産生を促し腸炎を惹起している可能性が示唆された。また細菌感染は TLR に働きかけサイトカイン産生による炎症反応が起こるとされ、CDT の炎症誘導は TcdA、TcdB と同じく TLR2、TLR4、MyD88 経由で引き起こされる。そして、ヒトの細胞においては、TcdB、CDT 刺激後に TLR4 経由で IL-8 が産生されることが示唆された。本研究結果は、CDT は TcdA、TcdB と同様に、TLR2 または TLR4 を介して、マクロファージに由来する CXCL2 および TNF- $\alpha$  の産生を増強することを示しており、CDT が宿主免疫反応に影響する可能性を示した。

2021 年 12 月 24 日に審査委員全員参加の下で学位審査会が開催された。申請者のプレゼンテーションに引き続き、質疑応答が行われた。本研究では RAW246.7 で行われているが、どのような細胞で行うと理想的と考えられるか? 偽膜性腸炎に最も関与するトキシンはどれか? CDT には直接細胞障害性はあるのか? DC2.4 を使った実験において、CDT では上昇があるようにみえるが実際はどうだったのか? 臨床へのフィードバックとしてどのような応用が考えられるか? などの質問に対して、申請者はすべての的確に回答した。本研究は CDI における CDT を含めた CD 毒素がどのようにマクロファージに作用するかを明らかにした意義のある研究であり、審査委員全員一致で本論文は学位に相応しいと結論し、学位審査会を終了した。