

Mini Review

Clostridium difficile toxin A 誘発腸炎における
サイトカインの役割—IFN- γ の生物学的役割より—石田裕子^{1,2)}, 近藤稔和²⁾, 向田直史¹⁾¹⁾金沢大学がん研究所組織分子構築分野²⁾和歌山県立医科大学法医学教室*The pathogenic roles of IFN- γ in Clostridium difficile toxin A-induced enteritis*

Clostridium difficile (*C. difficile*) is a major causative agent of antibiotics-associated diarrhea and pseudomembranous colitis in humans. Pathogenic strains of *C. difficile* release toxin A, which is referred as enterotoxin due to its capacity to disrupt intestinal epithelial structure. Toxin A causes tissue damages directly by glucosylation of Rho and indirectly by inducing massive infiltration of neutrophils. We previously observed that interferon (IFN)- γ -deficient mice exhibited less neutrophil infiltration and tissue damages in several types of acute inflammation in liver. These observations prompted us to explore the roles of IFN- γ in toxin A-induced acute enteritis model. Injection of toxin A into ileal loops caused massive fluid secretion, disruption of epithelial structure, and massive neutrophil infiltration in wild-type(WT) mice, accompanied with increases in IFN- γ mRNA expression and protein contents in the intestine. A double-color immunofluorescence analysis detected IFN- γ protein in infiltrating neutrophils and to a lesser degree, CD3-positive lymphocytes. On the contrary, toxin A failed to induce fluid secretion, disruption of intestinal epithelial structure, and neutrophil infiltration in IFN- γ -deficient mice. Similarly, pretreatment of neutralizing anti-IFN- γ antibody prevented toxin A-induced enteritis. These observations suggest that IFN- γ is a good molecular target for the control of *C. difficile*-associated pseudomembranous colitis.

Rec.1/7/2005, Acc.6/16/2005, pp507-511

Yuko Ishida^{1,2)}, Toshikazu Kondo²⁾, Naofumi Mukaida¹⁾¹⁾Division of Molecular Bioregulation, Cancer Research Institute, Kanazawa University²⁾Department of Forensic Medicine, Wakayama Medical University**Key words** *Clostridium difficile*, inflammation, neutrophils, cytokines, IFN- γ

はじめに

「炎症性腸疾患」は潰瘍性大腸炎やクローン病に代表されるが、広義には腸結核、アメーバ赤痢などの感染性のもや抗生物質に起因する腸炎なども含まれる。いずれの炎症性腸疾患の発症においても、遺伝的素因(遺伝的変異)・免疫学的要因(粘膜免疫の異常, 自己免疫)・環境因子(食事, 腸内細菌)などが関与していると考えられるが、発症機序は未だ不明である。

Clostridium difficile(*C.difficile*)は芽胞を形成するグラム陽

性の偏性嫌気性桿菌で、偽膜性大腸炎の重要な病原体の一つである。*C. difficile*が原因で生じる偽膜性大腸炎は、抗生物質による治療の合併症として知られており、米国だけでも年間300万件以上発生しているといわれている^{1,2)}。抗生物質投与による腸内細菌叢の変化に伴い、異常繁殖した*C.difficile*がトキシンA, トキシンBの2種類の毒素を産生し、偽膜性大腸炎を引き起こす³⁾。主な症状はトキシンAによると考えられており、内視鏡検査では円形に隆起した黄白色の偽膜が認められ、下痢・腹痛・発熱を伴う

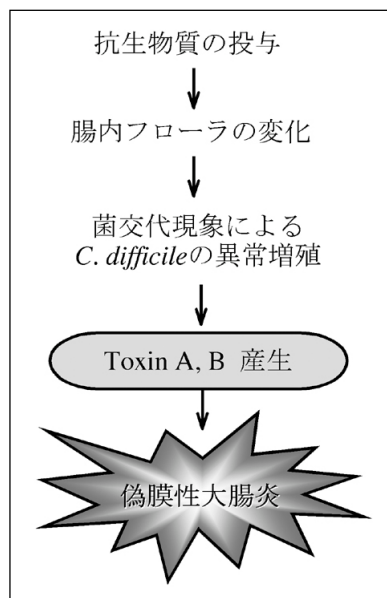


図1 抗生物質関連偽膜性大腸炎
抗生物質の投与によって腸内細菌叢の変化が起こると、菌交代現象によって異常繁殖した *C. difficile* が、毒素(トキシンA, トキシンB)を産生し、偽膜性大腸炎を発症する。

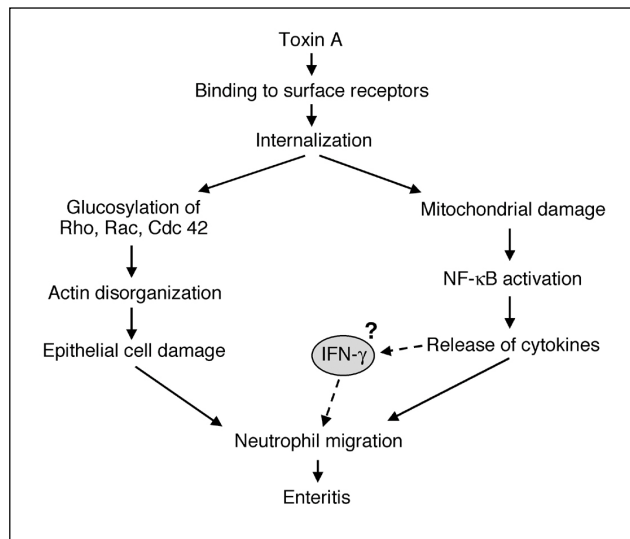


図2 トキシンA誘発腸炎の発症機序

現在、トキシンA誘発腸炎の発症には、Rho glucosylationによる系と、NF- κ B活性化による系の2通りが示唆されている(文献5より改変引用)。筆者らは、特に炎症性サイトカインであるIFN- γ の関与について検討を行った。

重篤な偽膜性大腸炎を発症する(図1)。また、高齢者や術後の患者で重症に陥ることが多く、時に死に至ることもあることから、高齢化の進む日本でも医原性感染症の一つとして注目を集めている。

現在、*C. difficile*による偽膜性大腸炎の主な治療法は、原因抗生物質の投与中止と*C. difficile*に抗菌作用を示すバンコマイシンの投与である。しかしながら、治療が不完全であったためによる再燃や、治療後に再び*C. difficile*を獲得して発症する再感染の可能性が決して低くはないことから、新たな治療法の開発が望まれている⁴⁾。近年、抗tumor necrosis factor(TNF)- α 抗体がクローン病に著明な効果を示すことが明らかとなるとともに、interleukin(IL)-6を標的とした治療の臨床応用が試みられるなど、サイトカインを標的とした治療が炎症性腸疾患に対して有効であると考えられるに至っている。したがって、*C. difficile*による偽膜性大腸炎においても炎症性サイトカインを標的とする生物製剤治療は効果的で、おそらく副作用が少ない治療法となり得る可能性があると考えられる。

近年の免疫学・分子生物学、またその実験法の進歩に伴う動物モデルの詳細な解析により、*C. difficile*による偽膜性大腸炎の発症メカニズムも徐々に解明されつつある⁵⁾。しかしながら、腸管粘膜は常時ウイルス・細菌などの微生物・異物の侵入などに曝されており、生体防御機構の

解析には困難な点が多い。生体防御機構としての炎症とその制御についてのより詳細な解析が、病態解明および治療法確立において重要であると考えられる。

*C. difficile*トキシンAによる偽膜性大腸炎の発症機序

腸管におけるトキシンAのレセプターは未だ特定されていないが、トキシンAが細胞膜のレセプターに結合すると数分以内に侵入が始まり、低分子GTP結合タンパク質であるRhoファミリーのglucosylationを引き起こし、アクチン分子の重合を破壊することが知られている。その結果、粘膜上皮細胞のアポトーシスやネクローシスが誘導され、粘膜障害が生じる^{5,6)}。

トキシンAによる腸炎では、ヒト・実験動物ともに、好中球を主体とする炎症細胞の浸潤を伴った腸管上皮細胞の破壊が、病理組織学的な特徴である。細胞内に侵入したトキシンAはミトコンドリア傷害も引き起こすことによって、転写因子であるNF- κ Bの活性化を誘導し、種々の炎症メディエーターを産生するとされている⁷⁾。したがって、好中球の集積には、炎症性サイトカインおよびケモカインが深く関与し、結果的に腸管の組織傷害に重要な役割を果たしていると考えられる。また、NF- κ Bを介した炎症反応の惹起はRho glucosylation非依存的に起きている

と考えられるが、その機序は完全には解明されていないのが現状である(図2)^{5,6)}。

トキシンA誘発腸炎における好中球の関与

トキシンA誘発腸炎の発症および病態に中心的な役割を担っていると考えられる好中球の重要性は、動物モデルを用いた解析から明らかになってきている。動物モデルにおいては、腸管内への水分貯留と同時に著明な好中球浸潤が認められる。白血球インテグリンのβサブユニットであるCD18の中和抗体投与により好中球浸潤が減弱し、その結果水分貯留および腸炎が軽減した⁸⁾。好中球を枯渇させたラットでも腸炎の軽減が報告されている⁹⁾。これらのことは、トキシンA誘発腸炎の発症には、トキシンAによる直接的な粘膜上皮細胞傷害作用以外に、浸潤してきた好中球を介した組織傷害が関与していることを示唆している。

トキシンA誘発腸炎におけるサイトカイン・ケモカインの関与

種々の炎症性サイトカイン・ケモカインが、トキシンA誘発腸炎の発症や病態に関与していると考えられている。強力な好中球遊走活性を有しているIL-8は、トキシンA刺激によりヒト腸管細胞での産生が亢進する¹⁰⁾。また、ラットの腸管上皮では、トキシンA投与後30分の早期からIL-8の機能的なホモログであるmacrophage inflammatory protein(MIP)-2のmRNA・タンパクの増加に伴い、好中球浸潤や水分貯留量も増加した。MIP-2の発現レベルが炎症の程度と相関するのみならず、抗MIP-2抗体投与によって、これらの変化が軽減されたことから、MIP-2はトキシンA誘発腸炎の早期メディエーターであると考えられている¹¹⁾。また、MIP-2産生はTNF-α刺激で増強されるが、実際トキシンAを投与した野生型マウスの腸管ではTNF-α発現も亢進しており、これらサイトカイン・ケモカインの共同作用によって、好中球浸潤を惹起しているものと考えられる¹²⁾。

さらに、マウス腸管へのトキシンA投与によりMIP-1αおよびregulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted(RANTES)の発現亢進が認められ、これらケモカインのレセプターであるCC chemokine receptor 1(CCR1)を欠損したマウスでは、トキシンA誘発腸炎が軽減することが報告されている¹³⁾。CCR1欠損マウスでは、好中球のMIP-1αに対する遊走活性が失われていることから、その結果として炎症が抑制され、腸炎が軽減されたと考えられる。MIP-1α遺伝子欠損マウスや、RANTESのアンタゴニスト投与実験でも同様の結果が得られている。

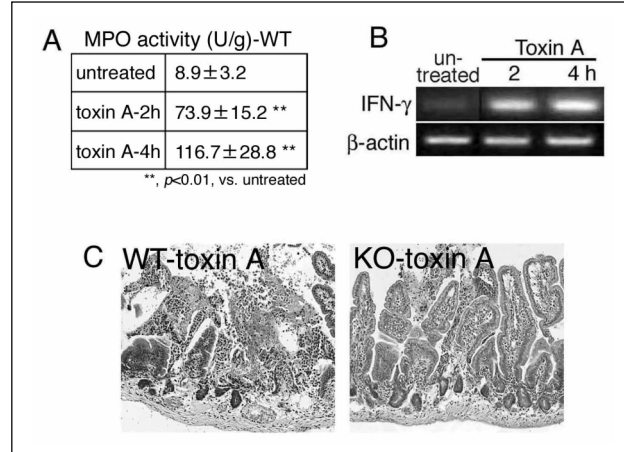


図3 トキシンA投与により、野生型マウス腸内におけるミエロペルオキシダーゼ活性(MPO activity, 好中球浸潤の指標)(A), およびIFN-γの遺伝子発現(B)が増加し、著しい腸粘膜組織の破壊が認められた(C-WT, HE)。一方、IFN-γ遺伝子欠損マウスでは、組織破壊の程度は軽度であった(C-KO HE)。(詳しくは文献12参照)

MIP-1αやRANTESの発現亢進は、他の種々の炎症性腸疾患モデルにおいても認められており、さらにはCCR1によるシグナル伝達には好中球の遊走だけでなく、Th1/Th2免疫応答のバランスも制御している可能性が示唆されていることから、これらケモカインが好中球のみならず、腸粘膜内のTリンパ球の動態を制御することを通して、トキシンA誘発腸炎の発症に関与している可能性も考えられる。しかしながら、これらの点については、今後のさらなる検討が必要であると考えられる。

トキシンA誘発腸炎におけるIFN-γの役割

IFN-γは、代表的な炎症性サイトカインであり、抗ウイルス作用、マクロファージやNK細胞の活性化、マクロファージ上のMHC抗原の発現亢進など大変広範囲な生理活性を有している¹⁴⁾。また、Th1免疫応答の中心的役割を担っていることから、特にクローン病を含む様々なTh1優位な慢性炎症に関与していると考えられている^{15,16)}。近年筆者らは急性肝障害モデルにおける炎症反応において、IFN-γが中心的メディエーターとして働いていることを見出し、IFN-γ欠損マウスでは、好中球浸潤の減弱に伴い組織傷害が軽減することを報告している¹⁷⁾。

野生型マウスの腸管にトキシンAを投与すると、水分貯留の増加と著明な好中球浸潤を認めた。この時、それらに伴ってIFN-γのmRNAおよびタンパク発現が腸管内で著明に増加しており、浸潤好中球と粘膜固有層のリンパ球とでIFN-γタンパクが検出された(図3)¹²⁾。TNF-α

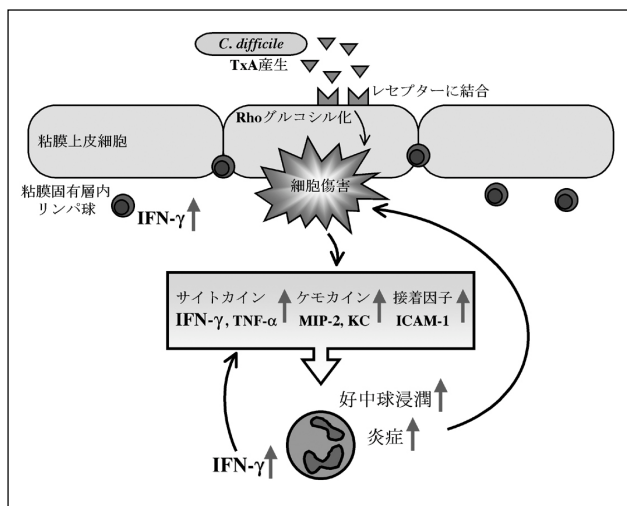


図4 トキシンA誘発腸炎におけるIFN-γの関与
トキシンA誘発腸炎の発症および病態には、好中球を主体とする炎症細胞を介した腸管上皮細胞傷害作用があり、その過程でIFN-γが重要な役割を担っていることが示唆された。(詳しくは文献12参照)

や種々のケモカイン、ICAM-1のmRNA発現の亢進も認め、これらは好中球浸潤および粘膜傷害の程度と関連していた。一方、IFN-γ欠損マウスにトキシンAを投与したところ、種々のサイトカイン・ケモカインmRNA発現亢進の減弱に伴って、好中球浸潤・水分貯留のみならず、腸粘膜組織の破壊もほとんど認められなかった(図3)。同様の結果は、抗IFN-γ抗体を前投与した野生型マウスの腸管に、トキシンAを投与した時にも認められた。

IFN-γは、TNF-αとの相乗作用によって腸管細胞からのIL-8やKCの産生を増強させる^{18,19)}ことや、IFN-γがICAM-1発現を増強させる²⁰⁾ことを考え合わせると、トキシンAによって腸管局所でのIFN-γ産生が亢進し、TNF-αやケモカイン、ICAM-1の発現が誘導され、それらとの相互作用により好中球の遊走および活性を亢進させたと考えられる。さらに、浸潤してきた好中球が新たに種々の炎症性サイトカイン・ケモカインを産生することによって、炎症をいっそう増悪させたものと考えられた(図4)。

おわりに

本稿では、トキシンA誘発腸炎の発症および病態には、好中球を中心とした炎症細胞を介しての上皮細胞傷害があり、この過程にIFN-γをはじめ種々の炎症性サイトカイン・ケモカインが重要なメディエーターとして役割を果たし、最終的な組織破壊に関与していることを示した。したがって、IFN-γはトキシンA誘発腸炎の治療法を考える上で、有力な標的因子の候補であると考えられ

る。しかしながら、IFN-γに限らず炎症性サイトカインは複雑なサイトカイン・カスケードを形成し、他の炎症性サイトカインの活性を増幅することによって炎症の増幅に関与していることが予測される。したがって、IFN-γを標的とした治療法の開発のためには、これらの点がいっそう解明される必要があると考えられる。

文献

- 1) Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB: Clostridium difficile: associated diarrhea: A review. Arch Intern Med, 161: 525-533, 2001.
- 2) Bartlett JG: Antibiotic-associated diarrhea. Clin Infect Dis, 15: 573-581, 1992.
- 3) Lierly DM, Krivan HC, Wilkins TD: Clostridium difficile: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev, 1: 1-18, 1988.
- 4) Oldfield EC 3rd: Clostridium difficile-associated diarrhea: risk factors, diagnostic methods, and treatment. Rev Gastroenterol Disord, 4: 186-195, 2004.
- 5) Pothoulakis C, Lamont JT: Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to Clostridium difficile toxins. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 280: G178-183, 2001.
- 6) Aktories K, Just I: Monoglucosylation of low-molecular-mass GTP-binding Rho proteins by clostridial cytotoxin. Trends Cell Biol, 5: 441-443, 1995.
- 7) Warny M, Keates AC, Keates S, Castagliuolo I, Zacks JK, Aboudola S, Qamar A, Pothoulakis C, LaMont JT, Kelly CP: p38 MAP kinase activation by Clostridium difficile toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. J Clin Invest, 105: 1147-1156, 2000.
- 8) Kelly CP, Becker S, Linevsky JK, Joshi MA, O'Keane JC, Dickey BF, LaMont JT, Pothoulakis C: Neutrophil recruitment in Clostridium difficile toxin A enteritis in the rabbit. J Clin Invest, 93: 1257-1265, 1994.
- 9) Qiu B, Pothoulakis C, Castagliuolo I, Nikulasson S, LaMont JT: Participation of reactive oxygen metabolites in Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in rats. Am J Physiol, 276: G485-490, 1999.
- 10) Branka JE, Vallette G, Jarry A, Bou-Hanna C, Lemarre P, Van PN, Laboisie CL: Early functional effects of Clostridium difficile toxin A on human colonocytes. Gastroenterology, 12: 1887-1894, 1997.
- 11) Castagliuolo I, Keates AC, Wang CC, Pasha A, Valenick L, Kelly CP, Nikulasson ST, LaMont JT, Pothoulakis C:

- Links Clostridium difficile toxin A stimulates macrophage-inflammatory protein-2 production in rat intestinal epithelial cells. *J Immunol*, 160: 6039-6045, 1998.
- 12) Ishida Y, Maegawa T, Kondo T, Kimura A, Iwakura Y, Nakamura S, Mukaida N: Essential involvement of IFN- γ in Clostridium difficile toxin A-induced enteritis. *J Immunol*, 172: 3018-3025, 2004.
 - 13) Morteau O, Castagliuolo I, Mykoniatis A, Zacks J, Wlk M, Lu B, Pothoulakis C, Gerard NP, Gerard C: Genetic deficiency in the chemokine receptor CCR1 protects against acute Clostridium difficile toxin A enteritis in mice. *Gastroenterology*, 122: 725-733, 2002.
 - 14) Farrar MA, Schreiber RD: The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu Rev Immunol*, 11: 571-611, 1993.
 - 15) Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S: Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol*, 150: 823-832, 1997.
 - 16) Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D, Targan SR: A role for TNF- α and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol*, 159: 6276-6282, 1997.
 - 17) Ishida Y, Kondo T, Ohshima T, Fujiwara H, Iwakura Y, Mukaida N: A pivotal involvement of IFN- γ in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *FASEB J*, 16: 1227-1236, 2002.
 - 18) Schuerer-Maly CC, Eckmann L, Kagnoff MF, Falco MT, Maly FE: Links Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology*, 81: 85-91, 1994.
 - 19) Song F, Ito K, Denning TL, Kuninger D, Papaconstantinou J, Gourley W, Klimpel G, Balish E, Hokanson J, Ernst PB: Expression of the neutrophil chemokine KC in the colon of mice with enterocolitis and by intestinal epithelial cell lines: effects of flora and proinflammatory cytokines. *J Immunol*, 162: 2275-2280, 1999.
 - 20) Paolieri F, Battifora M, Riccio AM, Pesce G, Canonica GW, Bagnasco M: Intercellular adhesion molecule-1 on cultured human epithelial cell lines: influence of proinflammatory cytokines. *Allergy*, 52: 521-531, 1997.