




学位論文審査の結果の要旨

令和 3年 5月 28日

審査委員	主査	星野 克明 		
	副主査	中村 隆範 		
	副主査	上田 夏生 		
願出者	専攻	医学専攻	部門	
	学籍番号	17D719	氏名	Miad Elahi
論文題目	The human gut microbe <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> suppresses toxin release from <i>Clostridium difficile</i> by inhibiting autolysis			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格	<input type="radio"/> 不合格	(該当するものを○で囲むこと。)	

【要旨】

腸内細菌は食物の分解、腸管免疫の発達や病原微生物の定着阻害など、宿主に有益な生理作用を有する。腸内細菌の中には毒素産生能を持つ細菌も存在するが、それらは他の常在微生物によって増殖が抑制されている。*Clostridium difficile* (CD)は、抗菌薬によって腸内フローラが破綻した際に過増殖し、CD毒素(A毒素とB毒素)によって大腸に炎症を惹起する。CD関連下痢症には治療抵抗例も多く、便移植など新たな治療が試みられている。本研究では、CD関連下痢症の新たな治療法の開発を目的とし、ヒト腸管内の優勢細菌群である*Bacteroides*属がCDの病原性に与える影響を検討した。

*Bacteroides*属各菌株の培養上清を50%含有する試験培地、および対照培地を用いてCDを培養し、培養液中に含まれるCD毒素量をHT29細胞またはVero細胞に対する細胞傷害活性、および抗毒素抗体を用いるウェスタンブロットにより比較解析した。使用した菌株で、CD毒素の産生抑制作用が最も強い菌株は*Bacteroides thetaiotaomicron* (BT)であった。また、培養液中に見られる毒素産生を抑制する因子は耐熱性であり、分子量10,000から100,000と推測された。

次に、CD毒素の産生抑制に関わるBTの遺伝子を同定するために、トランスポゾンを用いる突然変異誘発試験を行った。トランスポゾン挿入変異株を解析した結果、莢膜多糖の合成や細胞外輸送に関わる遺伝子が、CD毒素の産生抑制に関与することが示された。これら候補から、多糖の細胞膜外輸送を担うundecaprenyl phosphate合成に関与する遺伝子*gcpE*に着目した。*gcpE*変異株では、複数の菌体外多糖の輸送量が一律に減少していると考えられる。*gcpE*変異株の培養上清から粗精製した多糖分画(PF)は、CD毒素産生を抑制する作用が野生型BT由来のPFよりも減弱していた。一方で、*gcpE*変異株由来のPFは、CD毒素遺伝子の発現を低減させないことが明らかとなった。

続いて、*Bacteroides*属菌株とCDの混合培養を行い、経時的にCDをグラム染色した結果、BTとの混合培養下でCDの溶菌が抑制されることが明らかとなった。CDの自己溶菌に及ぼすBTの影響を調べるために、0.02%のTriton X-100を用いる自己溶菌試験を行った。その結果、野生型BTの培養上清はCDの自己溶菌を抑制するが、*gcpB*変異株の培養上清は、その抑制効果が減弱することが示された。また、CD菌体中にある乳酸脱水素酵素(LDH)の細胞外への漏出を指標として自己溶菌について調べた結果、BTの培養上清はCDからのLDHの遊離を抑制する効果を持つことも示された。さらに、BT由来のPFをリゾチーム処理すると、CD毒素の産生抑制作用が、消失することも明らかとなった。

本研究により、BTの細胞壁に関連する多糖が、CDの自己溶菌を阻害することによってCD毒素の菌体外放出を抑制しているモデルが考えられた。今後は、本多糖を精製し、構造を解析する予定である。CD関連下痢症の新たな治療薬や予防薬への開発が期待される。

審査結果

令和3年5月17日に行われた公開学位論文審査会において、以下に示す様々な質疑応答が行われた。

1. BTの*gcpB*遺伝子変異株に注目した理由は何か？
2. *In vitro*の実験でBTがCDの毒素産生を抑制することを示しているが、マウス等の感染実験でも確認しているのか？
3. 細胞壁関連の多糖がCD毒素の産生を抑制すると述べているが、具体的にどのような種類の糖なのか？
4. BTと他の*Bacteroides*属で細胞壁の構造に違いはあるのか？
5. 抑制分子の分子量を、Amiconメンブレンを用いる限外ろ過法で推定しているが正確ではない。なぜ、ゲルろ過法を用いなかったのか？
6. BT由来の多糖がどのようなメカニズムでCDの自己溶菌を抑制しているのか？
7. A毒素とB毒素の違いは何か？
8. 本研究で報告したBT由来の多糖は治療への応用が可能と考えているのか？
9. 論文の図1のウェスタンブロットでCD毒素を定量しているが、CD菌体の増殖に違いはないのか？

申請者は、いずれの質問に対しても真摯に回答し、医学博士の学位授与に値する十分な見識と能力を有することが認められた。本研究成果はCD関連下痢症の治療薬の開発に寄与するものであり、学術的価値が高い。よって、本審査委員会では審査員全員一致して博士(医学)論文に相応しいものと判断し、合格とした。

掲載誌名	Antibiotics 2021, 第10巻, 第2号, 187		
(公表予定) 掲載年月	令和3年2月 掲載	出版社(等)名	Multidisciplinary Digital Publishing Institute

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。