

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790574

研究課題名 (和文) 非定型抗酸菌・レジオネラ菌感染症に対する肺コレクチンの  
生体防御機構と臨床応用研究課題名 (英文) Studies on host defense mechanisms of pulmonary collectins  
against *Mycobacterium avium* and *Legionella pneumophila*.

研究代表者

有木 茂 (ARIKI SHIGERU)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80464478

研究成果の概要 (和文)：肺コレクチンは呼吸器における生体防御において重要な役割を果たすC型コレクチンである。本研究課題では、肺コレクチンがレジオネラ菌・非定型抗酸菌の増殖を抑制すること、また非定型抗酸菌を凝集することなどにより、感染初期の過程において感染を局所に留める役割を果たすことを明らかにした。さらに、レジオネラ菌に対しては、マクロファージによる菌体の排除を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：Pulmonary collectins play important roles in innate immunity of the lung. In this study, we demonstrated that collectins prevent the spread of infection by inhibiting the growth of *L. pneumophila* and *M. avium*, and by agglutinating *M. avium*. Furthermore, collectins enhanced the clearance of *L. pneumophila* by macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器感染症、自然免疫、肺コレクチン、細胞内寄生細菌

## 1. 研究開始当初の背景

近年コンプロマイズドホストの増加に伴い、非定型抗酸菌 (*Mycobacterium avium*) やレジオネラ (*Legionella pneumophila*) などの細胞内寄生菌を原因菌とする呼吸器感染症が増加している。これらの感染症では、多剤耐性により治療が困難な例も報告されており、宿主が有する自然免疫機構を有効に作動させることが重要であると考えられる。細

胞内寄生菌は、マクロファージにより貪食されるものの、ファゴソームからファゴリソームへの成熟を阻害することでファゴリソームでの殺菌・消化を逃れ、細胞内で増殖する。細胞内寄生菌によるファゴソーム成熟の阻害機構に関しては、最近になっていくつもの文献が報告されている。また最近、細胞内寄生菌の排除にオートファジー経路が関与していることを示唆する結果が報告され

た。しかしながら、肺胞内でオートファジー経路を開始する引き金は何か、また、生体内でオートファジーは細胞内寄生菌の排除における主要経路なのか、など多くの疑問が残っている。宿主の自然免疫系による細胞内寄生菌に対する防御反応は、生物学的側面からも、医学的側面からも早急に解明されることが望まれる問題であるが、不明な点が多く残されているのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究計画は、生体防御の最前線である呼吸器における自然免疫機構のうち、肺コレクチンによる感染防御機構に焦点を絞り、特に細胞内寄生菌に対する生体防御機構の解明を目的とする。近年、非定型抗酸菌 (*Mycobacterium avium*) やレジオネラ (*Legionella pneumophila*) などの細胞内寄生菌を原因菌とする呼吸器感染症が増加しており、社会的な問題となっている。そこで本研究では、呼吸器の生体防御において重要な役割を果たす肺コレクチンと細胞内寄生菌との直接の相互作用、及び肺コレクチン存在下で細胞内寄生菌がマクロファージに貪食された場合のファゴソーム成熟過程を解析することで、細胞内寄生菌の感染過程における宿主の生体防御反応の全容を明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究計画では、細胞内寄生菌として *M. avium* および *L. pneumophila* を用いるが、予備実験から、これらの菌体と肺コレクチンがカルシウム依存的に結合することを確認している。そこで、肺コレクチンが認識している細胞内寄生菌上のリガンドを決定する。具体的には、細菌表層成分を用いてリガンドブロットや結合阻害実験を行なう。リガンドの候補分子を決定した後、表面プラズモン共鳴センサーにより結合を確認し、さらに解離定数を算出する。

(2) 細胞内寄生菌を液体、寒天プレートとの両培地で培養する際に、肺コレクチンの有無で増殖がどのように変化するかを解析する。液体培地では濁度変化を、寒天培地ではコロニー形成数を指標に解析を行なう。

(3) レジオネラの pore-forming activity に対する肺コレクチンの影響を解析する。PMA 刺激でマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞にレジオネラ菌を感染させる。感染後、細胞をアクリジンオレンジとエチジウムブ

ロマイドで染色する。レジオネラの感染に伴って pore が形成された細胞は赤色に、それ以外の細胞は緑に染色されるので、両者の数の比から pore-forming activity を数値化する。

(4) 肺コレクチンによる菌体凝集の観察。肺コレクチンと FITC ラベルした細胞内寄生菌をインキュベートした後、蛍光顕微鏡下で菌体を観察する。

(5) 肺コレクチン存在下で貪食された細胞内寄生菌の生存率を解析する。PMA 刺激でマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞、ヒト末梢血から分離したマクロファージに細胞内寄生細菌を感染させる。感染後、細胞を洗浄することで細胞外に残存した菌体を取り除き、培地を加えて細胞を培養する。感染後 0, 1, 2, 3, 4 日目に細胞破砕液を調製し、細菌培養用の寒天培地に播き、マクロファージ細胞内に存在する細胞内寄生菌の数をコロニー数として測定する。

(6) 肺コレクチン存在下でマクロファージに取り込まれた細胞内寄生菌を含むファゴソームの成熟過程を解析する。PMA 刺激でマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞に細胞内寄生菌を感染させる。感染した細胞を、細胞内寄生菌に対する抗体と抗 LAMP-1 (リソソームのマーカー蛋白質) 抗体で二重染色する。ファゴソームの成熟が起これば、細胞内寄生菌を含むファゴソームは LAMP-1 と共局在するので、全菌体数および LAMP-1 と共局在した菌体数をカウントして、両者の比からファゴソームの成熟度合いを解析する。

## 4. 研究成果

### (1) レジオネラ菌に対する肺コレクチンの生体防御機構

肺コレクチンはレジオネラ菌体に  $Ca^{2+}$  依存的に結合した。SP-A、SP-D はいずれもレジオネラ菌の LPS を認識していることが明らかとなった。レジオネラ菌をコレクチン存在下で培養すると、その増殖は有意に抑制された。レジオネラは、マクロファージに感染する際にマクロファージ細胞膜に傷害を与えるが、肺コレクチンはレジオネラ感染による膜傷害を低下させ、マクロファージを保護する働きがあることが明らかとなった。

肺コレクチン存在下ではマクロファージによるレジオネラ菌の貪食が促進されることが明らかとなった。レジオネラ菌はマクロファージにより貪食された後も、ファゴソームとリソソームの融

合を阻害することで消化を逃れ細胞内に寄生する。肺コレクチン存在下で貪食されたレジオネラ菌の細胞内増殖を解析したところ、貪食された菌体数は増加しているにも関わらず、1, 2, 3, 4 日後に細胞内に存在する菌体数はコントロール群と比べ有意に減少していた。肺コレクチン存在下で貪食されたレジオネラ菌は、リソソームのマーカー蛋白質である LAMP-1 と共局在する割合がコントロール群と比べ増加していることから、肺コレクチンはレジオネラ菌を取り込んだファゴソームとリソソームとの融合を促進することで、レジオネラ菌の細胞内増殖を抑制していると考えられる。これらの結果は、肺コレクチンがレジオネラ菌感染の初期過程において、菌体の増殖を抑えると同時にクリアランスを促進することで、感染排除に重要な役割を果たしていること示唆している。

#### (2) 非定型抗酸菌に対する肺コレクチンの生体防御機構

肺コレクチンは、濃度依存性、Ca<sup>2+</sup>依存性に非定型抗酸菌に結合した。SP-Aは菌体表層に存在する脂質成分を、SP-Dはリポアラビノマンナン (LAM) をそれぞれ認識することが明らかとなった。表面プラズモン共鳴センサーを用いた解析では、SP-DとLAMの結合の解離定数は10<sup>-9</sup> M程度であり、肺コレクチンは非定型抗酸菌と強固に結合すると考えられる。コレクチン存在下で非定型抗酸菌を培養したところ、SP-Aは非定型抗酸菌の増殖を阻害した。SP-Dも増殖抑制活性を示したが、その活性はSP-Aと比較すると非常に弱かった。一方、非定型抗酸菌に対する凝集活性を観察すると、SP-Dが低濃度で菌体凝集を引き起こしたのに対して、SP-Aは高濃度でも菌体凝集を引き起こさなかった。SP-AとSP-Dのキメラ体を用いた解析から、菌体凝集にはSP-Dのコレクチン活性の特異性が重要であるが、より効果的に菌体を凝集するためにはSP-Aの立体構造が重要であることが明らかとなった。以上の結果は、肺コレクチンが非定型抗酸菌表層に存在する別々の分子を認識することで、増殖抑制、菌体凝集というそれぞれの機能を発揮し、非定型抗酸菌を感染局所に封じ込め、感染の拡大を防いでいることを示唆している。

#### (3) 国内外における位置づけとインパクト

本研究課題では、肺コレクチンと細胞内寄生細菌の相互作用に着目して研究を行った。細胞内寄生細菌に対する生体防御の研究は、主にマクロファージなどの免疫担当細胞と細菌の関係のみに着目されてきた。しかし、

実際の感染の場である呼吸器には、高濃度の肺コレクチンが存在しており、その存在を無視して感染現象の本質を捉えることは不可能である。レジオネラ菌や非定型抗酸菌に対する肺コレクチンの生体防御機構に着目した本研究は、国内外でも独創性が高く、社会的要求の高い研究である。また、得られた結果の一部は *J. Biol. Chem.* に掲載されるなど、高い評価を得ている。

#### (4) 今後の展望

本研究課題では、肺コレクチン存在下でマクロファージに貪食されたレジオネラ菌では、LAMP-1 と共局在する割合がコントロール群と比べ有意に増加していることを明らかにした。最近の研究では、細胞内寄生細菌の排除においてはオートファジーが重要な役割を果たしているということが報告されている。一方では、細菌はオートファジーを利用して殺菌から逃れているという報告もされている。いずれにしても、細胞内寄生細菌感染とオートファジーには密接な関係があると考えられる。肺コレクチンはレジオネラを含むファゴソームの成熟に影響を与えることから、オートファジー経路に何らかの作用を示す可能性があると考えられる。今後は、このような可能性を視野に、肺コレクチンによるファゴソーム成熟促進の詳細なメカニズムを解明したい。

また、非定型抗酸菌に対する生体防御機構については、まず SP-A に対するリガンドを明確にすることが重要であると考えられる。さらに、マクロファージによる非定型抗酸菌の貪食過程や、感染した非定型抗酸菌の増殖過程に対する肺コレクチンの作用はさらなる解析が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Sawada K., Ariki S., Kojima T., Saito A., Yamazoe M., Nishitani C., Shimizu T., Takahashi M., Mitsuzawa H., Yokota S. I., Sawada N., Fujii N., Takahashi H., & Kuroki Y. 「Pulmonary collectins protect macrophages against pore-forming activity of *Legionella pneumophila* and suppress its intracellular growth.」 *J. Biol. Chem.* 査読有、Vol. 285, 2010, pp. 8434-8443.
- ② 澤田格、有木茂、山添雅己、西谷千明、清水健之、高橋素子、横田伸一、藤井暢弘、高橋弘毅、黒木由夫 「肺コレクチ

ンによるレジオネラ菌の増殖抑制」 分子呼吸器病、 査読無、 Vol. 13、 2009、 pp. 117-119

〔学会発表〕 (計 9 件)

- ① 有木茂、澤田格、藤井暢弘、賀佐伸省、西谷千明、清水健之、山添雅己、高橋素子、黒木由夫 「非定型抗酸菌に対する肺コレクチンの生体防御機構」 第 8 2 回日本生化学会大会、 2009 年 10 月 24 日、神戸
- ② Arika S., Sawada K., Yamazoe M., Nishitani C., Shimizu T., Takahashi M., Yokota S., Fujii N., Takahashi H., Kuroki Y. 「Roles of pulmonary collectins in host defense against *Legionella pneumophila* infection.」 Experimental Biology 2009、 2009 年 4 月 19 日、 New Orleans、 USA
- ③ Arika S., Sawada K., Gasa S., Fujii N., Yamazoe M., Shimizu T., Nishitani C., Takahashi M., Kuroki Y. 「Pulmonary collectins interact with and aggregate *Mycobacterium avium*」 The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity、 2008 年 9 月 10 日、 淡路

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有木 茂 (ARIKI SHIGERU )

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80464478

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：