

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790764

研究課題名（和文） レジオネラ感染症に対する肺コレクチンの生体防御機構解明と臨床応用

研究課題名（英文） Studies on host defense mechanisms of pulmonary collectins against *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 型レクチンである。本研究では、肺コレクチンがレジオネラ感染時に誘導されるオートファジーを特異的に抑制することを明らかにした。さらに、肺コレクチンはレジオネラ菌がエフェクター分子を宿主細胞内に分泌するのを抑制した。これらの結果は、肺コレクチンが既知のものとはまったく異なる分子機構でレジオネラ感染から宿主細胞を保護していることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Pulmonary collectins play important roles in innate immunity of the lung. In this study, we found that pulmonary collectins attenuate autophagy induced by *L. pneumophila* infection. Furthermore, pulmonary collectins inhibit the secretion of effector molecules into host cells via type IV secretion system of *L. pneumophila*. These results suggest that pulmonary collectins protect host cells by the previously uncharacterized host defense mechanism against intracellular pathogen.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：肺コレクチン、自然免疫、細胞内寄生細菌

1. 研究開始当初の背景

近年、易感染性宿主の増加に伴い、レジオネラを原因菌とする呼吸器感染症の報告数が急増している。レジオネラ菌は、通常のマクロファージ内での殺菌過程から逃れ、マク

ロファージ内で増殖する細胞内寄生細菌の一種である。これらの感染症を克服するためには、宿主が本来備えている自然免疫機構を十分に機能させることが有効であると考えられる。

細胞内寄生細菌に対する生体防御機構としては、オートファジーにより形成されるオートファゴソームでの殺菌が注目されてきた。これらの研究成果はマクロファージと感染微生物の関係にのみ着目したものであるが、実際の感染の場である呼吸器表層には肺コレクチンなどの生体防御物質が存在している。これらの存在を無視しては感染現象の本質をとらえることはできないと考え、これまでに細胞内寄生細菌に対する肺コレクチンの生体防御機能を解析してきた。肺コレクチンは、肺胞 II 型細胞により合成・分泌され、呼吸器の生体防御反応において中心的な役割を担っている C 型レクチンである。これまでの研究で、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食食が促進されることを明らかにした。この現象は、増殖の場であるマクロファージ細胞内へのレジオネラ菌の侵入を助けているようにみえる。しかしながら、肺コレクチン存在下で食食されたレジオネラ菌は、コントロール群と比較して効率よくリソソームに運ばれる。その結果、レジオネラ菌のマクロファージ細胞内での増殖は抑制される。つまり、肺コレクチン存在下においてマクロファージはより多くのレジオネラ菌体を取り込み、効率的に殺菌していると考えられる。これらの結果は、レジオネラ感染に対する生体防御において肺コレクチンが重要な役割を果たしていることを示している。また、肺コレクチンを臨床応用することでレジオネラ菌に対する新規治療法・予防法を開発できる可能性を示唆している。しかしながら、肺コレクチンが細胞内増殖を抑制する詳細な分子機構に関しては不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、肺コレクチンによるレジオネラ菌の細胞内増殖抑制作用の詳細な分子機構を解明することを目的とした。特に、肺コレクチンがファゴソームとリソソームの融合を促進する分子機構に注目して研究を行なった。また、レジオネラ菌体表面に存在する肺コレクチンのリガンド分子を同定することは、生体防御の分子機構解明においては重要な情報となる。これまでの研究成果から、レジオネラ菌由来のリポ多糖が肺コレクチンのリガンドとなることが明らかとなっているが、リポ多糖以外のリガンドが存在する可能性もある。したがって、リポ多糖以外の分子で、肺コレクチンのリガンドとなりうる分子を単離することも試みた。

3. 研究の方法

(1) レジオネラ感染により誘導されるオー

トファジーの解析

PMA 処理によりマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞と肺胞上皮由来の A549 細胞にレジオネラ菌を感染させた。感染により誘導されたオートファジーの程度を以下の二つの方法で解析した。

- ① 細胞破碎液を作成し、抗 LC3 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行なった。オートファジーが誘導されると LC3 は脂質修飾を受けて電気泳動での移動度が変化するため、修飾を受ける前のバンド (LC3-I) と修飾を受けたバンド (LC3-II) の量比を解析することでオートファジーの程度を知ることができる。
- ② 感染後の細胞を固定し、抗 LC3 抗体で免疫染色を行なった。LC3 は平常時には細胞質に均一に存在しているが、オートファジーが誘導されるとオートファゴソームに局在するためドット状に観察できる。ドット状の蛍光が観察できた細胞をオートファジーが起こった細胞としてカウントし、観察した細胞のなかでオートファジーを起こしている細胞の割合を算出する。

(2) レジオネラ菌の IV 型分泌機構の解析

レジオネラ菌は、細胞内での生存・増殖を可能にするためのエフェクター分子を IV 型分泌機構を介して宿主細胞内に分泌する。エフェクター分子が宿主細胞内に分泌されると宿主細胞内の cAMP 濃度が上昇するような遺伝子改変レジオネラ菌を用いて、肺コレクチン存在下での IV 型分泌機構の活性を測定した。PMA 処理によりマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞に上述の遺伝子改変レジオネラ菌を感染させ、感染後の細胞破碎液に含まれる cAMP 濃度を市販の ELISA キットで測定した。

(3) 肺コレクチンのリガンドの単離

肺コレクチンをセファロース樹脂に固定し、肺コレクチンカラムを作製した。市販の試薬でレジオネラ菌の細胞壁・細胞膜成分を分離し、肺コレクチンカラムに添加した。肺コレクチンとレジオネラ菌体の結合はカルシウムイオン依存性であるので、EDTA を含む溶液をカラムに添加することで肺コレクチンに結合した物質を溶出した。溶出液を電気泳動し、CBB 染色、銀染色により確認した。

4. 研究成果

(1) レジオネラ感染により誘導されるオートファジーに対する肺コレクチンの影響

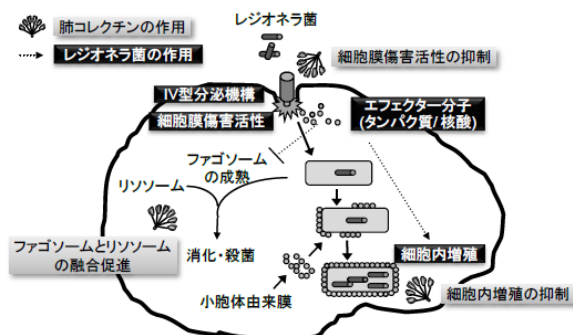
細胞内寄生細菌に対する生体防御におい

てはオートファジー経路が重要であると考えられている。そこで、肺コレクチン存在下でレジオネラ菌を感染させた細胞内でどの程度オートファジーが誘導されているのかを解析した。肺コレクチンはレジオネラ菌の細胞内増殖を抑制することから、コントロール群よりもオートファジーが強く誘導されているか、少なくとも同程度に誘導されていると予想された。ところが、肺コレクチン存在下でレジオネラ菌を感染させた細胞内では、オートファジーは有意に抑制されていた。この結果は、ウエスタンブロッティングでも免疫染色でも同様の結果が確認されたので、アッセイ系の不備によるものではないと考えられる。そこで、肺コレクチンはオートファジー経路を誘導するシグナル伝達過程のどこかを阻害するのではないかと考え、薬剤（ラパマイシン）により誘導されるオートファジーに対する肺コレクチンの影響を解析した。しかし、肺コレクチンは薬剤により誘導されるオートファジーには影響を示さなかった。これらの結果は、肺コレクチンがレジオネラ菌感染に応答して起こるオートファジーを特異的に抑制していることを示している。

(2) レジオネラ菌の IV 型分泌機構に対する肺コレクチンの影響

上述の結果とこれまでの研究成果をまとめると、レジオネラ菌感染防御において、肺コレクチンは以下のような作用を示す（下図参照）。

- ・ 宿主の細胞膜がレジオネラ菌の IV 型分泌機構によって受ける傷害を軽減する。
- ・ レジオネラ菌を取り込んだファゴソームとリソソームの融合を促進する。
- ・ レジオネラ菌の細胞内増殖を抑制する。
- ・ レジオネラ菌感染時に起こるオートファジーを抑制する。



図：これまでの研究成果から明らかになっていた肺コレクチンの作用

レジオネラ菌感染に対する生体防御機構であるオートファジーを抑制するにも関わ

らず、細胞内での菌体増殖を抑制するという結果は、一見矛盾する結果である。しかしながら、これらすべての現象は、レジオネラ菌の IV 型分泌機構、あるいは IV 型分泌機構を介して分泌されるエフェクター分子のはたらきを肺コレクチンが抑制していると考えれば説明できる。

そこで、IV 型分泌機構を介してエフェクター分子が宿主細胞内に分泌されると宿主細胞内の cAMP 濃度が上昇するような遺伝子改変レジオネラ菌を用いて、肺コレクチン存在下での IV 型分泌機構の活性を測定した。その結果、肺コレクチン存在下では有意に cAMP 濃度の上昇が抑制されており、IV 型分泌機構を介したエフェクター分子の分泌自体が抑制されていることが示唆された。

これらの結果は、肺コレクチンが既知の生体防御機構とはまったく異なる機序でレジオネラ菌感染から宿主を守っていることを示している。現在、どのような分子機構で肺コレクチンが IV 型分泌機構の活性を抑制しているのかを解析中である。

(3) 肺コレクチンのリガンド

肺コレクチンの作用をより深く理解し、研究成果を臨床応用につなげるためには、レジオネラ菌体表面に存在する肺コレクチンリガンドに関する情報が有用である。そこで、肺コレクチンカラムを作成し、レジオネラ菌体破碎液からリガンドを単離することを試みた。しかしながら、レジオネラ菌体破碎液に含まれる大量のリポ多糖が妨げとなり、単離には至らなかった。

(4) 今後の展望

本研究結果から、肺コレクチンがレジオネラ菌の IV 型分泌機構を抑制することが示唆された。IV 型分泌機構はレジオネラ菌の感染・生存には必須の機構であり、事実、IV 型分泌機構の機能を欠いた変異体は宿主細胞内で増殖することができない。このことは、本研究で示された肺コレクチンの作用を臨床応用することで、レジオネラ菌感染症の予防・克服のための画期的な創薬・治療法の確立につながる可能性があることを示唆している。そのためには、肺コレクチンが IV 型分泌機構を阻害する分子メカニズムを詳細に理解することが必要である。また、レジオネラ菌表面に存在する肺コレクチンのリガンド分子がリポ多糖だけなのか否かを明確にする必要がある。今後、これらの課題を明らかにするための研究を継続していきたい。

オートファジー経路は細胞内寄生細菌に対する生体防御には重要なものであると考えられている。しかし、本研究の成果からは、

肺コレクチン存在下ではオートファジーが抑制されていてもレジオネラ菌はリソソームへ効率よく運ばれ殺菌されることが考えられる。今後、オートファジーを抑制した細胞に肺コレクチン存在下でレジオネラ菌を感染させ、その細胞内増殖過程を解析することで、本研究の成果から得られた仮説を検証していきたい。

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8件)

- 1) Ariki S., Nishitani C., Kuroki Y. (2012) Diverse functions of pulmonary collectins in host defense of the lung. *J. Biomed. Biotechnol.* Vol. 2012, Article ID 532071. 査読有
DOI:10.1155/2012/532071
- 2) Ariki S., Kojima T., Gasa S., 他8名 (2011) Pulmonary collectins play distinct roles in host defense against *Mycobacterium avium*. *J. Immunol.* Vol. 187, pp 2586-2594. 査読有
DOI:10.4049/jimmunol.1100024

[学会発表] (計7件)

- 1) Ariki S., 他9名 Pulmonary collectins attenuate growth of *Mycobacterium avium*. **American Thoracic Society International Conference 2011**, May 15, 2011 Denver, USA
- 2) Saito A., Ariki S., 他4名 Pulmonary collectins attenuate autophagy induced by *L. pneumophila* infection. **American Thoracic Society International Conference 2011**, May 15, 2011 Denver, USA
- 3) Saito A., Ariki S., 他6名 Pulmonary collectins inhibit the autophagy induced by *Legionella pneumophila* infection. **BMB 2010** 2010年12月10日 兵庫県、神戸
- 4) 齋藤充史、有木茂、他6名 「肺コレクチンによるレジオネラ菌の増殖抑制」 **第16回日本エンドトキシン・自然免疫研究会** 2010年11月13日 奈良県、橿原

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：