

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861278

研究課題名(和文) 尿路感染症に対するサーファクタント蛋白質Aの防御機構の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Surfactant protein A inhibits growth and adherence of uropathogenic Escherichia coli to protect the bladder from infection

研究代表者

橋本 次朗 (Hashimoto, Jiro)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30404685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：SP-AノックアウトマウスではSP-Aが尿路病原性大腸菌(UPEC)の尿路上皮細胞への接着を抑制した。SP-AはUPECにレクチン活性を介して結合し、尿中での増殖を抑制した。また、SP-Aが結合したUPECは膀胱上皮細胞への接着能が低下した。さらに、SP-Aは膀胱上皮細胞に作用することでもUPECの接着を阻害した。この分子機構は、SP-Aが膀胱上皮のUPEC受容体であるUroplakin 1aへ結合し、UPECのアドヘジンであるFimHが結合するのを競合的に阻害することが考えられる。これらの結果は、SP-AがUPECに対する生体防御において重要な役割を果たしていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that surfactant protein A (SP-A)-deficient mice were more susceptible to uropathogenic Escherichia coli (UPEC) infection than WT mice. SP-A directly bound to UPEC in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. SP-A inhibited growth of UPEC in human urine. The binding of SP-A to UPEC decreased the adherence of bacteria to urothelial cells. These results indicate that direct action of SP-A on UPEC is important in host defense against UPEC. In addition, adhesion of UPEC to urothelial cells was decreased when urothelial cells were preincubated with SP-A. Adhesion of UPEC to urothelial cells is achieved via interaction between FimH, an adhesin located at bacterial pili, and uroplakin 1a, a glycoprotein expressed on the urothelium. SP-A directly bound to uroplakin 1a and competed with FimH for uroplakin 1a binding. Our data clearly indicate that SP-A plays indispensable roles in host defense against UPEC.

研究分野：泌尿器科感染症

キーワード：尿路感染症 尿路病原性大腸菌 サーファクタントタンパク質A

## 1. 研究開始当初の背景

感染防御機構は自然免疫と獲得免疫に分類される。自然免疫を担うタンパク質は、病原微生物の侵入前から生体内に備えられており、病原微生物の表面に普遍的に存在する分子パターンを認識し排除する。すなわち、自然免疫は感染初期に作用する即時応答型の生体防御機構である。近年、Toll-like receptor (TLR) をはじめとするパターン認識分子群の発見により、自然免疫が生体防御において不可欠なものであることが明らかとなってきたが、尿路における自然免疫機構についてはいまだ不明な点が多い。

尿路感染症の主要な原因菌である尿路病原性大腸菌 (Uropathogenic *E. coli*: UPEC) は、その多くが Type1 線毛を有している。Type1 線毛の先端にはマンノース結合レクチンである FimH というアドヘジンが存在している。FimH が尿路上皮の膜タンパク質である Uroplakin Ia (UPIa) の糖鎖に含まれるマンノースに結合することで UPEC は尿路上皮へ接着する。UPEC の上皮細胞への接着は感染症発症の第一歩であるが、宿主側は様々な方法で感染防御を行なっている。たとえば、尿流による洗浄作用、尿中の尿素・塩類・pH、浸透圧などの物理化学的な接着阻害要因のほか、Tamm-Horsfall タンパク質やラクトフェリン、可溶性 IgA などの宿主タンパク質も UPEC の尿路上皮への接着を阻害する。さらに、抗菌ペプチド、TLR を介して産生されるサイトカインによる炎症反応、白血球の貪食作用などにより菌体の排除が行われる。これらの防御機構を免れて尿路上皮細胞内に侵入した UPEC が増殖を開始すると、尿路上皮はアポトーシスにより感染細胞を脱落させ感染拡大を防ぐ。このような防御機構に加え、膀胱には生体防御レクチンである肺コレクチンが発現していることが RT-PCR により示唆されていた。しかしながら、タンパク質レベルでの発現確認や、尿路での感染防御機能の解析は行われていなかった。

肺コレクチンは、肺胞 II 型細胞により合成・分泌される肺サーファクタントの構成成分であり、サーファクタントタンパク質 A および D (SP-A および SP-D) の二種類が存在する。申請者の所属する研究グループでは、呼吸器における生体防御において肺コレクチンが、

- (1) 感染微生物と直接結合することでオプソニンとして機能し、貪食による菌体排除を促進する。
- (2) 貪食受容体のマクロファージ細胞

膜への局在を増加させることで、マクロファージの貪食能を増加させる。(J. Biol. Chem. **279**: 21421; J. Immunol. **172**: 7592)

- (3) 細胞内寄生細菌の増殖を抑制し、感染排除を促進する。(J. Biol. Chem. **285**: 8434; J. Immunol. **187**: 2586)
- (4) TLR や病原微生物表面の TLR リガンドと相互作用することで炎症反応を制御する。(J. Biol. Chem. **238**: 35878; J. Biol. Chem. **281**: 21771)

ことを明らかにしてきた。そこで、これら呼吸器における肺コレクチン研究の経験と成果を基に、尿路感染症に対する肺コレクチンの生体防御機能を明らかにすることを目的に本研究を開始した。

これまでの研究では、SP-D が尿路上皮にタンパク質レベルで発現しており、UPEC に対する生体防御機能を示すことを明らかにした。SP-D は UPEC と直接結合することで菌体を凝集する。また、UPIa と結合することで UPEC の FimH と競合し、UPEC の尿路上皮への接着を阻害する。一方、SP-A に関しては、尿路における発現及び、生体防御機能についての検討はなされていない。SP-A と SP-D は一次構造や立体構造が大きく異なっており、リガンドの認識特異性も異なる。実際にこれら二種類のタンパク質は同じ病原微生物に対しても異なる生体防御反応を示す。また、炎症反応の制御においても SP-A と SP-D では異なる作用を示す。したがって、UPEC に対しても SP-A は SP-D と異なる生体防御機能を示す可能性がある。そこで、本申請課題では、尿路感染症に対する SP-A の生体防御機能を明らかにすることを目的とする。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、尿路における SP-A の発現と、尿路感染症に対する SP-A の生体防御機能を明らかにすることを目的とした。具体的には、以下の点を明らかにすることを目的とした。

- ・ SP-A はヒト膀胱上皮に発現しているのか。
- ・ SP-A は UPEC の尿中での増殖を抑制するのか。
- ・ SP-A は UPEC の尿路上皮への接着を阻害するのか。
- ・ SP-A が UPEC の接着を阻害するのであれば、その阻害機構を明らかにする。

- ・ SP-A ノックアウトマウスと野生型マウスの膀胱に UPEC を感染させ、SP-A の感染防御効果を in vivo で確認する。

### 3. 研究の方法

#### (1)膀胱及び尿中における SP-A の発現解析

ヒト手術検体の膀胱を用い、免疫組織染色によって SP-A の局在を明らかにした。また、ヒト尿を抗 SP-A ポリクローナル抗体を用いて免疫沈降した後、電気泳動を行い、抗 SP-A モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングすることにより、尿中 SP-A の存在を確認した。

#### (2)SP-A と UPEC の結合解析

ウエスタンブロッティング法を用いた液相及び、ELISA 法を用いた固相の両実験により、SP-A と UPEC (J96 株) との直接結合を解析した。

#### (3)SP-A による UPEC の凝集解析

UPEC (J96 株) と SP-A または SP-D を一定時間培養し、濁度を測定した。また、蛍光タンパク質 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) を発現した J96 を SP-A、SP-D の存在下で培養し、蛍光顕微鏡を用いて凝集の有無を観察した。

#### (4)SP-A による UPEC の増殖抑制効果

UPEC (J96 株) を、SP-A もしくは SP-D の存在下に尿中で培養し、6 時間後の菌数を測定した。

#### (5)UPEC の尿路上皮細胞への接着に対する SP-A の作用の解析

ヒト膀胱癌細胞株である 5637 細胞に、SP-A とプレインキュベーションした EGFP 発現 UPEC (J96 株) を感染させた。感染後、UPEC が接着した細胞の割合を蛍光顕微鏡で観察した。

5637 細胞と SP-A をプレインキュベーションした後に、EGFP 発現 UPEC (J96 株) を感染させた。感染後、UPEC が接着した細胞の割合を蛍光顕微鏡で観察した。

FimH の UPK1a への結合部位である FimH-RBS (receptor binding site) のクローニングを行い、大腸菌発現系を用いた組換え FimH タンパク質を作成した。また、UPLa の組換えタンパク質を HEK293T 細胞で作成した。これらの組換えタンパク質を用いて ELISA を行い、FimH の UPLa への結合に対する SP-A の影響を解析した。

#### (6)SP-A の UPEC に対する感染防御能の生体内解析

SP-A ノックアウトマウス及び野生型マウ

スに、経尿道的に UPEC (J96 株) を膀胱内に投与し、一定時間経過後に膀胱に付着した細菌数および膀胱粘膜下に浸潤した好中球数を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1)膀胱及び尿中における SP-A の発現

膀胱癌患者の手術摘出標本の非癌部位を抗 SP-A ポリクローナル抗体を用いて免疫染色したところ、尿路上皮細胞の細胞質が特異的に染色され、SP-A が発現していることが示唆された。

また、ヒト尿を用いたウエスタンブロッティングでは、肺胞液から抽出したヒト SP-A より分子量が小さいものの単量体および二量体からなる特徴的なバンドが検出された。尿中の SP-A は、肺由来の SP-A から糖鎖を切断したものとほぼ同等の分子量であった。したがって、尿路に発現している SP-A は、肺由来の SP-A とは糖鎖構造が異なるものの、膀胱上皮に発現し、尿中にも分泌されていることが示唆された。

#### (2)SP-A と UPEC の直接結合

SP-A は  $Ca^{2+}$  存在下で UPEC に結合した。この結合は、キレート剤である EDTA や競合的に作用する  $\alpha$  メチルマンノシドの存在下で抑制された。したがって、SP-A はレクチン活性により UPEC と結合していると考えられた。

#### (3)SP-A による UPEC の凝集

SP-D は UPEC を凝集したが、SP-A では凝集作用を認めなかった。また、糖鎖認識領域が SP-D 由来、コラーゲン様ドメインが SP-A 由来であるキメラタンパク質でも凝集作用は認められなかった。SP-A と SP-D はオリゴマー構造が大きく異なる。キメラタンパク質は SP-A と同様のオリゴマー構造を示すことから、UPEC に対する凝集作用には、SP-D のオリゴマー構造が重要であることが示唆された。

#### (4)SP-A による UPEC の増殖抑制

SP-A は濃度依存性に尿中での UPEC 増殖を抑制したのに対し、SP-D では増殖抑制作用は認められなかった。また、殺菌作用のあるポリミキシン B を加えて UPEC を培養した場合は、1 時間後には UPEC が死滅していたが、SP-A は UPEC 単独で培養した場合と菌数が同程度であった。このことより SP-A の UPEC 増殖抑制は、殺菌的ではなく、静菌的作用によるものであると考えられた。

#### (5) UPEC の尿路上皮細胞への接着に対する SP-A の作用

SP-A とプレインキュベーションした UPEC (J96 株) を UPEC に感染させると、コントロール群と比較して 5637 細胞への接着が有意に抑制された。SP-A と 5637 細胞をプレインキュベーションした場合にも、UPEC の 5637 細胞へ

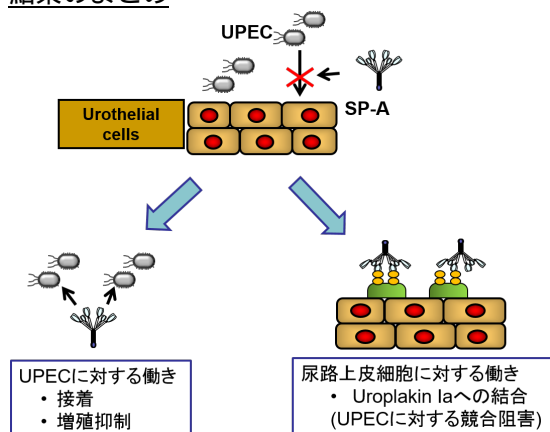
の接着が有意に抑制された。  
 SP-A は UPIa に結合した。この結合は  $\alpha$  メチルマンノシドで阻害されたことから、SP-A はレクチン活性により UPIa に結合すると考えられる。同様に、FimH は UPIa と結合した。FimH と UPIa の結合は SP-A 存在下で有意に阻害された。FimH と SP-A はともに UPIa の糖鎖マンノースを介して UPIa に結合すると考えられる。したがって、SP-A は UPEC の FimH が膀胱上皮の UPIa に結合することを競合的に阻害していることが示唆された。

#### (6)SP-A の UPEC に対する感染防御能の生体内解析

SP-A ノックアウトマウスと野生型マウスの膀胱に、経尿道的に UPEC (J96 株) を投与し、2 時間後に膀胱に接着している細菌数をカウントした。SP-A ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べ有意に接着細菌数が多かった。また、SP-A ノックアウトマウスに、UPEC と SP-A を混合して膀胱内に投与したところ、膀胱に接着する菌数は野生型マウスと差がなかった。

上記モデルマウスの感染 4 時間後の組織切片を観察すると、SP-A ノックアウトマウスでは接着した菌数が多いにもかかわらず、浸潤している好中球数は少なかった。この結果は、SP-A が膀胱の免疫応答調節においても重要な役割を果たしていることを示唆している。

#### 結果のまとめ



SP-A はヒト膀胱上皮に発現しており、尿中へも分泌されている。SP-A はレクチン活性によって UPEC に結合し、尿中での UPEC の増殖を抑制する。また、UPEC の P 線毛に存在する FimH が尿路上皮細胞の膜タンパク質である UPIa に結合することを、SP-A は競合的に阻害する。この阻害効果により、SP-A は UPEC の尿路上皮細胞への接着を抑制すると考えられる。また、SP-A は炎症細胞の浸潤など、膀胱の免疫応答調節においても重要な役割を果たしている可能性がある。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

- 1) 橋本次朗, 他 8 名 膀胱におけるサーファクタント蛋白質 A の発現と尿路感染性大腸菌に対する感染防御機構. 第 395 回日本泌尿器科学会北海道地方会 特別講演 2015 年 6 月 13 日 北海道大学医学部学友会館「フラテ」(北海道札幌市)
- 2) 橋本次朗, 他 8 名 膀胱におけるサーファクタント蛋白質 A の発現と尿路感染性大腸菌に対する感染防御機構. 第 103 回日本泌尿器科学会総会 2015 年 4 月 20 日 石川県立音楽堂、他(石川県金沢市)
- 3) 橋本次朗, 他 8 名 膀胱におけるサーファクタント蛋白質 A の発現と尿路感染性大腸菌に対する感染防御機構. 第 61 回日本化学療法学会東日本支部総会 2014 年 10 月 30 日 東京ドームホテル(東京都文京区)
- 4) Hashimoto J., 他 10 名 Surfactant protein A prevents UPEC adhesion to urothelial surface and inhibits growth of UPEC in urine. 34th Congress of the Societe Internationale d'Urologie, Oct 13, 2014 Gragrow, UK

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

橋本 次朗 (HASHIMOTO JIRO)  
 札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30404685

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：