

研第312号

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Mechanisms of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression in human lung epithelial cells

(ヒト肺上皮細胞における *Legionella pneumophila* が誘導するインターロイキン-8 発現機構)

氏名 照屋 宏 充 (印)

論 文 要 旨

【 背 景 と 目 的 】

Legionella pneumophila は通性細胞内寄生菌であり、肺胞マクロファージに貪食されるが、IV型分泌機構により、その殺菌機構を逃れて、ファゴソーム内で増殖する。また、*L. pneumophila* は肺上皮細胞にも感染するが、その役割は不明である。一方、IL-8は好中球を遊走し、活性化するCXCケモカインであり、炎症性肺疾患において局所の好中球性炎症に重要な役割を果たすことが知られている。そこで、レジオネラ症における肺上皮細胞の役割について検討する目的で、*L. pneumophila* 感染によるIL-8発現誘導機構を解析した。

【 方 法 】

肺上皮細胞として、ヒト由来II型肺胞上皮細胞株A549と気道上皮細胞株NCI-H292を用いた。*L. pneumophila* はAA100jm株とIV型分泌機構を欠失した*dotO*変異株、及びCorby株とフラジェリンを欠失した*flaA*変異株を用い

た。菌の細胞内での増殖は、感染細胞を回収後、細胞抽出液を希釈し BCYE- α 寒天培地に撒き、4日後にコロニー数を測定した。IL-8 mRNA の発現は RT-PCR 法にて、培養液中への分泌は ELISA 法にて調べた。IL-8 転写機構の解析にはレポーターアッセイと EMSA を用いた。種々の NF- κ B シグナル関連分子や Hsp90 の発現はウエスタンブロット法で検討した。

【結果】

L. pneumophila は肺上皮細胞内で増殖したが、*dot0* 変異株はマクロファージ同様、上皮細胞でも増殖できなかった。IL-8 mRNA の発現は感染後1時間で見られ、24時間後まで持続した。一方、*dot0* 変異株による IL-8 mRNA の発現は一過性であり、*flaA* 変異株では感染16時間後より発現が見られ、誘導が遅延していた。IL-8 分泌量も野生型株に比べ、*dot0* 変異株や *flaA* 変異株では減少していた。*L. pneumophila* は IL-8 遺伝子の転写を NF- κ B 配列依存性に増強した。NF- κ B シグナル伝達

に関わる $I\kappa B$ 、IKK、NIK の優性抑制変異体の導入は *L. pneumophila* 誘導性 IL-8 遺伝子転写活性を抑制した。NF- κ B 阻害剤や IKK α 、IKK β と結合し蛋白質の安定化に関与する Hsp90 の阻害剤で細胞を処理すると、IL-8 の発現誘導が阻害された。*L. pneumophila* 感染細胞の核蛋白質から p50、p65、c-Rel から成る NF- κ B 複合体が検出されたが、NF- κ B 阻害剤や Hsp90 阻害剤は、この NF- κ B 複合体の DNA 結合を抑制した。Hsp90 阻害剤は IKK α と IKK β 蛋白質の発現を抑制したが、プロテアソーム阻害剤はその抑制を解除した。

【 結 論 】

L. pneumophila は肺上皮細胞に感染後、NIK や IKK の活性化を介して NF- κ B 依存性に IL-8 の発現を誘導し、そのシグナル伝達には IKK α と IKK β 蛋白質の安定化に関与する Hsp90 も重要であった。さらに、菌側の病原因子として、IV 型分泌機構とフラジェリンが関与していることが明らかになった。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 論文博	第 号	氏 名	照屋 宏充
論文審査委員	審査日	平成 20年 2月 6日		
	主査教授	鈴木敏彦 印		
	副査教授	苅谷研一 印		
	副査教授	須加原一博 印		
(論文題目)				
Mechanisms of <i>Legionella pneumophila</i> -induced interleukin-8 expression in human lung epithelial cells				
(論文審査結果の要旨)				
上記論文に関して、研究にいたる背景と目的、研究内容、および研究結果の意義と学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。				
1. 研究の背景と目的				
<p>通性細胞内寄生菌である <i>Legionella pneumophila</i> は、肺胞マクロファージ内で増殖する。マクロファージにおける増殖機構や感染後の細胞遺伝子制御機構はよく解析されている。一方、肺における細菌の感染防御において肺上皮細胞は最初の前線基地となるはずであるが、肺上皮細胞に <i>L. pneumophila</i> が感染することはわかっているものの、菌の増殖機構やその役割は不明である。IL-8 は好中球を遊走し、活性化するケモカインであり、局所の好中球性炎症に重要な役割を果たすことが知られている。そこで、レジオネラ肺炎における肺上皮細胞の役割について検討する目的で、<i>L. pneumophila</i> 感染による IL-8 発現誘導機構の解析が行われた。</p>				
2. 研究内容				
<p>肺上皮細胞として、ヒト由来Ⅱ型肺胞上皮細胞株と気道上皮細胞株を用いた。<i>L. pneumophila</i> は野生株と、変異株としてⅣ型分泌機構欠損株、フラジェリン欠損株を用いて感染実験を行った。</p> <p>野生株とフラジェリン欠損株は、いずれの肺上皮細胞株にも感染して増殖したが、Ⅳ型分泌機構欠損株は増殖できなかった。IL-8 mRNA の発現はすべての株が誘導した。しかし、野生株と比べ、Ⅳ型分泌機構欠損株ではその発現は一過性であり、フラジェリン欠損株ではその発現誘導に時間を要した。IL-8 の分泌は野生株に比べて、両変異株で減少していた。以上の結果から、レジオネラ感染肺上皮細胞における IL-8 の誘導には初期にはフラジェリンと上皮細胞との接触が、そして後期にはⅣ型分泌機構による菌の増殖が必要であると考えられた。</p> <p>レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、ウェスタンブロットによる解析から、<i>L. pneumophila</i> は IL-8 遺伝子の転写を NF-κB 結合配列依存性に増強することがわかった。さらに、NF-κB の活性化には NIK から IKK の活性化による IκBα のリン酸化が関与して</p>				

いた。阻害剤を用いた実験により、IKK α やIKK β のタンパク質の安定化に關与する Hsp90 も *L. pneumophila* による NF- κ B シグナルの活性化に寄与していることが明らかとなった。

3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究はレジオネラ肺炎における肺上皮細胞での菌の増殖機構や IL-8 発現誘導機構を明らかにし、肺上皮細胞の感染防御における役割を示したものである。これまでマクロファージを用いた研究が盛んであったレジオネラ感染症研究において、新しい視点を導入した報告であると位置づけられる。とくに、IV型分泌機構やフラジェリンはレジオネラに限らず、他の細菌においても重要な病原因子であり、それらの認識機構を含め、今後の研究展開における貴重な報告である。なお、本研究は 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology にて Best Poster Award を受賞しており、国際的にも高水準のものであると評価される。

以上により、本論文は学位授与に十分値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。