

氏名	コーウィワッタナーゲン ジュターボン Kohwiwattanagun Juthaporn
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第3112号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科病理系専攻
学位論文題目	Mycobacterial Mammalian Cell Entry Protein 1 (Mce1A) - Mediated Adherence Enhances the Chemokine Production by A549 Alveolar Epithelial Cells (結核菌細胞内侵入因子 Mce1A による A549 肺胞上皮細胞からのケモカイン産生誘導機序)
論文調査委員	(主査) 教授 杉田昌彦 教授 三嶋理晃 教授 西淵光昭

論文内容の要旨

Mycobacterium cell entry protein 1A (Mce1A) は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) に特有な細胞内侵入因子である。リコンビナントタンパク質を用いた解析から、この Mce1A は、菌の上皮細胞への侵入に重要な役割を果たすことが示されている。実際の感染で、結核菌は肺胞マクロファージだけでなく肺胞上皮細胞にも侵入できることから、菌は Mce1A を介して細胞内殺菌機構を有さない上皮細胞に侵入し、その細胞内で増殖することで感染宿主内での長期生存をより容易にしているものと考えられる。一方、肺胞上皮細胞には感染した病原体を排除する能力はないが、ケモカインを産生して炎症性細胞を動員することで、感染局所における宿主初期防御反応に関与することができる。

最近、Mce1A を欠損した結核菌の感染では、広範な炎症像が肺において認められるものの、肉芽腫形成が認められないことが示されている。肉芽腫の形成には、ケモカインやサイトカインによる炎症性細胞の動員と活性化が必要となることから、この結果は、Mce1A が侵入因子としてだけでなく、感染局所のケモカインやサイトカイン産生応答にも関与することを示唆するものである。そこで本研究では、Mce1A が肺胞上皮細胞からのケモカインおよびサイトカイン産生にどのような影響を有するのかについて解析を行った。

Mce1A 以外の結核菌因子の関与を排除して Mce1A の活性を調べるため、ここでは菌体表層に Mce1A を発現するリコンビナント *E. coli* (Mce1A (+) *E. coli*) を用いた。II 型肺胞上皮細胞株 A549 細胞に Mce1A (+) *E. coli* を感染させたところ、細胞に付着した菌数および細胞内に侵入した菌数は、コントロール *E. coli* (Mce1A (-) *E. coli*) に比較して明らかに多かった。また、Mce1A (-) *E. coli* 感染後の interleukin-8 (IL-8) および monocyte chemoattractant peptide-1 (MCP-1) 産生は弱いものであったが、Mce1A (+) *E. coli* の感染では強い産生が誘導された。さらに、Mce1A (+) *E. coli* は A549 細胞の TNF α および RANTES の転写を増強することが示された。一方、Mce1A (+) *E. coli* 感染後の細胞への付着・侵入およびケモカインの産生は、抗 Mce1A 抗体の処理で著しく抑制されることがわかった。これらの結果から、Mce1A は菌の肺胞上皮細胞への付着・侵入を誘導するだけでなく、ケモカインの発現および産生を亢進させることが明らかとなった。さらにその機序について解析するため、A549 細胞をサイトカラシン D で処理して、菌の細胞内侵入を阻害した場合のケモカイン産生応答を調べた。その結果、IL-8 および MCP-1 産生はいずれも抑制されることが示された。サイトカラシン D 処理は、IL-1 β 刺激で誘導されるケモカイン産生には影響がなかったことから、Mce1A (+) *E. coli* 感染後のケモカイン産生誘導には Mce1A を介した細胞内侵入のプロセスが必要となることが示された。最後に、Mce1A にケモカイン産生誘導能があるか否かを調べるため、Mce1A をコートした蛍光ラテックスビーズで A549 細胞を刺激した。Mce1A をコートしたビーズは効率よく細胞内に取り込まれたが、IL-8 および MCP-1 産生は誘導されなかった。

以上の結果から、Mce1A と細胞との interaction は菌の細胞侵入を亢進するが、その結合が A549 細胞からのケモカイン産生を誘導するのではなく、Mce1A を介した菌と細胞との結合が他の *E. coli* 由来因子と細胞との interaction を亢進する

ため、ケモカイン産生が誘導されたものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

結核菌の有する各種病原因子のうち、Mycobacterium cell entryprotein 1A (Mce1A) は非貪食細胞への侵入因子として知られ、殺菌能を欠く肺胞上皮細胞への侵入による宿主体内での結核菌長期生存に関与すると考えられている。一方、肺胞上皮細胞は、ケモカイン産生を介して炎症性細胞を感染局所に動員することで宿主初期防御反応に関与する。最近、Mce1A が感染局所でのケモカインやサイトカイン産生応答に関与することが示唆された。その詳細なメカニズムを明らかにするため、本研究では肺胞上皮細胞からのケモカイン産生における Mce1A の関与について解析が行われた。

菌体表層に Mce1A を発現するリコンビナント大腸菌を II 型肺胞上皮細胞株 A549 細胞に感染させたところ、interleukin-8 (IL-8) および monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の産生が強く誘導された。これらケモカイン産生は抗 Mce1A 抗体添加で著しく抑制された。また、サイトカラシン D 処理により IL-8 および MCP-1 産生が抑制されたことから、Mce1A を介した細胞侵入のプロセスがこれらケモカイン産生に必要であることが示された。一方、Mce1A をコートしたラテックスビーズには IL-8 および MCP-1 産生誘導能が認められなかった。これらの結果から、Mce1A 自体にはケモカイン産生誘導能はないが、Mce1A を介した細胞への結合が、他の菌体表層由来因子に対する細胞のシグナル応答を亢進させる可能性が示された。

以上の研究は、結核菌の病原性の解明に貢献し、結核病態の理解に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成19年3月2日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。