The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Potent Antimycobacterial Activity of Mouse Secretory Leukocyte Protease Inhibitor
Author(s)	西村, 潤一
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49810
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	西（にし）　村（むら）　潤（じゅん）　一（いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２２８０４　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	Potent Antimycobacterial Activity of Mouse Secretory Leukocyte Protease Inhibitor （マウスSLPIの抗結核菌活性とそのメカニズム）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　澤　　芳樹 （副査） 教　授　奥村明之進　　教　授　朝野　和典

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

抗結核薬の開発により結核菌に対する治療が進歩した現在でも、結核による死者は全世界で発展途上国を中心に毎年200万人に上る。またHIV併発結核、多剤耐性結核菌の出現など、結核感染症は今日でも人類に脅威を及ぼす感染症のひとつである。結核菌は飛沫により肺に侵入し、肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージに感染、増殖をする。そのため、結核菌に対する初期の生体の防御機構として肺胞上皮細胞は重要な役割を果たしていると考えられる。

Secretory leukocyte protease inhibitor（SLPI）は2つのwhey acidic protein（WAP）ドメインを有する12kDaのタンパク質である。SLPIは好中球、マクロファージ、呼吸器系や消化器系の上皮細胞などから分泌されるタンパク質で、従来プロテアーゼインヒビターとして発見されたがグラム陽性、陰性菌、真菌に対する抗菌作用、また、近年では抗炎症作用を有することが報告されている。このようにSLPIは

多機能を持った分泌タンパク質であるが、SLPIの生体内での本来の役割は不明である。本研究ではⅡ型肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージより分泌されるSLPIに注目して結核菌に対する作用および機構について解析を行った。

〔　方法　〕
C57BL/6マウスに*Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG)を経気道的に投与し、SLPIの発現を肺組織のqPCR、免疫染色、気管支肺胞洗浄液を用いたWestern blottingにより解析した。大腸菌からリコンビナントSLPIを精製してBCG、結核菌に対する増殖抑制効果を解析した。SLPI投与後のBCGを走査電子顕微鏡により観察した。菌の細胞膜の溶解を定量化する1-N-phenylnaphthylamine(NPN)を用いたOuter membrane permeabilization assayを行った。SLPIの変異タンパクを作製し抗結核菌作用を解析した。SLPIノックアウトマウスと野生型マウスに経気管的に結核菌を投与し、各マウスの生存期間、感染後3週の肺および脾臓の結核菌生菌数を解析した。

〔　成績　〕
1. SLPIの結核菌による発現誘導と抗結核菌作用
マウスに経気道的にBCGを投与することによりSLPIの発現は感染後2日目に増大した。感染後2日目の肺の免疫染色でSLPIが主に肺胞上皮細胞で発現していた。肺胞気管支洗浄液中に感染後2日目にSLPIを検出した。則ち、SLPIは結核菌類の感染初期に肺胞上皮細胞に誘導、肺胞内に分泌されることが示された。
in vitro でリコンビナントmouseSLPIを投与すると、BCG、結核菌H37Rv株、H37Ra株の増殖は抑制された。

2. SLPIの抗結核菌作用のメカニズム
走査電子顕微鏡で観察すると、SLPI投与後3時間でBCGは細胞膜に瘤を形成し、12時間後に細胞膜は破壊された。SLPI投与によるBCG によるNPNの取り込みはSLPIの濃度依存的に増加した。以上より、SLPIはBCG細胞膜を直接結合して破壊することが示された。SLPIの持つ2つのWAPドメインの片方を削除した変異SLPIを作製し、増殖抑制効果、細胞膜の破壊を解析した。SLPIのWAPドメインは両方とも独立して増殖抑制効果、細胞膜破壊作用が観察された。次にWAPドメインに存在する2箇所の陽電荷アミノ酸を陰電荷アミノ酸に置換したSLPIのWAPドメインタンパク質を作製し、増殖抑制効果、細胞膜破壊を観察した。陰電荷アミノ酸に置換した変異タンパク質は増殖抑制効果、細胞膜破壊を示さず、結核菌に対する抗菌作用に陽電荷アミノ酸が重要であることが示唆された。

3. SLPIノックアウトマウスの結核菌に対する感受性
野生型マウスが生存する菌量でSLPIKOマウスは感染後4週から8週で全例死亡した。感染後3週目に肺、脾臓の生菌数を測定するとSLPIKOマウスで結核菌数が野生型と比べて有意に増大した。

〔　総　　括　〕
SLPIは結核菌感染に対して肺胞上皮細胞で発現し肺胞腔内に分泌された。SLPIは結核菌に対して直接結合し細胞膜を破壊し、増殖抑制効果を示した。SLPIのWAPドメインは各々抗菌活性を有し、抗菌活性にはWAPドメインの陽電荷アミノ酸が重要であると考えられた。SLPIKOマウスは結核菌に対して高感受性であり、結核菌に対する感染初期の防御機構としてSLPIが重要であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

結核は今日でも人類に脅威を及ぼす感染症のひとつであり、近年従来の結核菌治療薬が無効である多剤耐性結核菌が出現し問題となっている。そこで抗菌タンパク質であるSecretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) の結核菌呼吸器感染時における作用とその分子メカニズムを解明することを目的とした。

SLPIが結核菌感染の際に気道に分泌されること、SLPIが結核菌に対して細胞膜透過性を亢進させることで結核菌細胞膜を破壊し増殖抑制効果を持つことを証明した。また、そのSLPIの抗菌活性には陽電荷アミノ酸が重要であることを明らかにした。

さらに、SLPI欠損マウスを解析することで、SLPIが結核菌呼吸器感染時に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

これらの研究はSLPIが結核菌に対する新たな治療薬になる可能性を示唆するものであり、学位授与に値すると考えられる。