

Title	Lipocalin 2-Dependent Inhibition of Mycobacterial Growth in Alveolar Epithelium
Author(s)	財賀, 大行
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54226">https://hdl.handle.net/11094/54226</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【126】

氏名	さいがひろゆき 財賀大行
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 23695 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予環境医学専攻
学位論文名	Lipocalin 2-Dependent Inhibition of Mycobacterial Growth in Alveolar Epithelium (肺胞上皮におけるリポカリン2依存的結核細菌増殖抑制)
論文審査委員	(主査) 教授 竹田 潔 (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 熊ノ郷 淳

### 論文内容の要旨

(目的)

結核菌をはじめとする多くの細菌は、生命を維持するために鉄イオンを外部から補充しなければならない。特に、宿主および細胞内に感染する細菌にとっては、限られた範囲で遊離鉄を獲得する必要がある。一方、宿主内では Lipocalin 2 (Lcn2) というタンパク質が、宿主内の遊離鉄と結合することが知られている。このような Lcn2 の遊離鉄との結合が、感染細菌の鉄獲得を阻害し、その結果増殖を抑制することが予想される。しかし、これまで Lcn2 が結核菌の感染防御に関わっているという報告はなされていない。そこで我々は、Lcn2 欠損マウスを用いて、結核菌感染に対する生体内での Lcn2 の役割や重要性、および感染防御メカニズムを解明することを目的とした。

(方法ならびに成績)

### 1. Lcn2 による結核菌増殖抑制

Lcn2 による結核菌の増殖抑制を検討するため、まずリコンビナント Lcn2 を精製した。そのリコンビナント Lcn2 を BCG および結核菌培養液に加え、数日後結核菌数を測定した。その結果、Lcn2 濃度依存的に結核菌の増殖が抑制された。また Lcn2 により増殖抑制された結核菌培養液に鉄イオンを補うと、鉄イオン濃度依存的に増殖抑制が解除された。このことから Lcn2 は、結核菌の鉄獲得を阻害することで増殖を抑制していることが示唆された。次に Lcn2 欠損マウスを用いて、結核菌感染における生存率を解析した。その結果、Lcn2 欠損マウスは野生型マウスに比べて早くほとんどが死亡した。また感染 2 週間後のマウスの肺の菌数を比較したところ、Lcn2 欠損マウスの肺で菌数が増加していた。このように、Lcn2 欠損マウスは結核菌感染に対して高感受性を示した。

### 2. Lcn2 の発現

BCG 感染 2 日目のマウスの肺切片を抗 Lcn2 抗体で免疫染色したところ、肺胞上皮細胞で Lcn2 が発現していることが確認された。また肺胞マクロファージを単離し、*in vitro* で BCG 感染させると、感染 2 日目に Lcn2 mRNA の発現が亢進した。また Lcn2 の肺胞腔内への分泌が予想されたことから、感染初期マウスの肺胞洗浄液 (BALF) を、抗 Lcn2 抗体を用いてウエスタンブロッティングにより解析したところ、Lcn2 のバンドが確認された。以上のことから Lcn2 は結核菌感染初期に、肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージから肺胞腔内に分泌されることが示唆された。

### 3. 肺胞上皮細胞における結核菌感染防御メカニズム

次に、Lcn2 欠損マウスが結核菌感染に感受性を示すメカニズムを検討した。結核菌感染 5 日目の野生型および Lcn2 欠損マウスの肺切片を免疫組織染色した。その結果、Lcn2 欠損マウスの肺胞上皮細胞内で明らかに結核菌が認められたので、我々は肺胞上皮細胞に着目した。肺胞上皮細胞の cell line (AEC) に *in vitro* で BCG を感染させて細胞内の菌数を比較した。その結果、野生型マウス由来の AEC に比べて、Lcn2 欠損マウス由来の AEC で菌数が増加していた。このことから肺胞上皮細胞において、Lcn2 欠損により結核菌の細胞への侵入、増殖が増加していることが示唆された。

### 4. Lcn2 における肺胞上皮細胞内での結核菌増殖抑制

まず、分泌された Lcn2 が細胞内に取り込まれるかを検討した。GFP を発現させた BCG をあらかじめ感染させた肺胞上皮細胞に、蛍光処理したリコンビナント Lcn2 を加え、蛍光観察した。その結果、Lcn2 はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、さらに感染させた BCG とも近接していることが確認された。また 3H ウラシルを用いた実験系で、肺胞上皮細胞内に取り込まれた Lcn2 が細胞内の BCG の増殖を抑制することが示唆された。

(総括)

以上の結果より、結核菌が宿主に感染すると、感染初期に肺胞上皮および肺胞マクロファージから肺胞

腔内へ Lcn2 が分泌され、結核菌の鉄獲得を阻害することで結核菌の増殖を制限していることが示唆された。また、分泌された Lcn2 は肺胞上皮細胞内に取り込まれ、細胞内に寄生した結核菌の増殖を抑制していることが明らかとなった。このように、Lcn2 は肺胞上皮という第一線のバリアーで結核菌感染防御として重要な役割を担っていることが明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

結核菌は主にマクロファージに感染し、細胞内で生存することが知られている。最近、肺胞上皮細胞にも感染することが報告されたが、これまで結核菌に対する肺胞上皮細胞での感染防御機構は不明であった。

本研究では、結核菌感染により肺胞上皮細胞や肺胞マクロファージなどから分泌される Lipocalin 2 の結核菌感染防御メカニズムについて解析した。結核菌感染初期に肺胞上皮細胞などから肺胞腔内へ分泌される Lipocalin 2 は、エンドサイトーシスによって肺胞上皮細胞内に取り込まれ、結核菌が増殖する際に必要な鉄イオンの取り込みを阻害することで細胞内の結核菌の増殖を抑制することを、Lipocalin 2 欠損マウスなどを用いて明らかにした。

本研究により、結核菌感染に対する肺胞上皮での感染防御メカニズムの一端が明らかとなり、非常に意義のある研究成果であると考えられる。よって本研究は博士 (医学) の学位授与に値する。