

学 位 論 文 要 旨

氏 名 原田 真也



論 文 題 目

「Panton-Valentine leukocidin induces cytokine release and cytotoxicity mediated by the C5a receptor on rabbit alveolar macrophages」

(ウサギ肺胞マクロファージを用いた Panton-Valentine leukocidin による C5a 受容体を介したサイトカイン放出と細胞障害の検討)

指 導 教 授 承 認 印

横場 正典 

Panton-Valentine leukocidin induces cytokine release and cytotoxicity mediated by the C5a receptor on rabbit alveolar macrophages

(ウサギ肺胞マクロファージを用いた Panton-Valentine leukocidin による C5a 受容体を介したサイトカイン放出と細胞障害の検討)

氏名 原田 真也

【背景】

市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (CA-MRSA) が産生する Panton-Valentine leukocidin (PVL) は重症感染症を引き起こす原因となる白血球溶解毒素である。PVL 陽性 CA-MRSA 感染症において肺炎は特に致死率が高い。PVL は LukS-PV と LukF-PV から成る 2 成分毒素であり、標的細胞の受容体を介して LukS-PV と LukF-PV が交互に会合し細孔を形成することで細胞内成分の流出を来し、標的細胞を壊死に導く。PVL は好中球に対して細胞障害性を示し、さらに受容体として C5a receptor (C5aR) が同定されている。また、好中球は PVL 刺激によりサイトカインを産生することが知られている。しかし、PVL の持つ細胞および種特異性によって、詳細な作用は明らかになっていない。

【目的】

PVL 陽性 CA-MRSA による肺炎の病態を解明するため、肺胞腔の初期免疫に中心的な役割を持つ肺胞マクロファージ (AM) を用いて、PVL による刺激実験を行い、PVL の細胞障害性を評価し、さらに、PVL 刺激に対する AM からのサイトカイン産生について検討する。

【方法】

(1) リコンビナント蛋白作成

PVL 産生 CA-MRSA である USA300 株由来の LukS-PV および LukF-PV の塩基配列をそれぞれ pRSET ベクターに導入する。さらにそれらと塩基配列を導入していない pRSET を大腸菌 DH5 α に形質導入し、それぞれ LukS-PV-pRSET、LukF-PV-pRSET および Empty vector (EV) -pRSET を作成する。それらをさらに大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、LukS-PV-pRSET、LukF-PV-pRSET および EV-pRSET 由来のリコンビナント蛋白をそれぞれ発現させる。発現させたリコンビナント蛋白は Cobalt Affinity Resin を用いて精製し、DetxiGel カラムを用いて Lipopolysaccharide (LPS) を除去する。

精製したリコンビナント蛋白 (rLukS-PV、rLukF-PV および rEV) はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウエスタンブロッティング (WB) でその発現を確認し、凍結融解による蛋白の凝集・析出を避けるためグリセリンと 1:1 で混合する。

(2) ウサギ肺胞マクロファージの回収

実験用ウサギ (New Zealand white) をイソフルラン吸入で麻酔導入し、ペントバルビタールを腹腔内注射することで麻酔を維持する。麻酔後、頸部切開し、気管と頸動脈を同定後、頸動脈穿刺により放血致死させる。その後、同定した気管を切開し、生理食塩水によって気管支肺胞洗浄

を行う。得られた気管支肺胞洗浄液を遠心分離し、沈殿物を 10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有 RPMI1640 に再懸濁し、孵卵器で 2 時間培養後、接着細胞を肺胞マクロファージとする。マクロファージの純度はメイギムザ染色とフローサイトメトリーで確認する。

(3) 肺胞マクロファージ培養と刺激実験および C5aR 阻害実験

回収した肺胞マクロファージは細胞培養用プレートに 1×10^5 細胞/well ずつ播種し、孵卵器で一晩培養し、細胞を接着させる。培養液には 10%FBS 含有 RPMI1640 を用いる。

刺激実験の場合、接着した肺胞マクロファージを 5、100 nM の rLukS-PV、rLukF-PV、rEV、rPVL (rLukS-PV と rLukF-PV を 1:1 で混合して作成) および Positive control (PC) として LPS 100 ng/mL で 24 時間刺激する。

C5aR 阻害実験の場合、細胞接着後、C5aR の阻害剤である PMX205 100 μ M で 15 分間前処理をし、5、100 nM の rLukS-PV、rPVL および LPS 100ng/mL で 24 時間刺激する。

(4) 細胞障害性評価

リコンビナント蛋白で刺激後および無刺激 (Negative control ; NC) の細胞に対して MTT assay を行い、マイクロプレートリーダーを用いてそれぞれの細胞の吸光度を測定する (測定波長 : 570 nm、基準波長 : 655 nm)。刺激後と NC の細胞の吸光度を比較することで、刺激による細胞障害性を評価する。

(5) サイトカイン測定

リコンビナント蛋白で刺激後、PC および NC の細胞上清を用いて、ELISA を用いて、サイトカイン (刺激実験の場合 : TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β C5aR 阻害実験の場合 : TNF- α を測定) を測定し、刺激後と NC でのサイトカイン値とを PC でのサイトカイン値の比で比較する。

(6) C5aR 発現確認

細胞溶解液 (滅菌水にトリス 20 mM、スクロース 0.25 M、トリトン 1%、グリコールエーテルジアミン四酢酸 10 mM、エチレンジアミン四酢酸 2 mM で溶解し pH 8.2 に調整して作成) を用いて、肺胞マクロファージを氷冷下で 1 時間処理し、C5aR に対するモノクローナル抗体を用いて WB により C5aR の発現を確認する。

(7) 統計解析

3 群以上の比較の場合、一元配置分散分析を用いる。2 群間の比較の場合、F 検定が等分散であると仮定し、t 検定を行う。統計分析には統計解析ソフト EZR を使用する。すべての値は平均値 \pm 標準誤差で表し、 $p < 0.05$ を統計的に有意であると見なす。サイトカインの測定において濃度が検出感度よりも低い場合、各 ELISA の検出感度の下限 (TNF- α : 31.3 pg/mL、IL-6 : 12.5 pg/mL、IL-1 β : 49.15 pg/mL) を用いて統計解析を行う。

【結果】

リコンビナント蛋白に関しては、LukS-PV と LukF-PV の分子量はそれぞれ、32 および 34 kDa であることから、SDS-PAGE および WB で rLukS-PV と rLukF-PV が発現し、rEV には発現していないことが確認された。肺胞マクロファージの純度に関しては、メイギムザ染色では 89%、フローサイトメトリーでは 88%の純度が確認できた。

細胞障害性に関しては、MTT assay で、NC に対し、5nM、100nM の rPVL 刺激でそれぞれ有意な吸光度低下 ($p<0.01$) を認め、濃度依存的な細胞障害性を示した。一方で rLukS-PV、rLukF-PV および rEV による刺激ではいずれも NC と比較して吸光度に有意差は認めなかった。

サイトカイン産生に関しては、ELISA の結果、PC とのサイトカイン比は 100nM LukS-PV 刺激でいずれのサイトカインも NC に対して有意に上昇した ($p<0.01$)。一方で、rLukF-PV、rPVL、rEV ではいずれの刺激によっても NC と有意差を認めなかった。

C5aR 阻害実験に関しては、ウサギ C5aR は 50kDa であり、WB で AM における C5aR の発現が確認できた。細胞障害性については、PMX205 で細胞を前処理することにより、5nM PVL 刺激の場合、未処理の細胞よりも吸光度低下が改善 ($p<0.05$) し、細胞障害の抑制が示された。サイトカインについても PMX205 での前処理により、100nM LukS-PV 刺激による TNF- α の産生が有意に抑制された ($p<0.01$)。

【考察】

これまで C5aR を介したヒト初代培養好中球に対する PVL 細胞障害性が報告されていたが、肺胞腔における PVL の作用機序を解明する上では不十分であった。そのため本研究は、肺胞腔の自然免疫において主要な役割を担う AM に焦点を当て、PVL の作用を検討した。本研究結果は LukS-PV が AM からの炎症性サイトカインの放出を誘発し、LukS-PV と LukF-PV が C5aR を介して会合し孔形成をすることで細胞障害性を来すことを示した。壊死性肺炎のメカニズムを考える上で、この PVL の作用により、AM の貪食作用およびサイトカイン放出作用が障害され、病原因子の除去の遅延を来し、感染が長期化および重篤化する可能性が示唆された。

ヒト好中球では、PVL により TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β などのサイトカインが放出されることが報告されている。一方、本研究では、ウサギ AM において PVL の構成要素である LukS-PV の存在下で同様のサイトカイン放出がみられたものの、PVL 存在下では AM そのものが障害されることが明らかとなった。今後、PVL とその構成要素である LukS-PV の作用に関して、宿主種と細胞種の違いを考慮した検討が必要であると考えられる。本研究ではサイトカイン放出に関連する受容体に関し、AM においては C5aR が関与していることが示されたが、好中球においては C5aR 以外に Toll-like 2 receptor の関与を示した報告もあり、今後複数の受容体を評価する必要性が考えられる。

【結語】

PVL は C5aR を介しその構成成分が会合し AM を障害し、LukS-PV は単独で C5aR を介してサイトカイン放出を誘導した。