

呼吸器における感染防御創薬を目指した肺コレクチンの分子基盤研究

西谷 千明 [札幌医科大学医学部医化学講座／助教]
(前 札幌医科大学医学部第一生化学講座/助教)

背景・目的

近年、細胞内寄生菌の非定型抗酸菌やレジオネラ菌による呼吸器感染症が増加している。これら感染症は治療が困難な場合があり、生体が有している自然免疫を有効に作動させることが重要である。我々は、呼吸器における自然免疫で重要な役割を果たしている肺コレクチン(肺サーファクタント蛋白質A及びD: SP-A, SP-D)が、肺胞マクロファージ(MΦ)の貪食受容体の細胞表面への発現を増強することで、肺炎球菌や非定型抗酸菌の貪食を促進することを明らかにした。本研究では、これら細菌に対する肺コレクチンの直接作用、及び、肺コレクチンが介在するMΦの貪食促進の分子機構を解明することにより、感染防御創薬として肺コレクチン関与自然免疫機構を応用するための分子基盤を確立する。

内容・方法

A. レジオネラ(*Legionella pneumophila*)と肺コレクチンの結合

熱殺菌(100度、5分間)したレジオネラを固相化し、肺コレクチンとの結合をカルシウム及びEDTA存在下で解析した。

B. SP-Aのレジオネラに対する結合部位の同定

SP-Aとレジオネラの結合へ及ぼす、抗SP-Aモノクローナル抗体(mAb)の影響を調べた。

C. 非定型抗酸菌 *Mycobacterium avium*(*M. avium*)と肺コレクチンの結合

紫外線殺菌(5分間)した*M. avium*と肺コレクチンとの溶液中での結合を、カルシウム及びEDTA存在下で解析した。

D. *M. avium*の凝集に対する肺コレクチンの効果

*M. avium*の細胞壁は、アラビノガラクタノペプチドグリカンを核とし、多数の脂肪酸や脂質、リポアラビノマンナン(LAM)等の糖脂質で構成される。我々は、LAMがSP-Dと直接結合することを明らかにしていることから、肺コレクチンと*M. avium*との結合に及ぼすLAMの影響を調べた。さらに、紫外線殺菌した*M. avium*の凝集に対する、肺コレクチンの影響を調べた。

結果・成果

A. レジオネラ(*Legionella pneumophila*)と肺コレクチンの結合

熱殺菌したレジオネラをマイクロタイターウェルに固相化し、肺コレクチンとの結合をカルシウム及びEDTA存在下で解析した。カルシウム存在下で、SP-A および

Dは、濃度依存性にレジオネラに結合した。EDTA存在下では、レジオネラとの結合は、SP-Aで約40%、SP-Dは約65%にまで抑制された。以上の結果から、肺コレクチンは、熱処理したレジオネラ菌体に、一部カルシウム依存性に結合することを示唆した。さらに、溶液中においても、肺コレクチンとレジオネラは同様の結合性を示したことから、肺コレクチンはレジオネラに直接結合することが明らかとなった。

B. SP-Aのレジオネラに対する結合部位の同定

SP-Aのレジオネラに対する結合部位を同定するため、SP-Aと抗SP-A mAbを反応させ、これら複合体とレジオネラとの結合を調べた。その結果、SP-Aの糖鎖認識領域(CRD)をエピトープにもつ抗SP-A mAbがSP-Aとレジオネラとの結合を有意に抑制した。以上のことから、SP-Aのレジオネラに対する結合部位はCRDであることが示唆された。

C. *Mycobacterium avium*(*M. avium*)と肺コレクチンの結合

紫外線殺菌した*M. avium*と肺コレクチンとの溶液中の結合をカルシウム及びEDTA存在下で解析した。カルシウム存在下で、SP-AおよびDは、濃度依存性に*M. avium*に結合し、EDTA存在下で完全に結合が阻害された。それ故、肺コレクチンはカルシウム依存性に*M. avium*と直接結合することが明らかとなった。

D. *M. avium*の凝集に対する肺コレクチンの効果

肺コレクチンと*M. avium*との結合に及ぼすLAMの影響を調べた。LAMは濃度依存性に*M. avium*とSP-Dとの結合を抑制した。一方、SP-Aと*M. avium*との結合にLAMは全く影響を及ぼさなかった。さらに、SP-AおよびDは、いずれもカルシウム存在下で*M. avium*の凝集を促進させ、EDTA存在下では肺コレクチンによる凝集効果は認められなかった。また、LAMの存在下においても、SP-Dのみ*M. avium*の凝集が阻害された。以上の結果から、肺コレクチンはカルシウム依存性に*M. avium*を凝集し、SP-DのリガンドであるLAMは、SP-Dによる*M. avium*凝集効果を阻害することが明らかとなった。

今後の展望

本研究により肺コレクチンはレジオネラおよび*M. avium*に直接結合することが明らかとなった。今後は、肺胞マクロファージに貪食された、レジオネラ及び*M. avium*のファゴソームやファゴリソーム内の生存率を調査し、肺コレクチン存在下と非存在下で、これら細菌の細胞内生存率を比較する。また、最も有効に細胞内寄生菌の貪食を促進するSP-A/SP-Dキメラ体を作成し、生体が本来有している自然免疫機構を有効に作動させる為の分子基盤を解明することで、呼吸器感染症の予防及び治療への応用へ発展することが期待される。