

川元 康嗣 論文内容の要旨

主 論 文

TNF- α inhibits the growth of *Legionella pneumophila* in airway epithelial cells

by inducing apoptosis

TNF- α は、アポトーシスを誘導することで *Legionella pneumophila* の気道上皮細胞内での増殖を抑制する

川元 康嗣、森永 芳智、木村 由美子、賀来 敬仁、小佐井 康介、宇野 直輝、
長谷川 寛雄、柳原 克紀、

(掲載雑誌名・Journal of Infection and Chemotherapy ・ in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：柳原 克紀教授)

緒 言

レジオネラ肺炎の原因菌である *Legionella pneumophila* (Lp) は、下気道へ吸入されると貪食細胞であるマクロファージへ感染し、細胞内で増殖する。Lp 感染マクロファージならびに細胞死の過程で放出される炎症メディエーターは、病態の重症化との関わりが指摘されている。TNF- α はレジオネラ肺炎に対する宿主応答として重要な役割を果たしていると考えられ、TNF- α 阻害薬を治療として使用している自己免疫疾患や炎症性腸疾患の患者では、Lp 感染ならびに重症化のリスクが高い。近年、非貪食細胞である気道上皮細胞への感染も確認され、細胞内で増殖することが明らかとなっているが、Lp に対する気道上皮細胞の生体防御としての役割ならびに TNF- α との関わりは十分に解明されていない。そこで、今回我々は、Lp の気道上皮細胞内増殖に対する TNF- α の効果について検討した。

対象と方法

Lp (臨床分離株 NUL1) を気道上皮細胞株 NCI-H292 または単球系細胞株 THP-1 に感染後、細胞内菌数ならびに細胞傷害性を評価した。細胞内菌数は、細胞外の細菌をゲンタマイシンで死菌化したのち、蒸留水で細胞を破壊後、BCYE- α 寒天培地上に塗布した。感染後 48 時間までの TNF- α ならびに抗 TNF- α 中和抗体存在下での細胞内菌数を評価した。細胞傷害性は、培養上清中の LDH (Lactate dehydrogenase) ならびに 0.2% トリパンプルー染色で評価した。アポトーシスの関与を評価するために、活性化 caspase 3/7 を蛍光染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。また、caspase 阻害剤 (zVAD) を用いて、細胞死を抑制した時の Lp 細胞内菌数を評価した。細菌数、細胞傷害性はいずれも mean \pm SD で表した。

結 果

Lp を NCI-H292 に MOI 50 (multiplicity of infection) で感染後、細胞内菌数は時間依存性に増加した。48 時間時点における Lp 感染細胞内菌数は 6.95 \pm 0.04 Log₁₀CFU/mL であったのに対し、TNF- α 刺激下では濃度依存性に減少し、TNF- α 50ng/mL での細胞内菌数は 5.59 \pm 0.25 Log₁₀CFU/mL であった (p<0.01)。この TNF- α による増殖阻害効果は、抗 TNF- α 中和抗体を添加することにより抑制された。

48 時間時点における Lp 感染細胞の生細胞率の 78.7 \pm 3.2%と比較して、TNF- α 刺激 Lp 感染細胞の生細胞率は 56.7 \pm 4.6%と有意に減少しており (p<0.01)、LDH も上昇していた (p<0.01)。活性化 caspase3/7 陽性細胞は Lp 感染細胞で観察され、TNF- α 刺激でより多く観察された。TNF- α 刺激 Lp 感染細胞を zVAD で処理することにより、caspase3/7 活性化細胞は減少し、生細胞率が有意に上昇した (TNF- α , 43.7 \pm 2.3% vs. TNF- α +zVAD, 53.3 \pm 4.1%, p<0.05)。また、細胞内菌数も zVAD 処理により有意に増加した (TNF- α , 5.17 \pm 0.08 Log₁₀CFU/mL vs. TNF- α +zVAD, 6.14 \pm 0.11 Log₁₀CFU/mL, p<0.01)。THP-1 においても TNF- α による Lp 増殖抑制効果が認められ、細胞死が誘導されていた。

考 察

TNF- α は、Lp 感染気道上皮細胞のアポトーシスを促進し、細菌の増殖を抑制することが示唆された。単球/マクロファージでも同様の現象が確認され、細胞死による細菌数の制御は、これらの細胞に共通の生体防御の機序の一つと推察された。TNF α 阻害薬投与中の患者では、その機能が低下する結果、急激な細菌増殖を招き、重症化につながっている可能性が考えられた。しかしながら、気道上皮の細胞死は、物理的バリアの破綻から感染巣の拡大につながる可能性も考えられるため、気道上皮細胞への細菌感染と細胞死との関わりについてはさらなる検討が必要である。

本作用が TNF- α 阻害薬による Lp 感染症のリスク増加の機序のひとつと推察された。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。