Nontypeable Haemophilus influenzae exploits the interaction between protein-E and vitronectin for the adherence and invasion to bronchial epithelial cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2016-05-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 池田, 政輝 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3003

博士（医学）　　池田　政輝

論文題目

Nontypeable *Haemophilus influenzae* exploits the interaction between protein-E and vitronectin for the adherence and invasion to bronchial epithelial cells

（無莢膜型ヘモフィルスインフルエンザ菌は気管支上皮細胞への接着と侵入に Protein-E とビトロネクチンの相互作用を利用する）

論文の内容の要旨

［はじめに］

Haemophilus influenzae はヒトや動物の粘膜に存在するグラム陰性菌であり、莢膜多糖体の抗原性により a～f の 6 種類に分類される莢膜型インフルエンザ菌と、無莢膜型インフルエンザ菌（nontypeable *Haemophilus influenzae*: NTHi）に大別される。NTHi は中耳炎や慢性気管支炎および慢性閉塞性肺疾患（COPD）の急性増悪における主要な起炎菌である。NTHi は宿主気道上皮細胞に侵入し抗菌薬や宿主免疫システムから免れることにより難治性となるため、NTHi の上皮細胞侵入を防ぐことは治療および疾患増悪予防の観点から重要と考えられる。しかし、この上皮細胞侵入における詳細なメカニズムは未だに解明されていない。一方、ビトロネクチンは細胞外基質あるいは血清に存在する糖タンパクであり、上皮細胞や NTHi に接着することが報告されている。さらに、NTHi の細胞外膜タンパクの一つである Protein-E はビトロネクチンへの結合性が報告されているが、この Protein-E とビトロネクチンの相互作用が NTHi の細胞内侵入に関与しているかどうかは不明である。今回我々は、Protein-E とビトロネクチンの相互作用に着目し、NTHi の気道上皮細胞侵入のメカニズムを解明するため研究を実施した。

［材料ならびに方法］

NTHi は市中肺炎患者の喀痰より培養された臨床分離株である HUSM 0481 株と標準株である ATCC 19418 株を用いた。NTHi は NAD とヘミンを添加したブレインハートインフュージョン(BHI) 液体培地で前培養した後、チョコレート寒天培地を用いて 37℃で一晩培養した。ヒト気道上皮細胞株は、BEAS-2B 細胞を用いた。感染多重度（MOI）100、2 時間の感染条件で BEAS-2B 細胞への侵入を評価した。細胞外の菌を 100 μg/ml 濃度のゲンタマイシンで殺菌した後に、細胞内細菌を LIVE/DEAD® BacLight bacterial viability kit で蛍光染色し、蛍光顕微鏡（BZ-9000）により観察した。さらに上皮細胞を蒸留水で破壊し、チョコレート寒天培地上のコロニー数を計測した。侵入した NTHi の細胞内局在を評価するため、各種エンドソームの蛍光染色を実施した。NTHi のビトロネクチンへの接着性を評価するため、ガラスボトムディッシュへコーティングしたビトロネクチンと接着した NTHi を LIVE/DEAD® kit により染色し観察した。NTHi とビトロネクチンの結合を阻害するヘパリンあるいは Protein-E ペプチド（PE^{84-108}）での前処理により、NTHi のビトロネクチンへの接着および細胞内侵入への阻害効果

を評価した。さらに気道上皮細胞とビトロネクチンの結合を阻害する Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチドによる阻害実験も実施した。

［結果］

使用した NTHi 2 菌株による気道上皮細胞内侵入を、蛍光顕微鏡観察および細胞内侵入菌のコロニー数計測により確認した。細胞内へ侵入した NTHi は、感染 2 時間後に早期エンドソーム内に認めたが、後期エンドソームや酸性エンドソームには確認できなかった。NTHi 2 菌株は明らかにビトロネクチンへ強く接着し（259-309 菌数/視野）、この接着はヘパリンの前処理により阻害された。さらにビトロネクチンへの接着は PE^{84-108} の前処置により阻害され、この阻害効果は PE^{84-108} の濃度依存的であった。NTHi の細胞内侵入は、ヘパリンあるいは PE^{84-108} の前処理により阻害されたが、RGD ペプチドでの阻害効果は認められなかった。

［考察］

NTHi の細胞内侵入メカニズムに関しては、マクロピノサイトーシスや血小板活性化因子 (PAF) レセプター、β-グルカンレセプターなどの関与が報告されているが、Protein-E が関与したとする報告は我々が知る範囲では認められない。また、ビトロネクチンの関与についての報告もわずかである。本研究においては、ヘパリンの前処理により NTHi の気道上皮細胞への侵入が阻害されたため、NTHi の細胞内侵入メカニズムには NTHi とビトロネクチンの結合が重要であると考えられた。また、PE^{84-108} の前処理により有意に細胞内侵入が阻害されたため、特に NTHi の有する Protein-E とビトロネクチンの結合が細胞内侵入に強く関与していることが証明された。NTHi の Protein-E と宿主のビトロネクチンは、難治性の NTHi 感染に対する治療やワクチンにおける新たなターゲットとなる可能性があると考えられる。

［結論］

NTHi の有する Protein-E と宿主ビトロネクチンの結合が、NTHi の気道上皮細胞への接着および侵入に関与している。