



Synergistic activation of NF- κ B by nontypeable Haemophilus influenzae and tumor necrosis factor α

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡邊, 高弘 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/305

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 404号	学位授与年月日	平成17年 7月22日
氏 名	渡 邊 高 弘		
論文題目	Synergistic activation of NF-κB by nontypeable Haemophilus influenzae and tumor necrosis factor α (インフルエンザ桿菌無莢膜株と腫瘍壊死因子-αによる NF による NF-κB の相乗的活性化)		

博士(医学) 渡 邊 高 弘

論文題目

Synergistic activation of NF- κ B by nontypeable *Haemophilus influenzae* and tumor necrosis factor α
(インフルエンザ桿菌無莢膜株と腫瘍壊死因子- α によるNF- κ Bの相乗的活性化)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

中耳炎の主たる起炎菌であるインフルエンザ桿菌無莢膜株(nontypeable *Haemophilus influenzae*; NTHi)はヒト上皮細胞において腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α)などの炎症性サイトカインの産生を誘導することが知られている。炎症性サイトカインは生体防御機構の一端を担うが、一方で感染によってそのネットワークが攪乱されると炎症の重症化を招くと考えられている。しかし、炎症性サイトカインがその制御機構から逸脱して過剰に産生されるメカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究はNTHi感染時のサイトカイン産生に伴う、中耳の炎症惹起・増悪の分子的機構を検討する目的で行われた。

〔材料ならびに方法〕

培養細胞にNTHi抽出物とTNF- α をそれぞれ単独あるいは両者同時に作用させて、種々の炎症性サイトカイン遺伝子発現に関わる転写因子NF- κ Bの活性を測定した。併せてNF- κ B活性化に関与するシグナル伝達経路の同定を行った。また、同様の実験系でTNF- α 、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、インターロイキン-8(IL-8)の各サイトカインの産生誘導に関与するシグナル伝達経路を検討した。

培養細胞：ヒト子宮頸癌細胞HeLa、ヒト中耳粘膜上皮細胞由来のhuman middle ear epithelial cell line-1、ヒト正常気管上皮細胞のnormal human bronchial epithelial cellsを用いた。また、ラット線維芽細胞由来の樹立培養細胞も用いた。

NTHi：チョコレート寒天培地で培養し、得られたコロニーをNADとheminを添加した液体培地に移して更に培養した。この培養液を遠心分離して細菌を回収し、PBSに懸濁した。この細菌懸濁液を超音波破碎処理後に遠心分離し、上清をNTHi抽出物としてすべての実験に用いた。

ルシフェラーゼアッセイ：NF- κ Bの活性測定のためルシフェラーゼ遺伝子(NF- κ B luc reporter plasmid)を細胞に導入した。必要に応じてヒト細胞内遺伝子プラスミドをルシフェラーゼ遺伝子と共に細胞へ導入した。遺伝子導入した細胞にNTHiとTNF- α を作用させた後に回収し、ルミノメーターで活性を測定した。

免疫蛍光染色法：NF- κ Bのサブユニットであるp65に対する抗体を一次抗体、fluorescein isothiocyanateで標識した抗体を二次抗体に用いて、活性化したNF- κ Bの核内への移行を観察した。

ウェスタンブロット法：I κ B α 、MKK3/6、p38のリン酸化を検討した。

RT-PCR法：TNF- α 、IL-1 β 、IL-8のmRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCR法で定量した。

〔結果〕

1) NTHi単独、TNF- α 単独で作用させると、それぞれNF- κ Bの活性を認めた。

- 2) NTHiとTNF- α の同時作用では単独の場合と比較してNF- κ Bの活性は相乗的に上昇した。この相乗的活性化にはNF- κ Bの一般的な活性化経路であるNIK-IKK- β/γ 依存性I κ B α リン酸化および分解経路とMAPK経路のMEKK1-MKK3/6-p38経路の関与が認められた。
- 3) NTHi、TNF- α のそれぞれの単独作用によりTNF- α 自体、IL-1 β 、IL-8のすべてがmRNAレベルで誘導された。
- 4) NTHiとTNF- α の同時作用では各サイトカイン遺伝子の転写は相乗的に促進された。
- 5) これらの炎症性サイトカインの発現にはNF- κ Bの活性化と同様にNIK-IKK依存性I κ B α リン酸化および分解経路とMEKK1-MKK3/6-p38経路の両者の関与が示唆された。

〔考察〕

中耳炎症例の中耳貯留液を培養して細菌陽性群と細菌陰性群を比較すると、陽性群の貯留液中のサイトカイン量は陰性群と比較して有意に高いとの報告がある。これらの報告は細菌感染により産生誘導された炎症性サイトカインが中耳腔に放出され、局所に存在する細菌や菌体成分と共に炎症反応を増強させている可能性を示唆している。

本研究ではin vitroにおいてNTHiの菌体成分とTNF- α が同時に存在する条件でNF- κ Bが相乗的に活性化され、ひいては炎症性サイトカインの相乗的な産生を誘導する機構を示した。即ち、NTHiとTNF- α はNIK-IKK- β/γ 依存性I κ B α リン酸化および分解経路とMEKK1-MKK3/6-p38経路を活性化して悪循環ともいえる炎症性サイトカインの過剰産生を惹起していると考えられた。生体において同様の反応が起これば接着分子の発現、白血球の浸潤・活性化といった反応が促進され、炎症の増悪・遷延化につながると考えられる。

今後はNTHiの外膜構成タンパク質を用いて同様の検討を行なうことが、中耳炎の新しい治療法への手がかりになると考えられる。

〔結語〕

NTHiとTNF- α はそれぞれが単独でNF- κ Bを活性化するが、両者が同時に存在するとNF- κ Bの活性を相乗的に上昇させる。この相乗的活性化に関与する経路はNIK-IKK- β/γ 依存性I κ B α リン酸化および分解経路とMEKK1-MKK3/6-p38経路の二者である。NF- κ B相乗的活性化は炎症性サイトカインの産生誘導を促進し、炎症反応を増強すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

インフルエンザ桿菌無莢膜株(nontypeable *Haemophilus influenzae*; NTHi)は小児中耳炎の主な起因菌であることが知られている。他の多くの病原体と同様にNTHiも主にNF- κ Bを介して宿主に腫瘍壊死因子- α (TNF- α)のような炎症性サイトカインやケモカインを産生誘導する。これらは感染防御に有効であるのみならず、過剰に産生されると炎症の重症化を招く。実際の感染局所では起因菌のみならず、これによって産生誘導されるTNF- α などもNF- κ Bの活性化に関与する可能性がある。そこで、申請者らはNTHi感染による中耳炎の増悪機構を明らかにするため、NTHiとTNF- α のNF- κ B活性化における相乗効果を検討した。

培養細胞としてはヒト子宮頸癌細胞HeLa、ヒト中耳粘膜上皮細胞株、ヒト正常気道上皮細胞、および

ラット線維芽細胞株を用いた。これらの培養細胞にNTHi抽出物とTNF- α をそれぞれ単独または両者を同時に作用させて、NF- κ Bの活性化とTNF- α 、インターロイキン(IL)-1 β 、およびIL-8の遺伝子発現を測定した。NF- κ Bの活性化は、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを用いたNF- κ B-Lucプラスミドの遺伝子導入細胞での測定、およびNF- κ Bp65に対する抗体を用いた免疫蛍光染色によりp65の細胞内局在により検討した。NF- κ Bの活性化に関与するシグナル伝達経路の検討は各分子の変異体を発現するプラスミドの遺伝子導入によるドミナント・ネガティブ法、各分子のリン酸化を認識する抗体によるウエスタンブロット法、およびプロテアソーム阻害剤、p38MAPK阻害剤の使用によって行った。得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) NTHiとTNF- α を同時に作用させると、それぞれを単独に作用させた場合に比し、NF- κ Bの活性化に相乗効果が認められた。
- (2) 上記の相乗効果は、TNF- α 自身、IL-1 β 、およびIL-8のmRNA発現でも認められた。
- (3) NTHiとTNF- α によるNF- κ B活性化および炎症性サイトカイン/ケモカインmRNA発現の相乗効果には、一般的なNF- κ Bの活性化経路であるNIK-IKK- β / γ 依存性I κ B α リン酸化/分解経路のみならずMAPK経路のMEKK1-MKK3/6-p38経路が関与していることが明らかとなった。

以上より、NTHiとTNF- α は少なくとも2経路を介して、NF- κ Bを相乗的に活性化し、TNF- α などのサイトカイン/ケモカインを産生誘導することが判明した。産生されたTNF- α は更に細菌と共にNF- κ Bを活性化するという悪性サイクルに陥り、炎症性サイトカインの過剰産生を引き起こすと考えられる。申請者は中耳炎においても、同様の機序で炎症の増悪・遷延化が起きる可能性を示唆している。

審査委員会では、中耳炎の主たる起因菌であるNTHiがTNF- α と相乗的にNF- κ Bを活性化すること、およびそのシグナル伝達機構を種々の方法により詳細に解明した点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) 用いた菌の抽出液およびTNF- α の至適濃度はどのように決定したか
- 2) 細胞への遺伝子導入の方法と導入効率について
- 3) ルシフェラーゼアッセイの結果は遺伝子導入効率で補正したか
- 4) レポーターにNF- κ B結合部位を3コピー用いた理由について
- 5) リン酸化I κ B α のウエスタンブロット法による検出について
- 6) この研究で用いた各ドミナント・ネガティブプラスミドの作用機序について
- 7) p38MAPKはNF- κ Bのどのサブユニットをリン酸化するか
- 8) NIK-IKK-I κ B α 経路とMEKK1-MKK3/6-p38経路のクロストークについて
- 9) NTHiとTNF- α の相乗効果のメカニズムについて
- 10) NTHiのどの成分がNF- κ Bの活性化に関与しているか
- 11) NTHiによる刺激にToll-like receptorは関与しているか

これらの試問に対して申請者からは適切な解答が得られた。このことより申請者は専門領域全般並びに関連研究領域に対しても十分理解ができていると判断された。この結果、申請者は博士(医学)の学位の授与にふさわしい学識を有するものと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 小 出 幸 夫

副査 橋 本 賢 二 副査 千 田 金 吾