

医研第324号

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Legionella pneumophila infection induces programmed cell death, caspase activation, and release of high-mobility group box 1 protein in A549 alveolar epithelial cells: inhibition by methyl prednisolone

(レジオネラ・ニューモフィラ感染により誘導される A549 肺胞上皮細胞のプログラム細胞死、カスパーゼ活性化、HMGB1 放出：メチルプレドニゾロンによるその抑制)

氏名 古 屋 誠



【	背	景	と	目	的	】	レ	ジ	オ	ネ	ラ	肺	炎	は	重	症	化	す	る
傾	向	が	強	く	高	頻	度	に	a	c	u	t	e		l	u	n	g	
i	n	j	u	r	y	(A	L	I)	お	よ	び	a	c	u	t	e	
r	e	s	p	i	r	a	t	o	r	y		d	i	s	t	r	e	s	s
	s	y	n	d	r	o	m	e	(A	R	D	S)	を	合	併	す	る
。	近	年	A	R	D	S	患	者	の	肺	胞	上	皮	細	胞	に	お	け	る
a	p	o	p	t	o	s	i	s	の	存	在	が	報	告	さ	れ	、	そ	の
病	態	形	成	へ	の	関	与	が	示	唆	さ	れ	て	い	る	。	こ	れ	ま
で	の	研	究	に	よ	り	レ	ジ	オ	ネ	ラ	が	肺	胞	上	皮	細	胞	へ
感	染	し	細	胞	傷	害	を	呈	す	る	こ	と	が	示	唆	さ	れ	て	い
る	が	、	そ	の	機	序	は	十	分	に	は	解	明	さ	れ	て	い	な	い
。	本	研	究	で	は	、	レ	ジ	オ	ネ	ラ	感	染	に	よ	り	誘	導	さ
れ	る	肺	胞	上	皮	細	胞	傷	害	の	機	序	や	そ	の	制	御	に	つ
い	て	i	n		v	i	t	r	o	に	て	検	討	し	た	。			
【	方	法	】	ヒ	ト	Ⅱ	型	肺	胞	上	皮	細	胞	(A	5	4	9)
に	レ	ジ	オ	ネ	ラ	を	感	染	さ	せ	、	菌	量	、	上	清	中	L	D
H	値	、	T	U	N	E	L	法	に	よ	る	核	D	N	A	断	片	化	、
c	o	l	o	r	i	m	e	t	r	i	c		a	s	s	a	y	お	よ
び	w	e	s	t	e	r	n		b	l	o	t	法	に	よ	る	各	種	c
a	s	p	a	s	e	活	性	の	測	定	を	行	っ	た	。	ま	た	、	新

*要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

(20×20)

し	い	急	性	炎	症	の	メ	デ	イ	エ	ー	タ	ー	と	さ	れ	る	h	i
g	h	-	m	o	b	i	l	i	t	y		g	r	o	u	p		b	o
x		l		p	r	o	t	e	i	n	(H	M	G	B	l)	分	泌
値	を	測	定	し	た	。	感	染	さ	せ	る	レ	ジ	オ	ネ	ラ	に	は	野
生	株	(L	e	g	i	o	n	e	l	l	a		p	n	e	u	m	o
p	h	i	l	a		s	e	r	o	g	r	o	u	p	l		A	A	l
0	0	j	m)	と	レ	ジ	オ	ネ	ラ	の	細	胞	内	増	殖	能	に	関
与	す	る	d	o	t	/	i	c	m	遺	伝	子	変	異	株	(d	o	t
O		m	u	t	a	n	t)	を	使	用	し	、	両	者	の	結	果	を
比	較	検	討	し	た	。	ま	た	、	野	生	株	感	染	に	伴	う	T	U
N	E	L	陽	性	細	胞	数	、	各	種	c	a	s	p	a	s	e	活	性
、	上	清	中	H	M	G	B	l	値	に	つ	い	て	m	e	t	h	y	l
p	r	e	d	n	i	s	o	l	o	n	e	添	加	の	影	響	を	比	較
検	討	し	た	。															
【	結	果	】	野	生	株	感	染	で	は	、	細	菌	の	細	胞	内	増	殖
、	m	u	l	t	i	p	l	i	c	i	t	y		o	f		i	n	f
e	c	t	i	o	n	(M	O	I)	に	依	存	し	た	上	清	中	L
D	H	・	H	M	G	B	l	値	お	よ	び	T	U	N	E	L	陽	性	細
胞	の	増	加	、		c	a	s	p	a	s	e	3	、	8	、	9	、	1
の	活	性	が	認	め	ら	れ	、	変	異	株	感	染	と	比	較	し	有	意

*要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

(20×20)




差	を	認	め	た	。	ま	た	、	m	e	t	h	y	l	p	r	e	d	n
i	s	o	l	o	n	e	(5	3	.	4	μ	M)	は	レ	ジ	オ	ネ
ラ	の	細	胞	内	増	殖	に	影	響	し	な	か	っ	た	が	、	同	添	加
に	よ	り	野	生	株	感	染	に	伴	う	T	U	N	E	L	陽	性	細	胞
の	減	少	、	c	a	s	p	a	s	e	3	、	8	、	9	、	1	活	性
お	よ	び	上	清	中	H	M	G	B	1	値	の	有	意	な	低	下	を	認
め	た	。																	
【	結	論	】	レ	ジ	オ	ネ	ラ	感	染	に	よ	り	A	5	4	9	肺	胞
上	皮	細	胞	に	お	い	て	、	核	D	N	A	の	断	片	化	、	c	a
s	p	a	s	e	3	、	8	、	9	、	1	活	性	を	伴	う	細	胞	死
が	誘	導	さ	れ	て	お	り	、	a	p	o	p	t	o	s	i	s	の	存
在	が	示	唆	さ	れ	た	。	ま	た	、	感	染	細	胞	で	は	H	M	G
B	1	分	泌	を	伴	う	細	胞	死	も	誘	導	さ	れ	て	い	た	。	そ
れ	ら	細	胞	死	の	過	程	に	は	、	レ	ジ	オ	ネ	ラ	の	細	胞	内
増	殖	に	関	わ	る	主	要	な	病	原	機	構	が	関	与	し	て	い	る
可	能	性	が	示	唆	さ	れ	た	。	更	に	、	m	e	t	h	y	l	p
r	e	d	n	i	s	o	l	o	n	e	は	、	c	a	s	p	a	s	e
3	、	8	、	9	、	1	活	性	の	低	下	を	伴	い	a	p	o	p	t
o	s	i	s	お	よ	び	H	M	G	B	1	分	泌	を	抑	制	す	る	こ
と	が	示	唆	さ	れ	た	。												

*要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

(20×20)

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	* <u>課程博</u> 論文博	第 <u>324</u> 号	氏名	古堅 誠
論文審査委員	審査日	平成20年 8 月 6 日		
	主査教授	鈴木 敏彦 		
	副査教授	松崎 吾朗 		
	副査教授	村山 貞之 		
(論文題目)				
<i>Legionella pneumophila</i> infection induces programmed cell death, caspase activation, and release of high-mobility group box 1 protein in A549 alveolar epithelial cells: inhibition by methyl prednisolone				
(論文審査結果の要旨)				
上記論文に関して、研究にいたる背景と目的、研究内容、および研究結果の意義と学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。				
1. 研究の背景と目的				
<p>レジオネラ肺炎は重症化する傾向が強く、高頻度に急性肺傷害(ALI; acute lung injury) および急性呼吸促進症候群(ARDS; acute respiratory distress syndrome)を合併する。近年、ARDS 患者の肺胞上皮細胞における apoptosis の存在が報告され、その病態形成への関与が示唆されている。また、これまでの研究によりレジオネラが肺胞上皮細胞へ感染し細胞傷害を呈することが示唆されているが、その機序は十分には解明されていない。</p> <p>本研究では、レジオネラ感染により誘導される肺胞上皮細胞傷害の機序や制御について <i>in vitro</i> にて検討した。</p>				
2. 研究内容				
<p>肺胞上皮細胞株として、ヒト由来Ⅱ型肺胞上皮細胞株(A549)を使用した。また、菌株として、<i>Legionella pneumophila</i> 野生株とレジオネラの細胞内増殖能に関わる <i>dot/icm</i> 遺伝子変異株を使用して感染実験を行い、両者の結果を比較検討した。</p> <p>レジオネラは肺胞上皮細胞へ感染し、感染多重度依存的に細胞傷害を誘導した。その細胞傷害の機序として、TUNEL 染色により核 DNA の断片化、colorimetric assay および Western blot 法により caspase 3、8、9、1 の活性化が確認され、apoptosis の存在が示唆された。また、新しい急性炎症のメディエーターとされる HMGB1(high-mobility group box 1 protein)分泌を伴う細胞死も誘導されていた。それら細胞死の誘導は変異株において有意に低下しており、その過程には <i>dot/icm</i> 遺伝子が関与している可能性が示唆された。更に、細胞傷害制御について野生株感染における methylprednisolone 添加の影響を比較検討した結果、methylprednisolone は caspase 3、8、9、1 活性の低下を伴い apoptosis および HMGB1 分泌を抑制することが示唆された。</p>				