

上皮細胞

気道上皮細胞からのlipopolysaccharide-binding protein 産生に及ぼすマクロライドの影響

山沢英明 坂東政司 大野彰二 杉山幸比古

はじめに

Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) はlipopolysaccharide (LPS) の膜型CD14や可溶性CD14への結合を促進させ、単球・マクロファージや内皮・上皮細胞のLPSに対する感受性を増強させる。これによりさまざまな炎症性メディエーターの産生が惹起され、innate immunityシステムの活性化が引き起こされる。もちろん、バランスを欠いた炎症性メディエーターの放出は生体にとって有害であることは言うまでもないが、細菌のエンドトキシンに対する生体の防御においてLBPは重要な役割を担っていると言える。さらにLBPは、LPSのHDLへの移送を促進することによりLPSを中和する働きも持っている¹⁾。

LBPの主たる産生部位は肝細胞であるが、最近、ヒトの2型肺胞上皮細胞からも産生されることが示され、エンドトキシンに対する肺局所での防御への関与が推測されている²⁾。今回我々は、気道上皮細胞からのLBP産生に及ぼすマクロライドの影響について検討した。

材料と方法

1) 細胞と試料

気道上皮細胞としては2型肺胞上皮細胞cell lineであるA549細胞を用い、10% FCS添加RPMI1640中で培養した。本実験で使用したマクロライドはクラリスロマイシン (CAM) でアボットジャパン社から提供をうけた。またデキサメサゾン (DEX) はSIGMA, interleukin (IL)-1, IL-6はR&D Systemsより購入した。

2) A549細胞からのLBP産生

50%コンフルエントのA549細胞 (24 well plate) を各濃度のDEX, IL-1, IL-6で刺激し、各濃度の

CAMの存在・非存在下にて72時間の培養を行い、上清中のLBP濃度をELISAキット (HyCult) を用いて測定した。また、LBP mRNAの発現は、サブコンフルエントのA549細胞 (6 well plate) を各条件下で24時間培養を行った後にRNAを回収し、RT-PCR法にて評価した。

3) *In vivo* での検討

雄のBalb/cマウス (25~30g) を用い、以下の3群に分けた。①コントロール (CTL) : day 1-4にDMSOを腹腔内投与 (ip)。②CAM低用量群 (Low) : day 1-4に5 mg/kgのCAMをip。③CAM高用量群 (High) : day 1-4に50mg/kgのCAMをip。マウスはday 4のCAMの投与24時間後にsacrificeし、採血と気管支肺胞洗浄 (BAL, 0.8ml×4) を施行した。血清と気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のLBP濃度をELISAで測定し、BALF中の総細胞数の計測、アルブミン濃度の測定を行った。各群とも一部のマウスではLPS (100 µg/kg) の気管内投与をday 4のCAMの投与4時間後に行い、その20時間後にマウスをsacrificeした。

結果

1. 気道上皮細胞からのLBP産生に及ぼすCAMの影響

A549細胞を各濃度のDEX (Fig. 1), IL-1, IL-6 (データ表示せず) で刺激したところ、いずれも濃度依存性にLBP産生を誘導した。次に、これらの物質のLBP産生誘導能に及ぼすCAM添加の影響について検討した。CAM単独ではLBPの産生は認められなかったが、10 µg/ml以上のCAMはDEXにより誘導されるA549細胞からのLBP産生を有意に増強した。IL-1のLBP産生誘導能も高濃度のCAM (100 µg/ml) により増強したが、反対にIL-6

Fig. 1. DEX induces LBP production by A549 cells.

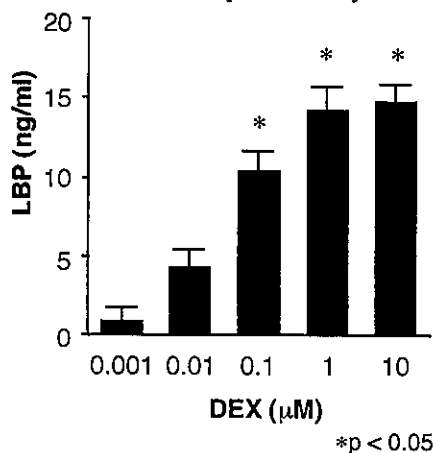
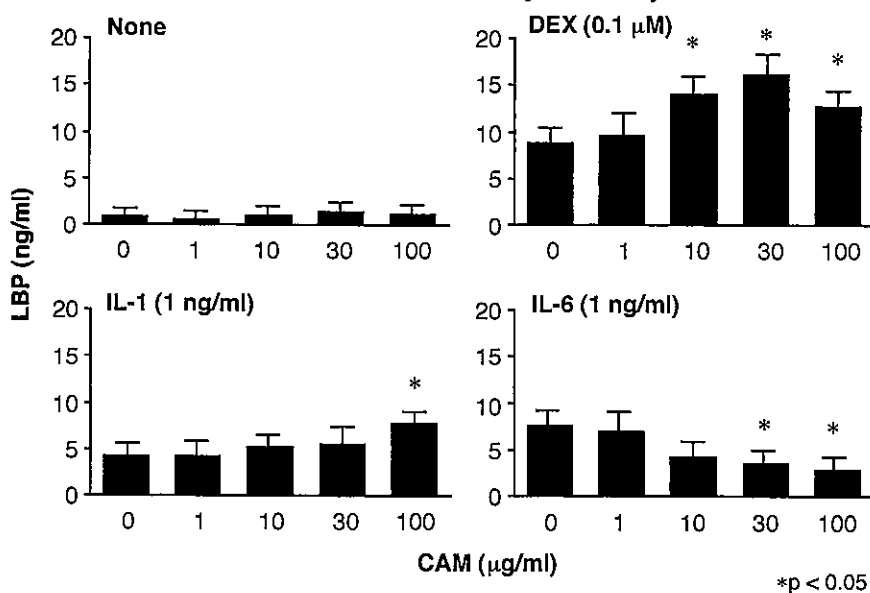


Fig. 2. CAM enhances DEX-induced LBP production by A549 cells.



のそれはCAMにより抑制された (Fig. 2)。DEXのLBP産生誘導能のCAMによる増強効果はmRNAのレベルでも認められた (Fig. 3)。

2. マウスモデルでの検討

LPS非投与下では、高用量のCAMの前投与によりBALFと血清中のLBP濃度は有意に上昇した。LPS気管内投与下では、非投与下と比べBALF中のLBP濃度は上昇したが、これは高用量のCAMの前

投与により抑制された。一方、上昇した血清中のLBP濃度については、CAM投与による影響は認められなかった (Fig. 4)。LPS非投与下では、BALF中のアルブミン濃度はCAMの前投与により変化を認めなかった。したがって前述の如くLBPのBALF中濃度が上昇した機序として血清LBP流入による可能性は低いと思われた。高用量CAMの前投与はLPS気管内投与により惹起されるBALF中

Fig. 3. Effect of CAM on LBP mRNA expression by A549 cells.

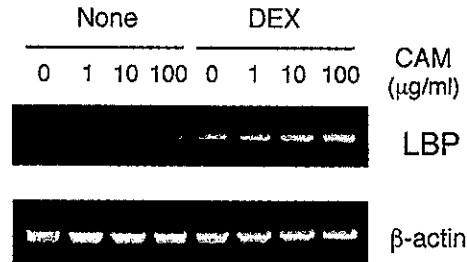
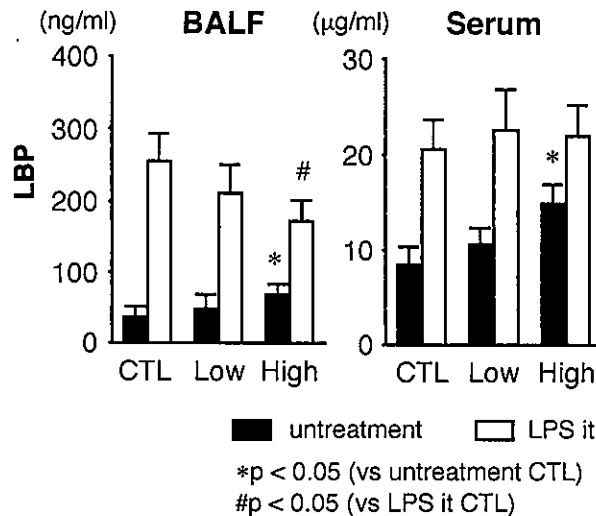


Fig. 4. Effect of CAM on albumin levels and total cell count in BALF.



のLBP濃度上昇を有意に抑制した。同時にアルブミン濃度上昇と総細胞数増加も抑制した (Fig. 5)。

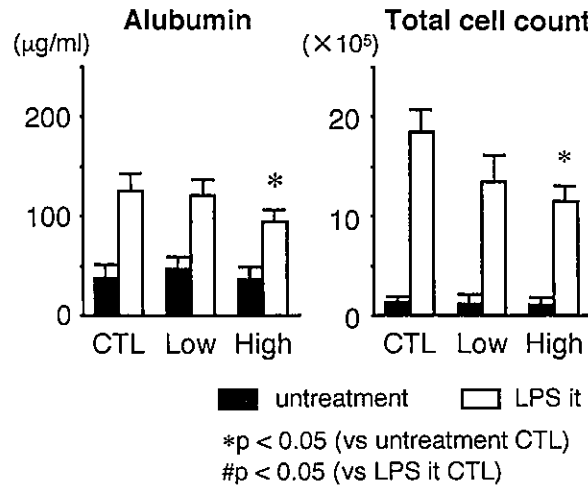
考 察

肺は外界と直接の接触をもった臓器であり、侵入する微生物やその産生物質に対する防御という点で気道上皮細胞の役割は重要である。事実、気道上皮細胞には、各種サイトカインやアンチプロテアーゼさらには抗菌蛋白の産生を介し、感染や局所の炎症反応を制御するという知見が集積されつつある^{3,4)}。最近、気道上皮細胞からのLBP産生が報告され、肺局所でのエンドトキシン曝露に対する特異的な防御への関与が推測されている²⁾。今回、我々はクラリスロマイシンがDEXやIL-1により誘導されるA549細胞からのLBP産生に対して、産生増強効果を有することを示した。

実際のところ、肺局所におけるLBP存在の意義や、LBPのsourceとして気道上皮細胞が占める比重などについてはまだまだ不明な点が多い。しかしながら、LBPが細菌感染に対する生体の防御に不可欠な因子であることは、そのノックアウトマウスにおいてグラム陰性菌 (*Salmonella typhimurium*) 感染に対する致死率が増加したという報告⁵⁾ や、肺の *Klebsiella pneumoniae* 感染において、早期の菌血症、肺での菌量の増加をきたし致死率が上昇したという報告⁶⁾ などにより裏付けられている。また低レベルのLBPが健常人のBALF中にも存在する事実⁷⁾ も、局所での防御への関与を示すものなのかも知れない。

クラリスロマイシンによるLBP産生増強のメカニズムについては、現時点では不明である。一つには、*in vitro*でクラリスロマイシン単独ではLBP

Fig. 5. Effect of CAM on LBP levels in BALF and serum of mouse.



産生誘導効果はなく、DEXの存在下でのみ産生増強効果を認めたことから、クラリスロマイシンがグルココルチコイドの細胞内シグナル伝達を促す方向に働いた可能性が考えられる。また今回、血中のグルココルチコイドについては測定しなかったものの、マウスへのマクロライド投与によりその上昇がみられるという報告⁸⁾もあることから、我々の*in vivo*モデルにおいてもクラリスロマイシン投与により内因性のグルココルチコイド産生が誘導され、肺局所と血清中のLBP濃度上昇が起こった可能性も考えられる。

LBPに関するこれまでの知見と今回の結果とを踏まえると、クラリスロマイシンによるLBP産生促進は、細菌感染に対する宿主の肺局所での防御能増強に寄与する可能性が示唆される。びまん性汎細気管支炎などの慢性気道炎症において、細菌の下気道への定着はしばしば遭遇する現象である。これは細菌に対する局所での防御機能の低下を示唆するものであり、おそらくLBP産生の制御不全が生じていることが予想される。これに関して局所のLBPの動態やマクロライド投与の影響などさらなる検討が必要と言える。

参考文献

1) WURFEL M. M., KUNITAKE S. T., LICHENSTEIN H., *et al.*: Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein

is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J. Exp. Med.* 180: 1025~1035, 1994

- 2) DENTENER M. A., VREUGDENHIL A. C., HOET P. H., *et al.*: Production of the acute-phase protein lipopolysaccharide-binding protein by respiratory type II epithelial cells: implications for local defense to bacterial endotoxins. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* 23: 146~153, 2000
- 3) GANZ T., WEISS J.: Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin. Hematol.* 34: 343~354, 1997
- 4) THOMPSON A. B., ROBBINS R. A., ROMBERGER D. J., *et al.*: Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur. Respir. J.* 8: 127~149, 1995
- 5) JACK R. S., FAN X., BERNHEIDEN M., *et al.*: Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature.* 389: 742~745, 1997
- 6) FAN M. H., KLEIN R. D., STEINSTRASSER L., *et al.*: An essential role for lipopolysaccharide-binding protein in pulmonary innate immune responses. *Shock.* 18: 248~254, 2002
- 7) MARTIN T. R., MATHISON J. C., TOBIAS P. S., *et al.*: Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs. *J. Clin. Invest.* 90: 2209~2219, 1992
- 8) YAMAMOTO S., ASANO K., SHIMANE T., *et al.*: Enhancement of endogenous corticosterone levels by a macrolide antibiotic, roxithromycin in mice. *Life Sci.* 69: 1115~1121, 2001