

ミニ特集「免疫と結核」

新規結核免疫応答因子の可能性

— SLPI と Lipocalin 2 による結核自然免疫 —

財賀 大行 竹田 潔

要旨：結核の原因細菌である結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、非常に巧妙な機構で宿主による生体防御から回避し、宿主特にマクロファージ内で生存することができる細胞内寄生細菌である。近年、結核菌が肺胞マクロファージだけでなく肺胞上皮細胞にも侵入することが報告された。しかしながら、肺胞上皮細胞での結核菌感染防御機構についてはあまりわかっていない。最近のわれわれの研究により、結核菌感染時に肺胞マクロファージや肺胞上皮細胞などから分泌されるタンパク質のうち、プロテアーゼインヒビターとして知られる secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) は、結核菌細胞膜の透過性を亢進させることにより殺菌作用を示し、Lipocalin 2 は肺胞上皮細胞内で鉄イオンの取り込みを阻害することにより結核菌の増殖を抑制することが明らかになった。このように肺胞上皮細胞にもマクロファージのように抗結核菌感染防御機構が備わっていることが明らかになった。本稿では、結核菌感染症における宿主側の感染防御メカニズム、特に自然免疫系に焦点を当てて、結核菌感染時での呼吸器粘膜表層における宿主細胞の新規の免疫応答を紹介したい。

キーワード：結核菌, TLR, 肺胞上皮細胞, SLPI, Lipocalin 2

はじめに

われわれは細菌やウイルスなどの病原性微生物や外来性の異物といった抗原に曝露する可能性のある環境で生活している。そのため病原性微生物などの外界からの異物侵入を非自己として感知し、それを排除するシステムとして生体防御を司る免疫系が備わっている。免疫系は自然免疫系と獲得免疫系に大別され、この二本柱が複雑に絡み合いながら機能している。20世紀後半に Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) が発見され、俄然自然免疫系が注目を集め、その重要性がクローズアップされるようになった。

TLR はファミリーを形成し、各メンバーが病原体の構成成分をそれぞれ特異的に認識する。例えば、TLR1, 2, 6 はマイコプラズマおよび細菌由来のポリペプチドを認識し、TLR3 は二本鎖 RNA, TLR4 は lipopolysaccharide (LPS), TLR5 は鞭毛タンパク質, TLR7 は一本鎖 RNA, TLR9 は CpG DNA をそれぞれ認識する。これらの認識により、さらに IL-12, IL-6, TNF- α などの炎症性サイ

トカインといった種々の遺伝子発現が誘導される。自然免疫系の細胞であるマクロファージや樹状細胞では、貪食による病原体由来のペプチド抗原の T 細胞への提示、そして TLR を介した炎症性サイトカインや共刺激分子などの遺伝子発現により、抗原特異的な獲得免疫系、特に Th1 細胞分化を誘導することが知られている。このように病原体を認識する TLR を介した自然免疫担当細胞での遺伝子発現は、獲得免疫系活性化にとって重要な役割を担っている。

結核菌の細胞表層を構成する主な脂質はミコール酸である。このミコール酸がペプチドグリカンなどの細胞表層と結合することでマイコリルアラビノガラクトン (MAG) を形成する。またリポ多糖の 1 種であるリポアラビノマンナン (LAM) も結核菌の分厚い脂質で構成される細胞表層構成成分である。この糖脂質 LAM が実際に結核菌に対する宿主免疫応答の様々な段階で認識される分子である。この分子が TLR ファミリー分子のうち TLR2 により認識され、結核菌に対する強力な IL-12, IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインの産生誘導を促

す。このように宿主細胞が迅速に結核菌特異的な分子構造、PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) を認識し活性化することは、自然免疫系による感染防御、さらには後の結核菌特異的な獲得免疫応答への誘導など、結核菌に対する総合的な感染防御において非常に重要になってくる。

このような宿主細胞による攻撃をあざ笑うかのように巧みな手口で回避し、細胞内、特にマクロファージ内で生存することができるのが結核菌である。結核菌は主に気道から肺へと侵入し、貪食作用によって肺胞マクロファージに取り込まれる。多くの細菌はマクロファージによる殺菌作用が働くことによって死滅するが、結核菌はこの殺菌作用をことごとく回避している。その一例がファゴソームとリソソームの融合抑制である。例えば、宿主細胞の膜コレステロールと TACO (tryptophan aspartate containing coat protein) をファゴソーム膜上に集積させることによって、またフォスファターゼ SapM、セリン/スレオニンキナーゼ PknG といった分子を分泌することによってファゴソームとリソソームの融合過程を制御していることが報告されている^{1)~3)}。

このような自らの棲家となるマクロファージの殺菌作用を活性化させずに細胞内に寄生する能力を有する結核菌だが、さらに近年では、貪食作用をもった肺胞マクロファージだけでなく、非貪食系細胞である II 型肺胞上皮細胞にも結核菌が侵入することが報告されている⁴⁾。II 型肺胞上皮細胞は肺でサーファクタントタンパク質を分泌する分泌細胞として知られており、マクロファージのような特異的な殺菌作用はこれまで知られていない。結核菌にとっては殺菌作用の弱い肺胞上皮細胞は長期棲みつ場所としては格好の場であると考えられる。しかし肺胞マクロファージだけでなくそのような II 型肺胞上皮細胞にも TLR2 が発現していることが報告された⁵⁾。つまり II 型肺胞上皮細胞にも結核菌に対する感染防御機構が存在することが示唆される。

筆者らの研究室では、この II 型肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージなどから産生分泌されるプロテアーゼインヒビターである SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) と、鉄イオンキレート剤として知られる Lipocalin 2 が強い抗結核菌作用を有していることを、ノックアウトマウスを用いた解析などから突き止めた⁶⁾⁷⁾。本稿では特に肺胞上皮細胞に注目し、自然免疫系での結核菌感染防御メカニズムを紹介する。

1. SLPI による結核菌感染防御機構

SLPI は分子量 11.7 kDa の分泌タンパク質で、タンパク質中にある 8 個のシステイン残基が 4 対のジスルフィド結合構造をなし、whey acidic protein (WAP) モチーフ

を 2 個形成して存在している⁸⁾⁹⁾。SLPI は肺、涙腺、性腺、皮膚などの分泌担当細胞より分泌される^{10)~13)}。当初 SLPI は発見の経緯からプロテアーゼ阻害剤としての作用が注目された。SLPI タンパク質の C 末端領域はセリンプロテアーゼ阻害作用を有しており、好中球から分泌されるエラスターゼやカテプシン G、膵外分泌腺より分泌されるトリプシンやキモトリプシン、マスト細胞から分泌されるトリプターゼやキマーゼに対して拮抗作用を示す¹⁴⁾。そのため SLPI は炎症部位におけるプロテアーゼによる組織損傷に対して保護作用を示すと考えられた。実際、ノックアウトマウスを用いた解析により、SLPI ノックアウトマウスは皮膚損傷の創傷治癒遅延を示した¹⁵⁾。その後、グラム陽性、陰性菌、真菌、ウイルスに対して増殖を抑制することが報告された¹⁶⁾¹⁷⁾。また、SLPI は TLR 刺激によって単球、マクロファージにおいて発現が誘導され、TLR 依存的な NF- κ B 活性を抑制する作用があることが示されている¹⁸⁾。実際、SLPI ノックアウトマウスは TLR4 のリガンドである LPS により惹起される敗血症に高感受性であった¹⁹⁾。このように SLPI は多機能を有する分子である。そこでわれわれは SLPI の抗菌活性に注目し、結核菌感染防御における SLPI の役割を解析した。

(1) SLPI の発現、産生

まず、結核菌感染時におけるマウスの肺での SLPI の発現について解析した。マウスに *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) を経気道的に感染させ、SLPI mRNA の発現を定量的 RT-PCR で解析したところ、BCG 感染 2 日後に SLPI mRNA の発現が著明に増大していた。また SLPI のタンパク質レベルでの発現を免疫染色によって解析したところ、SLPI は BCG 感染 2 日後に細気管支の上皮細胞内に分布し、管腔側に局在を示した (図 1)。これに加えて、肺胞マクロファージや分泌細胞として知られる II 型肺胞上皮細胞を用いた実験系からも、SLPI が BCG 感染により発現、産生されることが明らかになった。これらの結果は、SLPI の分泌が結核菌感染で促進されていることを示唆する所見と考えられた。そこで次に、SLPI の肺胞腔内への分泌について検討した。マウスに BCG を経気道的に感染させ、0、1、2、3 日後のマウスの気管支肺胞洗浄液を回収し、SLPI タンパク質の発現を、抗 SLPI 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析したところ、感染 2 日後以降の肺胞洗浄液中に SLPI が認められた。このように SLPI は BCG 感染初期に速やかに誘導、産生され、肺胞腔内に分泌されることが示唆された。

(2) SLPI の結核菌増殖抑制能とその作用機序

SLPI は一般細菌、真菌などの増殖を抑制することが示されているが、作用するためには高濃度が必要であ

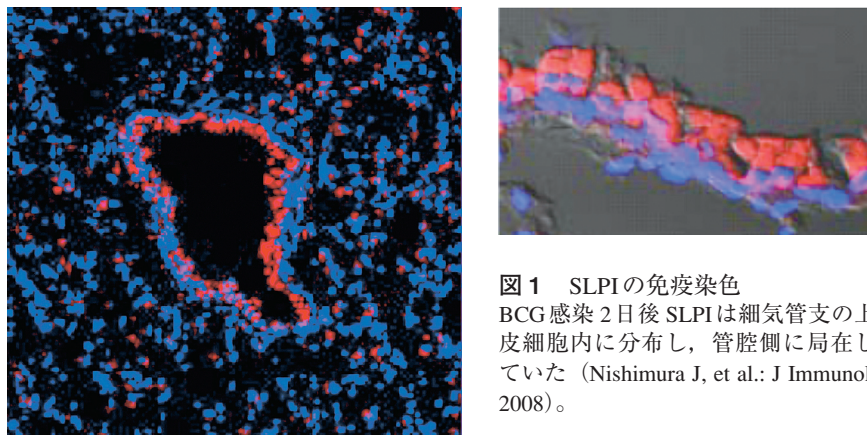


図1 SLPIの免疫染色
BCG感染2日後SLPIは細気管支の上
皮細胞内に分布し、管腔側に局在し
ていた (Nishimura J, et al.: J Immunol.
2008)。

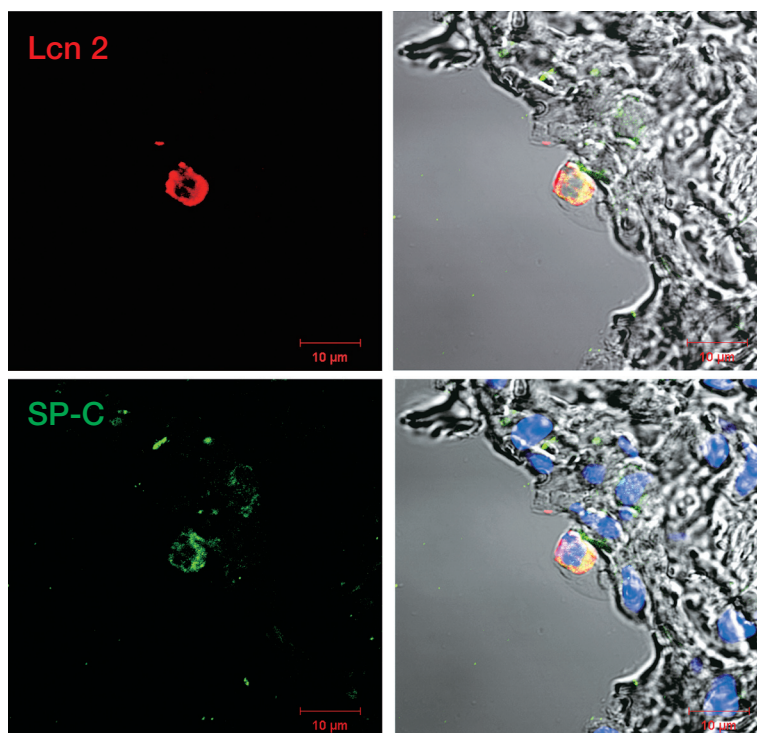


図4 Lipocalin 2の免疫染色
BCG感染2日後の肺切片をLipo-
calin 2とサーファクタントタンパ
ク質 (SP-C) の抗体を用いて免疫
染色した。Lipocalin 2とSP-Cが共
局在していたことから、Lipocalin 2
はII型肺胞上皮細胞から産生され
ていることが示唆された (Saiga H,
et al.: J Immunol. 2008)。

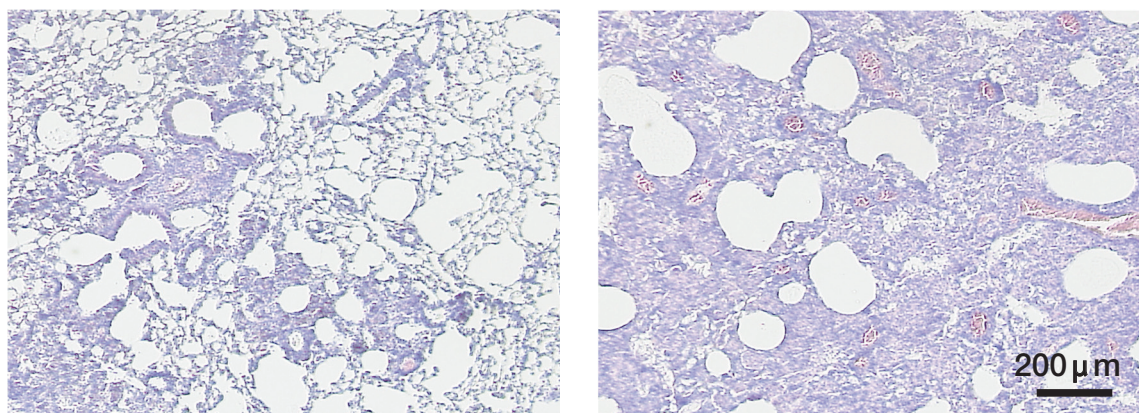


図5 野生型マウスおよびLipocalin 2ノックアウトマウスの結核菌感染後 肺組織におけるHE染色
結核菌感染5日後の各マウスの肺切片のHE染色。Lipocalin 2ノックアウトマウスの肺は顕著に種々の炎症細胞
による浸潤が認められる (Saiga H, et al.: J Immunol. 2008)。

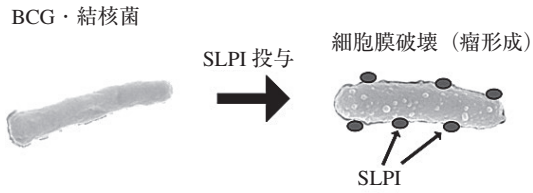


図2 SLPIによる細胞膜破壊
SLPIはBCG, 結核菌に対して直接結合し, 細胞膜透過性亢進により細胞膜に瘤を形成する。このため, 結核菌の増殖が抑制される。

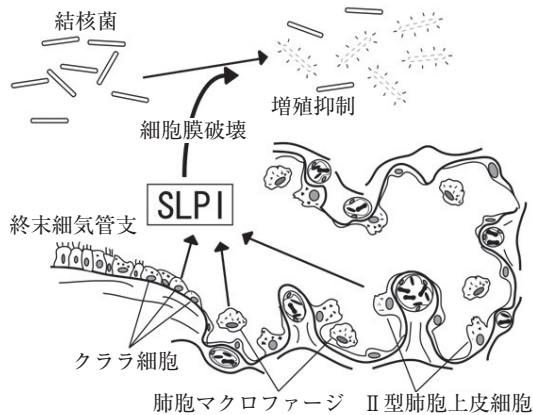


図3 SLPIの結核菌に対する感染防御機構
下気道, 肺胞に侵入した結核菌に対して, 気管支の胚細胞, 細気管支のクララ細胞, 肺胞のII型肺胞上皮細胞および肺マクロファージからSLPIが管腔内に分泌される。SLPIは直接結核菌に結合し, 細胞膜を破壊することにより増殖を抑制している。このように結核菌に対してSLPIは強い結核菌感染防御作用を有している。

る¹⁶⁾¹⁷⁾²⁰⁾。そこで, SLPIのBCGおよび結核菌に対する*in vitro*での増殖抑制能について検討した。その結果, SLPIタンパク質はBCGおよび結核菌H37Ra株, H37Rv株に対して, グラム陰性桿菌であるサルモネラ菌よりもより低濃度で増殖を抑制していた。このことから, SLPIは結核菌に対する感染防御を担う抗菌タンパクである可能性が示唆された。そこでSLPIのBCGに対する増殖抑制の作用機序を解析した。SLPIを投与して3時間後のBCGを, 走査電子顕微鏡を用いて観察したところ, BCG細胞膜表面に瘤が形成されていた。また, SLPIはBCGに結合し, BCG細胞膜の透過性を亢進させていた。このようにSLPIは直接BCG細胞膜に作用して破壊することが示唆された(図2)。SLPIにはWAPモチーフが2個存在し, マウスSLPIのN末端, C末端WAPモチーフのそれぞれがBCGに対する増殖抑制能, 膜透過性の亢進能を有していた。また, アミノ酸配列の解析により, WAPモチーフの陽電荷アミノ酸が重要であることが推

測された。事実, 陽電荷アミノ酸の一部を陰電荷アミノ酸に置換した変異SLPIタンパク質はBCGに対する増殖抑制, 膜透過性亢進を示さなかった。デフェンシンも陽電荷アミノ酸が重要であり, その電気的エネルギーにより細菌の細胞膜に結合し破壊することが示されており, SLPIも同様の機序により増殖抑制を示すことが考えられる。

(3) 生体内でのSLPIの役割

SLPIノックアウトマウスを用いて, 生体内での結核菌感染に対するSLPIの役割について解析を行った。SLPIノックアウトマウスと野生型マウスに結核菌H37Rv株を経気道的に感染させ, 生存率をモニターした。その結果, SLPIノックアウトマウスは結核菌感染後約2カ月で全例死亡したが, 野生型マウスはほとんど死亡しなかった。また, 結核菌感染5日後のマウスの肺を摘出し, チール・ネールゼン染色で結核菌の局在を解析したところ, 野生型マウスでは結節が散見され, 結節内にはのみ結核菌が認められたが, SLPIノックアウトマウスの肺ではびまん性に間質の肥厚を認め, 散在性に多数の結核菌を認めた。また, 一見正常と思われるSLPIノックアウトマウスの肺実質にも細胞内寄生している結核菌を認めた。野生型マウスと比較してSLPIノックアウトマウスの肺の結核菌数は多く観察され, これはSLPIの欠損により結核菌に対する感染防御能が低下したためと考えられる。このように, SLPIは結核菌感染に対して分泌担当細胞から早期に分泌され, 結核菌に対して増殖抑制能を示し, 感染防御を担っていることが示された(図3)。

2. Lipocalin 2による結核菌感染防御機構

細菌にとって鉄イオンは宿主細胞同様, 代謝や酸化ストレスからの防御といった生命維持において重要である。そのため宿主に侵入後, 細菌は宿主内の鉄イオンを取り込む。しかし, 宿主内の鉄イオンは優先的にトランスフェリンやラクトフェリンといったタンパク質と結合してしまい, 親水性の遊離した状態ではほとんど利用できない。そのため細菌は宿主内の遊離鉄を獲得するために, 鉄イオンと高いアフィニティーをもっているsiderophoreという化合物を分泌する。siderophoreと鉄イオンが結合することによって細菌は遊離鉄を獲得し, 代謝や増殖に利用する^{21)~23)}。

Lipocalin 2 (24p3もしくはNeutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin)はLipocalinファミリーに属する低分子量タンパク質である。Lipocalin 2は最初, 好中球顆粒成分として同定され²⁴⁾, 細菌感染により血清や滑膜で顕著に発現量が増加することが知られている²⁵⁾。また炎症や腫瘍形成に反応して上皮細胞から分泌されることや, アポ

トースや腎臓細胞の分化に関与していることも報告されている²⁶⁾²⁷⁾。最近、Lipocalin 2は大腸菌が分泌する siderophoreである enterochelinと鉄イオンの複合体に結合し、大腸菌の鉄イオン獲得を阻害することが報告された^{28)~30)}。Lipocalin 2による鉄イオンの取り込み阻害により、大腸菌は鉄不足となり代謝や増殖に影響がでる。このように、利用可能な鉄イオンの調節は宿主と病原菌の相互作用のバランスで成り立っている。

結核菌においても大腸菌同様、宿主内の限られた遊離鉄を獲得しなければならない³¹⁾。そのため、結核菌も鉄イオンと高いアフィニティーをもつ小さい水溶性の分子である exochelinと呼ばれる siderophoreを分泌していることが知られている³²⁾。さらに細胞外で鉄イオンと結合した exochelinは、結核菌の細胞壁にある鉄イオンと高いアフィニティーをもった別の分子 mycobactinに鉄イオンを輸送する。mycobactinは細胞壁を通して結核菌内への鉄イオンの輸送を担っている³³⁾。Lipocalin 2がこの mycobactin-鉄イオン複合体と結合しうることが Lipocalin 2の構造解析から示された²⁵⁾。しかし Lipocalin 2が結核菌の増殖抑制に関与しているかについては不明であった。そこでわれわれは Lipocalin 2の結核菌感染防御における役割について Lipocalin 2ノックアウトマウスを用いて解析した。

(1) Lipocalin 2の発現と産生

Lipocalin 2の結核菌感染防御における役割について解析するために、まず肺における Lipocalin 2の発現誘導を検討した。SLPIの場合と同様に経気道的に BCGを感染させたマウスより肺を摘出し、定量的 RT-PCRを行ったところ、BCG感染2日後のマウスの肺で Lipocalin 2 mRNAの発現が亢進していた。次に、肺における Lipocalin 2のタンパク質レベルでの発現を解析するために免疫染色を行った。その結果、II型肺胞上皮細胞特異的に発現している Surfactant Protein C (SP-C)と Lipocalin 2が共局在していた(図4)。II型肺胞上皮細胞は主に分泌細胞として知られていることから、次に Lipocalin 2の肺胞腔内への分泌について検討した。BCG感染させたマウスから肺胞洗浄液を回収し、Lipocalin 2タンパク質の発現を、抗 Lipocalin 2抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、感染2日後のマウスの肺胞洗浄液中に大量の Lipocalin 2が認められた。これらの結果から、Lipocalin 2は結核菌感染初期に、II型肺胞上皮細胞で産生され、肺胞腔内に分泌されることが明らかになった。

(2) Lipocalin 2の結核菌に対する増殖抑制機構

肺胞腔内に分泌される Lipocalin 2が大腸菌の場合と同様に結核菌の増殖を抑制するか検討した。まずリコンビナント Lipocalin 2を精製し、Lipocalin 2存在下で BCG

を試験管内で培養し、増殖を調べたところ、Lipocalin 2濃度依存的に BCGおよび結核菌 H37Ra株、H37Rv株の増殖を抑制した。またリコンビナント Lipocalin 2存在下で培養した BCGに鉄イオンを補ってやると、Lipocalin 2による BCGの増殖抑制が解除された。このことから Lipocalin 2による結核菌の増殖抑制は、大腸菌同様、Lipocalin 2が結核菌の鉄イオンの取り込みを阻害することが原因であると示唆された。

(3) 生体内での Lipocalin 2の役割

さらに、Lipocalin 2ノックアウトマウスを用いて生体内での結核菌感染における Lipocalin 2の役割を解析した。結核菌 H37Rv株を経気道感染させ、生存率をモニターしたところ、Lipocalin 2ノックアウトマウスは感染36日目から死亡しはじめ8週までに約6割のマウスが死亡した。一方、野生型マウスは感染8週間でもすべてが生存していた。また感染6週間後のマウスの肺の CFU titerを比較したところ、Lipocalin 2ノックアウトマウスのほうが増加していた。さらに感染20日後のマウスの肺組織を病理学的に解析したところ、Lipocalin 2ノックアウトマウスの肺では顕著な種々の炎症細胞の浸潤が認められた(図5)。このように Lipocalin 2ノックアウトマウスは結核菌感染に対して高い感受性を示した。

(4) 肺胞上皮細胞内での Lipocalin 2の役割

次に、感染した結核菌の肺での局在を解析した。結核菌感染5日後の野生型および Lipocalin 2ノックアウトマウスの肺切片をチール・ネールゼン染色し比較したところ、Lipocalin 2ノックアウトマウスの肺胞上皮細胞には結核菌が多数認められたが、野生型マウスにはほとんど認められなかった。つまり Lipocalin 2は肺胞上皮細胞で結核菌感染防御に関わっていることが推測された。そこでわれわれは肺胞上皮細胞、特に Lipocalin 2を分泌するII型肺胞上皮細胞に注目し、野生型および Lipocalin 2ノックアウトマウスより cell lineを作製し、肺胞上皮細胞における Lipocalin 2の役割を解析した。野生型および Lipocalin 2ノックアウトマウス由来の肺胞上皮細胞株に *in vitro*で BCGを感染させ、抗生物質で細胞外の BCGを取り除いた後、活動性の高い結核菌に優先的に取り込まれる^{3H}ウラシルを用いて細胞内の結核菌の増殖を比較したところ、ノックアウトマウス由来の肺胞上皮細胞の^{3H}の取り込みのほうが多かった。またそこにリコンビナント Lipocalin 2を加えてやると^{3H}の取り込みが減少した。このことから Lipocalin 2が肺胞上皮細胞内の結核菌の増殖を抑制していることが予想された。実際に肺胞上皮細胞に GFPを発現する BCGを感染させて Lipocalin 2との局在を共焦点蛍光顕微鏡で解析すると、Lipocalin 2は肺胞上皮細胞のエンドソーム内に取り込まれ、BCGとも共局在していた。さらに前述したように^{3H}を用い

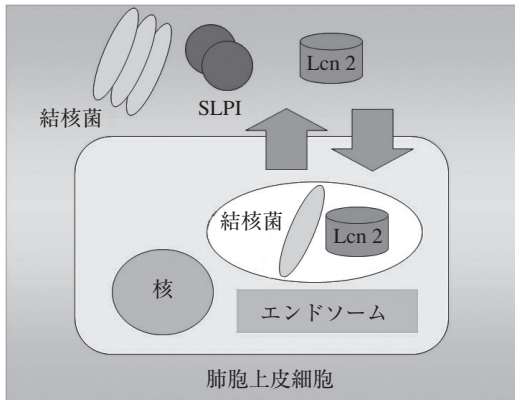


図6 SLPIおよびLipocalin 2の結核菌に対する感染防御機構

結核菌感染初期にII型肺胞上皮細胞などから肺胞腔内へ分泌されたSLPIとLipocalin 2はそれぞれ異なった場所で結核菌の増殖を抑制している。SLPIは細胞外で結核菌に直接結合することで細胞膜を破壊している。一方Lipocalin 2は細胞内に取り込まれて細胞内に寄生した結核菌の増殖を抑制している。

て細胞内での結核菌の増殖を解析したところ、エンドサイトーシス阻害剤で処理するとLipocalin 2による ^3H の取り込み減少が解除された。以上のことから、Lipocalin 2はエンドサイトーシスによって肺胞上皮細胞内に取り込まれて、エンドソーム内に寄生した結核菌の増殖を抑制していることが明らかになった。

3. 肺胞上皮細胞による抗結核菌感染防御機構

SLPI, Lipocalin 2という2種類の分泌タンパク質はともに結核菌感染初期に肺胞マクロファージおよび肺胞上皮細胞, 特にII型肺胞上皮細胞から肺胞腔内に分泌される抗結核菌タンパク質ではあるが, それぞれ作用機序も作用する場所も異なっている。前者のSLPIは細胞外に分泌され, 直接結核菌の細胞壁を破壊することにより結核菌の侵入や感染を食い止めている。一方で, 後者のLipocalin 2は結核菌の増殖に必要な鉄イオンの取り込みを阻害することにより間接的に結核菌の増殖を抑制している。Lipocalin 2はおそらく細胞外に分泌されることにより細胞外の結核菌の侵入, 感染を食い止めていると考えられる。さらに細胞内にも取り込まれることによって, 侵入を食い止められず細胞内に寄生した結核菌に対しても積極的に増殖抑制につとめている(図6)。このように, マクロファージのような殺菌作用をもたないII型肺胞上皮細胞にもマクロファージに負けないくらいの結核菌感染防御メカニズムが備わっていることが明らかになった。

おわりに

フレミングが初めて抗生物質であるペニシリンを発見してから80年がたった今, 科学の飛躍的な進歩により人類の最大の脅威であった感染症に歯止めがかかったかに思われたが, 結核, エイズ, マラリアは未だ3大感染症といわれるほど, 現代でも世界的問題として取り上げられている。特に再興感染症として位置づけられる結核は, 世界人口の3分の1の人が罹患していると推定され, 結核の予防と治療法の開発は世界レベルで急務といえる。

今回, われわれが紹介したSLPI, Lipocalin 2という2つの分泌タンパク質の抗結核菌感染防御機構の解明により, 肺胞上皮という第一線のバリアーでの生体防御機構が明らかになったが, あくまでも最終目標である結核克服の通過点でしかない。今後の研究が抗結核薬の開発の分子基盤に少しでも役立つように日々研究に励みたいと思っている。

文 献

- 1) Gatfield J, Pieters J: Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. 2000; 288: 1647-1650.
- 2) Saleh MT, Belisle JT: Secretion of an acid phosphatase (SapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. *J Bacteriol*. 2000; 182: 6850-6853.
- 3) Walburger A, Koul A, Ferrari G, et al.: Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science*. 2004; 304: 1800-1804.
- 4) Bermudez LE, Goodman J: *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun*. 1996; 64: 1400-1406.
- 5) Droemann D, Goldmann T, Branscheid D, et al.: Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Histochem Cell Biol*. 2003; 119: 103-108.
- 6) Nishimura J, Saiga H, Sato S, et al.: Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J Immunol*. 2008; 180: 4032-4039.
- 7) Saiga H, Nishimura J, Kuwata H, et al.: Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J Immunol*. 2008; 181: 8521-8527.
- 8) Clauss A, Lilja H, Lundwall A: The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 333: 383-389.
- 9) Eisenberg SP, Hale KK, Heimdal P, et al.: Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor. *J Biol Chem*. 1990; 265: 7976-7981.
- 10) Abe T, Kobayashi N, Yoshimura K, et al.: Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J*

- Clin Invest. 1991 ; 87 : 2207–2215.
- 11) Hiemstra PS, Wetering SV, Stolk J: Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur Respir J*. 1998 ; 12 : 1200–1208.
 - 12) Schiessler H, Fink E, Fritz H, et al.: Acid-stable proteinase inhibitors from human seminal plasma. *Methods Enzymol*. 1976 ; 45 : 847–859.
 - 13) Vogelmeier C, Hubbard RC, Fells GA, et al.: Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor. *J Clin Invest*. 1991 ; 87 : 482–488.
 - 14) Thompson RC, Ohlsson K: Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986 ; 83 : 6692–6696.
 - 15) Ashcroft GS, Lei K, Jin W, et al.: Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med*. 2000 ; 6 : 1147–1153.
 - 16) Tomee JF, Hiemsta PS, Wieland RH, et al.: Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi. *J Infect Dis*. 1997 ; 176 : 740–747.
 - 17) Hiemstra PS, Massen RJ, Stolk J, et al.: Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun*. 1997 ; 64 : 4520–4524.
 - 18) Jin FY, Nathan C, Radzioch D, et al.: Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell*. 1997 ; 88 : 417–426.
 - 19) Nakamura A, Mori Y, Hagiwara K, et al.: Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice. *J Exp Med*. 2003 ; 197 : 669–674.
 - 20) Si-Tahar M, Merlin D, Sitaraman S, et al.: Constitutive and regulated secretion of secretory leukocyte protease inhibitor by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2000 ; 118 : 1061–1071.
 - 21) De Voss JJ, Rutter K, Schroeder BG, et al.: The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 ; 97 : 1252–1257.
 - 22) Parent MA, Bellaire BH, Murphy EA, et al.: Brucella abortus siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) facilitates intracellular survival of the bacteria. *Microb Pathog*. 2002 ; 32 : 239–248.
 - 23) Fischbach MA, Lin H, Liu DR, et al.: How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat Chem Biol*. 2006 ; 2 : 132–138.
 - 24) Cowland JB, Borregaard N: Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics*. 1997 ; 45 : 17–23.
 - 25) Holmes MA, Paulsene W, Jide X, et al.: Siderocalin (Lcn2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against Mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure*. 2006 ; 13 : 29–41.
 - 26) Devireddy LR, Teodoro JG, Richard FA, et al.: Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science*. 2001 ; 293 : 829–834.
 - 27) Yang J, Mori K, Li JY, et al.: Iron, lipocalin, and kidney epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 ; 285 : F9–F18.
 - 28) Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, et al.: The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*. 2002 ; 10 : 1033–1043.
 - 29) Flo TH, Smith KD, Sato S, et al.: Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004 ; 432 : 917–921.
 - 30) Berger T, Togawa A, Duncan GS, et al.: Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 ; 103 : 1834–1839.
 - 31) De Voss JJ, Rutter K, Schroeder BG, et al.: Iron acquisition and metabolism by Mycobacteria. *J Bacteriol*. 1999 ; 181 : 4443–4451.
 - 32) Macham LP, Ratledge C, Nocton JC: Extracellular iron acquisition by Mycobacteria: Role of the exochelins and evidence against the participation of mycobactin. *Infect Immun*. 1975 ; 12 : 1242–1251.
 - 33) Gobin J, Moore CH, Reeve JR, et al.: Iron acquisition by *Mycobacterium tuberculosis*: isolation and characterization of a family of iron-binding exochelins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 ; 92 : 5189–5193.

POTENTIAL OF NOVEL ANTIMYCOBACTERIAL IMMUNE FACTORS,
SLPI AND LIPOCALIN 2

Hiroyuki SAIGA and Kiyoshi TAKEDA

Abstract *Mycobacterium tuberculosis*, causing tuberculosis, is the pathogen that invades immune cells, especially macrophages, and evade from the host immune response. Recent studies have reported that *M. tuberculosis* also invade alveolar epithelial cells as well as alveolar macrophages. However, the role of alveolar epithelial cells in the host defense against *M. tuberculosis* remains unknown. In this study, we demonstrate that secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and lipocalin 2 are secreted into the alveolar space by alveolar macrophages and epithelial cells during the early phase of respiratory mycobacterial infection. SLPI kills mycobacteria by enhancing the membrane permeability, and lipocalin 2 is internalized into the alveolar epithelial cells and inhibits intracellular mycobacterial growth by blocking iron uptake. Taken together, these findings highlight a pivotal role for alveolar

epithelial cells during mycobacterial infection.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, TLR, Alveolar epithelial cell, SLPI, Lipocalin 2

Laboratory of Immune Regulation, Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University

Correspondence to: Hiroyuki Saiga, Laboratory of Immune Regulation, Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871 Japan.

(E-mail: saiga@ongene.med.osaka-u.ac.jp)