

論文の内容の要旨

農学国際 専攻

平成22年度博士課程 進学

氏名 綱嶋 るみ

指導教員名 松本 安喜

論文題目 一酸化窒素に依存しないマクロファージのリーシュマニア
殺傷作用に関する研究

途上国において広がりを見せるリーシュマニア症の原因微生物であるリーシュマニア原虫は、哺乳動物体内においてマクロファージ (MΦ) に寄生し増殖する。感染 MΦ の細胞内部における殺原虫因子を誘導することが、リーシュマニア症の発症防御に重要であると考えられている。先行研究において、Green らはマウス腹腔 MΦ に対してサイトカインを前処置した場合に、原虫感染 72 時間以降において一酸化窒素 (NO) による細胞内原虫殺傷が起こり、細胞内原虫の生残率が低下することを報告した。その時点では、活性酸素種 (ROS) 等の NO 以外の殺原虫効果はほとんどないと考えられていたが、当研究室の太田らは、マウス腹腔 MΦ に対して IFN- γ 及び IL-12 (IFN- γ /IL-12) を前処置した場合に、NO 産生の見られない原虫感染 4 時間にすでに原虫生残率が低下することを示した。*in vitro* において、MΦ が原虫感染 4 時間という早い段階で細胞内原虫生残率の低下を示したことによって、従来から知られていた NO を介した殺原虫効果と相乗的に機能することが期待される。

そこで本研究では、IFN- γ /IL-12 前処置によって *Leishmania major* (原虫) 感染初期 (感染 4 時間) に見られた原虫生残率低下のメカニズムを解明し、ヒト治療への応用を念頭に置きヒト細胞を用いた解析を行った。

第一章 蛍光染色原虫を用いた原虫感染の新規解析方法の確立

原虫感染初期に見られた細胞内原虫生残率低下のメカニズムとして、(1) MΦへの原虫侵入量が低下した、(2) MΦ細胞内での NO 以外による原虫殺傷が起きた、という 2 つの可能性を考えた。これら 2 つの可能性を判別する方法として、MΦ内に侵入した原虫量の差に注目した。そこで、「生残した原虫を持つ MΦであること」をギムザ染色像から判別する従来法では判別不能であった、「原虫を貪食して殺傷した MΦ」を検出する新規の解析方法として、原虫細胞膜表面を PKH26 を用いて蛍光標識する手法を確立した。この手法を用いて、IFN- γ /IL-12 前処置をした MΦへのリーシュマニア原虫 *in vitro* 感染を行い、蛍光陽性細胞をもって MΦへの原虫侵入率、及びギムザ染色細胞から原虫生残率を測定した。その結果、IFN- γ /IL-12 前処置 MΦと未処置 MΦは共に同レベルの原虫侵入率であり、上記(2)であると考えられた。原虫生残率は、IFN- γ /IL-12 前処置 MΦが無処置 MΦよりも有意に低いことが先行研究と同様に示された。このように、細胞内に原虫侵入が起きているが生残原虫が減少することから、*in vitro* において、マウス腹腔 MΦが IFN- γ /IL-12 前処置により原虫感染 4 時間以内に殺原虫効果を持つことが示唆された。また、本検討においても NO 産生測定を行った結果、IFN- γ /IL-12 前処置 MΦは原虫感染 24 時間以降で NO 産生が起っていたことから、原虫感染 4 時間以内に働く殺原虫因子は NO ではないことが示唆された。

第二章 *in vitro* においてリーシュマニア感染初期に原虫殺傷因子として働く活性酸素種 (ROS) の検証

第一章で示唆された、原虫感染初期に働く原虫殺傷の因子として、活性酸素種 (ROS) である可能性について検討した。IFN- γ /IL-12 前処置を行い原虫を添加した MΦの細胞外 ROS を Luminol 法で、細胞内 ROS を DCFH 法で測定を行った。その結果、細胞外 ROS は時間を追うにつれて、IFN- γ /IL-12 前処置 MΦが無処置 MΦに比べて高い傾向を示すようになり、原虫感染 1 時間後に有意に高い値を示した。一方、細胞内 ROS も原虫感染 1 時間後に、IFN- γ /IL-12 前処置 MΦの方が有意に高い傾向を示した。このことから、IFN- γ /IL-12 前処置によって MΦ細胞内では ROS の産生が増強されている可能性が示唆された。次に、ROS の阻害剤 (抗酸化物質) である α -tocopherol (α -TOC) を MΦに対して IFN- γ /IL-12 前処置の際に同時に作用させた場合の ROS 産生量の変化

の度合いを検討したところ、細胞内 ROS 及び細胞外 ROS は α -TOC の添加によって有意に低下した。その際、原虫侵入率は α -TOC 非添加時と同様、 α -TOC+IFN- γ /IL-12 前処置 M Φ と α -TOC 前処置 M Φ 共に同レベルであったが、原虫生残率は非添加時に認められた IFN- γ /IL-12 前処置による生残率の低下は認められず、 α -TOC+IFN- γ /IL-12 前処置 M Φ と α -TOC 前処置 M Φ 共に同レベルを示した。以上のことから、IFN- γ /IL-12 前処置をすることによって原虫感染初期に ROS による原虫殺傷が増強される事が示唆された。

また、ROS の一種であるスーパーオキシドを産生するために必要となる NADPH oxidase complex (NOX) とその一部である p67^{phox} の分布状態を anti-NOX/p67^{phox} を用いて検討したところ、原虫感染 4 時間後の IFN- γ /IL-12 前処置 M Φ と未処置 M Φ 共に同程度分布していることが分かった。NOX/p67^{phox} は、ファゴソーム及びファゴライソソーム上に分布していると考えられることから、この結果は、細胞内原虫侵入率が IFN- γ /IL-12 前処置 M Φ と未処置 M Φ で差がないことを支持する結果であると考えられた。

第三章 ヒト細胞を用いた基礎検討

第二章までに示された結果は、全てマウス腹腔 M Φ を用いた検討によるものである。最終目標は、ヒトにおけるリーシュマニア症の発症防御に活かすためである。そのため本章では、マウス細胞だけではなくヒト細胞株に対して IFN- γ / IL-12 前処置を行った際の細胞内原虫侵入率、細胞内原虫生残率、NO 濃度の検討を行った。まず、マウス M Φ 様細胞株 RAW264.7 と J774A.1 に対して IFN- γ / IL-12 を前処置後もしくは未処置で原虫感染を行ったところ、マウス腹腔 M Φ と同様に原虫侵入率は両処置群で有意な差はなかったが、細胞内原虫生残率の前処置群における有意な低下が示された。NO 産生量は感染直後および 4 時間では IFN- γ / IL-12 前処置群と未処置群の間に有意な差はなく、感染 72 時間で IFN- γ / IL-12 前処置群に有意な上昇が見られた。また、ヒト単球由来細胞株 U-937 と THP-1 に対して IFN- γ / IL-12 を前処置後もしくは未処置で原虫感染を行った。その結果、U-937 の細胞内原虫生残率は IFN- γ / IL-12 前処置群が未処置群よりも有意に低下することが示されたが、THP-1 の細胞内原虫生残率は、IFN- γ / IL-12 前処置群と未処置群の間に有意な差は見られなかった。なぜ THP-1 と U-937 で IFN- γ / IL-12 前処置による反応性に差がみられたのか現段階では不明であるが、分化の到達度や細胞株の由来の違いなどが要因であると推測した。ヒト細胞株 U-937 においてマウス腹腔 M Φ に見られたような IFN- γ / IL-12 前処置による細胞内原虫

生残率低下を示したことから、ヒトにおいても IFN- γ / IL-12 前処置による細胞内原虫殺傷増強の効果が認められる可能性が示唆された。U-937 は、今後 IFN- γ / IL-12 前処置効果の分子機構をヒト細胞株を用いて解明する際に有用であると考えている。

本章ではさらに、IFN- γ / IL-12 が高価であることから、IFN- γ / IL-12 の補完をする物質として、Toll Like receptor (TLR) 4 を介して貪食細胞を活性化する細胞壁リポ多糖である LPS もしくは IP-PA1 を用いたときに、マウス脾臓 M Φ が M Φ 細胞内原虫生残率低下を示すのか検討を行った。マウス脾臓 M Φ に対して LPS もしくは IP-PA1 を前処置し原虫感染を行ったところ、原虫感染 4 時間後において原虫生残率が未処置群よりも有意に低下した。また、NO 産生量を経時的に測定したところ、原虫感染直後、4 時間では未処置群、LPS もしくは IP-PA1 前処置群ともに低値を示しており、感染 24 時間以降に LPS もしくは IP-PA1 前処置群において有意な上昇が見られた。原虫感染 4 時間時点では LPS もしくは IP-PA1 前処置群において NO 産生が低い値を示していることから、NO 以外による因子、ROS による細胞内原虫殺傷などが機能したと推察された。今後は、LPS もしくは IP-PA1 処置によりもたらされる細胞内での原虫生残率低下の機構解明およびヒト細胞での再現が急務であると考えている。また同時に、TLR を介した免疫腑活を起こす CpG や PolyI:C などを用いて同様の検討を行い、M Φ 細胞内で IFN- γ / IL-12 の補完を行い、原虫生残率低下を促進することができる物質のスクリーニングが重要であると考えられる。そして、原虫生残率低下促進が認められた物質を用いて *in vivo* での原虫感染抑制検討へ応用し、生体への影響評価が行われることに期待したい。

以上から、本研究により、*in vitro* において M Φ に対して IFN- γ / IL-12 処置をすることによって、M Φ 細胞内での ROS 産生が増強され、原虫感染初期に細胞内原虫の殺傷が起こることが示された。原虫感染初期に ROS による細胞内原虫殺傷能が誘導されることは、原虫感染後期に見られる NO による殺原虫効果との相乗効果により、病変形成を抑制し、治療薬の軽減や治療期間の短縮、さらにはワクチン効果の増強などを期待でき、リーシュマニア症治療を行う上で問題となっている、治療薬の副作用や金銭的な問題を解決する糸口となる可能性を秘めていると考えられる。