

博士論文（要約）

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

東京大学大学院
農学生命科学研究科

綱嶋 るみ

本博士論文の内容は、
学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。
5年以内に出版予定。

目次

目次	i
序章	
1. リーシュマニア症	1
2. リーシュマニア原虫と宿主	2
3. 宿主の免疫応答	3
4. 目的	6
5. 図説明	7
6. 図	9
論文の内容の要旨	
第1章	13
第2章	14
第3章	15
総括・展望	19
謝辞	25
参考文献	26

序章

1. リーシュマニア症

リーシュマニア症は、サシチョウバエという小型の節足動物によって細胞内寄生性の寄生虫であるリーシュマニア原虫 (*Leishmania* spp.) が媒介されることにより引き起こされる。人獣共通感染症であるリーシュマニア症は、熱帯・亜熱帯を中心に約 88 カ国での流行が認められており、死亡者は 6 万人、感染者は 1200 万人、そして 3 億 5000 万人が感染と隣り合わせであるといわれている [1]。ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus; HIV) との重複感染が起きている地域も多く、治療や予防に緊急の対策が求められている。世界保健機関 (WHO) が緊急に対策を要するとしている ‘顧みられない熱帯病’ (Neglected Tropical Diseases) (リーシュマニア症、フィラリア症、住血吸虫症) の 1 つでもある [1]。体内への原虫侵入によってもたらされる病型はリーシュマニア原虫の種類により分類されており、皮膚型リーシュマニア症を引き起こす *Leishmania (L.) major*、*L. tropica*、*L. mexicana*、皮膚粘膜型リーシュマニア症を引き起こす *L. braziliensis*、内臓型リーシュマニア症を引き起こす *L. infantum*、*L. donovani*、*L. chagasi* が知られている [2]。

2. リーシュマニア原虫と宿主

リーシュマニア原虫はその生活環の中で二つの形態をとっており、サシチョウバエの中腸内では鞭毛を 1 本有するプロマスティゴート型と呼ばれる形態で増殖するが、哺乳類に感染すると鞭毛のない卵形のアマスティゴート型と呼ばれる形態となり、大食細胞（マクロファージ, 以下 $M\Phi$ ）の細胞内に感染し、増殖する（図 1, 2）。リーシュマニア原虫に感染した $M\Phi$ は破壊され、放出された原虫がさらに感染局所に遊走した $M\Phi$ に感染することで病変が拡大してゆき、感染 $M\Phi$ の集簇を伴う病変が形成される。

現在、リーシュマニア症の治療には 5 価のアンチモン製剤が主に使用されているが、近年、第 2 世代治療薬としてアンフォテリシン B やイトラコナゾールなどの抗真菌薬も用いられている[3, 4, 5]。しかし、薬剤耐性原虫の出現が報告されていること[6]や、治療薬が高価であること、そして、薬剤の副作用等が問題となっている。このことから、薬剤に頼らない、ワクチンを用いた予防法や免疫の活性化を促す治療法の研究が進められており[7, 8]、未感染者または感染者の免疫力を強化することによる感染防御や症状の治癒が期待されている。

3. 宿主の免疫応答

病変部の治癒と悪化には細胞性免疫（Th 1 型免疫応答）と液性免疫（Th 2 型免疫応答）という 2 つの免疫系のバランスが重要であることがマウスリーシュマニア症モデルを用いた検討から分かっている[9, 10]。体内にリーシュマニア原虫が侵入すると、原虫を貪食した抗原提示細胞によって原虫の情報が T 細胞（Th 0 細胞）へ伝達される。その情報とともにサイトカインによる分化刺激を受けた Th 0 細胞は Th 1 細胞、または Th 2 細胞へと分化する [11]（図 3）。

In vivo において、これらサイトカインに注目した検討は多数行われている。リーシュマニア症抵抗性マウス（C57BL/6 マウス）の病変部では、抗原提示細胞からの IL-12 の刺激を受けた Th 0 細胞が Th 1 細胞へと分化し、IFN- γ を放出するようになり、Th 1 型免疫応答を体内に誘導する。その結果、M Φ が活性化されることで細胞内の原虫を殺傷し、病変が治癒することが分かっている[9]。一方、リーシュマニア症感受性マウス（BALB/c マウス）の病変部では、抗原提示細胞から IL-12 の刺激を受けなかった Th 0 細胞が Th 2 細胞へと分化し、IL-4 を放出するようになり、Th 2 型免疫応答を体内に誘導する[9]。IL-4 によって B 細胞が活性化し抗体産生が起こるが、細胞内へ寄生しているリーシュマニア原虫には抗体の効力が及ばず、その結果 M Φ 内で原虫増殖が起き、病変が悪化する[9]（図 3）。しかし、BALB/c マウスに対する IL-12 の投与は、病変の

縮小を促すが、IL-12 と共に抗 IFN- γ 抗体を投与することで病変が再び悪化する [9]。これらは、IL-12 や IFN- γ が感受性マウスを防御するために必須であることを示している。また、BALB/c マウスに対する抗 IL-4 抗体の投与によって病変の縮小が起こること [12] や、C57BL/6 マウスに対して抗 IFN- γ 抗体を投与することにより病変の悪化が起こることも知られている [12]。これらのことは、IL-12 および IFN- γ がリーシュマニア感染制御に必須であることを示しているが、一方で、IFN- γ mRNA が、抵抗性の C57BL/6 マウス感染皮膚病変からだけでなく、感受性の BALB/c マウス感染皮膚病変からも検出されている [11] ということから、IFN- γ の単独産生は制御に十分ではなく、*in vivo* における IFN- γ と IL-12 双方の存在が、リーシュマニア症の制御に必要であることが伺われる。

In vitro においては、IL-12 と IFN- γ はそれぞれに単独でリーシュマニア原虫の宿主となった M Φ を活性化し、原虫感染後期（感染 72 時間後）には M Φ 内に一酸化窒素合成酵素（iNOS）誘導されることで、一酸化窒素（NO）による細胞内原虫の殺傷が起き、原虫感染率を低下させることが報告されている [14, 15]。また、IFN- γ が M Φ に感染したリーシュマニア原虫の活性を直接抑制するという効果も報告されている [15]。NO により、原虫は効果的に殺傷されるものの、宿主におけるリーシュマニア感染制御をより安定的に行うためには、NO に

よらない殺傷機能を相乗効果として加えることが理想であると推測される。当研究室の太田らは、*in vitro* において IFN- γ と IL-12 を同時に前処置 (IFN- γ /IL-12) したマウス腹腔 M Φ が、まだ NO 産生が誘導されていない原虫の接着侵入直後である感染初期 (感染 4 時間後) に原虫感染率の低下を示すということ報告した[16]。また、iNOS によって原虫感染後期に合成される NO 産生は、サイトカイン単独の場合よりも IFN- γ /IL-12 前処置の方が効果的であることも確認された[16]。ここで注目したいことは、*in vitro* において、サイトカインの処置を行うことで原虫感染後期に細胞内原虫殺傷の因子として機能する NO 以外に、原虫感染初期に細胞内原虫殺傷を行う因子がある可能性が示されていることである[16]。さらに、*in vitro* において M Φ に対して IFN- γ および LPS で処置をすることで、原虫感染 24 時間後に NO および活性酸素 (ROS) によって細胞内原虫殺傷が起きるとの報告もある[17]。*In vitro* における原虫感染初期の原虫感染率低下は、感染後期における細胞内の原虫量にも影響すると考えられることから、感染初期の段階での感染抵抗性が重要な意味を持つことが推測できる。しかしながら、IFN- γ /IL-12 処置がもたらした原虫感染 4 時間後の感染抵抗性メカニズムはいまだ不明であった。

4. 目的

そこで本研究では、*in vitro* において MΦ への IFN- γ /IL-12 前処置によって見られた原虫感染初期の原虫生残率低下のメカニズムを解明し、そのメカニズムを利用したヒト生体内での原虫感染制御（細胞内生残原虫の減少）を目標とした。

第1章では、IFN- γ /IL-12 前処置 MΦ の原虫感染率低下の要因として（1）MΦ の細胞表面に変化が起こり、原虫の MΦ への接着や侵入を阻害し、MΦ 自体の原虫貪食の低下によって MΦ 細胞内に取り込まれる原虫数そのものの個数が減少し、感染率の低下が起きた。（2）MΦ 細胞内部での殺原虫効果が高まり、活発な貪食と NO 以外の因子による原虫の殺傷と消化が起これば感染率の低下が起きた。という二つの可能性を想定し、MΦ への原虫侵入に着目した検討を行った。

第2章では、第1章で得られた結果から、IFN- γ /IL-12 前処置を行った MΦ 細胞内において活性酸素種（ROS）の産生が起きている事を推察し、サイトカイン処置後および原虫感染後の ROS 産生検討を行った。また、IFN- γ /IL-12 前処置の殺原虫効果が ROS に依存するかを確認するため、ROS 阻害剤である α -トコフェロールをサイトカインと同時に前処置した場合の MΦ への影響を検討した。

第3章では、最終目標がヒトにおけるリーシュマニア感染の制御を行うことであることから、マウス腹腔 MΦ だけではなくマウス細胞株および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。さらに、MΦ の由来する組織や環境要因により、IFN- γ / IL-12 に対する反応性が低い場合を想定し、IFN- γ / IL-12 以外の刺激によって ROS の産生を補完的に促進することのできる物質として、Toll Like receptor (TLR) 4 を介した Th1 活性を起こす LPS もしくは IP-PA1 を用いたときに、マウス脾臓 MΦ が MΦ 細胞内原虫生残率低下を示すのか検討を行った。

5. 図説明

図1 リーシュマニア原虫

リーシュマニア原虫はサシチョウバエの中腸内においては、鞭毛を1本有するプロマスティゴート型と呼ばれる形態で増殖する。哺乳動物に感染すると鞭毛のない卵形のアマスティゴート型となり、MΦ内で増殖する。

図2 リーシュマニア原虫の生活環

リーシュマニア原虫はその生活環の中で二つの形態をとっており、その形態は図1で示した通りである。MΦの細胞内に感染した原虫は増殖し、MΦが破壊され、放出された原虫がさらに感染局所に遊走したMΦに感染することで病変が拡大してゆき、感染MΦの集簇を伴う病変が形成される。出典：CDC

図3 サイトカインによるT細胞の分化

体内にリーシュマニア原虫が侵入すると、原虫を貪食した抗原提示細胞によって原虫の情報がTh0細胞へ伝達される。その情報とともにIL-12による刺激を受けたTh0細胞はTh1細胞へ分化し、IL-4による刺激を受けたTh0細胞はTh2細胞へと分化する。Th1細胞はIFN-γ等の炎症性サイトカインを放出することでMφを活性化し、細胞内原虫の殺傷へと導かれる。Th2細胞はB細胞を活性化し抗体の産生を促すが、細胞内に寄生する原虫に対して抗体が機能できず、原虫の排除をすることができない。

6. 図

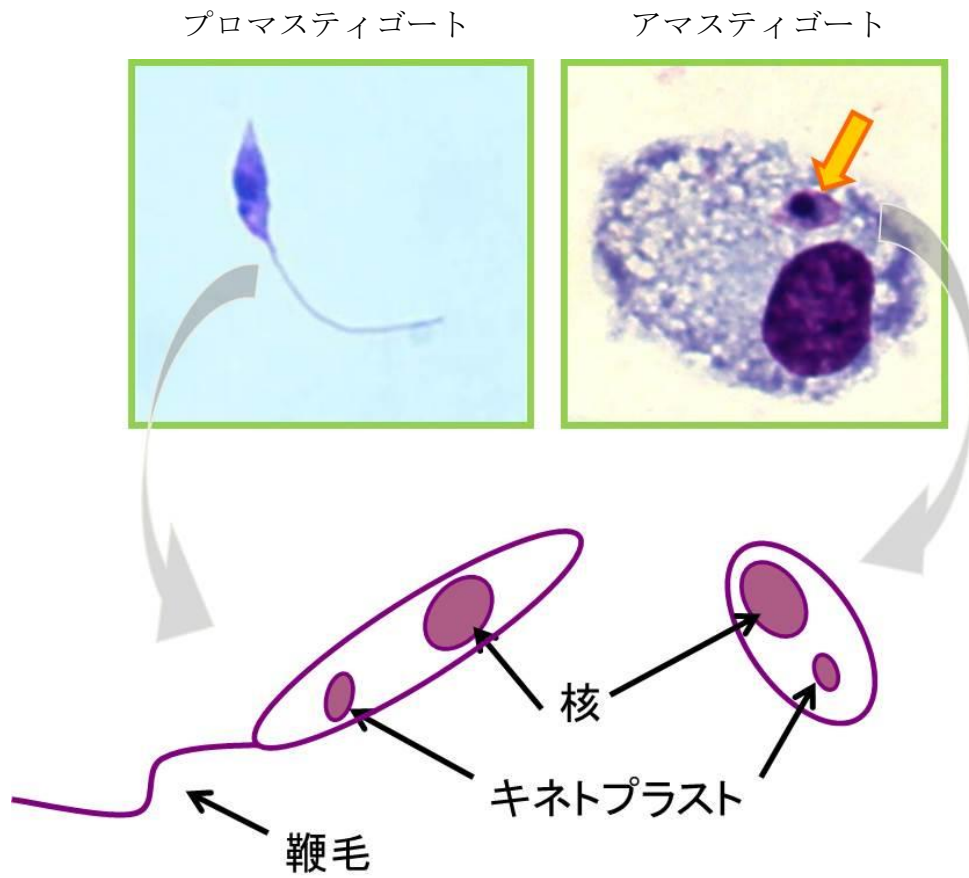


図1 リーシュマニア原虫

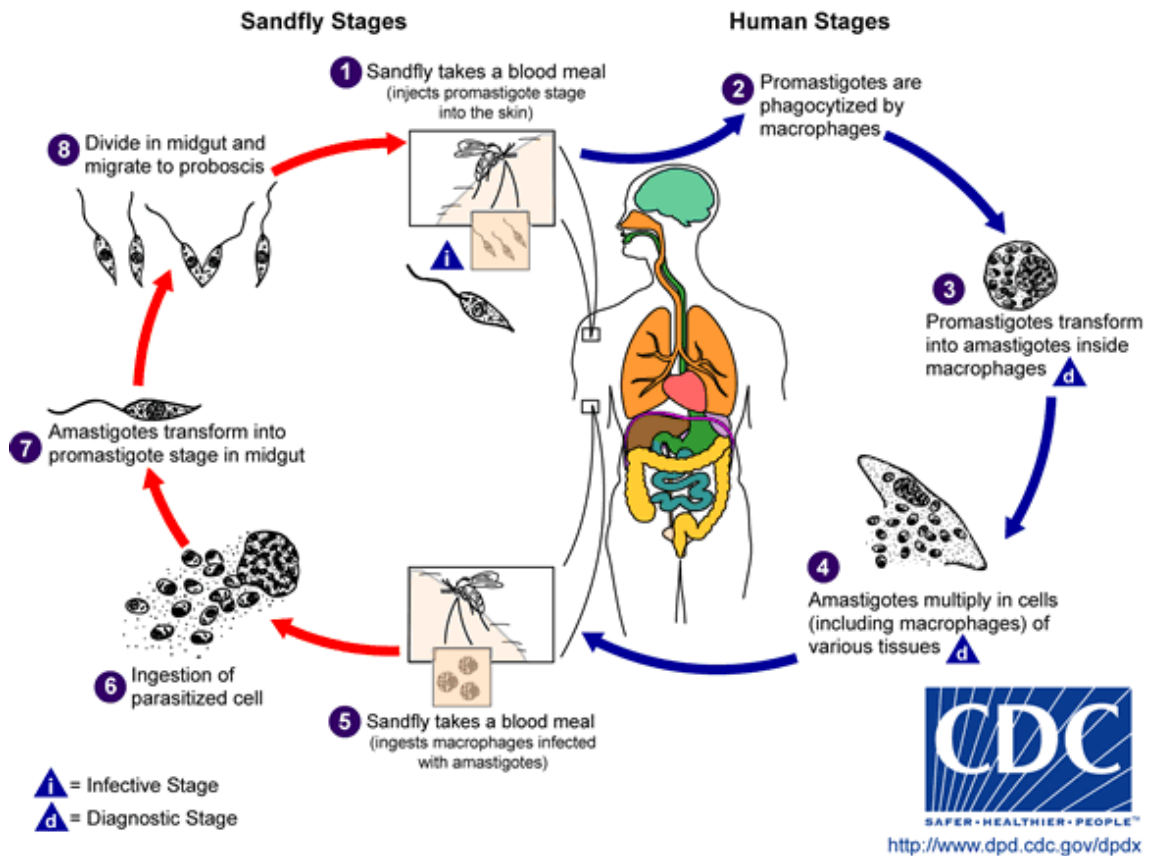


図2 リーシュマニア原虫の生活環

(CDC ホームページより)

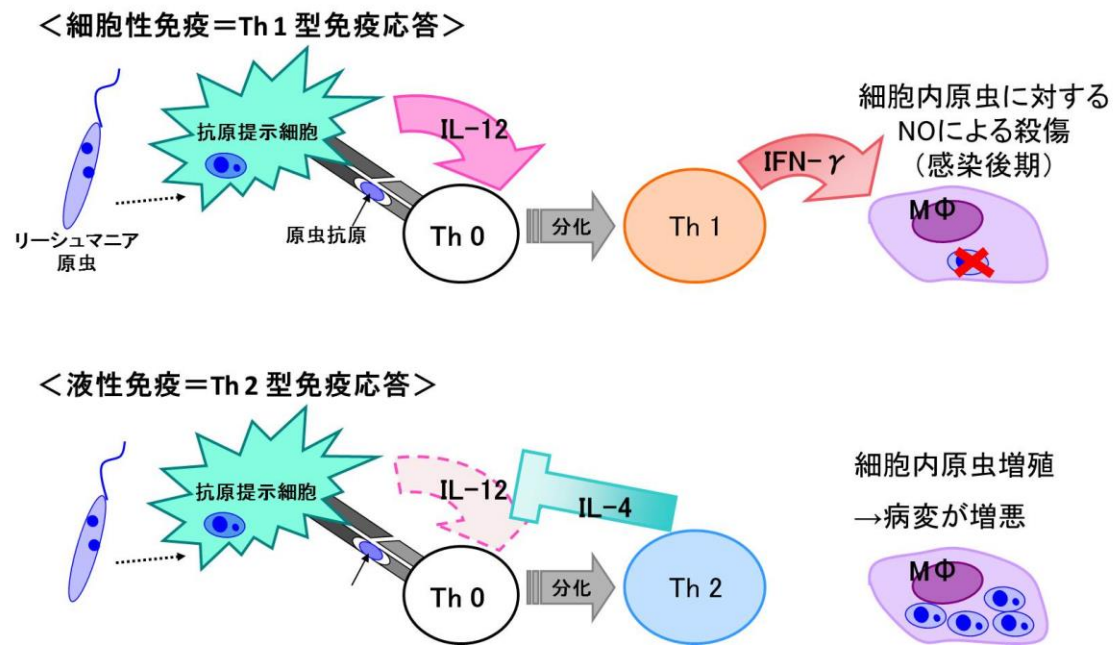


図3 サイトカインによるT細胞の分化

論文の内容の要旨

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 M Φ 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 M Φ が未処置 M Φ 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 M Φ 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 M Φ 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 M Φ 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 MΦ が MΦ 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 MΦ 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 を介した免疫応答を起す CpG や PolyI:C などを用いて同様の検討を行い、MΦ 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 MΦ に対して IFN- γ / IL-12 処置をすることによって、MΦ 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。

総括・展望

リーシュマニア原虫はサシチョウバエによって媒介され、人獣共通感染症であるリーシュマニア症を引き起こす。内蔵型リーシュマニア症は重篤になれば死に至る感染症であり、皮膚型リーシュマニア症は皮膚病変部が痕として残るため差別の対象となることもある。また、HIV との重複感染が起きている地域が多いこともあり、治療や予防に緊急の対策が求められている。現在、リーシュマニア症の治療には 5 価のアンチモン製剤が主に使用されているが、近年、第 2 世代治療薬としてアンホテリシン B やイトラコナゾールなどの抗真菌薬も用いられている [3, 4, 5]。しかし、薬剤耐性原虫の出現が報告されていること [6] や、治療薬が高価であるために流行地である開発途上国において薬剤が広まりにくいこと、そして薬剤の副作用等が問題となっている。このことから、薬剤に頼らない、ワクチンを用いた予防法や免疫の活性化を促す治療法の研究が進められており、未感染者または感染者の免疫力を強化することによる感染防御や症状の治癒が期待されている。本研究は、リーシュマニア症の感染防御や治癒に関して開発が期待される、「免疫力を強化することによるリーシュマニア症の制御」の一端を担っていると考えている。

まず本研究の特色として、第 1 章で示した、MΦに対する新たな解析方法を考案した点がある。*L. major* を赤色蛍光色素 PKH26 を用いて染色をすることで、従来法では目視することができなかった MΦへの原虫の総侵入量（細胞内生残原虫および、侵入後に貪食殺傷された原虫）を知ることができるようになった。GFP を導入した *L. major* も作出されており、蛍光検出による高感度の抗原虫薬スクリーニング等に応用されているが、本研究においては MΦへの侵入後に酸化ストレスを受けることによって GFP 蛍光が消失するため、‘侵入後に貪食殺傷された原虫の痕跡’を追うことが困難であった。しかしながら、PKH26 染色 *L. major* を用いることでその難点を克服することができた。また、蛍光観察による原虫の侵入率と、ギムザ染色後の明視野観察による原虫の生残率の 2 つの指標を、同一の細胞を用いて測定できる点も大きな利点である。

ところで、本研究においては PKH26 染色 *L. major* を *in vitro* 感染実験に用いたが、*in vivo* 感染実験においても使用できることが当研究室での検討によって確認されており、*L. major* が貪食細胞に感染し感染部位からリンパ節へ流入する様子等が観察されている。生きている原虫と殺傷された原虫、両方を目視することができる利点を用いることで、*in vivo* における原虫動態の更なる解析を行うことができるようになったと考えられる。これらのことから、PKH26 染

色原虫を用いた検討は、*in vitro*、*in vivo* どちらに対しても様々に応用をすることができる検討方法であると言える。

第 2 章では、IFN- γ / IL-12 前処置によって M Φ 細胞内 ROS の産生増強が起こることを推察し、ROS 産生量や ROS 産生に関与するタンパクに注目した検討を行った。その結果、M Φ への IFN- γ / IL-12 前処置は *L. major* 感染後の ROS 産生増強を促すことが示され、細胞内原虫殺傷へ寄与している可能性が強く示唆された。

第 3 章において、IFN- γ / IL-12 前処置がヒト由来細胞株 U-937 においても細胞内原虫感染率低下へ寄与することが分かった。また、IFN- γ / IL-12 への反応性の低いマウス脾臓 M Φ に対しては、TLR4 を介した Th1 活性を起こす LPS もしくは IP-PA1 を用いた際に、マウス脾臓 M Φ が M Φ 細胞内原虫生残率低下を示すことが分かった。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る。このことから、IFN- γ / IL-12 以外の ROS 産生増強の補完をする物質として TLR リガンドの有効性が示唆された。

現在までに、*in vivo* におけるサイトカインを用いた治療や予防の研究はマウスリーシュマニア症モデルを用いて行われている (表 1)。例えば IL-12 をアジ

ユバントとして使用し、治療薬のペントスタムやアンホテリシン B または原虫由来の SLA を用いて感染前や感染後に投与し、病変部の原虫減少効果や病変の退縮効果、または血中の IFN- γ 濃度などを検討している。共投与群は病変部における原虫殺傷率が高く、主に iNOS の誘導による原虫殺傷の効果が得られている。しかしながら IL-12 単独投与群は、殺傷効果が低い結果となっている。これら研究からは、体内において効率的に Th1 型免疫を誘導すること、IFN- γ 産生を誘導することが病変の退縮、病変部の原虫量減少へ繋がることが示唆されている。このことから、病変部における IL-12 と IFN- γ の存在が、原虫感染前および原虫感染後で重要となることが分かる。

本研究において得られた、IFN- γ / IL-12 前処置による ROS 産生誘導による殺原虫効果を、ヒトの治療へ応用する方法として考えられるのは、病変部を標的とした直接投与である。全身投与や筋肉注射などでは IFN- γ / IL-12 の濃度が希釈され、病変部における効力が弱まると推測されるためである。また他の方法としては、病変部にワクチンを接種し、IFN- γ / IL-12 産生を誘導させる方法、もしくは TLR リガンドを接種することで ROS 産生誘導する方法などが挙げられる。ROS 産生を誘導することができれば、NO に加えて相乗的に原虫殺傷を行うことができ、治療効果としての期待も高くなると考えられる。ヒト細胞株を用いた検討結果から、ヒトにおいても効果を得られることが示されたことか

ら、組織による反応性の違いなどに関する更なる解析を行われることで、ヒトに対する治療法へと応用することが期待できる。

以上から、本研究は、**ROS** という本来貪食細胞が持つ殺傷因子をより効果に誘導し増強することで、リーシュマニア感染制御を行うことができることを示し、現在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。

サイトカイン	薬剤・ 抗原など	投与時期	病変部の 原虫殺傷率	文献
IL-12	ペントスタム	感染後	約 50-80%	[44]
IL-12	アンホテリシン B	感染後	約 80%	[45]
IL-12	—	感染後	約 30%	[45]
IL-12	SLA	感染前	約 60%	[46]
IL-12	—	感染前	約 10%	[46]
IFN- γ				

表1 マウスリーシュマニア症モデルを用いた、
サイトカインの *in vivo* 治療・予防への応用例

謝辞

終始きめ細やかな指導を行ってくださった松本安喜准教授に、心から深く御礼申し上げます。

また、多くの貴重なご意見、ご助言を賜った

松本芳嗣教授、杉浦勝明教授、後藤康之准教授、辻尚利教授に厚く御礼申し上げます。

そして、国際動物資源科学研究室の皆さまには多くの面で支えていただきました。感謝しております。

最後に、生活面・精神面・金銭面において何よりも大きな支えとなってくれた家族に心から感謝致します。

参考文献

1. Neuber H. 2008. Leishmaniasis. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 9, 754-765.
2. Liese J, Schleicher U, Bodgan C. 2008. The innate immune response against *Leishmania* parasites. Immunobiology. 213, 377-387.
3. Wasan KM, Wasan EK, Gershkovich P, Zhu X, Tidwell RR, Werbovetz KA, Clement JG, Thornton SJ. 2009. Highly effective oral amphotericin B formulation against murine visceral leishmaniasis. J. Infect. Dis. 3, 357-360.
4. Consigli J, Daniello C, Gallerano V, Papa M, Guidi A. 2006. Cutaneous leishmaniasis: successful treatment with itraconazole. Int. J. Dermatol. 45, 46-49.
5. Choi CM, Lerner EA. 2002. Leishmaniasis: recognition and management with a focus on the immunocompromised patient. Am. J. Clin. Dermatol. 3, 91-105.

6. Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC. 2008. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. *Parasitol. Res.* 103, 1-10.

7. Kushawaha PK, Gupta R, Sundar S, Sahasrabuddhe AA, Dube A. 2011. Elongation Factor-2, a Th1 Stimulatory Protein of *Leishmania donovani*, Generates Strong IFN- γ and IL-12 Response in Cured *Leishmania*-Infected Patients/Hamsters and Protects Hamsters against *Leishmania* challenge. *J. Immunol.* 187, 6417-6427.

8. Sakai S, Takashima Y, Matsumoto Y, Reed SG, Hayashi Y, Matsumoto Y. 2010. Intranasal immunization with Leish-111f induces IFN-gamma production and protects mice from *Leishmania major* infection. *Vaccine.* 28, 2207-2213.

9. Rogers KA, DeKrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol.*

Lett. 209, 1-7.

10. Ben-Othman R, Guizani-Tabbane L, Dellagi K. 2008. *Leishmania* initially activates but subsequently down-regulates intracellular mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B signaling in macrophages. *Mol. Immunol.* 45, 3222-3229.

11. Seder RA, Gazzinelli A, Sher A, Paul WE. 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10188–10192.

12. Sadick MD, Heinzl FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, Locksle RM. 1990. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J. Exp. Med.* 171, 115-127.

13. Stenger S, Thüring H, Rölinghoff M, Bogdan C. 1994. Tissue expression

of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. J. Exp. Med. 180, 783-793.

14. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB Jr, Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy intercellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. J. Immunol. 144, 278-283.

15. Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA. 1990. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . J. Immunol. 145, 4290-4297.

16. Ota H, Takashima Y, Matsumoto Y, Hayashi Y, Matsumoto Y. 2008. Pretreatment of macrophages with the combination of IFN- γ and IL-12 induces resistance to *Leishmania major* at the early phase of infection. J. Vet. Med. Sci. 6, 589-593.

17. Mukbel RM, Patten Jr, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE. 2007.

Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 669–675.

18. Albertine KH, Gee MH. 1996. In vivo labeling of neutrophils using a fluorescent cell linker. *J. Leukoc. Biol.* 59, 631-638.

19. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131-138.

20. Schirmer RH, Schollhammer T, Eisenbrand G, Krauth-siegel RL. 1987. Oxidative stress as a defense mechanism against parasitic infections. *Free Rad. Res. Comms.* 3, 3-12.

21. Depke M, Breitbach K, Dangc KH, Brinkmann, Salazar MG, Dhoplec VM, Bast A, Steil L, Schmidta F, Steinmetzb I, Völker U. 2014. Bone marrow-derived macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice fundamentally differ in their respiratory chain complex proteins, lysosomal

enzymes and components of antioxidant stress systems. *J. Proteomics*. 103, 72-86.

22. Passwell JH, Shor R, Gazit E, Shoham J. 1986. The effects of concanavalin A-induced lymphokines from the T-lymphocyte subpopulations on human monocyte leishmanicidal capacity and H₂O₂ production. *Immunology*. 59, 245-250.

23. Ding A, Hwang S, Schwab R. 1994. Effect of aging on murine macrophages. Diminished response to IFN-gamma for enhanced oxidative metabolism. *J. Immunol*. 153, 2146-2152.

24. Murray HW. 1981. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *J. Exp. Med.* May 153, 1302-1315.

25. Bae YS, Lee JH, Choi SH, Kim S, Almazan F, Witztum JL, Miller YI. 2009. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4 and spleen

tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *B. Circ. Res.* 104, 210-218.

26. Devaraj S, Jialal I. 1998. The effects of alpha-tocopherol on critical cells in atherogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.* 9, 11–15.

27. Egger T, Hammer A, Wintersperger A, Goti D, Malle E, Sattler W. 2001. Modulation of microglial superoxide production by α -tocopherol in vitro: attenuation of p67^{phox} translocation by a protein phosphatase-dependent pathway. *J. Neurochem.* 79, 1169-1182.

28. Cachia O, Benna JE, Pedruzzi E, Descomps B, Gougerot-Pocidallo MA, Leger CL. 1998. α -tocopherol inhibits the respiratory burst in monocytes. Attenuation of p47^{phox} membrane translocation and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 273, 32801–32805.

29. Scott P. 1993. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science.* 260, 496-497.

30. Marzio PD, Puddu P, Conti L, Belardelli F, Gessani S. 1994. Interferon- γ upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 179, 1731-1736.

31. Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. 1998. Murine macrophages secrete interferon γ upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 187, 2103–2108.

32. Passwell JH, Shor R, Shoham J. 1986. The enhancing effect of interferon- β and γ on the killing of *Leishmania tropica major* in human mononuclear phagocytes in vitro. *J. Immunol.* 136, 3062-3066.

33. Liew FY, Wei XQ, Proudfoot L. 1997. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 352, 1311-1351.

34. Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. 2002. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 187-248.
35. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274, 10689-10692.
36. Tahan F, Jazrawi E, Moodley T, Rovati GE, Adcock IM. 2008. Montelukast inhibits tumour necrosis factor- α -mediated interleukin-8 expression through inhibition of nuclear factor- κ B p65-associated histone acetyltransferase activity. *Clin. Exp. Allergy.* 38, 805-811.
37. Gebre-Hiwot A, Tadesse G, Croft SL, Frommel D. 1992. An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Trop.* 51, 237-245.
38. Nakata K, Inagawa H, Soma G. 2011. Lipopolysaccharide IP-PA1 from

Pantoea agglomerans prevents suppression of macrophage function in stress-induced diseases. *Anticancer Res.* 31, 2437-2440.

39. Bhardwaj N, Lucia ER, William PL, Abhay RS. 2005. *Leishmania* inhibites STAT1-mediated IFN- γ signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1 β by *Leishmania mexicana*. *Int. J. Parasitol.* 35, 75-82.

40. Moreira W, Leblanc E, Ouellette M. 2009. The role of reduced pterins in resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates in the protozoan parasite *Leishmania*. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 367-375.

41. Ferreira AS, de Souza MA, Barbosa NR, da Silva SS. 2008. *Leishmania amazonensis*: Xylitol as inhibitor of macrophage infection and stimulator of macrophage nitric oxide production. *Exp. Parasitol.* 119, 74-79.

42. Bowie A, O'Neill LA. 2000. The interleukin-1 receptor/ Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and

microbial product. *J. Leukoc. Biol.* 67,508-514.

43. Sparwasser T, Vabulas RM, Villmow B, Lipford GB, Wagner H. 2000. Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur. J. Immunol.* 30, 3591–3597.

44. Nabors GS, Afonso LCC, Farrell JP, Scott P. 1995. Switch from a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 3142-3146.

45. Murray HW, Brooks EB, DeVecchio JL, Heinzl FP. 2003. Immunoenhancement combined with amphotericin B as treatment for experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2513-2517.

46. Afonso LCC, Scharon TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P.

1994. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*. 263, 235-237.