

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成13年度博士課程 進学

氏名 後藤 康之

指導教官 松本 芳嗣

論文題目 Studies on innate immunity in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis

(和訳 皮膚型リーシュマニア症の病態形成における自然免疫に関する研究)

リーシュマニア症はリーシュマニア原虫の感染によって引き起こされる人獣共通感染症である。本症は、その病態から皮膚型、皮膚粘膜型、内臓型リーシュマニア症の大きく3つに分類される。リーシュマニア症の患者は全世界で1, 200万人にも上るといわれており、早急なコントロールが必要とされる感染症の一つである。一般に宿主免疫は T 細胞非依存的な自然免疫と T 細胞依存的な獲得免疫の大きく二つに分けられる。リーシュマニア症における生態防御や病態形成には細胞性免疫と液性免疫のバランスが重要な役割を担っており、これらの免疫を制御すると考えられる胸腺内発育依存的な T 細胞を中心とした獲得免疫がリーシュマニア症における生態防御や病態形成に重要であると考えられている。それに対して、近年好中球、マクロファージ、NK 細胞を中心とした自然免疫が注目されつつあり、生態防御における自然免疫の役割について明らかになりつつあるが、病態形成における自然免疫の関わりについてはあまり研究がなされていない。そこで本研究では、皮膚型リーシュマニア症の病態形成における T 細胞非依存的な自然免疫の関与を明らかにすることを目的として、まず機能的な T および B 細胞を欠損しているマウスとして知られている recombination activating gene 2 遺伝子欠損マウス (RAG-2^{-/-}マウス) を用いて、皮膚病変の形成における T および B 細胞非依存的な宿主免疫反応の関与について検討した。また、好中球やマクロ

ファージに対する遊走蛋白であり、炎症性マクロファージのマーカーとして有用性が知られている migration inhibitory factor-related protein (MRP) 8 および MRP14 に注目して、皮膚型リーシュマニア症の病変部に集簇したマクロファージによる MRP8、14の発現について検討した。さらに、これら宿主の蛋白と原虫との直接的な関与について明らかにするために、原虫への MRP の接着について検討を行った。

第一章では、皮膚型リーシュマニア症の病態形成に関わる自然免疫の重要性について病理組織学的に明らかにするため、機能的な T および B 細胞を欠損している RAG-2^{-/-}マウスに原虫を感染させ解析を行った。まず、皮膚型リーシュマニア症を引き起こす *Leishmania major* の培養プロモステイゴート 1×10^7 細胞を、BALB/c および RAG-2^{-/-}マウスの尾根部に皮内接種した。*Leishmania major*は両マウスに対して感染性を示し、接種1週目にはすでに皮膚に腫隆の形成が観察され、その病変は時間経過とともに増大した。皮膚病変部の長径を接種後毎週測定したところ、両マウスとも同様の病変拡大が確認された(接種4週目: BALB/c 7.2 mm, RAG-2^{-/-} 8.0 mm)。接種4週目における感染皮膚組織切片の HE 染色標本観察の結果、BALB/c および RAG-2^{-/-}マウスにみられた皮膚病変部において好中球および単核細胞の集簇が観察され、特に単核細胞の集簇が顕著に観察された。これらの単核細胞のほとんどは形態学的にマクロファージであると考えられた。抗 CD3 ϵ 抗体を用いた免疫組織化学の結果、BALB/c マウスの皮膚病変部に陽性細胞が観察されたもののその割合は低く、RAG-2^{-/-}マウスでは陽性細胞は観察されなかった。以上の結果から、皮膚型リーシュマニア症における皮膚病変形成には感染部位におけるマクロファージの集簇が関与しており、それらの集簇は T および B 細胞非依存的であることが示唆された。さらに、非感染マウスの皮膚に見られる血管のうち、血管内に単球や好中球が観察された血管は0%であったのに対して、感染マウス病変部の皮膚に見られる血管では単球で20%、好中球で18%の血管にそれらの細胞が観察された。皮膚病変部形成におけるマクロファージ集簇の要因の一つとして血管からの単球の遊走が関与していると考えられることから、これらの病態に T および B 細胞非依存的なマクロファージ遊走蛋白が役割を担っていると推察された。

第二章では、第一章で皮膚型リーシュマニア症の病態形成に T および B 細胞非依存的なマクロファージの集簇が関与していることが示唆されたことから、これらマクロファージの性状についてマク

ロファージマーカー分子の発現を指標として常在性マクロファージと比較検討することを目的とした。MRP8 および MRP14 はマクロファージや好中球の産生する蛋白であり、近年炎症反応部位に見られるマクロファージのマーカーとしてその有用性が知られている。そこで、本章では *L. major* 原虫感染4週目マウスを用いて、病変部に集簇したマクロファージにおけるMRP8 およびMRP14 の発現について検討した。ウエスタンブロッティングにより皮膚病変部におけるMRP の発現を検討したところ、非感染マウス皮膚と比較して BALB/c および RAG-2^{-/-}マウスの両種の病変部には MRP8 および MRP14 が高く発現していることが確認された。*L. major*原虫感染4週目 BALB/c マウスの皮膚には中心に潰瘍を伴う腫隆が観察されたが、リーシュマニア原虫は潰瘍隣接部に特に多く観察された。単核細胞は潰瘍隣接部からその周辺部にかけて広く観察されたが、これらの部位には MRP8 および MRP14 陽性細胞が多く観察され、特に周辺部の細胞においては約50%が MRP 陽性細胞であった。他のマクロファージのマーカーである F4/80 に対する抗体を用いた免疫組織化学的解析の結果、脾臓の常在性マクロファージの多くが F4/80 陽性、MRP8 陰性、MRP14 陰性であるのに対して、病変部に見られる単核細胞の多くが F4/80 陰性、MRP8 陽性、MRP14 陽性であった。これらの結果から、皮膚型リーシュマニア症の皮膚病変部に集簇したマクロファージは、マクロファージの中でも常在性のマクロファージとは異なり MRP を産生する細胞群であることが明らかになった。MRP8 および MRP14 はマクロファージや好中球に対する遊走蛋白であることから、病変部において MRP8 および MRP14 が T および B 細胞非依存的なマクロファージの集簇に関与している可能性が考えられた。

近年、炎症性疾患における細胞外 MRP について注目が集まっている。第三章では、第二章よりリーシュマニア原虫感染組織に MRP が存在することが明らかになったことから、MRP と原虫との直接的な関与について明らかにするために、免疫組織化学およびウエスタンブロッティングにより、リーシュマニア原虫感染皮膚病変部における原虫に対する MRP8 および MRP14 の接着について解析を行った。抗 MRP8 抗体および抗 MRP14 抗体を用いた免疫組織化学の結果、*L. major* 原虫感染4週目マウス皮膚病変部、特に潰瘍隣接部に宿主細胞と比べてサイズの小さい(長径:約 4 μm) MRP8 陽性細胞および MRP14 陽性細胞が多数観察された。これらの細胞は抗リーシュマニア抗体を用いた免疫組織化学標本観察時に見られる陽性細胞と形態的に類似しており、これらの MRP 陽性細胞はアマスティゴートであると示唆された。病変部から精製したアマスティゴートを抗原とし

たウエスタンブロットリングの結果、アマスティゴート抗原として調整した試料中に MRP8 および MRP14 が存在することが確認された。以上のことから *in vivo* において MRP8 および MRP14 がアマスティゴートに接着していることが明らかになった。培養プロマスティゴートおよび *in vitro* で培養したアマスティゴートに対する MRP14 の接着能を検討したところ、MRP14 は Zn^{2+} 存在下で両発育ステージの原虫に接着することが明らかになり、両発育ステージで共通の分子が MRP の接着に機能していると考えられた。病変部においてマクロファージ遊走蛋白である MRP がリーシュマニア原虫に接着していることから、原虫感染部位への T および B 細胞非依存的なマクロファージの集簇に MRP が関与していると考えられる。

本研究により、①皮膚型リーシュマニア症の病態形成にマクロファージの集簇が関与しており、これらの集簇は T および B 細胞非依存的であること、②病変部に集簇したマクロファージは常在性のマクロファージとは異なり MRP8、14 を産生する細胞群であること、③感染部位において原虫に対して MRP8、14 が接着しており、接着に関与する原虫の分子は両発育期で共通の分子であることが明らかになった。以上のことより、これら病変部に見られるマクロファージは常在性のマクロファージとは異なり、あらかじめ遊走蛋白を発現させておくことで、原虫の貪食といった刺激により速やかに遊走蛋白を分泌することができ、感染部位に新たなマクロファージを呼び寄せるという役割を持った、炎症反応専門の細胞群ではないかと考えられた。これらのことより、皮膚型リーシュマニア症の病態形成にマクロファージ遊走蛋白を介した T および B 細胞非依存的な免疫、すなわち自然免疫が病態形成に寄与していると考えられた。本研究により感染のきわめて初期に限らず、感染4週目以降といった一般的に獲得免疫が重要だとされている時期においても病態形成に自然免疫が関与していると示唆された。すなわち皮膚型リーシュマニア症の病態形成においては獲得免疫のみならず自然免疫応答が大変重要な役割を担っていると考えられ、このように本研究によって得られた新たな知見は遊走蛋白の阻害といった自然免疫応答の修飾による新たな治療法の開発につながると考えられる。