

論文内容の要旨

獣医学専攻

平成 19 年度 博士課程進学

氏名 坂井 祐介

指導教員名 中山 裕之

論文題目

Investigation for regression factors in trehalose 6, 6'-dimycolate(TDM)-induced granulomatous lesions.

(トレハロースジミコレート(TDM)誘発性肉芽腫病変の退縮因子の検索)

マクロファージの結節性集簇病変である肉芽腫は結核の特徴的病変である。同病変は菌体を隔離することで病変を限局化するという意義がある一方で、マクロファージ内の菌体に抗生物質や免疫機構による攻撃が届きにくく菌体の長期的な生存に貢献するという側面も指摘されている。本研究ではこのような肉芽腫病変の免疫学的性状・病理学的性状を明らかにし、その中から肉芽腫の退縮に関与する因子を検索することを目的とした。本県球では肉芽腫病変を惹起するためにトレハロースジミコレート (TDM) を使用した。TDM は結核菌の細胞壁に最も多く含まれるトレハロースとミコール酸から成る *Mycobacterium* 属菌に特有の糖脂質であり、実験動物に投与すると単独で肉芽腫病変を誘発するため、肉芽腫病変の研究に広く使用されている。また、TDM はマクロファージの食作用を阻害する機

能により菌体の食細胞内寄生能に貢献していることも知られている。生体内で果たすこれらの役割から、TDM は結核菌の主要な病原因子であると考えられている。一方で、TDM は結核菌自体とは異なり生体内で増殖しないため、TDM 誘発性肉芽腫モデルで病変の形成から退縮までの過程を比較的速やかに観察することが可能である。

本研究では、まず第一章で、TDM を 7 週齢の雌の BALB/c マウスに腹腔内投与して肉芽腫病変を惹起し、投与後 0, 3, 7, 14, 21 日に解剖・採材を行った。病変は TDM 投与後 7 日まで拡大し、以降縮小した。肉芽腫病巣を構成する炎症細胞は、投与後 3 日では少数の顆粒球 (polymorphonuclear cells ; PMN) とマクロファージで、投与後 7 日では PMN が増加し、線維増生が加わった。投与後 14 日ではリンパ球が増加し、PMN や線維芽細胞の比率は低下し、投与後 21 日では PMN はほとんど消失し、リンパ球とマクロファージのみからなる病変が主体であった。免疫染色によりリンパ球のサブセットを解析した結果、IgG 陽性の形質細胞はほとんど存在せず、CD3 陽性の T 細胞が主体であった。この内、Granzyme B 陽性の細胞傷害性 T 細胞はほとんど存在しなかったことから、リンパ球のほとんどはヘルパー T 細胞であると考えられた。

アポトーシスが病変の縮小に寄与している可能性があると考えたため、TUNEL 染色を行ったところ、TUNEL 陽性細胞率は投与後 14 日にピークを示した。この時期は病変縮小の時期と一致することからアポトーシスは病変縮小の 1 因子であると考えられた。

投与後の炎症性・炎症抑制性サイトカインの発現を Real-time PCR により解析した。炎症性サイトカインを調べたところ、TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 は投与後 7 日をピークとする発現動態を示し、病変の大きさを反映していた。IL-4 の発現はいずれのタイムポイントでも抑制されており、IFN-gamma の発現は常に高値を示していた。IL-4 は Th2 サイトカインであり、IL-6, IFN-gamma は Th1 サイトカインであることから、TDM 誘発性肉芽腫応答は Th1 が優位であることが確認された。一方、炎症抑制性サイトカインである IL-10, IL-27 は病変の経過とは無関係に常に低値を維持していた。このことから、肉芽腫病変の退縮には炎症性サイトカインの発現抑制が重要であると考えられた。炎症抑制性サイトカイン

ンの1つである TGF-beta は炎症性サイトカインと同様投与後 7 日をピークとする推移を示したが投与後 14 日にも高い発現量を維持していた。TGF-beta は炎症抑制の他、線維増生などにも関与しており、炎症性サイトカインと共に病変退縮に関与している可能性が示唆された。

次いで各種ケモカインの発現について Real-time PCR 法による解析を行った。病巣構成細胞の変化と対応するように投与後 3, 7 日後では顆粒球誘引ケモカインである RANTES, MIP-1alpha, MIP1-beta の発現が顕著で、それ以降ではリンパ球誘引ケモカインである IP-10, MCP-1 の発現が顕著であるという結果が得られた。上述した TGF-beta はリンパ球誘引ケモカインの分泌を促進し、顆粒球誘引ケモカインの分泌を抑制する機能および線維増生を促進する機能も有することから、投与後 7~14 日に生じたケモカインプロファイルの変化や投与後 7 日に顕著であった線維芽細胞の増殖にも TGF-beta が関与した可能性がある。

なぜ上述のような炎症性サイトカインの発現抑制が生じるのかを調べるために、炎症性サイトカインの細胞内シグナル伝達を抑制する因子である SOCS family, A20, ABIN family について Real-time PCR 法により発現の解析を行った。この結果、SOCS-3, A20, ABIN-3 の発現が投与後 7~14 日にかけて顕著に上昇しており、この発現上昇が炎症性サイトカインの発現抑制に関与しているのではないかと考えられた。他の SOCS family および ABIN-2 は全て発現が抑制されていた。ABIN-1 については発現の上昇が見られたものの上昇率が低く、あまり重要ではないと考えられた。

A20 と ABIN-3 は複合体を形成し、炎症細胞の活性化に深く関与する NF-kappa B 経路の活性化を抑制することが知られていることから、ABIN-3 の病巣における役割や相互作用の相手を探索することは重要であると考え、第二章では、A20 と ABIN-3 について Western blot 法による発現解析、リン酸化抗体を用いた NF-kappa B の活性化状態の検索、および共免疫沈降法による ABIN-3 が相互作用する相手因子の探索を行った。リン酸化 NF-kappa B 陽性細胞率、リン酸化 IKK alpha / beta 陽性細胞率、Western blot で測定されたリン酸

化 NF-kappa B のタンパク量は、投与後 7 日まで増加し、以降減少した。この活性型の増加は病変の大きさと相関しており、NF-kappa B 経路が病変の拡大に関与していることが示唆された。また、NF-kappa B は代表的なアポトーシス抑制因子であることから病変の縮小を阻害しているとも考えられた。

A20, ABIN-3 について Western blot 法によるタンパクレベルでの発現量変動の解析を行ったところ、より緩やかではあるものの mRNA と同様の動態を示した。さらに、抗 ABIN-3 抗体を用いた共免疫沈降法により ABIN-3 の相互作用相手を探索したところ A20 が検出された。すなわち、TDM 誘発性肉芽腫モデルにおいても A20 と ABIN-3 は複合体を形成していることが確認された。これに対し、NF-kappa B 経路のタンパクであり ABIN-3 類似タンパクである ABIN-1 と相互作用することが知られている RIP, IKK-gamma は検出されなかった。また、これらと同様に NF-kappa B 経路の 1 つである TAK-1 が検出されたことから、ABIN-3 と TAK-1 の相互作用が示唆された。A20 は標的タンパクのユビキチン化状態を変化させる酵素で、多くの場合標的タンパクはユビキチン化され、プロテアソームでの分解が促進される。ABIN-1,-2 は標的タンパクを A20 と接続する役割を果たしている。したがって、ABIN-3 は TAK-1 と A20 の架け橋としての役割を果たしており、その結果 TAK-1 は分解され NF-kappa B の活性化が抑制されると考えられた。

以上、本研究の成果により、TDM 誘発性肉芽腫病変の拡大および維持には TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 などの炎症性サイトカインや、これらの因子を介した NF-kappa B 経路の活性化が関与していることが推測された。また、病変の退縮には TGF-beta の発現上昇、SOCS-3 によるサイトカインシグナル伝達の抑制および A20, ABIN-3 による TAK-1 の抑制を介した NF-kappa B 経路の抑制が関与すると示唆された。本研究で初めて明らかになった TDM 誘発性肉芽腫病変の消長に関する各種因子の動態は結核病変の制御に有用な知見を供するものと考えられた。