

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

さかい ゆうすけ

申請者氏名 坂井 祐介

肉芽腫は結核の特徴的病変である。本研究ではこの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ている。肉芽腫病変を惹起するために *Mycobacterium* 属菌の細胞壁に特有の糖脂質であるトレハロースジミコレート (TDM) を使用した。

第一章では、TDM を 7 週齢の雌 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, 7 日では顆粒球 (polymorphonuclear cells ; PMN) とマクロファージを主体とし、投与後 14, 21 日ではリンパ球とマクロファージを主体としていた。免疫染色の結果、リンパ球は T 細胞がほとんどで、形質細胞や細胞傷害性 T 細胞はほとんど存在しなかった。

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。

各種サイトカイン及びケモカインの発現を Real-time PCR により解析した。炎症性サイトカインでは、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た。IL-4 の発現は常に低値で、IFN-gamma の発現は常に高値を示していた。これらの結果から、TDM 誘発性肉芽腫では 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 は比較的低値であった。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の 1 つである TGF-beta は 3 日後から 21 日後まで高い発現量を維持していた。よって、TGF-beta も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。ケモカインでは病巣構成細胞の変化と対応して、投与後 3, 7 日後では顆粒球誘引性の RANTES, MIP-1alpha, MIP1-beta の発現が、それ以降ではリンパ球誘引性の IP-10, MCP-1 の発現が高かった。上述の 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 の発現が顕著に上昇しており、炎症性サイトカインの発現抑制への関与が示唆された。A20, ABIN-3 では Western blot 法をでも、mRNA と同様の動態を示した。

第二章では、A20 と ABIN-3 について更なる検索を進めた。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。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。

さらに、抗 ABIN-3 抗体を用いた免疫沈降を行い、次いで免疫沈降産物を用いてウェスタンブロット法を行った結果、A20, TAK-1 が検出された。これに対し、RIP, IKK-gamma は検出されなかった。これらの結果から、A20 と ABIN-3 の複合体形成、ABIN-3 と TAK-1 の相互作用が示唆された。ABIN-3 は TAK-1 を A20 と接続する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。

以上の結果から、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。

本研究の成果は肉芽腫、さらには結核病変の形成および退縮機構の分子病理学的理解に大いに寄与すると思われた。よって審査委員一同は申請者が博士（獣医学）の学位を授与するに値すると認めた。