

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 石井 健一

本論文では、昆虫であるカイコをモデル生物として、サイトカインを中心とした新しい自然免疫機構の解析がなされている。また、これより派生したテーマとして、宿主免疫を抑制する日和見感染菌、あるいは免疫を過剰亢進させる炎症起因菌のそれぞれにおける病原性発現機構についての研究成果が記されている。

まず、カイコにおける昆虫サイトカイン paralytic peptide (PP)を介する新規免疫経路の発見を機軸として、自然免疫応答に関する研究成果が第1章及び第2章に記載されている。このうち第1章では、カイコの免疫組織において昆虫サイトカイン PPにより発現が変動する遺伝子群についての網羅的解析が行われている。その結果、PPは複数の免疫関連遺伝子（脂肪体における抗菌ペプチド遺伝子、及び血球細胞における食食関連遺伝子）の発現を誘導することが明らかとなった。またPPは、細菌との直接的な結合によるオプソニン化を介さずに、カイコの血球細胞による細菌の食食反応を促進させた。さらに、PPはカイコの脂肪体において、ストレスシグナル経路の一つである p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)を活性化することが判明した。これらのPP依存的な免疫関連遺伝子の発現誘導並びにカイコ個体の細菌感染抵抗性の上昇は、p38 MAPK阻害剤により抑制されたことから、上記のPP依存的な自然免疫応答の活性化にp38 MAPK経路が寄与する可能性が示唆されている。

第2章では、PPにより誘導される遺伝子のうち、一酸化窒素合成酵素(nitric oxide synthase; NOS)に着目し、昆虫サイトカインの働きにおける一酸化窒素の寄与について検討されている。活性型PPを血液内注射したカイコにおいて、血液中での一酸化窒素濃度、並びに脂肪体及び腸管におけるNOSの発現誘導がみられた。また、カイコをNOS阻害剤により処理することにより、PP依存的な免疫関連遺伝子の発現誘導、p38 MAPKの活性化、並びにカイコ個体の細菌感染抵抗性の上昇が抑制された。これらの結果から、第1章で解析されたPP活性化反応の下流で引き起こされる自然免疫応答において、NOSの働きが重要となることが示唆された。

次に第3章では、PPを中心とする宿主免疫応答を抑制する病原体としてセラチア菌 *Serratia marcescens* に注目し、その病原性発現機構が解析されている。このうち第1節では、セラチア菌がカイコ血球細胞（哺乳動物のマクロファージ等に相当する免疫細胞）に対して細胞死を誘導することが示されている。この血球細胞の細胞死誘導に必要なセラチア菌の遺伝子を、トランスポゾン挿入変異株のスクリーニングにより探索した結果、未知遺伝子を含む複数の病原性遺伝子が同定された。そのうち、LPSのO抗原合成に必要な *wecA* 遺伝子、並びに鞭毛合成に寄与する *flhD* 及び *fliR* 遺伝子について、セラチア菌の遺伝子破壊株を作出したところ、それらのカイコ血球細胞並びに個体に対する殺傷活性が著しく低下することが判明した。上記遺伝子破壊株では、マウス腹腔内マクロファージに対する殺傷能も低下していたことから、これらの遺伝子群がセラチア菌の哺乳動物に対する病原性発現においても寄与すると考えられる。

第3章の第2節では、セラチア菌が（細胞死誘導とは異なる機構により）カイコ血球細胞の接着性を低下

させ、細胞性免疫を抑制することが示唆された。セラチア菌の培養上清から、カイコ血中での血球細胞数を増加させる活性を指標に精製したところ、Serralysin metalloprotease が同定された。また、Serralysin 遺伝子を破壊したセラチア菌変異株では、カイコ個体殺傷能が低下していたことから、本因子がセラチア菌の病原性発現に寄与することが示唆された。このように、宿主生物の血球細胞の接着性を低下させ、細胞性免疫を抑制する細菌の病原性因子の報告例は無く、本研究が初めてである。

最後に、第4章では、免疫機構の「負」の側面である過剰免疫疾患に焦点が当てられ、「血液内への病原体の侵入により免疫応答が過剰に活性化され個体が死に至る」という過剰免疫疾患モデルが、カイコを用いて無脊椎動物で初めて構築されている。ヒトの口腔内に炎症を引き起こす歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* をカイコに感染させた場合、他の病原性細菌では見られない現象 (*in vitro* で増殖抑制効果のある抗生物質によりカイコの感染死が治療されない等) が観察された。歯周病菌によるカイコの殺傷が、細胞壁構成成分の一つであるペプチドグリカンの分解酵素により処理することにより抑制されたことから、上記の反応にペプチドグリカンが寄与することが示唆された。一方、この歯周病菌によるカイコの殺傷が、免疫系を抑制する薬剤(メラニン化反応阻害剤及びセリンプロテアーゼ阻害剤)、ラジカル消去剤、及びカスパーゼ阻害剤の投与により遅延したことから、本病態における過剰免疫活性化の寄与が示唆された。さらに、歯周病菌のペプチドグリカンによる免疫過剰活性化は、カイコだけでなく、他の昆虫(鱗翅目昆虫、鞘翅目昆虫)及び哺乳動物細胞(マウス腹腔内マクロファージ)においても誘導された。これまで無脊椎動物において、宿主免疫の暴走により病態を呈する現象は捉えられておらず、本研究が初めての報告例である。さらに、ペプチドグリカンは歯周病菌の病原性因子としてこれまで注目されておらず、本研究によりその病態への寄与が初めて示唆された。

本論文では免疫系の正の働き(病原体の効率的な排除応答の活性化)と負の働き(過剰に活性化した場合の宿主自身に対する傷害)の両方について、カイコをモデル生物としてアプローチする独創的な創薬基盤研究が展開された。本研究は、自然免疫系の制御機構の理解、並びにヒトにおける感染症治療法の確立につながるものと考えられる。よって申請者は、博士(薬学)の学位を受けるに十分な資格を有すると判定した。