

論文の内容の要旨

論文題目：マウス病原性大腸菌 *Citrobacter rodentium* 感染
に対する Cas-L / NEDD9 の防御機構について

氏名：吉川 理子

Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L) は 1996 年に当研究室で発見され、クローニングされた β 1 インテグリンの下流にある足場タンパク質(スキヤフォールドタンパク質:scaffold protein) であり、Crk-associated substrate (Cas) ファミリーに属する。当研究室では Cas-L の生学的機能について解析を進めてきた。また、ヒトおよびマウス関節炎の重症度や非小細胞性肺癌患者の生命予後と Cas-L の発現が関連している可能性を報告し、Cas-L がそれらの疾患の治療標的分子、あるいはバイオマーカーと成りうることを示唆している。一方、Cas-L は主にリンパ球、好中球、及び上皮細胞での発現が報告されているが、Cas-L の発現が、生体内で感染症に対して如何に作用するかを報告した先行研究は存在せず、Cas-L 欠損時に感染に対して生じうる生体応答の変化を研究することは重要であると考えられる。

そこで本研究では、Cas-L 欠損マウスを用いてヒト病原性大腸菌のマウスモデルである *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) を Cas-L 欠損マウス (Cas-L homo) と野生型マウス (WT) に経口感染させ、比較検討を行なった。

まず、大腸、脾臓、肝臓の定着菌数 (CFU/g) について検討した。WT と Cas-L homo のいずれも大腸で 10^8 - 10^9 、脾臓で 10^4 - 10^5 、肝臓で 10^3 - 10^5 の菌の定着を認めたが、両マウス群で定着菌数に有意な差を認めなかった。また、WT と Cas-L homo のいずれのマウス群でも大腸以外に脾臓、肝臓に菌が播種・定着していたが、脾臓に比較して肝臓への菌の定着率が高い傾向が認められた (脾臓 ; WT : 12 例中 7 例 (58%)、Cas-L homo : 11 例中 4 例 (36%)、肝臓 ; WT : 12 例中 11 例 (92%)、Cas-L homo : 11 例中 10 例 (91%))

次に、感染前後の脾臓重量の変化をそれぞれのマウス群で比較したところ、WT では感染前と比べて感染後に脾臓重量/体重 (g) が有意に増加していたのに対し ($p = 0.013$)、Cas-L homo では感染前後で有意差を認めなかった ($p = 0.41$)。非感染群、感染群、のそれぞれで WT と Cas-L homo の脾臓重量に差があるかどうかを検討すると、非感染群での Cas-L homo の脾臓重量/体重 (g) は WT と比較して有意差は認められなかったが ($p = 0.28$)、感染群で比較すると Cas-L homo は WT よりも有意に小さかった ($p = 0.0000057$)。

血中サイトカイン測定では、Cas-L homo において WT と比較して IL-1 α 、IL-1 β 、TGF- β の血中濃度が有意に低下していた (それぞれ $p = 0.015$ 、 $p = 0.047$ 、 $p = 0.042$)。

病理組織学検査において、肉眼的所見で最も顕著な相違を認めたのは肝臓で、感染 7 日後に解剖しえた症例に関しては、WT では 26 例中 5 例 (19%)、Cas-L homo では 26 例中 0 例 (0%) で白色の壊死巣が観察された。この白色壊死巣は、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色の拡大像において、凝固・融解壊死した巨大な梗塞組織を中心として周囲を取り囲むように分葉型の多核白血球が集

簇している像を呈しており、WT : 52 例中 9 例 (17%)、Cas-L homo : 57 例中 3 例 (5.3%) と、WT と比較して Cas-L homo で有意に少ない傾向が認められた (X^2 検定、 $p = 0.045$)。また、組織壊死像は門脈周囲に形成されているものが目立ち、WT 4 例で門脈内フィブリン血栓を合併している所見を認めたが、Cas-L homo では確認できなかった ($p < 0.05$)。さらに、HE 染色と免疫染色において、大腸・脾臓・肝臓への菌の定着やこれらの臓器への炎症細胞浸潤は感染 7 日後には両マウス群で明らかな差を認めなかったが、感染 10 日後では Cas-L homo において、WT と比較して、菌の定着及び炎症細胞浸潤が遷延していた。

フローサイトメトリー解析では、骨髄および脾臓における WT と Cas-L homo の細胞分画に差があるかどうか、また感染によってそれらの差が変化するかどうか (特に好中球の動員に差があるかどうか) を見るために、FACS Aria[®]を用いてそれぞれの臓器の細胞分画の解析と比較を行った。はじめに、CD11b 陽性・CD11c 陰性の細胞集団のうち、Ly-6G 強度陽性・Ly-6C 陽性 (CD11b⁺ Ly-6G^{high} Ly-6C^{int}) の集団を好中球、Ly-6G 陰性・Ly-6C 強度陽性 (CD11b⁺ Ly-6G⁻ Ly-6C^{high}) の集団をマクロファージ、Ly-6G 陰性・Ly-6C 陰性 (CD11b⁺ Ly-6G⁻ Ly-6C⁻) の集団を好酸球として解析した。骨髄の非感染群は、好中球分画 : 4-14%、マクロファージ : 5% 未満、好酸球 : 1.5% 未満、といずれも WT と Cas-L homo で明らかな差を認めなかった。感染 7 日後は、WT も Cas-L homo も好中球およびマクロファージの割合が非感染群と比較して減少傾向を認め、感染 14 日後は WT および Cas-L homo の好中球・マクロファージの割合は非感染群と比較して増加を示し、特に WT においてその傾向は顕著であった。次に脾臓の非感染群は、好中球 : 0.5%

未満、マクロファージ：1%未満、好酸球：1%未満で WT と Cas-L homo で明らかな差を認めなかった。感染 7 日後に Cas-L homo の脾臓における好中球の割合の増加を認めた。感染 14 日後になると、Cas-L homo および WT の脾臓における好中球およびマクロファージの割合の増加を認めたが、特に Cas-L homo における増加が顕著であった。以上より、Cas-L homo の脾臓では WT と同等かそれ以上に *C. rodentium* 感染に対して好中球やマクロファージが動員されている事が示唆された。

Citrobacter killing assay では、Cas-L homo の好中球の殺菌能が WT に比較して低下していることが示唆された。

以上の結果から、Cas-L 欠損マウスでは、野生型マウスと比べて 1)肝細胞の凝固壊死を伴う巨大な膿瘍形成や門脈内フィブリン血栓の減少、2) 大腸・脾臓・肝臓の菌の定着や炎症細胞浸潤の遷延、3) IL-1 α 、IL-1 β 、TGF- β の血中濃度の低下、4) 好中球の殺菌機能の低下、が認められた。