

京都大学	博士（医学）	氏名	DAIM Sylvia
論文題目	<p>Expression of the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> PPE37 protein in <i>Mycobacterium smegmatis</i> induces low TNF-<math>\alpha</math> and IL-6 production in murine macrophages  (結核菌由来 PPE37 タンパク質の発現は、<i>Mycobacterium smegmatis</i> によるマクロファージからの TNF-<math>\alpha</math> および IL-6 産生誘導を抑制する)</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>結核の原因菌である結核菌(<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)が宿主に感染すると、感染宿主では防御免疫の主体となる強い細胞性免疫が発現する。しかし、結核菌は特異的防御免疫が誘導されても容易に体内から排除されず、感染を持続することができる。この事実は、菌が宿主の免疫防御機構を回避するための巧妙な手段を獲得していること示すものである。結核菌はマクロファージに貪食されても細胞内で生存・増殖できる。この細胞内寄生性機序は、結核菌が宿主感染防御に対する強い抵抗性を発揮するために重要であると考えられているが、その詳細については不明な点が多く残されている。一方、最近のDNAアレイを用いた遺伝子発現の網羅的な解析から、結核菌がマクロファージに感染した場合や、感染マウスの肺において結核菌タンパク質であるPPE37の発現が著明に上昇することが示されている。PPE37は、proline-proline-glutamic acid (PPE)ファミリーに属するタンパク質で、特に病原性の高い抗酸菌にその遺伝子が認められることから、菌の細胞内寄生性や病原性に関与することが考えられる。そこで本研究では、PPE37タンパク質がマクロファージ機能に及ぼす影響について解析を行った。結核菌由来<i>ppe37</i>遺伝子を発現ベクターに組み込み、<i>M. smegmatis</i> mc<sup>2</sup>155に導入してPPE37タンパク質を産生する<i>M. smegmatis</i>株(<i>Ms_ppe37</i>)を作製した。また、発現ベクターのみを<i>M. smegmatis</i> mc<sup>2</sup>155にトランスフェクトしたものをコントロール株(<i>Ms_vec</i>)として実験に用いた。PPE37の細胞内増殖への影響を調べるため、<i>Ms_ppe37</i>および<i>Ms_vec</i>を<i>in vitro</i>でマクロファージに感染させ、経時的に細胞内菌数を測定した。その結果、両菌株の細胞内菌数に違いは認められず、PPE37は菌の細胞内生存・増殖には影響しないことが示された。また、病原性の強い結核菌株は感染マクロファージのネクロシス誘導能が高いことが報告されている。そこで、<i>Ms_ppe37</i>と<i>Ms_vec</i>をマクロファージに感染させ、その後の細胞死の程度を培養上清中に遊離したlactate dehydrogenase (LDH)量を指標にして調べた。その結果、<i>Ms_ppe37</i>と<i>Ms_vec</i>感染の間に違いは認められず、PPE37は細胞死誘導には関与しないことが示された。一方、感染後の炎症性サイトカイン産生応答を解析したところ、<i>Ms_ppe37</i>感染で誘導されるTNF-<math>\alpha</math>とIL-6 mRNAの発現およびそれらサイトカインの産生レベルは、<i>Ms_vec</i>感染の場合に比較して明らかに低いことが示された。また、サイトカイン産生に関与する各種シグナル伝達分子の活性化レベルを測定したところ、<i>Ms_vec</i>感染に比較して<i>Ms_ppe37</i>感染の場合にはNF-<math>\kappa</math>Bや、ERKおよびp38 MAPキナーゼの活性化レベルが低いことが明らかとなった。しかし、マクロファージ上のMHC classI、MHC classII、CD80、CD86 およびCD40の発現レベルは両菌株の感染後同程度に増強することが示された。以上の結果から、PPE37にはNF-<math>\kappa</math>BやMAPK経路の活性化を抑制する能力があり、<i>Ms_ppe37</i>感染では<i>Ms</i>刺激によって誘導されるTNF-<math>\alpha</math>およびIL-6産生がその抑制作用の影響を受けるものと考えられた。また、PPE37はこのようにして宿主防御に抑制的に働き、結核菌の感染成立に関与することが示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

結核菌の強い病原性には、宿主細胞内寄生や宿主免疫回避を可能にする因子が深く関与している。結核菌ゲノムにはPPEモチーフを有するPPEファミリーをコードする遺伝子が多数存在するが、その機能は十分解明されていない。そのなかでPPE37は感染においてその発現が上昇することから、本研究ではPPE37を産生する*M. smegmatis*株(*Ms\_ppe37*)を作製し、PPE37が感染マクロファージの機能に及ぼす影響について解析した。*Ms\_ppe37*および発現ベクターをトランスフェクトしたコントロール株*Ms\_vec*をマクロファージに感染させ、経時的に細胞内菌数を測定した。その結果、PPE37は菌の細胞内増殖には影響しないことが示された。また、PPE37は感染細胞の細胞死誘導にも関与しないことが明らかとなった。一方、炎症性サイトカイン産生応答について調べた結果、*Ms\_ppe37*感染で誘導されるTNF- $\alpha$ とIL-6 mRNAの発現およびそれらサイトカインの産生レベルは、*Ms\_vec*感染の場合に比較して明らかに低いことが示された。また、*Ms\_vec*感染に比較して*Ms\_ppe37*感染の場合にはNF- $\kappa$ B、ERKおよびp38 MAPキナーゼの活性化レベルが低いことが明らかとなった。しかし、マクロファージ上のMHC抗原、CD80、CD86やCD40の発現量は両菌株の感染で違いはみられなかった。PPE37はNF- $\kappa$ BやMAPK経路の活性化を抑制することでマクロファージの炎症性サイトカイン産生を低下させ、宿主防御に抑制的な働きをする可能性が示された。

以上の研究は、結核菌の病原因子の解明に貢献し、結核菌対宿主相互作用に関する研究の進歩に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成23年2月22日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降