

氏 名	うち やま りょう すけ 内 山 良 介
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3144 号
学位授与の日付	平 成 19 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学位論文題目	Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of RAW264 cells infected with <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (結核菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 感染 RAW264 細胞における caspase-9 を介した necrosis 抑制機序)
論文調査委員	(主 査) 教 授 湊 長 博 教 授 三 嶋 理 晃 教 授 長 田 重 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* はヒト結核症の原因菌で、現在、世界のおよそ3分の1が潜在的に結核菌に感染しており、そのうち年間約800万人が結核を発症し、その死亡者数は200万人にのぼるものと推定されている。また、我が国においても多剤耐性菌の増加や結核蔓延国からの人的流入などにより、今後結核の増加が懸念される現状にあることから、その感染病態機序を明らかにすることは重要な課題といえる。

結核菌はヒトに感染後、マクロファージに侵入する。マクロファージは強力な細胞内殺菌機構を有するが、結核菌はその殺菌機構を巧みに回避して細胞内で増殖することができる。一方宿主側では、結核菌の感染に伴い強いTh1型防御免疫が誘導されるが、結核菌は排除されることなく長期にわたり感染宿主内で生存し続けることができる。結核菌がどのようにしてマクロファージ内で生存し続けるのか、その機序については今なお不明な点が多い。しかし最近、結核菌が宿主細胞であるマクロファージの細胞死を制御し、その細胞内で増殖することが示されており、この機序は結核菌が宿主体内で生存するために重要であると考えられる。そこで本研究では、結核菌が感染細胞の細胞死を制御する機序を解析するため、各種caspase活性化と細胞死の関係について検討した。

結核菌強毒株 H37Rv をマウスマクロファージ系細胞株 RAW264 細胞に感染させたところ、caspase-8, 3/7, 9 活性化および DNA 断片化が認められた。また、広域 caspase 阻害剤 z-VAD-fmk により各種 caspase の活性を阻害した場合には DNA 断片化が認められなかったことから、H37Rv 感染細胞では apoptosis が誘導されていることが示された。一方、H37Rv はこの細胞内環境では増殖可能であったが、z-VAD-fmk を培養系に添加した場合には、ほとんどの細胞で necrosis 様細胞死が誘導され、H37Rv の細胞内増殖が抑制された。感染細胞を z-VAD-fmk で処理した場合、細胞内活性酸素濃度の上昇が認められたことから、抗酸化剤 3-(2)-t-butyl-4-hydroxyanisole で処理して細胞内活性酸素を除去したところ、感染細胞は necrosis には陥らず、菌の細胞内増殖の抑制が解除された。これらの結果より、結核菌感染細胞では活性化された caspase が細胞内活性酸素濃度の上昇を抑えることで、細胞の necrosis 誘導を抑制していることが示された。この necrosis 抑制機序に関与する caspase を同定する目的で、各種 caspase 特異的な阻害剤を用いて解析したところ、caspase-9 活性を阻害した場合のみ感染細胞の necrosis の亢進が認められた。さらに、この caspase-9 活性化と菌の病原性との関連性を調べるため、RAW264 細胞に結核菌弱毒株 H37Ra を感染させ、その後の caspase-9 活性化を H37Rv 感染細胞と比較した。その結果、H37Ra 感染細胞では caspase-9 活性化が認められず、caspase-9 活性化は菌の病原性に関連することが示された。

以上の結果から、結核菌強毒株 H37Rv 感染において誘導される caspase-9 活性化は、感染細胞の活性酸素濃度の上昇を阻害することで、necrosis を抑制するものと考えられた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

結核菌による感染マクロファージの細胞死制御機序を解析するため、結核菌感染後の caspase の活性化と細胞死の関係に

ついて検討を行った。結核菌強毒株 H37Rv をマウスマクロファージ系細胞株 RAW 264 細胞に感染させたところ、caspase-8, 3/7, 9 の活性化および DNA 断片化が認められた。また、この細胞内環境で H37Rv は増殖することが示された。一方、広域 caspase 阻害剤 z-VAD-fmk で感染細胞を処理した場合には、DNA 断片化は抑制されたが、ほとんどの感染細胞で necrosis 様細胞死が誘導され、H37Rv の細胞内増殖が著明に抑制された。また、感染後にみられる細胞内活性酸素濃度の上昇を酸化剤で抑制すると、感染細胞は necrosis には陥らず、菌の細胞内増殖の抑制が解除することが示された。さらにこの結核菌感染細胞でみられる necrosis 誘導は、caspase-9 特異的阻害剤の処理でも誘導され、H37Rv 感染でみられる caspase-9 の活性化は弱毒株 H37Ra 感染では認められなかった。以上の結果より、結核菌強毒株 H37Rv は、感染初期に caspase-9 の活性化を誘導して活性酸素依存的な necrosis 誘導を抑制することで、増殖に必要な宿主細胞を維持しているものと考えられた。

以上の研究は、結核菌の病原メカニズムの解明に貢献し、結核感染症の征圧に関わ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 19 年 6 月 11 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。