京都大学	博士（医科学）	氏　名	暮沼　武士
論文題目	The RD1 locus in the *Mycobacterium* tuberculosis genome contributes to activation of caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages (結核菌ゲノム上の RD1 領域は、結核菌感染マクロファージの細胞内カリウムイオンの流出を介してカスパーゼ１の活性化に関与する)		

（論文内容の要旨）

結核菌 *M. tuberculosis* と結核の予防接種に用いられる非病原性ワクチン株である *M. bovis* BCG のゲノム配列の比較から、結核菌ゲノム上には BCG には存在しない 16 個の region of difference (RD)と呼ばれる遺伝子領域が存在することが明らかにされた。分子疫学および分子遺伝学的な解析から、これら RD のうち RD1 領域が結核菌の病原性だけでなく、宿主防御免疫の誘導あるいは、肉芽腫形成や感染細胞の細胞死誘導に重要な役割を果たすことが示されている。RD1 領域には、主要な T 細胞抗原である ESAT-6 や CFP-10 遺伝子とそれらの分泌装置、あるいはシャペロンとして分泌に関与する遺伝子がコードされている。しかし、この領域がどのような機序で宿主防御免疫の誘導に関与するのかは、今のところ不明である。そこで本研究では、RD1 領域が結核菌感染マクロファージからのサイトカイン産生にどのように関与するのかについて解析した。3%チオグリコレートで誘導した腹腔滲出マクロファージに結核菌 H37Rv 株（野生株）、RD1 欠損 H37Rv 株(ΔRD1)および RD1 相補株(ΔRD1::RD1)を multiplicity of infection (MOI)=5 で感染させ、その後のサイトカイン産生を ELISA で調べた。その結果、H37Rv および ΔRD1 感染後の TNF-α と IL-6 産生には違いは認められなかったが、ΔRD1 感染後の IL-1β と IL-18 産生は H37Rv 感染の場合に比較して有意に低いことが示された。このサイトカイン産生応答の違いは、感染効率を下げて MOI=1 で感染させた場合でも、骨髄由来マクロファージを用いて感染実験を行なった場合でも同様に観察された。また、ΔRD1 感染後の IL-1β および IL-18 産生の低下は、RD1 遺伝子領域を相補することにより野生株感染のレベルまで回復した。これらの結果から、RD1 領域は IL-1β と IL-18 産生の誘導に関与することが明らかとなった。IL-1β および IL-18 は前駆体タンパク質として合成され、その後 caspase-1 によるプロセッシングを受けて成熟型として培養上清中に放出されることが知られている。そこで、H37Rv および ΔRD1 感染後のこれらサイトカイン産生を経時的に調べたところ、mRNA の発現および前駆体タンパク質の産生は両株の感染で同程度に誘導されることが示された。しかし、IL-1β と IL-18 のプロセッシングに必要な活性型 caspase-1 は H37Rv 感染では誘導されたが、ΔRD1 感染では誘導されず、RD1 が caspase-1 の活性化に重要な役割を果たしていることが示された。さらに解析を進めたところ、H37Rv 感染後の活性型 caspase-1 の誘導や IL-1β および IL-18 産生は、培地中に塩化カリウムを添加して細胞からのカリウムイオンの流出を阻害することにより抑制されることが示された。また、ΔRD1 感染では弱い IL-1β や IL-18 産生しか認められなかったが、この系にカリウムイオノフォアである nigericin を加えてカリウムイオンの流出を誘導すると、各サイトカイン産生の著明な亢進が観察された。さらに、結核菌感染で誘導されるカリウムイオンの流出は、ATP 依存的にカリウムイオンの流出を引き起こす P2X7 受容体や、Ｉ型インターフェロンに依存しないことが各遺伝子欠損マクロファージを用いた実験から明らかとなった。以上の実験成績から、結核菌の病原性発現に重要な RD1 領域は、感染マクロファージからのカリウムイオンの流出に関与し、その結果活性化された caspase-1 が、IL-1β や IL-18 のプロセッシングを行い、それらが成熟化したサイトカインとして産生されることが示された。

（論文審査の結果の要旨）

結核菌ゲノム上のRD1遺伝子領域は菌の病原性だけでなく、防御免疫の誘導や感染細胞の細胞死にも関与することが報告されている。しかし、RD1領域がどのような機序でその機能を発揮するのかは今のところ明らかではない。そこで本研究では、主に防御免疫発現へのRD1の役割について調べる目的で、腹腔滲出マクロファージまたは骨髄由来マクロファージに結核菌H37Rv株(野生株)およびRD1欠損株(ΔRD1)を感染させ、RD1の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を解析した。その結果、RD1領域はTNF-αとIL-6産生には影響を及ぼさなかったが、IL-1βおよびIL-18産生には重要な役割を果たすことが明らかとなった。H37RvおよびΔRD1感染後のこれらサイトカイン産生を転写段階から調べたところ、mRNAの発現および前駆体タンパク質の産生は両株の感染で同程度に認められた。しかし、IL-1βとIL-18のプロセッシングに必要な活性型caspase-1はH37Rv感染でしか誘導されず、RD1領域がcaspase-1の活性化に重要な役割を果たしていることが示された。さらに、RD1領域はP2X7受容体やI型インターフェロン非依存的に感染マクロファージからのカリウムイオン流出を亢進させ、その結果活性化されたcaspase-1がIL-1βやIL-18のプロセッシングを行い、成熟化したサイトカインとして産生されることが示された。

以上の研究は、結核菌の病原メカニズムの解明に貢献し、結核の制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(医科学)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21年11月2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