

氏 名	かく 角 たい 泰 じん 人
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1939 号
学位授与の日付	平 成 19 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion (結核菌ゲノムのRD1領域は、ミトコンドリア膜傷害とATP枯渇を介してRAW264マクロファージ細胞株のネクロシスを誘導する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 西 沢 光 昭 教 授 一 山 智 教 授 三 嶋 理 晃

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、細胞内で増殖することができる。近年、病原性の強い結核菌は宿主マクロファージの apoptosis を抑制することで自身の増殖の場を維持することが示された。これは、結核菌が宿主生体内で生存するための重要な機序であると考えられる。さらに、病原性の強い結核菌は感染細胞の necrosis を強く誘導し、その細胞傷害反応には結核菌ゲノム上の RD1 領域が関与することが示されている。この現象は、マクロファージ内で増殖した菌が感染細胞を破壊し、周辺細胞へと感染を拡大する上で重要な過程ではないかと考えられる。しかし、その機序は今のところ明確ではない。そこで本研究では、結核菌 H37Rv とその RD1 欠損変異株 ($\Delta RD1$) 感染後の necrosis 誘導能を比較し、RD1 領域がどのようなメカニズムで感染細胞の細胞傷害に関与するのかについて検討した。

結核菌強毒株 H37Rv、 $\Delta RD1$ および RD1 相補株 ($\Delta RD1::RD1$) 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、H37Rv および $\Delta RD1::RD1$ の感染では培養上清中への lactate dehydrogenase の遊離および propidium iodide 染色で陽性に染まる細胞数が増加し、細胞が necrosis に陥っていることが示された。しかし、これらの変化は $\Delta RD1$ 感染では認められなかった。さらに、H37Rv および $\Delta RD1::RD1$ 感染では感染早期に mitochondria の膜電位の低下が観察され、mitochondria 内膜が傷害されることが示された。一方、 $\Delta RD1$ 感染では mitochondria への影響は認められなかった。これらの結果から、H37Rv 感染による RAW264 細胞の necrosis 誘導には RD1 領域が関与し、感染細胞の mitochondria 機能を阻害することで necrosis が誘導されるものと考えられた。さらに、H37Rv 感染後の necrosis 誘導機序について解析したところ、H37Rv 感染後に上昇する細胞内活性酸素を抗酸化剤 3(2)-*t*-butyl-4-hydroxyanisole で除去しても、mitochondria 内膜傷害の程度に変化は認められなかったことから、細胞内に蓄積する活性酸素が necrosis の原因ではないことが示された。一方、 $\Delta RD1$ 感染と比較して H37Rv および $\Delta RD1::RD1$ 感染では、細胞内 ATP 濃度が著しく減少することが明らかとなった。以上の結果から、H37Rv 感染で誘導される necrosis には RD1 領域が重要な役割を果たしており、この領域に存在する結核菌因子が感染細胞の mitochondria 傷害に関与し、その結果として細胞内 ATP 濃度の減少を引き起こすことで細胞が necrosis に陥るものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

病原性の強い結核菌はマクロファージに侵入後、細胞内で増殖し、ネクロシスを誘導することで細胞外に出てさらに感染を拡大するものと考えられている。このネクロシス誘導能は弱毒株にはみられないことから、結核菌の病原性発現に関わる重要な機序であると考えられる。最近、結核菌ゲノム上のRD1領域が、感染マクロファージのネクロシス誘導および菌の病原性に関与することが示された。そこで本研究では、結核菌強毒株 H37Rv、RD1 欠損変異株 (Δ RD1) および RD1 相補株をマクロファージ細胞株 RAW264 細胞に感染させ、RD1 領域がどのような機序でネクロシス誘導に関与するのかについて解析した。その結果、H37Rv および RD1 相補株の感染24時間後では、lactate dehydrogenase の遊離および propidium iodide 染色陽性細胞数の増加が認められたが、アポトーシスは誘導されておらず、感染により細胞がネクロシスに陥っていることが示された。しかし、 Δ RD1 感染ではネクロシスの誘導は認められなかった。また、H37Rv および RD1 相補株感染細胞では感染2時間後よりミトコンドリア内膜が傷害されていることが示されたが、 Δ RD1 感染ではミトコンドリアへの影響は認められなかった。さらに、H37Rv 感染後に上昇する細胞内活性酸素はミトコンドリア内膜傷害の原因ではないことが示された。また、 Δ RD1 感染の場合と比較して H37Rv および RD1 相補株感染では、細胞内 ATP 濃度の著明な減少が認められた。以上の結果から、H37Rv 感染で誘導されるネクロシスには RD1 領域が重要で、RD1 領域の遺伝子産物が感染細胞のミトコンドリア内膜傷害を誘導し、その結果細胞内 ATP 濃度の減少が関与して細胞がネクロシスに陥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7月31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。