

謝辞

本研究の機会と proHB-EGF 遺伝子の提供を頂きました愛媛大学大学院医学系研究科生化学・分子遺伝学教室の東山繁樹教授をはじめ、ご協力頂いた教室メンバーの方々に深謝いたします。

- 1) Nanba, D., Mammoto, A., Hashimoto, K., & Higashiyama, S. (2003) *J. Cell Biol.*, 163, 489–502.
- 2) Kinugasa, Y., Hieda, M., Hori, M., & Higashiyama, S. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 14797–14806.
- 3) Hieda, M., Isokane, M., Koizumi, M., Higashi, C., Tachibana, T., Shudou, M., Taniguchi, T., Hieda, Y., & Higashiyama, S. (2008) *J. Cell Biol.*, 180, 763–769.
- 4) Nanba, D., Inoue, H., Shigemi, Y., Shirakata, Y., Hashimoto, K., & Higashiyama, S. (2008) *J. Cell Physiol.*, 214, 465–473.
- 5) Higashiyama, S., Iwabuki, H., Morimoto, C., Hieda, M., Inoue, H., & Matsushita, N. (2008) *Cancer Sci.*, 99, 214–220.
- 6) Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., Nanba, D., Higashiyama, S., Hori, M., Klagsbrun, M., & Mekada, E. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100, 3221–3226.
- 7) Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., Endoh, M., Kaneda, Y., Takagi, S., Itami, S., Takeda, N., Yamada, G., & Mekada, E. (2003) *J. Cell Biol.*, 163, 469–475.
- 8) Uetani, T., Nakayama, H., Okayama, H., Okura, T., Higaki, J., Inoue, H., & Higashiyama, S. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 12399–12409.
- 9) Lin, J., Hutchinson, L., Gaston, S.M., Raab, G., & Freedman, M.R. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 30127–30132.
- 10) Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A., & Reed, J.C. (1995) *Cell*, 80, 279–284.
- 11) Schulz, J.B., Bremen, D., Reed, J.C., Lommatzsch, J., Takayama, S., Wüllner, U., Löschmann, P.A., Klockgether, T., & Weller, M. (1997) *J. Neurochem.*, 69, 2075–2086.

井上 博文^{1),3)}, 上谷 晃由^{1),2)}

¹⁾愛媛大学大学院医学系研究科
生化学・分子遺伝学分野,

²⁾愛媛大学大学院医学系研究科病態情報内科学分野,

³⁾愛媛大学プロテオ医学研究センター
バイオイメージングコアラボラトリー)

Survival response of EGF family shedding to hypoxia in cardiomyocytes

Hirofumi Inoue^{1),3)} and Teruyoshi Uetani^{1),2)} ¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Toon, Ehime, 791-0295, Japan, ²⁾Department of Integrated Medicine and Informatics, Ehime University Graduate School of Medicine, ³⁾Bioimaging Core Laboratory, Ehime Proteo Medicine Research Center, Ehime University)

感染に対する宿主側トレランス機構の発見

はじめに

マラリアや西ナイル熱、日本脳炎やフィラリアなど、蚊やダニなどの節足動物によって媒介される感染性疾患は依然として脅威である。これらの疾病を媒介する節足動物はベクター（運び屋昆虫）と呼ばれ、人間や動物に広く被害を及ぼしている。またこれらの中には人間と動物間に病原体が相互伝播する人獣共通感染症を媒介するものも多数存在し、対策が不可欠となっている。

それぞれの疾病を引き起こす病原体（ウイルス、細菌、寄生虫）が節足動物の体内で成長・増殖し、それらの病原体が宿主に伝播されることにより感染が成り立つ。感染症の本質は、宿主個体と病原微生物間に存在する「寄生する・寄生される」といった単純な生物学的関係といえる。病原体媒介節足動物も、自然免疫応答を中心に、病原体に対する様々な排除システムを持っていることが知られている¹⁾。病原体と節足動物間で成立する病原体-ベクター相互関係が理解され、病原体を制圧できるベクター側抵抗性因子を発見することは、従来の抗生物質などとは全く異なった概念の薬物ターゲットを与え、病原体を保持することが不可能な昆虫を作出する道を開くと考えられる。

そこで著者らは、蚊やダニなどの媒介節足動物において、病原体が体内にありながらもほとんど病原性を示さないという事実に着目した。これは、媒介節足動物が、病原体の排除を目的とした通常の免疫システムとは異なる「感染耐性機構」を有することを示唆する。この仕組みにより、あたかも病原体と節足動物が共存している状態が作り出され、その結果ベクターとしての媒介能を保持することが可能になっていると考えた。そこで本研究では、病原体を媒介する節足動物が持つと思われる感染耐性（トレランス）のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

1. レジスタンスとトレランス

蚊やダニが見せるような、病原性を持つ微生物と宿主が共存する状態は、特に節足動物に限ったことではない。人間においても、チフス菌（サルモネラ菌）の健常保菌者の存在が知られている。その歴史上最初の臨床報告例では、ある家政婦が病気を発症しないにも関わらずチフス菌を持

ち続け、その結果多くの食中毒を引き起こしたというものである²⁾。このように、一見病原体と共存しながら生活する状態として「不顕性感染」や「潜伏感染」が知られているが、なぜ病原体が宿主や媒介節足動物の免疫などの防御反応から逃れ、またその病原体を持つ個体自身が病気にならないのか、長らく不明のままであった。宿主やベクターの感染防御応答は大きく2種類の異なる性質に分類される。一つは、病原体を積極的に排除するための「レジスタンス (resistance)」, もう一方は、宿主やベクターに与えられる病原体によるダメージを制御するための「トレランス (tolerance)」である。従来の免疫学・感染症学では、レジスタンス機構の解明に重点が置かれていたが、近年、種々の動物における感染応答において、トレランス機構が存在することが示唆されている^{3,4)}。病原体感染時の宿主やベクターにおける健康状態は、レジスタンスとトレランスの協調作用により決定されると考えられ、トレランスが不顕性感染など臨床的に症状を示さない状況に強く貢献していると予想されていた⁴⁾。本研究では、節足動物において、トレランスを制御する宿主因子、及びトレランス制御機構として貪食細胞の新しい機能を同定することに成功した。

2. トレランスを制御する宿主側因子の同定

節足動物は、哺乳類とよく似た分子機構により、感染防

御に対する応答を行っている⁵⁾。自然免疫を司る重要な Toll 様受容体は、元々はショウジョウバエから発見されたことから明らかである。このような理由から、近年ショウジョウバエを感染症モデルとして用いている研究が数多く成されており、蚊やダニを用いた研究では困難であった節足動物側因子の網羅的解析等が可能となった⁶⁾。著者らは、トレランスを制御する因子を遺伝学的に同定するために、ショウジョウバエの細菌感染モデルを構築し、遺伝学的スクリーニングを試みた。このモデルでは、感染が成立した宿主個体は致死性を示す。そこで、感染個体の生存率と感染個体内に存在する病原体数の相互関係に注目した。生存率は、病原体感染時における宿主の健康状態を表していると考えられ、病原体数は、宿主のレジスタンスを反映していると考えられる。トレランスを制御する宿主因子を同定するために、GS システムという機能獲得型の系統ライブラリーを用いて、食中毒の原因菌の一つであるサルモネラ (*Salmonella typhimurium*) 感染に対する宿主因子の機能を評価した。その結果、遺伝学的スクリーニングにより、サルモネラ感染による致死性を抑制する因子として、ショウジョウバエ p38 マップキナーゼ (*Dmp38b*) を同定した (図 1)⁷⁾。 *Dmp38b* 強制発現個体および機能欠損型変異体を用いた解析により、感染によって活性化された *Dmp38b* は、抗菌ペプチド発現などの免疫機構に影響を与

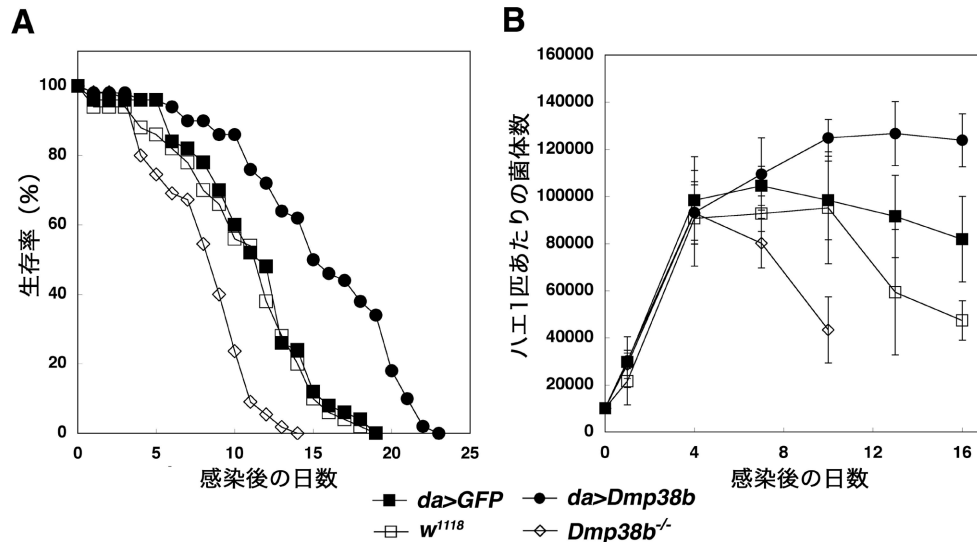


図 1 p38 マップキナーゼは感染時のトレランスを制御する

(A) *Dmp38b* 強制発現系統及び機能欠損型変異体のサルモネラ感染に対する生存率. (B) *Dmp38b* 強制発現系統及び機能欠損型変異体におけるサルモネラ増殖曲線. *da>GFP*: 強制発現のコントロール系統, *w¹¹¹⁸*: 野生型系統, *da>Dmp38b*: *Dmp38b* 強制発現系統, *Dmp38b^{-/-}*: *Dmp38b* 機能欠損型変異体.

えず、個体内での病原体の増殖を抑制する機能を持たないことが示された。すなわち、細菌が体内に存在するにも関わらず、その病原性に対して耐性を示す状態、いわゆる「トレランス」が付与されていることが見出された(図1)。これは、無症状であるのにマラリア原虫や日本脳炎ウイルスが節足動物体内で生存しているという、あたかも蚊やダニなどとよく似た状態である。

3. p38 誘導性トレランスに貪食細胞が関与する

p38 マップキナーゼは、細胞増殖や細胞死など様々な生命現象に関わるリン酸化酵素であり、自身がリン酸化され

ることで活性化し下流の分子にシグナルを伝達する。抗リン酸化 p38 抗体及び抗 p38 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果、ショウジョウバエ個体及び貪食細胞を起源とする培養細胞 (S2 細胞) において、サルモネラ感染が p38 のリン酸化を誘導することが明らかになった。サルモネラはマクロファージ内で増殖を行うことが可能であり、細胞内寄生細菌として知られている。貪食細胞内で特異的に GFP を発現する pMIG1 レポータープラスミドを持つサルモネラを用いた結果⁸⁾、ショウジョウバエに対する感染においても同様に貪食細胞に感染することが判明し、加えて感染宿主内におけるサルモネラの大部分は細胞内に

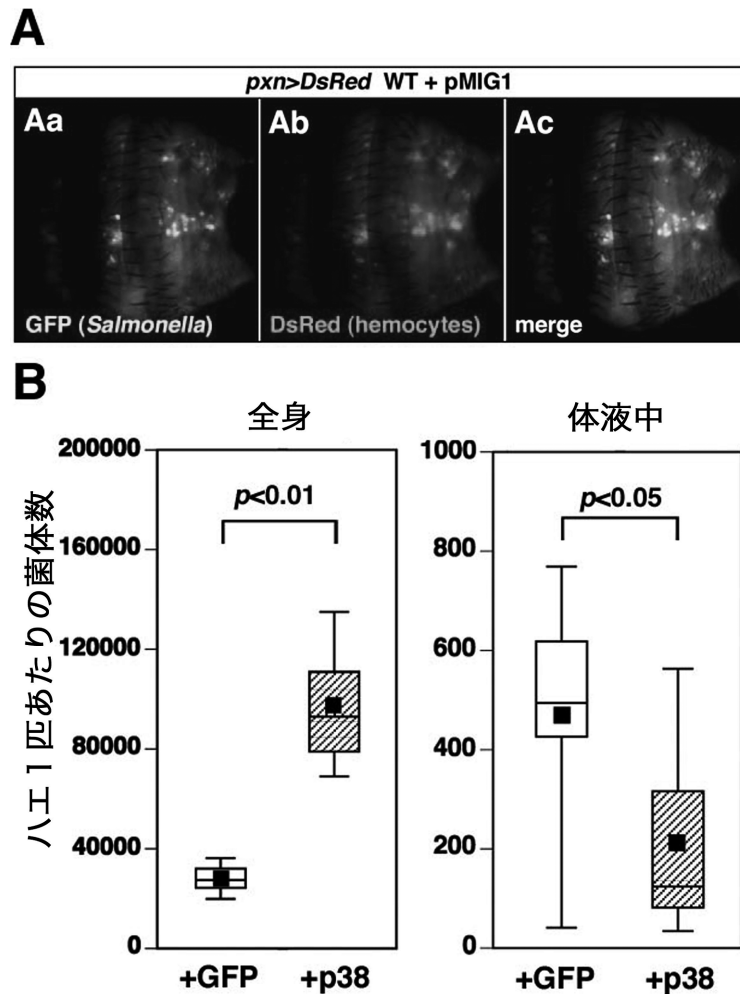


図2 p38 誘導性トレランスに貪食細胞が関与する
 (A) pMIG1 を用いたサルモネラの細胞内寄生の観察。GFP の蛍光は貪食細胞内のサルモネラ、DsRed の蛍光は貪食細胞そのものを示す。(B) サルモネラ感染個体における全身 (左) 及び体液中 (右) に含まれる菌体数。
 +p38 は *Dmp38b* 強制発現個体 (*da>Dmp38b*)、+GFP はコントロール (*da>GFP*) を示す。

存在していることがわかった (図 2A)。そこで、微細ビーズを用いた貪食阻害後のサルモネラ感染実験を行った結果、感染抵抗性が減弱した。つまり、サルモネラ感染による致死性における貪食細胞の重要性が見出された。次に、Dmp38b をショウジョウバエ貪食細胞特異的に強制発現 ($pxn > Dmp38b$) させた状態で、サルモネラ感染を行った。その結果、感染抵抗性は増強した。さらに、貪食細胞特異的 p38 強制発現系統では、体液中に存在している菌体数が少ないことが明らかとなった (図 2B)。以上の結果から、

p38 が誘導するトレランスにおいて、貪食細胞が重要な役割を担うことが示された。

4. 貪食性困り込みによるトレランスの制御

次に、前述の pMIG1 レポーターを組み込んだサルモネラを用いた感染実験において、その蛍光領域を、菌体を貪食した細胞のサイズと見なして解析した。Dmp38b 強制発現個体、Dmp38b 機能欠損型変異体及び野生型個体間で、そのサイズと個数を定量した結果、Dmp38b 依存的に貪食

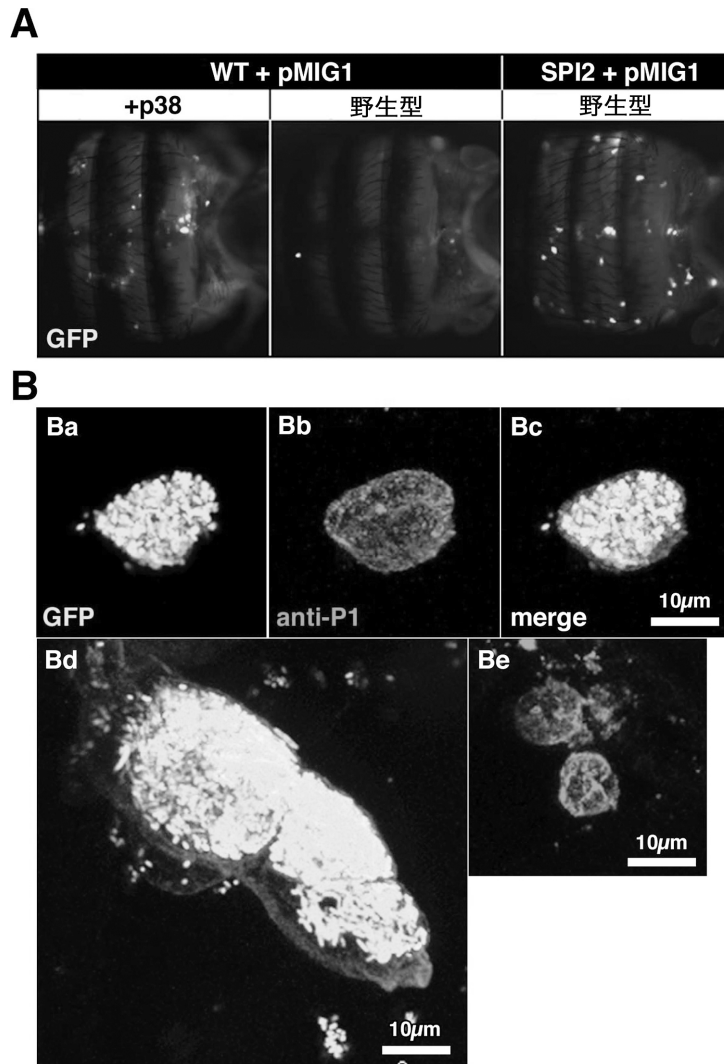


図 3 貪食性困り込みによるトレランスの制御

(A) pMIG1 による貪食細胞内に存在するサルモネラの検出。GFP の蛍光は貪食細胞内のサルモネラを示す。(B) 貪食細胞特異的抗体を用いた貪食細胞の大きさの検討。Ba: サルモネラ (GFP), Bb: 貪食細胞 (anti-P1), Bc: Ba と Bb の重ね合わせ, Bd: SPI2 変異体感染貪食細胞, Be: 非感染貪食細胞。スケールバー: 10 μm。

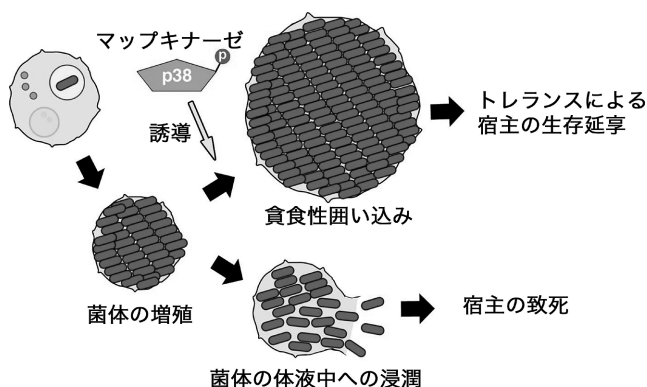


図4 p38 依存的貪食性囲い込みによるトレランス機構のモデル図

細胞が肥大化することが明らかになった (図3)。次に、pMIG1 による蛍光シグナルの詳細を観察するために、ショウジョウバエ貪食細胞 (プラズマトサイト) 特異的抗体を用いて免疫染色を行ったところ、p38 が活性化している貪食細胞は、その大きさを3-4倍にも肥大させ、細胞内に多くの増殖した菌体を含むことが明らかになった (図3)。この膨張した貪食細胞が大量の菌体を細胞内に封じ込める現象を、著者らは「貪食性囲い込み (phagocytic encapsulation)」と名付けた。貪食性囲い込みによる宿主の生存への影響を解析する目的で、SPI-2 変異体サルモネラを用いた。SPI-2 変異体は、ショウジョウバエ体内で通常どおり増殖を行うが、致死性はほとんど誘導しない。SPI-2 変異体に pMIG1 を組み込み、感染実験を行った結果、より顕著な貪食細胞の肥大化が観察された (図3)。微細ビーズを用いた貪食阻害後のサルモネラ感染実験では、肥大化した貪食細胞は観察されず、p38 誘導性トレランスは解消された。以上の結果から、貪食性囲い込み作用は体液中への菌体の脱出を阻害することにより、宿主個体へのトレランスを付与していることが示唆された (図4)。この現象は、宿主 (ヒトや動物など) に病原体を伝播する蚊やダニのようなベクターの実態や、その生物学的意義に迫る発見と考えられる。

おわりに

貪食性囲い込みは、体内に侵入した病原体を隔離するという極めて原始的な防御応答であることが示唆される。貪食作用は、脊椎動物では抗原提示のための消化やオートファジーなど様々な生命現象に関わっているが、元々の機能は単純に「他から隔離する」という現象であったと推測される。病原体を媒介する節足動物では、このトレランス

機能が他の動物よりも優れていると予想されるため、逆にこのトレランス能力を人為的に減弱させることに成功すれば、病原体の伝播をコントロールすることが可能になると考えられる。すなわち、蚊、ハエ、ノミやシラミなど節足動物を媒体とした疾病に対し、ベクター自身が保有するトレランス機構を調節する方法を探索することにより、感染症の制圧を目指す基礎研究基盤につながることを期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、お世話になった東京大学大学院薬学系研究科の三浦正幸教授、国立感染症研究所の青沼宏佳博士、帯広畜産大学の岡戸清博士、Bryce Nelson 博士、福本晋也講師に感謝する。

- 1) Yassine, H. & Osta, M.A. (2010) *Cell Microbiol.*, 12, 1-9.
- 2) 新澤直明, 嘉糠洋陸 (2009) *細胞工学*, 28, 1278-1279.
- 3) Råberg, L., Sim, D., & Read, A.F. (2007) *Science*, 318, 812-814.
- 4) Schneider, D.S. & Ayres, J.S. (2008) *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 889-895.
- 5) Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., & Hoffmann, J.A. (1996) *Cell*, 86, 973-983.
- 6) Dionne, M.S. & Schneider, D.S. (2008) *Dis. Model Mech.*, 1, 43-49.
- 7) Shinzawa, N., Nelson, B., Aonuma, H., Okado, K., Fukumoto, S., Miura, M., & Kanuka, H. (2009) *Cell Host Microbe*, 6, 244-252.
- 8) Valdivia, R.H. & Falkow, S. (1997) *Science*, 277, 2007-2011.

新澤 直明, 嘉糠 洋陸
(帯広畜産大学 原虫病研究センター
節足動物衛生工学分野)

Host tolerance and infectious disease

Naoaki Shinzawa and Hirotaka Kanuka (Vector Biology Unit, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan)