

(別紙様式第3号)

医研178

## 論 文 要 旨

### 論 文 題 目

***Legionella longbeachae* induces apoptosis of human macrophages *in vitro*  
through activation of the caspase pathway**

(*Legionella longbeachae* は *in vitro* においてヒトマクロファージに caspase を介してアポトーシスを誘導する)

氏名 新垣 紀子



研究の目的：*Legionella*

*longbeachae* (*L. longbeachae*) はレジオネラ症の重要な起因菌の一つである。オーストラリアでは腐葉土が感染源となり、本菌による肺炎が多発した。本邦では1996年に肺炎患者より初めて検出され、本邦の腐葉土にも生息することが確認された。その病原因子としてMip 蛋白が重要な役割を果たしているとの報告がある。近年、様々な微生物によるアポトーシス誘導が報告され、病原性との関連や生体防御機構における意義が検討されている。本研究では *L. longbeachae* およびその *mip* mutant を用いてアポトーシス誘導能、およびその機序を検討した。

方法：HL-60 由来ヒトマクロファージを用い、本菌の細胞内増殖能、細胞障害性を検討した。アポトーシス誘導能はDNAの断片化をアガロースゲル電気泳動法、Annexin V 染色を用いて検討した。また、カスパーゼ阻害剤を添加し、アポトーシス誘導能を検討した。

感染細胞の培養上清の TNF- $\alpha$  は ELISA 法にて測定し、さらに抗 TNF- $\alpha$  抗体を培養系に添加した上で、アポトーシス誘導能を検討した。感染細胞の FAS の発現はフローサイトメトリーを用いて測定した。




結果：*L. longbeachae* はヒトマクロファージ内で増殖するとともに感染菌量依存的にマクロファージに対し細胞障害性を示した。細胞は感染早期からアポトーシスを誘導していた。一方、*mip* mutant は細胞内での増殖は認められなかったが、アポトーシスを誘導した。カスパーゼ阻害剤にて本菌によるアポトーシスは抑制された。感染細胞の培養上清中の TNF- $\alpha$  は経時的な上昇を示したが、抗 TNF- $\alpha$  抗体を培養系に添加しても本菌によるアポトーシスは抑制されなかった。また感染したマクロファージの FAS の発現は感染後期になって増加した。

考察：我々は *L. longbeachae* がヒトマクロファージ内で増殖し、細胞障害性を示すとと

もに、増殖を開始する感染早期よりアポトーシスを誘導することを確認した。細胞内増殖能を示さない *mip* mutant もアポトーシスを誘導しており、菌の細胞内増殖はアポトーシス誘導に関与していない可能性を示唆した。本菌によるアポトーシスはカスパーゼを介するものであるが、TNF- $\alpha$  および FAS を介さず誘導されている可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

(1)

報告番号	* 課程博 第	号	氏名	新垣 紀子
論文審査委員	平成 13 年 12 月 20 日			
	主査教授	山根 誠久		 印
	副査教授	荻谷 研一		 印
	副査教授	菅見 直己		 印

### (論文題目)

***Legionella longbeachae* induces apoptosis of human macrophages in vitro through activation of the caspase pathway**

### (論文審査結果の要旨)

上記の論文に対し、その研究に至る背景、論文の内容とその学術的水準、研究の成果とその意義などを慎重に審査し、次のような審査結果を得た。

1. 研究の背景：*Legionella longbeachae* は、レジオネラ肺炎の起因菌のひとつとして1981年に初めて報告された菌である。欧米、本邦の統計では *Legionella pneumophila* が原因菌としては圧倒的に多く約8割から9割を占める。一方、オーストラリアでは事情が異なり、南オーストラリアにおいてはレジオネラ症の原因菌として本菌が約50%を占めており、さらに西オーストラリアでは約90%を占めると報告されている。これらは大規模な疫学調査によって園芸用の培養土が感染源であることが判明している。本邦では1996年に初めてレジオネラ肺炎患者より分離培養された菌であるが、患者が長年造園業に従事していたことから、本邦でも培養土についての検査が施行された。培養土24検体中、22検体からレジオネラ菌が検出され、*Legionella longbeachae* は *Legionella bozemanii* に次いで2番目に多く検出された。しかしながら、*Legionella pneumophila* と比較すると本菌を用いた研究結果は少なく、不明な点も多い。近年、様々な病原微生物とアポトーシスに関する報告がなされ、病態生理学的な意義が注目されている。これまでに報告されたアポトーシスの意義については、感染拡大のため貪食細胞を死滅させるというもの、あるいは炎症のトリガーとなるという報告、細胞内寄生菌では持続感染を惹起するため感染細胞のアポトーシスが抑制している、さらに生体防御機構の一つとしてとらえている報告などがある。また、近年、病原因子とアポトーシスに関する検討が進んでいる。Mip 蛋白は *Legionella pneumophila* の病原因子として重要であることが報告されており免疫

備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。

2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。

3 \*印は記入しないこと。

## 論文審査結果の要旨

(2)

抑制剤の FK506 と結合する蛋白と相同性があり、ペプチジルプロリルシーストランスイソメラーゼ活性を有している。この蛋白はマクロファージへの菌の感染性を高める蛋白として感染の初期に重要な役割を果たすと報告されている。*Legionella longbeachae* の *mip* mutant も *Acanthamoebae* に感染できず、モルモットの感染モデルでも病原性が低下していることが報告されている。今回、*Legionella longbeachae* およびその *mip* mutant を用い細胞内増殖能、細胞障害性、アポトーシス誘導能の検討を行った。さらに、*Legionella longbeachae* によるアポトーシス誘導の機序についても検討を加えた。

2. 論文の内容とその水準：*Legionella longbeachae* はマクロファージ内で増殖し同時に細胞傷害性を有していた。また本菌の感染したマクロファージの DNA の断片化はアガロース電気泳動法、TUNEL 法によって証明された。また、加熱処理をした菌にアポトーシス誘導能は認められず生菌のみがアポトーシス誘導能を有していた。フローサイトメを用い細胞を AnnexinV で染色することにより細胞内で増殖を開始する以前の感染早期からマクロファージはアポトーシスを起こしていることが明らかとなった。*Legionella longbeachae mip* mutant は細胞内での感染 48 時間まで細胞内の増殖は認められなかったが、アポトーシス誘導能を有していた。これは細胞内の菌の増殖が必ずしもアポトーシスの誘導に関与していないことが示された。感染細胞のアポトーシスは caspase 阻害剤である Z-VAD により抑制され caspase を介することが示唆された。FAS の発現は感染後期に上昇した。感染細胞の TNF- $\alpha$  receptor の発現、上清中の TNF- $\alpha$  は経時的に上昇したものの、抗 TNF- $\alpha$  抗体添加細胞にもアポトーシスが認められ本菌によるアポトーシスは FAS や TNF を介していない可能性が考えられた。

3. 研究成果の意義：

本研究は、*Legionella longbeachae* 感染が感染早期からマクロファージにアポトーシスを誘導し、またその誘導に細胞内増殖が必須でないこと、さらにその機序として caspase は介するものの FAS あるいは TNF- $\alpha$  を介さず未知の caspase 活性化機構が存在する可能性を初めて示唆したものである。

以上の結果から、本研究は学位授与に十分値する内容であると判断した。