

ストレス応答性 MAP キナーゼ p38 による感染トレランスの制御

東京慈恵会医科大学 熱帯医学講座
嘉糠 洋陸

1. はじめに

メアリー・マローン (Mary Mallon) は、1900年代初頭に世界で初めて臨床報告されたチフス菌 (サルモネラ菌) の健常保菌者である。自身は病気を発症しないにも係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ことから「腸チフスのメアリー (Typhoid Mary)」と呼ばれた。このように、病原体とあたかも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、なぜ病原体が宿主の免疫などの防御反応から逃れ、またその病原体を持つ人間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¹⁾²⁾。病原体感染時の宿主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。本研究では、宿主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. 方法

(1) ショウジョウバエへの細菌感染実験: ショウジョウバエ飼育及び交配は全て25度Cで行った。感染実験にはサルモネラ菌の一種である *Salmonella typhimurium* (菌液の濃度: 0.1 OD) を用いた。ショウジョウバエの感染に際し、マイクロインジェクターにより菌液を1匹につき65nl注入した。感染後は29度Cで飼育し、各種実験に供与した。(2) p38の活性化評価: 上記の方法に従い *S. typhimurium* の感染後、ショウジョウバエ個体から細胞破碎液を調整し、ウェスタンブロットに供与した。リン酸化p38特異的抗体を用い、p38タンパク質のリン酸化を調べることにより、活性化の指標とした。(3) 血球系細胞の貪食能評価: 貪食細胞に侵入した時のみ活性化するプロモーターに、*GFP* 遺伝子を配置したレポーター・プラスミドを *S. typhimurium* に導入する。貪食細胞を *pxn>dsRED* により可視化したショウジョウバエ個体にこの *S. typhimurium* を感染させ、共焦点レーザー顕微鏡により詳細に観察した。

3. 結果

自然免疫を司る Toll 様受容体がショウジョウバエから発見されたことは記憶に新しく、節足動物は我々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していることが明らかになった³⁾。近年、ショウ

ショウバエをヒト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、哺乳類を用いた研究では困難であった宿主側因子の網羅的解析等が可能となった。我々は、トレランスを制御する宿主因子を遺伝学的に同定するために、ショウジョウバエ・細菌感染モデルを構築した。食中毒の原因菌の一つであるサルモネラを用いた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⁴⁾。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1B,C)。これは、無症状であるのにサルモネラが体内で生存しているという、あたかもメアリー・マローンの不顕性感染とよく似た状態である。

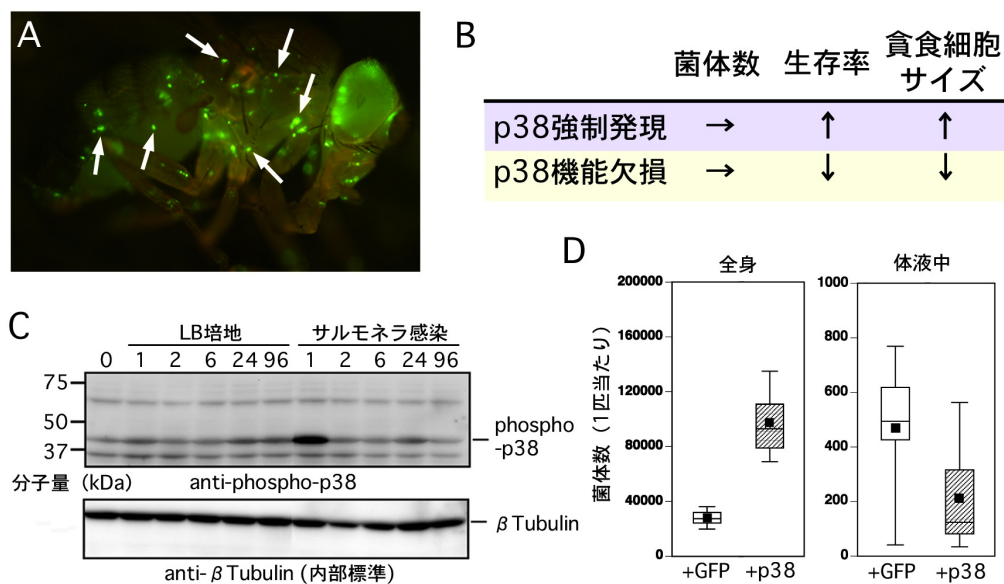


図1:サルモネラ感染により活性化されたDmp38bはトレランスを付与する

A:サルモネラはショウジョウバエ貪食細胞に侵入し増殖する。GFPシグナル(緑)はサルモネラを示す。pMIG1レポーターは貪食細胞内で特異的にGFPを発現する。B:サルモネラに感染しているp38強制発現系統および機能欠損型変異が示す表現型の概略。Dmp38bは菌体の増殖を抑制することなく、宿主個体に感染抵抗性を付与する。C:サルモネラ感染はショウジョウバエ個体内でp38をリン酸化する。D:p38強制発現個体においては、体液中菌体数が少ない(右)。文献4より改変。

細胞内寄生細菌であるサルモネラのショウジョウバエ貪食細胞内での挙動を観察する目的で、貪食細胞内で特異的にGFPを発現するレポータープラスミド(pMIG1)を用いた(図1A)⁵⁾。pMIG1を保持したサルモネラによる感染実験の結果、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2A)。我々は、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「貪食性囲い込み(phagocytic encapsulation)」と名付けた。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。また、p38によるトレランスを得ている個体は体液中の菌体数が少なかったことから(図1D)、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で宿主にトレランスを付

与していることが明らかとなった(図2B). この現象は、他の宿主(ヒトや動物など)にその感染症を伝染させる可能性のあるメアリー・マローンのような『無症候性キャリア』の実態や、その生物学的意義に迫る発見と考えられる。

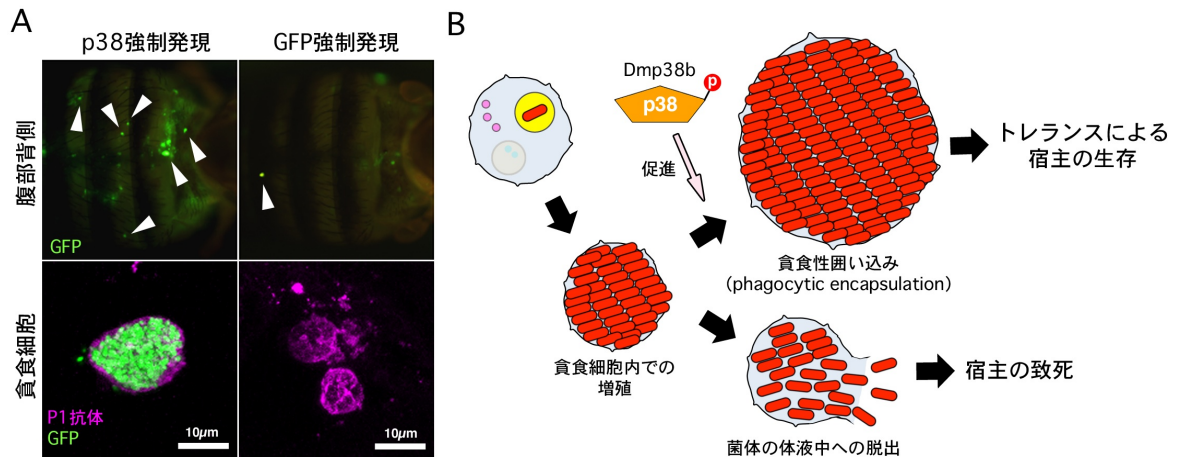


図2: 貪食性囲い込みはサルモネラの体液中への脱出を抑制することで宿主にトレランスを付与する
A: 肥大化した貪食細胞は増殖した菌体を細胞内に囲い込む. pMIG1レポーターを保持するサルモネラをp38強制発現個体に感染させると、強いGFPシグナルが観察される(上部左). p38強制発現個体の貪食細胞は、肥大化することで、細胞内に増殖したサルモネラを大量に含む(下部左). B: 貪食性囲い込みによるトレランスを示したモデル図. 貪食性囲い込みにより、増殖した菌体が細胞内に隔離され、結果として宿主に対して病原性を示さない. 文献4より改変.

4. 考察

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ことは想像に難くない。これは、我々の祖先が遥か昔に身に付けた「食べる」ことによる感染防御応答の痕跡なのではないだろうか。今後、宿主感染応答におけるトレランス機構の意義について議論が行われ、分子レベルでの制御機構のさらなる知見が得られることが期待される。

5. 参考文献

- 1) Råbarg L, et al: Science (2007) 318: 812-814
- 2) Schneider DS, et al: Nat. Rev. Immunol. (2008) 8: 889-895
- 3) Lemaitre B, et al: Cell (1996) 86: 973-983
- 4) Shinzawa N, et al: Cell Host Microbe (2009) 6: 244-252
- 5) Valdivia RH, et al: Science (1997) 277: 2007-2011