

平成 21 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790727

研究課題名（和文）サルモネラ感染症発症の病態および関連する宿主遺伝要因の解明

研究課題名（英文）Clarification of condition of salmonella infectious disease appearance of disease and relating landlord inheritance factor

研究代表者

保科 隆之（HOSHINA TAKAYUKI）

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：30398078

研究成果の概要：

サルモネラ感染症例の血液から T 細胞および T 細胞を分離し、マイクロアレイを利用して、それぞれの細胞に発現している分子を比較したところ、Interleukin(IL)-18 受容体の補助サブユニットであり、IL18 受容体のリガンド結合サブユニット IL-18 receptor 1 の IL-18 結合活性を高める、IL-18 receptor (IL-18Rb)、主に、NK 細胞、T 細胞の表面に存在し、標的細胞の糖鎖を認識して結合し、標的細胞を傷害する、natural killer cell receptor P1A(NKRP1A) およびサルモネラ、抗酸菌などの細胞内寄生菌の重症化に関与している IFN- receptor 1 (IFNGR1) が T 細胞において高発現を示した。これら 3 分子について発現を、 T 細胞および T 細胞でフローサイトメトリーを用いて比較したところ、 T 細胞で発現が高くなっていた。さらに、サルモネラ感染症例、非サルモネラ感染性腸炎症例および正常コントロールでの比較でも、NKRP1A 陽性 T 細胞の割合は有意に高く、細胞内の IFN- の発現も亢進していたことから、NKRP1A 陽性 T 細胞はサルモネラ感染症の防御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

また、ヒトのサルモネラ感受性への関与が疑われる IFNGR1、IL-1、tumor necrosis factor、IL-12Rb1、IFNGR2、IL-1、vitamin D receptor 遺伝子多型解析を疾患群および健常群で行ったが、有意な結果は得られなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児感染症学

## 1. 研究開始当初の背景

わが国において、サルモネラ感染症は細菌性食中毒の原因微生物として最も多く、全体

の 40% 前後を占め、年間患者数は 1 万人を超える。また、胃腸炎にとどまらず、敗血症、チフスなどの全身型へ移行し、致死的となる

場合があることが知られている。サルモネラはグラム陰性の細胞内寄生菌であり、マクロファージ内で増殖することが可能である。

サルモネラ感染症発症には、主に初期免疫に関与している T 細胞が増加傾向にあることが知られている (Hara T et al. Predominant activation and expansion of V $\beta$ 9-bearing T cells in vivo as well as in vitro in Salmonella infection. J Clin Invest 1992; 90: 204-10)。

このことから、我々は、サルモネラ感染症発症の病態を明らかにするために、サルモネラ感染症例の血液から、陽性 T 細胞、

陽性 T 細胞を分離し、それぞれより抽出された mRNA より標識 cDNA を合成し、マイクロアレイを用いて各遺伝子の発現状況を比較した。

その結果、Interleukin(IL)-18 受容体の補助サブユニットであり、IL18 受容体のリガンド結合サブユニット IL-18 receptor 1 の IL18 結合活性を高める、IL-18 receptor (IL-18Rb)、主に、NK 細胞、T 細胞の表面に存在し、標的細胞の糖鎖を認識して結合し、標的細胞を傷害する、natural killer cell receptor P1A (NKR1A) などが T 細胞において高発現を示し、これらの分子がサルモネラ感染症発症に関与している可能性が示唆された。

サルモネラに対する感受性や全身型への進展を決定する宿主側因子については、これまで、マウスを用いた動物実験や重症/反復性サルモネラ感染症症例の遺伝子解析などによる検討が行われている。

マウスを用いた動物実験では、Toll-like receptor 4 をコードする *Tlr4*、食細胞の NADPH oxidase のサブユニットである p67-phox をコードする *Ncf2* がサルモネラ感染性に関与していることが明らかにされており、ヒトにおいても同様の関与が示唆される。

一方、我々は、これまでに、サルモネラ感染症患者において、血清中の Interferon (IFN)- $\gamma$ 、IL-12、IL-15、IL-18 の濃度が上昇しており、特に全身型感染症の患者で、著しい上昇を認めていることを報告した (Mizuno Y et al. Th1-inducing cytokines in Salmonella infection. Clin Exp Immunol 2003; 131: 111-7)。

これらの結果と、サルモネラが細胞内寄生菌であることを考えると、細胞内寄生性細菌の排除に重要な役割を果たす Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$ 、IL-12 およびそれらの受容体、T 細胞、NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を促

進する IL-18 およびその受容体、IFN- $\gamma$  受容体からのシグナルを伝達する signal transducer and activator of transcription (STAT)-1、IFN- $\gamma$ /IL-12 経路の新しいサイトカインである IL-23、IL-27 およびそれらの受容体などの遺伝子もサルモネラ感受性に関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

サルモネラ感染症症例 (全身型、胃腸炎型) の集積を行い、これらの検体を利用して、マイクロアレイの結果に基づいて、高発現を示した IL-18Rb、KLRB1 の発現を正常集団と比較することで、サルモネラ感染症発症における宿主側の感染防御のメカニズム解明をめざす。主にマクロファージの病原体認識に関わる Toll-like receptor 4、食細胞内殺菌に関わる NADPH oxidase の構成成分である p67-phox、および細胞内寄生菌の排除に関わる分子の遺伝子多型を正常集団と比較することにより、サルモネラ感染症発症に関わる遺伝的要因を明らかにする。

上記のように、サルモネラ感染症発症の病態および遺伝的要因を明らかにすることでサルモネラ感染症の予防や治療に役立てていきたいと考えた。

## 3. 研究の方法

サルモネラ感染症発症の病態解析  
マイクロアレイの結果に基づいて、高発現を示した IL18Rb、NKR1A およびサルモネラ抗酸菌などの細胞内寄生菌の重症化に関与している IFN- $\gamma$  receptor 1 (IFNGR1) の 3 分子について発現をフローサイトメトリーで測定した。

サルモネラ感染症発症に関連する宿主遺伝的要因の解明

ヒトのサルモネラ感受性への関与が疑われる候補遺伝子として挙げられる *Tlr4*、*Ncf2* およびサイトカインである IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-18、IL-23、IL-27 およびそれらの受容体、STAT-1 などに関して、これらの各遺伝子多型を PCR 法およびダイレクトシーケンシング法によってスクリーニングした後、PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法または、

PCR-single strand conformation polymorphism(PCR-SSCP)法を用いて多検体処理を行い、疾患群および健常群につき各多型の頻度を決定し、統計的に比較を行い相関の有無を検討した。

#### 4. 研究成果

前述の3分子について発現を、 $\gamma\delta$  T細胞および $\alpha\beta$  T細胞でフローサイトメトリーを用いて比較したところ、 $\gamma\delta$  T細胞で発現が高くなっていた。さらに、サルモネラ感染症例、非サルモネラ感染性腸炎症例および正常コントロールでの比較でも、NKRP1A陽性T細胞の割合は有意に高く、細胞内のIFN- $\gamma$ の発現も亢進していたことから、NKRP1A陽性T細胞はサルモネラ感染症の防御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

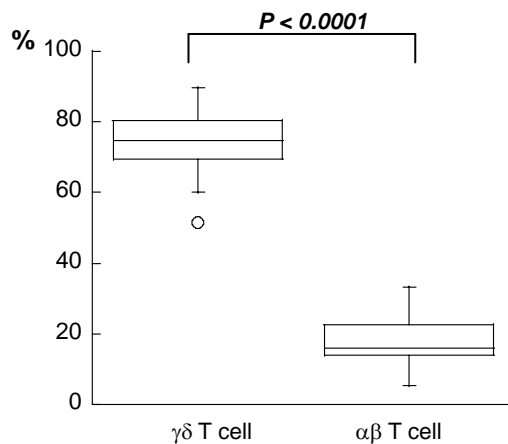


図1 サルモネラ感染症例の $\gamma\delta$  T細胞および $\alpha\beta$  T細胞におけるNKRP1A発現の比較

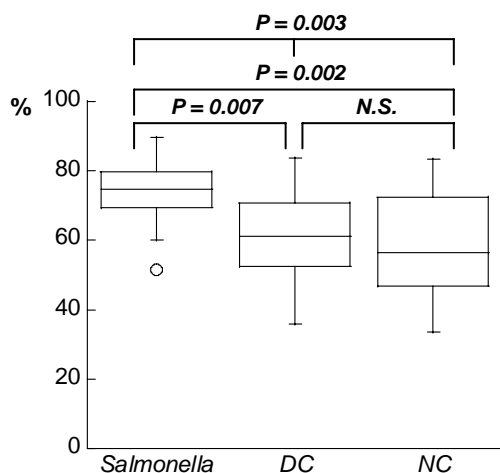


図2 サルモネラ感染症例、非サルモネラ性感染性腸炎症例(DC)および健常者(NC)由来のT細胞におけるNKRP1A発現の比較

また、ヒトのサルモネラ感受性への関与が疑われるIFNGR1、IFNGR2、IL-1、IL-12 receptor 1、tumor necrosis factor、vitamin D receptor遺伝子多型解析を疾患群および健常群で行ったが、有意な結果は得られなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

Hoshina T, Kusuha K, Ikeda K, Mizuno Y, Saito M, Hara T: High mobility group box 1 (HMGB1) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Kawasaki disease

Scandinavian Journal of Rheumatology 37 (6): 445-449, 2008 査読有

Hoshina T, Yamaguchi Y, Ohga S, Kira R, Ishimura M, Takada H, Tanaka T, Hara T:

Sjogren s syndrome-associated meningoencephalomyelitis: cerebrospinal fluid cytokine levels and therapeutic utility of tacrolimus

Journal of the Neurological Sciences 267 (1-2): 182-6, 2008 査読有

Hoshina T, Kusuha K, Saito M, Mizoguchi M, Morioka T, Mizuno Y, Aoki T, Hara T:

Infected subdural hematoma in an infant Japanese Journal of Infectious Diseases 61 (5): 412-4, 2008 査読有

〔学会発表〕(計1件)

サルモネラ感染症に対する $\gamma\delta$  T細胞の役割の検討-オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いた $\gamma\delta$  T細胞表面の分子発現の検討(第40回日本小児感染症学会、平成20年11月16日、名古屋)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

保科 隆之 ( HOSHINA TAKAYUKI )

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：30398078

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし