

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590506
 研究課題名(和文) リューシュマニア感染における慢性炎症によるリンパ組織破壊と免疫不全機構の解明
 研究課題名(英文)

研究代表者
 阿戸 学
 国立感染症研究所・免疫部・室長
 20392318

研究成果の概要：

内蔵リューシュマニア症は、*Leishmania donovani*によって起こる熱帯伝染病で、放置すると死に至る。有効なワクチンはなく、宿主免疫機構が感染の進行を阻止できない理由は未だ不明である。

本研究は、*L. donovani*感染マウスモデルを用いて、感染臓器のマクロファージとストローマ細胞をそれぞれ感染細胞と非感染細胞に分離精製し、慢性感染に伴う炎症によるリンパ組織破壊と免疫応答障害に関与する分子を同定する事を目的とした。

脾臓マクロファージに感染するが、脾臓ストローマ細胞に対する感染は認められない原虫株と、両細胞に感染する原虫を用いて、感染脾臓よりストローマ細胞を分離して遺伝子発現を比較した所、両細胞に感染能を有する原虫感染群においてのみ、ストローマ細胞のケモカインCCL19およびCCL21発現の減少が認められた。以上より、*L. donovani*のストローマ細胞直接感染によりT細胞免疫応答に必要なケモカインの産生を抑制し、免疫応答を障害していることが示唆された。

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	1,700,000	0	1,700,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000		3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：細胞・組織、免疫学、慢性感染、炎症、ストローマ

1. 研究開始当初の背景

内蔵リューシュマニア症は、原虫*Leishma*

*nia donovani*によって起こる熱帯伝染病で、感染は進行性であり、自然寛解はほ

とんどなく、放置すると死に至る。五価アンチモンによる治療が有効であるが、薬剤耐性原虫の増加、HIVとの重感染など、先進国においても重大な問題となりつつある(Sanders et al. Am J Trop Med Hyg. 2001 65:19341:774)。従って、病態メカニズムの理解に基づいた新規治療法の開発が望まれるが、宿主の免疫機構が感染の進行を阻止できない理由は未だ不明である。

我々は、これまでにヒトの病態をよく反映する*L. donovani*感染マウスモデルを用い、感染の進行に伴い、原虫は造血組織である脾臓と骨髄のマクロファージおよびストローマ細胞内で増殖することを明らかにした(Svensson et al. Immunity 2004)。また、感染の進行に伴い脾臓構築の異常とケモカイン等のストローマ細胞由来分子産生異常、および樹状細胞の分化異常が誘導されることを明らかにした(Engwerda et al. Am. J. Pathol 2002, Ato et al. Nat Immunol 2002)。さらに、慢性感染時に薬剤封入リポソームを用いて感染マクロファージを除去しても病態の改善は見られないことから(Ato et al. unpublished data)、リンパ組織内原虫感染ストローマ細胞の慢性炎症刺激による宿主免疫機構の障害が想定される。しかし、このようなストローマ細胞の機能修飾による免疫異常の分子機構についてはこれまで報告がない

2. 研究の目的

本研究は、*L. donovani*感染マウスモデルを用いて、慢性感染に伴う炎症によるリンパ組織破壊と免疫応答障害機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

L. donovani 感染で、リンパ組織障害に対するマクロファージおよびストローマ細胞の役割を探索するため、**Green fluorescent protein (GFP)**遺伝子導入原虫を作製しマウスに感染させる。次に、感染臓器のマクロファージとストローマ細胞を、それぞれ感染細胞と非感染細胞にセルソーターを用いて分離精製する。さらに、各分画の発現遺伝子を比較解析し、リンパ組織構築および免疫応答に影響を及ぼす宿主遺伝子発現変化をそれぞれの細胞間で、1)原虫感染によって誘導された遺伝子発現変化と、2)感染ではなく炎症によって誘導された遺伝子発現とに区別して、候補分子を同定することが可能である。これらの分子が目的遺伝子であるか否かは、In vitro または in vivo におけるリンパ組織構築と免疫反応に及ぼす影響を確認することで、明らかにすることが可能であると考えられる

4. 研究成果

感染細胞と非感染細胞の分離に必要なGFP導入*L. donovani*をマウスに感染させたが、親株と異なり、脾臓マクロファージへの感染は見られるものの、脾臓ストローマ細胞に対する感染は認められなかった。そこで、親株LV9 *L. donovani*感染脾臓と、GFP-LV9感染脾臓より、ストローマ細胞を分離してmRNAを抽出して遺伝子発現を比較した所、親株*L. donovani*感染群においてのみ、T細胞および樹状細胞を遊走させ、T細胞免疫

応答に関与しているケモカインCCL19 およびCCL21産生の減少が認められた。これらより、*L. donovani*のストローマ細胞直接感染により樹状細胞とT細胞の相互作用に必要なケモカインの産生を抑制し、免疫応答を抑制していることが示唆された。

CCL19およびCCL21の産生減少が、*L. donovani*感染防御免疫を抑制することは、以前に報告されており、(Ato et al. Nat. Immunol. 2002, Ato et al. J. Immunol. 2006)本研究はストローマ細胞への原虫の直接感染がケモカイン産生の抑制を誘導し、リンパ組織構築の障害を誘導することを明らかにし、慢性内臓リーシュマニア症に伴う免疫不全発症機構の解明につながる成果と考えられる。

(論文準備中) 今後、ケモカイン産生抑制が、ストローマ細胞障害に伴うか否かをin vitro感染系を用いて解析すると共に、他の発現分子においても解析を行う予定である。

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)

1. Chanchamroenl S, Kewcharoenwongl C, Susaengrat W, Ato M, Lertmemongkolchai G. Human Polymorphonuclear Neutrophil Responses to *Burkholderia pseudomallei* in Healthy and Diabetic Subjects. **Infect Immunity**. 2009 Jan;77(1):456-63.
2. Ato M, Ikebe T, Kawabata H, Takemori

T, Watanabe H. Incompetence of neutrophils to severe invasive group A streptococcus isolates is attributed to enhancing expression of plural virulence factors by null-function of a regulatory gene. **PLoS ONE**. 2008;3(10):e3455.

3. Mishima T, Iwabuchi K, Fujii S, Tanaka SY, Ogura H, Watano-Miyata K, Ishimori N, Andoh Y, Nakai Y, Iwabuchi C, Ato M, Kitabatake A, Tsutsui H, Onoé K. Allograft inflammatory factor-1 augments macrophage phagocytotic activity and accelerates the progression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. **Int J Mol Med**. 2008 Feb;21(2):181-7.

[学会発表] (計 1 件)

Ato M Host immune responses to *Leishmania donovani* infection: change from acute phase to chronic phase
16th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage 2007 平成19年6月15日 静岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿戸 学

国立感染症研究所・免疫部・室長

20392318

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者