

13. 尿中 LTE₄ と呼気 NO による小児気管支喘息の炎症状態の評価

ソロンゴ オロソー, 滝沢 琢己

荒川 浩一 (群馬大院・医・小児科学)

気管支喘息の気道炎症には、炎症細胞から放出されるロイコトリエン (LT) などの種々の炎症性メディエーターが関与し、尿中 LTE₄ は気道炎症のバイオマーカーとなりうる。一方、呼気中一酸化窒素濃度 (FeNO) も気道炎症の状態を反映するバイオマーカーとして注目されている。我々は症状が安定している学童期喘息児でのバイオマーカー測定の意義を明らかにする目的で、FeNO 値、尿中 LTE₄ や呼吸機能を検討した。群馬大学附属病院および関連病院に通院中で、C-ACT が 20 点以上の間欠～中等症の喘息児で同意の得られた 57 名 (平均年齢 11 歳 4 ヶ月, 男児 44 名) を対象にし、通常診療で行っている FeNO, 呼吸機能検査, 合併するアレルギー疾患, 治療内容および尿中 LTE₄ について検討した。コントロールされている小児喘息患者において、FeNO 高値群が少なからず存在した。これらの患児の FeNO 高値の理由は明らかではないが、興味深いことに尿中 LTE₄ と負の相関関係を認めた。一方、尿中 LTE₄ はヒスタミン H1 受容体拮抗薬投与群でより高値であり、アトピー合併喘息では高値となる可能性が示唆された。

14. 環境感知応答システムに依存した腸管出血性大腸菌 O157 のホスホマイシン抵抗性と炭素源獲得のトレードオフ

倉林久美子,¹ 平川 裕子,³ 谷本 弘一³

富田 治芳,^{2,3} 平川 秀忠¹

(1 群馬大・先端科学者育成ユニット)

(2 群馬大院・医・細菌学)

(3 群馬大院・附属・薬剤耐性菌実験施設)

ホスホマイシンは、大腸菌などによって惹き起こされる尿路感染症の治療薬として古くから用いられてきた。この抗菌薬の特徴は、グラム陰性、陽性問わず広範囲な抗菌スペクトルを持ち、さらに他の抗生物質と交叉耐性を持たないことが知られている。近年、これまで尿路感染症の治療薬として中心的に用いられてきた β-ラクタムやキノロン剤に対する耐性菌の広がりが問題となっていることから、ホスホマイシンの有用性が再検討されつつある。加えて、食中毒起因菌の一つである腸管出血性大腸菌 O157 の感染症に対して、ホスホマイシンの初期投与が溶血性尿毒症症候群 (HUS) の発症リスクを低下させるという報告もある。私たちは、大腸菌群とホスホマイシン抵抗性との関係を調べていた過程で、二成分情報伝達系が O157 のホスホマイシン抵抗性に関与していることを発見した。二成分情報伝達系は、細菌が保持し

ている環境感知応答システムであり、様々な環境変化を感知するセンサー蛋白質とセンサーからの情報に応じて下流の遺伝子群の発現を誘導する転写制御因子レスポンスレギュレーターからなる。私たちは、そのうちの一つ CpxAR (A がセンサーで R がレギュレーター) を不活性化させると O157 のホスホマイシンに対する抵抗性が増強することを見出した。ホスホマイシンはグルコース 6 リン酸とグリセロール 3 リン酸輸送体によって細胞内に取り込まれるが、CpxAR 不活性化株ではこれらの輸送体の発現レベルが大きく低下しており、そのためホスホマイシン取り込み能も低下していた。しかしこの株は、グルコース 6 リン酸とグリセロール 3 リン酸自体の取り込み能力も低下しているため、炭素源を上記の化合物とした最小培地では生育が遅延した。O157 はある種の環境変化に応じて、輸送体の発現量を変化させることにより、ホスホマイシン抵抗性と炭素源獲得のバランスをとっているのかもしれない。

15. SIRPα による脾臓 T 細胞の恒常性の調節

橋本 美穂,¹ 齊藤 泰之,² 金子 哲也²

大西 浩史,¹ 草刈 伸也,² 小谷 武徳³

村田 陽二,³ 岡澤 秀樹,³ 的崎 尚³

(1 群馬大院・保・生体情報検査科学)

(2 群馬大・生調研・バイオシグナル分野)

(3 神戸大学大学院医学研究科シグナル統合学分野)

SIRPα (Signal regulatory protein α) は、樹状細胞やマクロファージに発現する膜タンパク質であり、その細胞外領域のリガンドである膜タンパク質 CD47 と相互作用し、細胞間相互作用シグナル CD47-SIRPα 系を構成する。今回我々は、SIRPα 遺伝子改変 (MT) マウスの脾臓において、白脾髄の縮小と、CD4 陽性 T 細胞数の減少を見出した。さらに、脾臓 T 細胞領域の間質細胞が産生するケモカインである CCL19 および CCL21, サイトカインである IL-7 の遺伝子発現量の減少も見出した。同様の所見は、SIRPα のリガンドである CD47 のノックアウトマウスでも認められたことより、CD47-SIRPα 系が、T 細胞の恒常性維持に関与する可能性が考えられた。また、SIRPα の MT と野生型 (WT) マウスの間で骨髄キメラマウスを作成し解析したところ、MT の骨髄を移植した WT マウス (MT → WT) の脾臓では、WT の骨髄を WT マウスに移植したコントロールマウス (WT → WT) や WT の骨髄を移植した MT マウス (WT → MT) と比べて、リンパ濾胞の顕著な縮小がみられ、脾臓における CCL19, CCL21, CXCL13 および IL-7 の遺伝子発現量も有意に減少していた。つまり、血球側の SIRPα が T 細胞の恒常性維持に重要であることが示唆された。一方、

WT → MT マウスの脾臓でも CCL19 および CCL21 遺伝子発現量がコントロールマウスと比較して有意に低下していたことから、これらの発現調節には、非血球側の SIRP α も関与している可能性が示された。さらに、SIRP α MT マウスの脾臓のリンホトキシン (LT) リガンドやレセプターの発現減少、LT 刺激による下流シグナルの応答性の低下から、SIRP α は LT シグナルに関与し、ケモカインの発現調節を介して、T 細胞の恒常性維持に係わる可能性が考えられた。

16. 南米型トリパノソーマ感染細胞におけるオートファゴソーム形成と関連タンパク質の解析

高橋千由紀,¹ 畑生 俊光,² 嶋田 淳子¹

(1 群馬大院・保・生体情報検査科学)

(2 岡山大学大学院環境生命科学研究科)

Trypanosoma cruzi はシャーガス病をおこす寄生原虫で、世界で約 800 万人が感染しているが、本原虫の生物学的性質については不明な点が多い。これまでに、我々は本原虫感染細胞においてオートファジー関連タンパク質である LC 3 の発現が上昇することを見出した。オートファジーは細胞内のタンパク質分解や病原体排除機構として機能し、オートファゴソームという膜構造によって実行される。しかし本原虫感染細胞では原虫が排除されないことから、宿主オートファジーが正常に機能していない可能性がある。そこで我々はマーカータンパク質である syntaxin (Stx) 17 に着目し、原虫感染とオートファゴソーム形成との関連性を解析する目的として、本研究を行った。

【方法】 ヒト繊維肉腫細胞 HT 1080 を宿主として *T. cruzi* を感染させ、3 日後に感染および非感染細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、Alexa 標識抗 Stx 17 抗体と FITC 標識抗 LC 3 抗体とヘキスト 33342 で三重染色した。またグルコース飢餓によりオートファジーを誘導し、同様に三重染色し、蛍光顕微鏡による画像解析を行った。

【結果と考察】 定常状態の非感染細胞をコントロールとし、LC 3 と Stx 17 の蛍光強度を定量、比較した。LC 3 は定常状態、飢餓状態の感染細胞で顕著に蛍光強度が上昇した。一方、Stx 17 は飢餓状態の非感染細胞および感染細胞で蛍光強度が上昇したが、定常状態の感染細胞では顕著な上昇はみられず、LC 3 と異なる挙動を示した。LC 3 はオートファゴソームやその前段階である隔離膜に局在するため、感染細胞では隔離膜およびオートファゴソームが増加していると考えられる。一方、Stx 17 は隔離膜には局在せず、完全なオートファゴソームのみに局在するため、感染細胞では隔離膜は増加したが、完全なオートファゴソームの形成が抑制されているのではないかと考えられる。

17. ネズミマラリア感染臓器におけるスカベンジャー受容体の発現解析

宮下 大地,¹ 畑生 俊光,² 嶋田 淳子¹

(1 群馬大院・保・生体情報検査科学)

(2 岡山大学大学院環境生命科学研究科)

熱帯熱マラリアは早期に適切な治療が行われない場合、重症化し患者は死亡する。この重症化の理由の 1 つとして、宿主血管内皮細胞に原虫感染赤血球 (pRBC) が接着し血管を閉塞することが知られている。我々はこの接着反応に関与する宿主側分子としてスカベンジャー受容体 (SR) に着目した。今回、ネズミマラリア感染モデルを用いて、各臓器における SR の遺伝子発現および組織局在の解析を行った。

【方法】 マウス (C57/BL6) にネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA (PbANKA) を感染させ、感染 0, 3, 7 日目に脳、心臓、肺、肝臓、脾臓を摘出した。これらの臓器から RNA を抽出、RT-PCR とリアルタイム PCR 法で SR-A, SRCL, MARCO, CD36 の 4 種類の SR について遺伝子発現を解析した。また、臓器から凍結組織切片を作製、レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法で血管と周囲組織を収集し、組織での遺伝子発現解析を行った。同時に免疫蛍光染色法を用いて SR の組織局在解析を行った。**【結果・考察】** pRBC に対する主要接着因子である CD36 遺伝子はすべての臓器で恒常的な発現が観察された。SR-A, SRCL, MARCO はマラリア原虫感染により肺、肝臓、脾臓で遺伝子発現が上昇し、特に肝臓で MARCO の遺伝子発現上昇が顕著であった。LMD 法では、MARCO は感染 7 日目の肺と肝臓の実質組織で遺伝子発現が上昇し、脾臓の血管で遺伝子発現の上昇が観察された。免疫蛍光染色法でも MARCO は感染 7 日目の肝臓実質組織で発現が見られた。肺では肺胞壁で血管内皮およびマクロファージに発現しており、脾臓では白脾髄で血管内皮細胞に、赤脾髄でマクロファージに発現が観察された。以上より、SR 遺伝子は臓器の種類によって、発現に違いが認められた。特に MARCO は、臓器内の発現組織により、担う役割が異なると推察される。