

厚生科学研究費補助金（新興、再興感染症研究事業）

分担研究報告書

*Mycobacterium bovis* BCG 由来の DNA-rich フラクシオン (MY-1) の IFN- $\gamma$  産生誘導機構に関する研究

分担研究者：光山正雄（京都大学大学院医学研究科微生物感染症学教授）

研究要旨

*Mycobacterium bovis* BCG 由来の DNA-rich フラクシオンである MY-1 は NK 細胞を活性化し、宿主感染防御に重要な IFN- $\gamma$  産生を誘導することが報告されている。我々は、正常 C3H/He マウス脾細胞を MY-1 で刺激する系でこの IFN- $\gamma$  産生のメカニズムを解析した。正常マウス脾細胞を MY-1 で刺激すると、強い IFN- $\gamma$  産生が認められた。しかし NK 細胞を除去すると、この IFN- $\gamma$  産生は著しく弱くなった。また、Sephadex G-10 カラムを通し、脾細胞からマクロファージを除去すると IFN- $\gamma$  産生はほとんど認められなくなった。サイトカインに対するモノクローナル抗体を用いて各種サイトカインの IFN- $\gamma$  産生誘導への関与を調べたところ、IL-1 $\alpha$  や TNF $\alpha$  に比較して IL-12 および IL-18 が重要であることが示された。また、IL-12 および IL-18 ノックアウトマウスの脾細胞を MY-1 で刺激し、その IFN- $\gamma$  産生を調べた結果、コントロールマウスに比較して著しく弱いことが確認された。以上の結果から、MY-1 刺激による NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生にはマクロファージが必要で、MY-1 刺激を受けたマクロファージが IL-12 および IL-18 を産生し、それらサイトカインの刺激を受けて NK 細胞が IFN- $\gamma$  産生することが示された。

A. 研究目的

細胞内寄生菌の生菌をマウスに感染させると、感染初期に強い IFN $\gamma$  産生が認められる。しかし、この内因性 IFN $\gamma$  産生は非病原菌や死菌による免疫では認められない。また、生菌免疫する際に抗 IFN $\gamma$  抗体を同時に投与すると防御免疫の誘導が阻害されることから、感染初期に産生される IFN $\gamma$  が感染抵抗性 T 細胞の誘導に重要な役割を果たしていることを我々は示している。(1、2) 一方、MY-1 はマウス正常脾細胞を刺激して IFN $\gamma$  産生を誘導できることが報告されている。(3) 細胞内寄生菌に対する感染防御の誘導において重要な IFN- $\gamma$  産生を

積極的に誘導することは、感染抵抗性 T 細胞の分化誘導の亢進につながると考えられる。また、非特異的に IFN- $\gamma$  産生を誘導できる因子は、細胞内寄生菌に対する防御免疫誘導においてアジュバントとして機能すると考えられる。このような観点から、本研究では MY-1 の防御免疫誘導における immunomodulatory 活性について解析している。本研究報告書では、MY-1 刺激で誘導される IFN $\gamma$  産生のメカニズムをサイトカイン産生のレベルで解析した結果について報告する。

B. 研究方法

材料：MY-1 は国立感染症研究所の山本三郎先生より供与された。凍結乾燥した MY-1 を 10 mg/ml の濃度になるように PBS に溶解し、-80°C で保存した。リムルスカラー KY テスト（和光純薬、大阪）でこの MY-1 の LPS 濃度を測定した結果、0.5 EU/mg であった。細胞培養には RPMI1640 培地（GIBCO BRL, U.S.A.）に 10% 牛胎児血清、5 µg/ml ゲンタマイシン、5 mM hepes および  $2 \times 10^{-5}$  M 2-メルカプトエタノールを加えたものを完全培地として用いた。

マウス：雌性 C3H/HeN マウス（8 週令）、雌性 C3H/HeJ（8 週令）および雌性 C57BL/6 マウス（8 週令）は日本 SLC より購入した。また、IL-12 および IL-18 ノックアウトマウス（C57BL/6 バックグラウンド）は兵庫医大、岡村春樹先生より供与された。

IFN- $\gamma$  産生：マウス脾臓を無菌的に採取し、 $6.25 \times 10^6$  /ml の濃度になるように完全培地に懸濁した。48 穴組織培養用プレートにこの懸濁液 0.4 ml を入れ、100 µl の MY-1 で 24 時間刺激し、培養上清を回収した。上清中のサイトカインは EIA 法で測定した。また、マウス脾細胞を磁気ビーズで標識した抗 NK 細胞抗体 (DX5) で処理し、Magnetic cell sorter (MACS, Miltenyi, Germany) を通過させて NK 細胞を除去した。あるいは、Sephadex G-10 カラムを通過させて、付着性細胞を除去した細胞を MY-1 で刺激し、その IFN- $\gamma$  産生を調べた。

各種抗サイトカイン抗体を用いた IFN- $\gamma$  産生の抑制実験：C3H/HeN 脾細胞を MY-1 で刺激する系に抗 IL-1a 抗体（5 µg/ml）、

抗 IL-12 抗体（5 µg/ml）、抗 TNF- $\alpha$  抗体（1 µg/ml）（以上、Endogen、U.S.A.）あるいは抗 IL-18 抗体（2 µg/ml）（MBL、名古屋）を加え、それらサイトカインの IFN- $\gamma$  産生における関与を調べた。

### C. 研究結果

#### MY-1 の IFN- $\gamma$ 産生誘導能

正常 C3H/HeN マウス脾細胞を 10 あるいは 100 µg/ml の MY-1 で刺激したところ、強い IFN- $\gamma$  産生が認められた。この IFN- $\gamma$  の産生誘導は 1 µg/ml の MY-1 刺激でも認められたが、それ以下の濃度では誘導されなかった。（Figure 1）調製した MY-1 には微量の LPS の混入が認められた。グラム陰性菌の細胞壁成分である LPS は強力に IFN- $\gamma$  産生を誘導することができる。計算上細胞培養系に混入しうる LPS 濃度は、100 µg/ml の MY-1 で刺激した場合でも 0.05 EU/ml と非常に低く、この濃度では単独で IFN- $\gamma$  産生を誘導することはできない。しかし、MY-1 刺激で見られる IFN- $\gamma$  産生が MY-1 と LPS との相乗作用である可能性は否定できない。そこで、LPS-low responder strain である C3H/HeJ マウス脾細胞を MY-1 で刺激し、その IFN- $\gamma$  産生を調べた。その結果、C3H/HeN マウスの場合と同様に 10 および 100 µg/ml で刺激した場合に強い IFN- $\gamma$  産生が認められ、1 µg/ml の刺激でも有意な IFN- $\gamma$  産生が誘導された。（Figure 2）この結果、MY-1 による IFN- $\gamma$  産生誘導には LPS は関与しないことが明らかとなった。

MY-1 による IFN- $\gamma$  産生誘導における細胞間ネットワーク

MY-1 刺激で誘導される IFN- $\gamma$  の主な産

生細胞はNK細胞であることが示されている。そこで我々の実験系でも IFN- $\gamma$ の主要な産生細胞が NK 細胞であることを確認するため、C3H/HeN マウス脾細胞から NK 細胞を negative selection により完全に除去し、MY-1 で刺激して IFN- $\gamma$ 産生を調べた。脾細胞より DX5 陽性の NK 細胞を除去すると IFN- $\gamma$ 産生は著しく抑制された。

(Figure 3) また、DX5 陽性細胞のみを MY-1 で刺激しても IFN- $\gamma$ 産生は認められなかった。一方、この DX5 陰性細胞と DX5 陽性細胞を正常脾細胞に含まれる割合で混合した後 MY-1 で刺激したところ、IFN- $\gamma$ 産生のレベルの回復が認められたことから、この NK 細胞が主要な IFN- $\gamma$ 産生細胞であることが確認された。さらに、この IFN- $\gamma$ 産生は Sephadex-G-10 カラムを通過した細胞ではほとんど認められなかったことから、MY-1 で誘導される IFN- $\gamma$ 産生にはマクロファージの関与が必要となることが示された。

MY-1 による IFN- $\gamma$ 産生誘導に関与するサイトカイン

NK 細胞や T 細胞の IFN- $\gamma$ 産生誘導には種々のサイトカインが関与することが知られている。MY-1 による IFN- $\gamma$ 産生にはマクロファージが必要であることから、このマクロファージが産生するサイトカインが MY-1 刺激で誘導される IFN- $\gamma$ 産生に必須であると考えられる。そこで、C3H/HeN マウス脾細胞を MY-1 で刺激する系に各種サイトカインに対するモノクローナル抗体を加え、その IFN- $\gamma$ 産生を調べた。その結果、抗 IL-12 抗体を加えた場合の IFN- $\gamma$ 産生は抗体を加えていない場合に比べて 60 %程度に抑制された。(Figure 4) また、抗

IL-18 抗体を添加した系ではその産生はコントロールの 15 %程度に抑えられ、これら 2 種類の抗体を同時に添加するとその産生はさらに弱まることが示された。IL-1 $\alpha$  および TNF $\alpha$ の関与を調べるため同様の実験を行ったところ、IL-12 や IL-18 に比較して抗 IL-1 $\alpha$ 抗体および抗 TNF $\alpha$ 抗体では IFN- $\gamma$ 産生は抑制されないことがわかった。

(Figure 5) また、IL-12 および IL-18 の MY-1 による IFN- $\gamma$ 産生への関与を明確にするため、それぞれのノックアウトマウスの脾細胞を MY-1 で刺激し、その IFN- $\gamma$ 産生を調べた。その結果、コントロールマウスの IFN- $\gamma$ 産生に比較してノックアウトマウスの IFN- $\gamma$ の産生はいずれの場合も非常に弱いことがわかった。(Figure 6) 次に C3H/HeN マウス脾細胞を MY-1 で 24 時間刺激し、それらの産生量を調べた。その結果、強い IFN- $\gamma$ 産生が誘導される 10 あるいは 100 $\mu$ g/ml の MY-1 刺激では IL-12(p70)の産生が認められた。しかし、同じ培養上清中に IL-18 産生は検出することはできなかった。(Figure 7)

#### D. 考察

*M. bovis* BCG の DNA-rich フラクションである MY-1 は NK 細胞を活性化し、IFN- $\gamma$ 産生を誘導することが示された。Sephadex G-10 カラムを通し、マクロファージを除去すると IFN- $\gamma$ 産生がほとんど認められなくなるが、この操作で IFN- $\gamma$ の主要な産生細胞である NK 細胞の割合は変化しない。(4)また、この IFN- $\gamma$ 産生が抗 IL-12 および抗 IL-18 抗体により抑制されることから、脾細胞中に存在するマクロファージが IL-12 および IL-18 を産生し、NK

細胞からの IFN- $\gamma$  産生を誘導することがわかった。

近年、無脊椎動物の DNA が免疫系を活性化することが明らかにされ、その活性はメチル化されていない CpG モチーフと呼ばれる配列を有するオリゴヌクレオタイド (ODN) によることが明らかにされている。

(5) BCG 由来の DNA-rich フラクションである MY-1 の免疫賦活作用もこの CpG モチーフを含むパリンδροーム配列によることが徳永らによって明らかにされている。

(6、7) しかし、CpG モチーフを含む ODN による免疫担当細胞の活性化の機序については不明な点が多い。Stacey らは、マクロファージが細菌由来の DNA を取り込み、その DNA に存在する CpG モチーフが NF- $\kappa$ B のシグナルカスケードを活性化することを報告している。(8) また、Ballas らは、CpG モチーフを含む ODN は NK 細胞を直接活性化するのではなく、サイトカインを介して間接的にその細胞傷害性を高めていることを示している。(9) 我々が得た結果でも、NK 細胞による IFN- $\gamma$  産生誘導にはマクロファージが必要であることから、CpG モチーフを含む ODN による NK 細胞の活性化にはアクセサリ細胞としてマクロファージが必要で、この ODN によるマクロファージの活性化が引き金となって NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が誘導されると考えられる。NK 細胞の活性化あるいは、正常脾細胞からの IFN- $\gamma$  産生誘導に必要なサイトカインについて Halpern らは、IL-12 と TNF- $\alpha$  の重要性を示している。(10) 一方、Ballas らは IL-12、IFN- $\alpha/\beta$  および TNF- $\alpha$  を中和すると NK 細胞の細胞傷害性が抑制されることを報告しており、これ

らのサイトカインが NK 細胞の活性化に必要であることを示している。(9) また、我々は NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生誘導には IL-12 および IL-18 が重要であることを示した。実験条件の違いにより NK 細胞の活性化に要求されるサイトカインが異なるが、IL-12 はいずれの系でも共通してその必要性が示されていることから、このサイトカインが NK 細胞の活性化に最も影響する因子であると考えられる。我々の実験系では MY-1 刺激後の上清中に IL-18 を検出することができなかった。しかし、IL-18 ノックアウトマウスの脾細胞の IFN- $\gamma$  産生がコントロールマウスのそれに比べて著しく低いことから、IL-18 は NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生に重要な因子であり、IFN- $\gamma$  産生を誘導するためには IL-12 と微量の IL-18 の存在が必要になるのであろうと考えている。

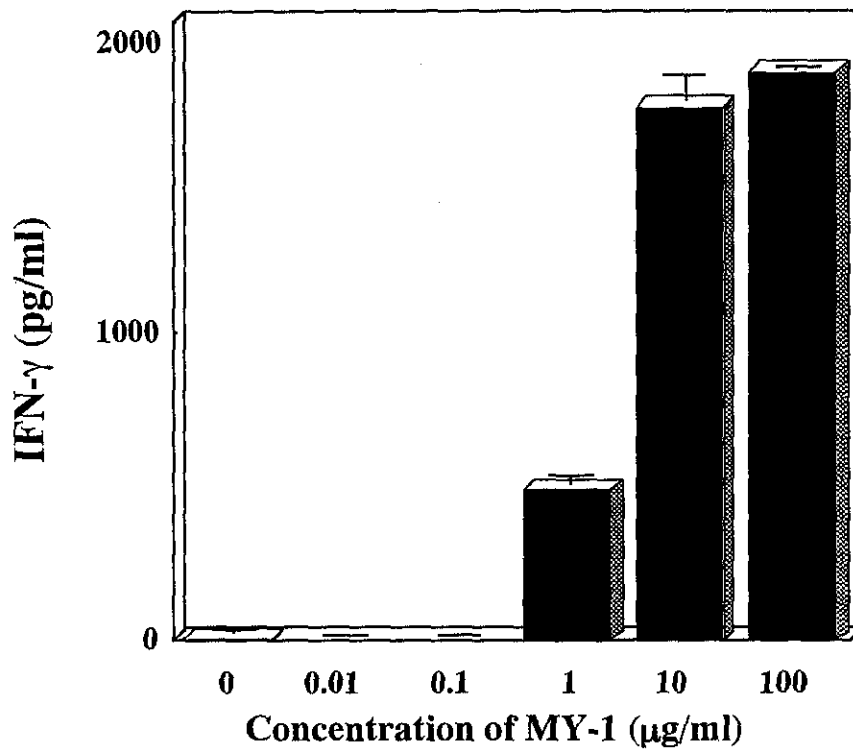
CpG モチーフを含む ODN は、細胞レベルでは B 細胞とマクロファージを直接活性化できる。(8、11) また、scavenger receptor や Mac-1 が ODN の binding site であることが報告されており、これらの分子が ODN による細胞の活性化に関与する可能性が示されている。(12、13) さらに現在、種々の DNA ワクチンの有効性が報告されているが、その効果の一部は CpG モチーフを含む ODN の免疫賦活作用によるものと考えられる。CpG モチーフを有する ODN による細胞の活性化のメカニズムは未だに明確ではないが、この点を明らかにし、積極的に応用することが可能になればより有効な DNA ワクチンの開発が可能になると考えられる。このような観点から、早急に CpG モチーフを含む ODN による免疫増強機序を解明しなければならないと考えている。

#### 参考文献

1. Yang, J., & Mitsuyama, M. An essential role for endogenous interferon- $\gamma$  in the generation of protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. *Immunology*, 91:529-535, 1997.
2. Yang, J., Kawamura, I., & Mitsuyama, M. Requirement of the initial production of gamma interferon in the generation of protective immunity of mice against *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, 65:72-77, 1997.
3. Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S., & Tokunaga, T. In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon- $\alpha/\beta$  and  $-\gamma$  with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79:866-873, 1988.
4. Nishibori, T., Xiong, H., Kawamura, I., Arakawa, M., & Mitsuyama, M. Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. *Infect. Immun.* 64:3188-3195, 1996.
5. Tokunaga, T., Yamamoto, T., & Yamamoto, S. How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 52:1-11, 1999.
6. Tokunaga, T., Yano, O., Kuramoto, E., Shimada, S., & Yamamoto, S. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol. Immunol.*, 36:55-66, 1992.
7. Kuramoto, E., Yano, O., Kimura, Y., Baba, M., Makino, T., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., & Tokunaga, T. Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83:1128-1131, 1992.
8. Stacey, K.J., Sweet, M.J., & Hume, D.A. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J. Immunol.*, 157:2116-2112, 1996.
9. Ballas, Z.K., Rasmussen, W.L., & Krieg, A.M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.*, 157:1840-1845, 1996.
10. Halpern, M.D., Kurlander, R.J., & Pisetsky, D.S. Bacterial DNA induces murine interferon- $\gamma$  production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cell. Immunol.* 167:72-78, 1996.
11. Krieg, A.M., Yi, A-K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., & Klinman, D.M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374:546-549, 1995.
12. Kimura, Y., Sonehara, K., Kuramoto, E., Makino, T., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., & Tokunaga, T. Binding of oligoguanylate to scavenger receptors is

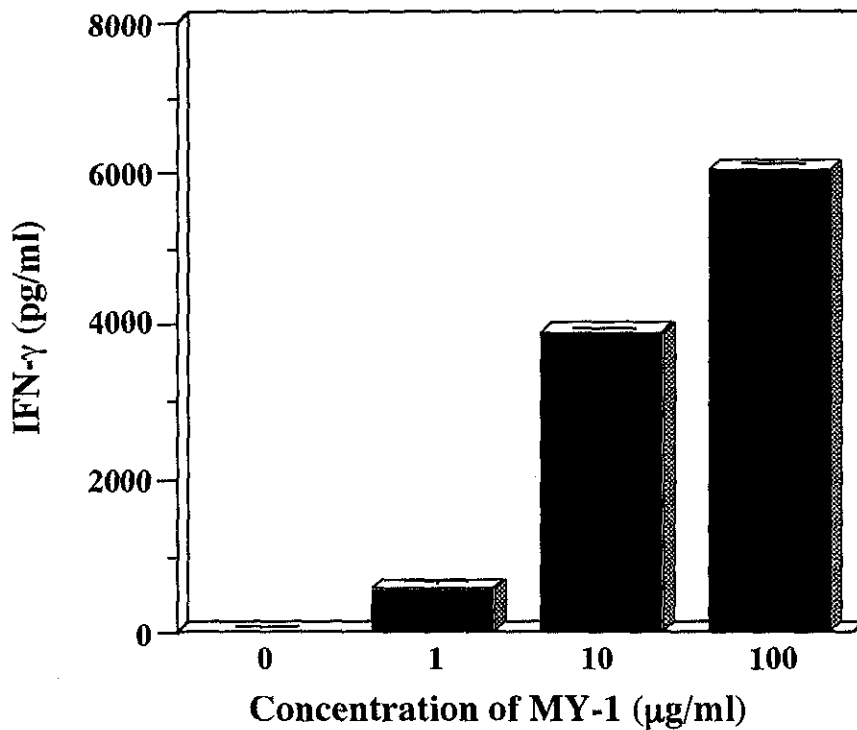
required for oligonucleotides to augment NK cell activity and induce IFN. *J.Biochem.*, 116:991-994, 1994.

13. Benimetskaya, L., Loike, J.D., Khaled, Z., Loike, G., Silverman, S.C., Cao, L., Khoury, J.E., Cai, T-Q., & Stein, C.A. Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein. *Nature Med.* 3:414-420, 1997.



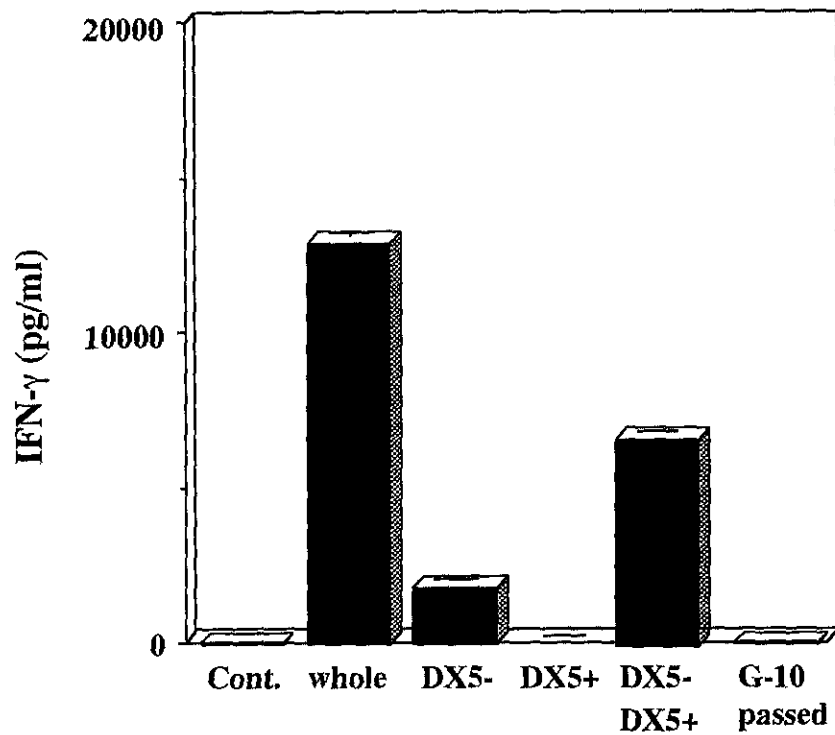
**Figure 1 IFN- $\gamma$  production of spleen cells after stimulation with MY-1**

Normal spleen cells were cultured with various concentrations of MY-1 for 24 h. The supernatant was collected and concentration of IFN- $\gamma$  was measured by EIA.



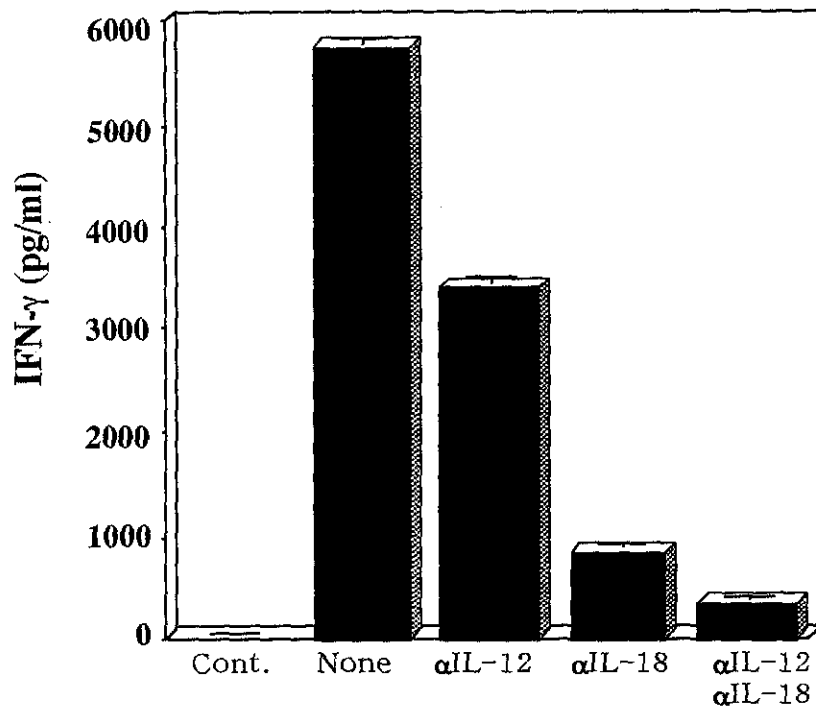
**Figure 2 IFN- $\gamma$  production of spleen cells of C3H/HeJ mice after stimulation with MY-1**

Normal spleen cells of C3H/HeJ mice were stimulated with MY-1. The supernatant was collected and concentration of IFN- $\gamma$  was measured by EIA.



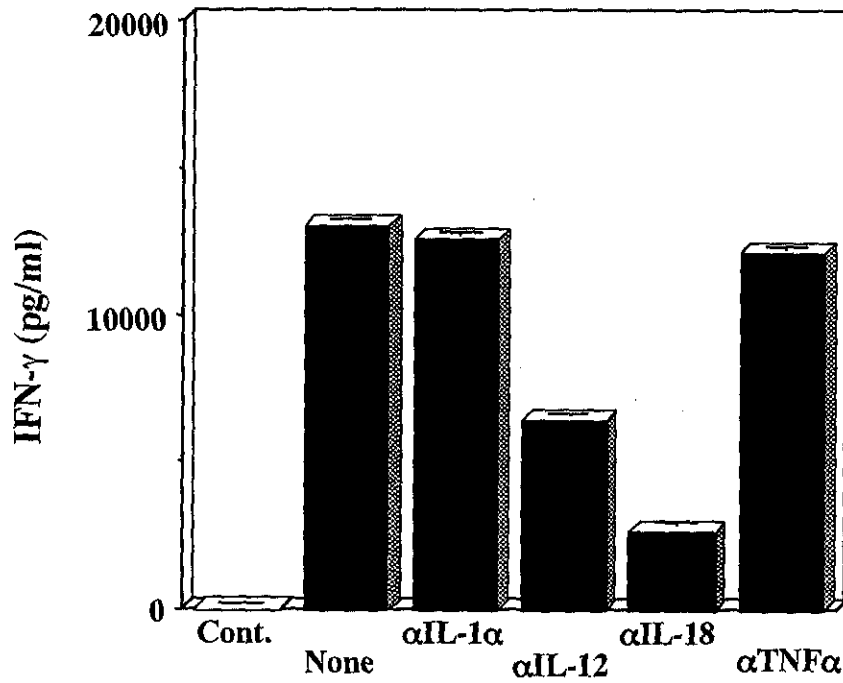
**Figure 3 IFN- $\gamma$  production of each spleen cell population after stimulation with MY-1**

Spleen cells were treated with anti-NK cell antibody (DX5) MicroBeads and passed through MACS. Alternatively, cells passed through Sephadex G-10 column were collected. Those cells were stimulated with MY-1 (10  $\mu$ g/ml) for 24 h.



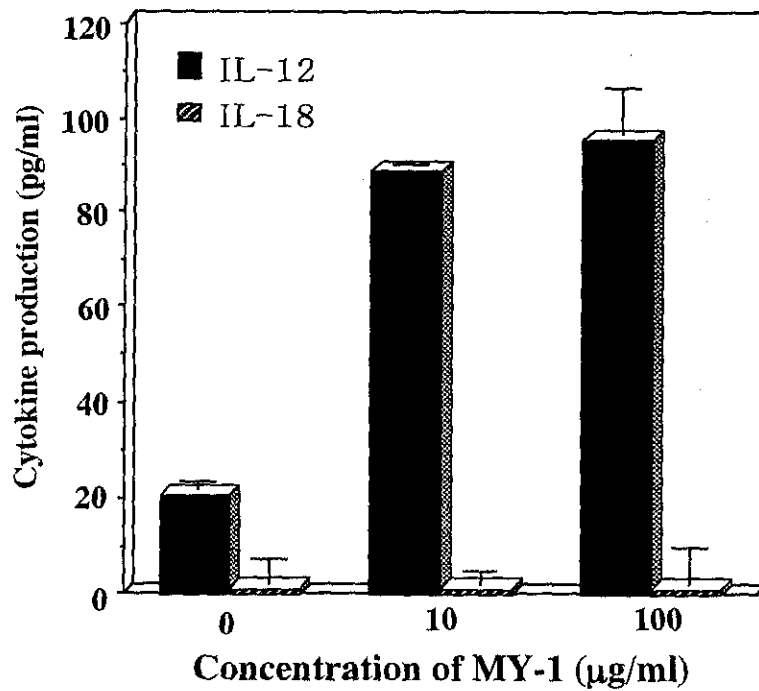
**Figure 4 Inhibition of IFN- $\gamma$  production by treatment with anti-IL-12 ( $\alpha$ IL-12) and anti-IL-18 antibodies ( $\alpha$ IL-18).**





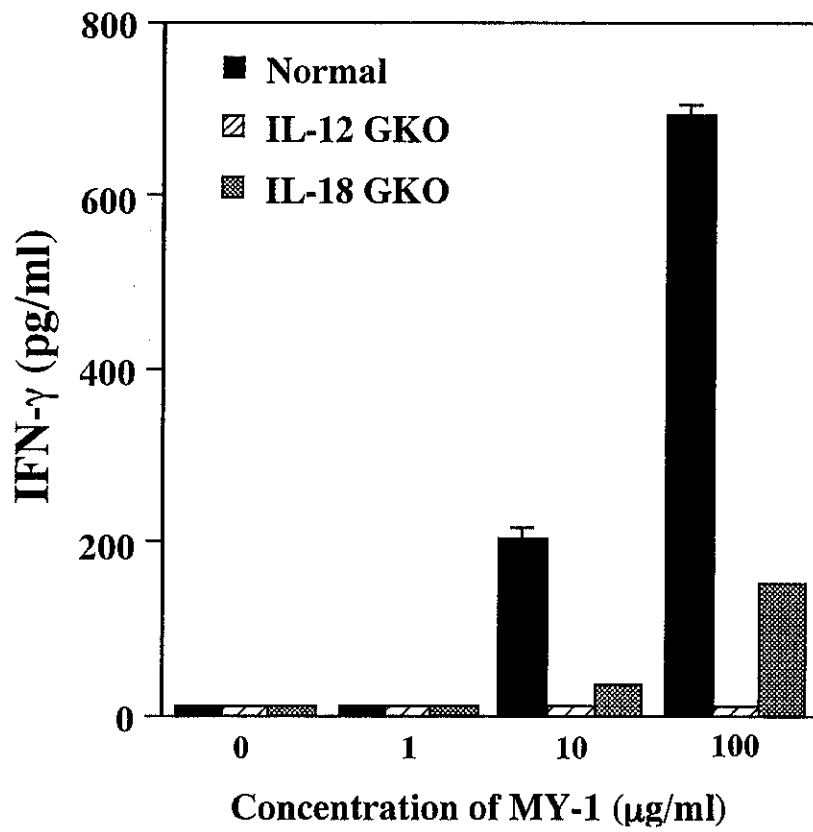
**Figure 5 Effect of antibodies to cytokines on MY-1-induced IFN-γ production**

Spleen cells were stimulated with 10 μg/ml of MY-1 in the presence of the antibodies. The supernatant was collected after 24 h and concentration of IFN-γ was measured by EIA.



**Figure 6 Production of IL-12 and IL-18 after stimulation with MY-1**

Spleen cells were stimulated with MY-1 for 24 h and the supernatant was collected. Concentration of IL-12 and IL-18 was measured by EIA.



**Figure 7** IFN- $\gamma$  production from spleen cells of normal C57BL/6, IL-12<sup>-/-</sup> (IL-12 GKO) and IL-18<sup>-/-</sup> (IL-18 GKO) mice after stimulation with MY-1