

Transplantation Now

発行 日本医学館

今日の 移植

2004 Vol.17 No.5
Japanese Journal of Medicine
隔月刊(1・3・5・7・9・11各月10日)通巻102号

5

別刷

執筆者名

所 属

論文タイトル

感染症と移植 PART 5

DNA ワクチンによる感染防御

小 出 幸 夫*

DNA vaccines in control of infectious diseases

DNA ワクチンは抗体のみならず、細胞性免疫を強力に誘導できることから、弱毒生ワクチンに代わる次世代のワクチンとして期待を集めている。感染症においては、結核菌などの細胞内寄生菌およびウイルスの慢性感染の防御には細胞性免疫が必須となるので、これらがDNA ワクチンの対象となる。本稿では、DNA ワクチンの接種法、免疫誘導機序、および最近関心を集めている感作/ブースト・ヘテロ免疫法について概説した。

Yukio Koide*

key words : DNA ワクチン, 遺伝子銃, 細胞内寄生菌, 細胞性免疫

ジェンナーは、牛痘に感染した乳しぼりの女性は天然痘に感染しないという事実ヒントを得、1796年5月に8歳の少年に牛痘を感染させた。これにより、この少年を天然痘の感染から防御することに成功した。世界最初のワクチンである。これに引きつづき、パスツールは、炭疽病、狂犬病、鶏コレラなどに対する弱毒生菌ワクチンの開発に成功した(1880年)。

パスツールはこれらの弱毒株を“ヴァクチン(ワクチン)”と名づけた。これはラテン語の雌牛を意味する“バッカ”からきており、ジェンナーが牛痘の膿を使ってはじめて予防接種方法を確立したことに敬意を払ったためであった。その後も多くのワクチンが開発され、人類はある種の感染症から逃れることができ、多大な恩恵を受けてきた。

7000年の長きにわたり人類を苦しめてきた天

然痘は、世界中から根絶されたことは周知のごとくである。これに引きつづきポリオも撲滅されつつある。このように、ある種の感染症に対してはワクチンの効果は絶大である。

1912年からの米国のCDC(Centers for Disease Control and Prevention)のワクチン接種前後の感染症発症率の比較によれば、ポリオ(急性灰白髄炎)に対する効果は100%、ジフテリア、麻疹、ムンプス、風疹に対する効果は99%以上、そして、百日咳に対する効果は97%以上である。しかしながら、エイズ、マラリアなどの危険な感染症に有効なワクチンはいまだ開発途上にある。また、結核の予防に使用されているBCGの成人における有効性は疑問視されている。

当初、まったく経験的につくられてきたワクチン(弱毒生ワクチン、不活化ワクチンなど)も免疫学の進歩により、感染防御免疫を成立させるのに必要な構成成分だけを抽出して作製した成分ワクチン(インフルエンザHA ワクチンなど)が開発されるまでに発達した。しかし見方を変えれば、現

*Department of Microbiology and Immunology, Hamamatsu University School of Medicine 浜松医科大学微生物学教室

表1 各種感染症におけるDNAワクチンの効果(実験動物)

病原体	DNA ワクチンがコードする抗原	抗体産生	CTLの誘導	感染防御
インフルエンザウイルス	NP, HA, M1	+	+	+
HIV	env, gag, rev	+	+	ND
ウシ・ヘルペスウイルス	gp	+	ND	+
狂犬病ウイルス	gp, NP	+	+	+
マラリア原虫	CSP	+	+	+
リーシュマニア	gp63	+	ND	+
結核菌	HSP65, Ag85	+	+	+
B型肝炎ウイルス	HBs, HBc	+	+	+
C型肝炎ウイルス	ヌクレオカプシド	+	+	ND
単純ヘルペスウイルス	gB, gD, ICP27	+	+	+
乳頭腫ウイルス	L1	+	ND	+
HTLV-I	env	+	ND	ND
リンパ球性脈絡膜炎ウイルス	NP	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	内毒素	+	ND	ND
肺炎マイコプラズマ	ND	+	ND	+
腸チフス菌	OmpC porin	+	ND	ND

ND: not determined

表2 DNAワクチンの臨床試験が行われている感染症

病原体	DNA ワクチンがコードする抗原	抗体産生	CTLの誘導
HIV(予防)	env, gag, rev など	+	+
HIV(治療)	env, tat, nef など	+	+
B型肝炎ウイルス(予防)	HBs	+	+
単純ヘルペスウイルス(予防)	gp, NP	+	+
インフルエンザウイルス(予防)	HA	解析中	解析中
マラリア原虫(予防)	スポロゾイト表面蛋白(CSP)	ND	+

ND: not determined

在では免疫応答機構が分子レベルで詳細に明らかにされているにもかかわらず、これらの知見はいまだワクチン開発に十分生かされていないともいえる。

HIV, C型肝炎ウイルス(HCV)などのウイルスの慢性感染, および抗酸菌, 原虫などの細胞内寄生体の感染に対する防御には, 細胞性免疫が必須である。しかし, 現在使用されているワクチンのなかで細胞性免疫を誘導するものはBCGのような弱毒生ワクチンに限られており, これはさまざまな副反応の可能性を秘めている。たとえば, 免疫不全の個体では重篤な感染症を起こしたり, ワクチン株の毒力復帰の可能性も排除できない。実際, ムンプスワクチンによる無菌性髄膜炎の副反応がわが国でみられたことは, まだ記憶に新し

い。

近年, DNAワクチンが抗体のみならず細胞性免疫を強力に誘導できることから, 弱毒生ワクチンに代わる有効で安全なワクチンとしての期待を集めている。

DNAワクチンは多くの興味ある発見と同様に偶然発見された。Wolffら¹⁾は, 発現ベクターをリポゾーム法で大腿四頭筋に導入し, 発現させることを試みた。このとき, コントロールとして発現ベクターのみ(naked plasmid)を筋注射したところ, 予想に反してこれが筋肉に発現ベクター由来の遺伝子発現を誘導した。この結果を受け, いくつかの研究グループがウイルス蛋白を発現するプラスミドをマウスに筋注射することで, そのウイルスに対する抗体のみならず細胞傷害性T細胞

(CTL)を誘導すること、およびこれにより感染防御能を誘導できることを示し^{2,3)}, DNA ワクチン開発の途が拓かれた。

DNA ワクチンの研究は感染症のみならず、当然、悪性腫瘍の分野でも行われているが、本稿では、感染症に関わる研究を表1に、臨床治験が行われているものを表2にまとめた。

上記したように、DNA ワクチンの特徴は細胞性免疫の誘導にあるので、細胞内寄生体感染、すなわち HIV、結核、マラリア原虫に関する研究が圧倒的に多い。主に米国で行われている臨床治験(表2)をみると、当然のことながら HIV を対象にした研究・治験が最も多いが、この分野で最近、“感作-ブースト”の工夫により強力な細胞性免疫を誘導できることが判明し注目されている(prime-boost heterologous immunization)。

DNA ワクチンによる免疫誘導の機序

DNA ワクチンの免疫誘導の機序はその接種法により異なる。接種法は大きくわけて、筋注法と遺伝子銃による経皮接種法がある。上記の DNA ワクチン法の発見の経緯より、一般的には筋注法が最も頻繁に採用されている。

マウスに筋注する場合は、大腿四頭筋または前頸骨筋に接種する。この場合、通常 bupivacaine (局所麻酔薬)またはカルジオトキシンを前投与したり、高張液(25% sucrose)にプラスミドを溶解して接種することで、プラスミドの宿主細胞へ取り込み効率を高める工夫をする。これらはいずれも筋肉を変性させる。その結果、筋細胞が再生する過程で DNA(プラスミド)をよく取り込むと考えられている。筋注法は一見簡単にみえるが、感作を成立させるにはテクニックを要し、また必ずしも毎回免疫を成立させられない。たとえば、筋繊維に平行に注射したほうが、直角に注射した場合よりも 200 倍プラスミドの取り込みがよい。

以上のように DNA ワクチンの筋肉内接種に際しては、注意深く行わないとよい結果は得られない。詳しくは、DNA Vaccine.com(<http://dnavaccine.com/>)を参照されたい。

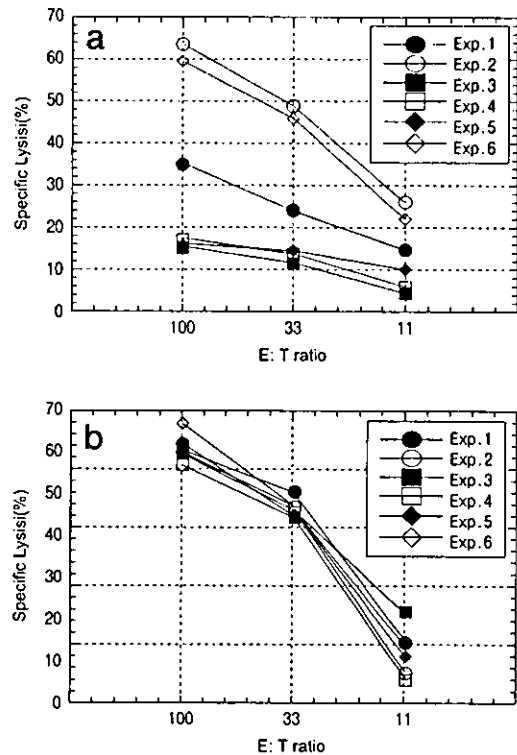


図1 筋注法と遺伝子銃法によって DNA ワクチンを免疫されたマウスの CTL 誘導活性の比較

BALB/c マウスに p91m(LLO91-99)DNA ワクチン 50 μg を 3 回筋注した(a)。また、遺伝子銃で同じ DNA ワクチンを 2 μg 遺伝子銃で接種した(b)。最終免疫 2 週後に免疫脾細胞を回収し、LLO91-99 で 5 日間試験管内刺激し、これをエフェクター細胞、LLO91-99 をパルスした J774 細胞(H-2^d)を標的細胞として、細胞傷害試験を行った。

遺伝子銃法では、金粒子(直径 1 μm)にプラスミドをコートし、高圧ヘリウムガスを用いて空気銃の要領で皮膚に撃ち込む。この場合、通常は剃毛したマウス腹部に接種する。すでによく知られている遺伝子銃法の長所は、筋注法に比較して、1/100 ~ 1/1000 のプラスミド量で同等の免疫を誘導できる点にある。一方、遺伝子銃は高価である点、また、誘導される細胞性免疫が 2 型ヘルパー T(Th2)細胞に限定される点が短所としてあげられる⁴⁾。

筆者らは、細胞内寄生菌である *Listeria monocytogenes*(以下、リステリア)の listeriolysin

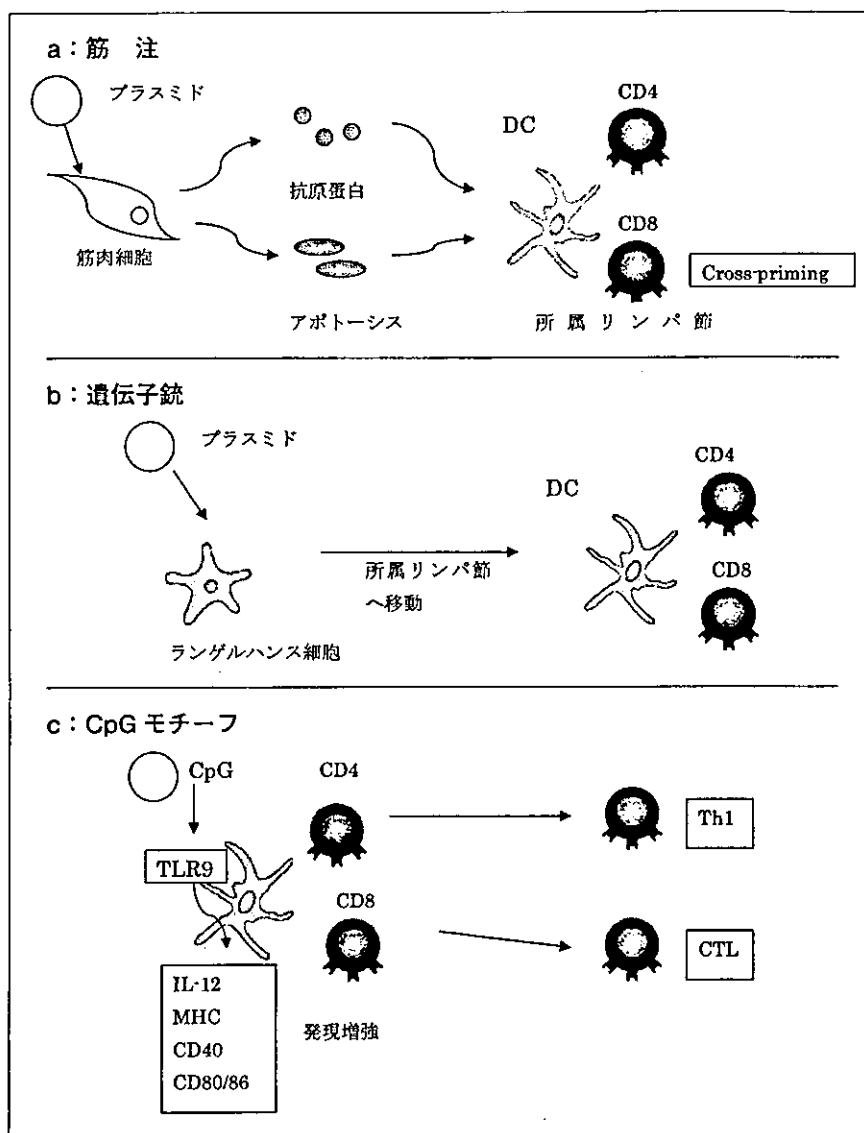


図2 DNA ワクチンによって誘導される細胞性免疫応答の機序

O(LLO)91-99を発現するプラスミドをBALB/cマウスに筋注法(50 μg)と遺伝子銃法(2 μg)で接種し、誘導されるCTL活性を測定した。図1にみられるように、筋注法では誘導されるCTL活性にばらつきが認められるのに対し、遺伝子銃法では安定して高い活性を持ったCTLが誘導できる⁹⁾。この免疫誘導の再現性がワクチンで最も重要であることは論を俟たない。したがって、筆者らは、もっぱら遺伝子銃によりDNAワクチンを接種している。

1. 筋注法による感作のメカニズム

筋注法を用いたDNAワクチンによる感作には、骨髄由来抗原提示細胞(APC)が重要な役割を担っていることが判明している(図2a)。

Conrら⁶⁾は、F1マウスに両親の骨髄を移植し、2種類のF1骨髄キメラマウスを作製した。これらのマウスにDNAワクチンを筋注したところ、誘導されたCTLは骨髄ドナーのH-2に拘束されていた。また、別の研究でDNAワクチンを筋注後、10分以内に筋注部の筋肉を切除しても免

疫応答は誘導されることが報告されている⁷⁾。さらに、筋肉細胞特異的な desmin 遺伝子のプロモーターの下流に HBs 遺伝子を挿入した発現プラスミドを筋注した場合、筋肉細胞でつくられた HBs は移入してきた APC (樹状細胞: DC) により取り込まれ、サイトメガロウイルス・プロモーターを用いた DNA ワクチンと同等の細胞性免疫を誘導できた⁸⁾。この際、興味あることに、Th 細胞のみならず、CTL も誘導でき、いわゆる“cross-priming”の現象が認められた。

このように、筋注では筋肉細胞、繊維芽細胞などに取り込まれたプラスミドはその細胞内で抗原蛋白を産生し、これを筋肉内に侵入してきた DC が取り込むか、アポトーシスを起こした抗原発現細胞を DC が取り込むかして、抗原は DC 内でいわゆる MHC クラス II 経路を介して、Th 細胞を感作すると考えられる。また、cross-priming の機序により CTL が誘導される。この cross-priming は DC に特異的で、他の APC には認められない。この現象は TAP-1/2 依存性であることが知られている。

DNA ワクチン(プラスミド)は、それ自身 CpG モチーフとよばれるアジュバント効果を示す塩基配列を持っている。すなわち、原核細胞の DNA は CpG の発現頻度が高く、しかもシトシンのメチル化は約 5% に抑えられている。これに対し、脊椎動物のゲノムでは CpG の発現頻度は抑えられており、しかもシトシンは 70~90% がメチル化されている。

このような分子的差異を認識し、DC、B 細胞、マクロファージなどは IL-12、TNF- α 、IFN- α/β などのサイトカインを産生し、MHC クラス II、CD80/86、CD40 の発現を増強する。この結果、Th 細胞は Th1 に誘導され、CTL の分化誘導を促すと考えられる(図 2c)。

合成オリゴ DNA を使った研究により、CpG モチーフとして機能する最適な配列は、マウスでは GACGTT、ヒトでは GTCGTT であることがわかった⁹⁾。また、ノックアウトマウスを使った研究により、CpG モチーフに対する細胞応答には Toll-like receptor (TLR) 9 が関係していることが判

明している¹⁰⁾。

2. 遺伝子銃法による感作のメカニズム

遺伝子銃による DNA ワクチンの接種では、表皮に存在する APC であるランゲルハンス細胞に直接 DNA ワクチンが導入されるため、ランゲルハンス細胞は成熟し所属リンパ節に移行し、副皮質で T 細胞に抗原提示をされると考えられる(図 2b)。

LC はもともと CC chemokine receptor (CCR) 6 を発現しているため、表皮ケラチノサイトが産生する CCR6 のリガンドである MIP-3 α により表皮にリクルートされる。しかし、いったん“danger signal”により成熟すると、ランゲルハンス細胞は CCR7 を発現する。このリガンドである MIP-3 β (および SLC) はリンパ節内の高内皮性小静脈に発現しているためリンパ節に移行する¹¹⁾。

遺伝子銃では Th2 細胞が選択的に誘導されることはすでに記した。この理由は、プラスミドが直接ランゲルハンス細胞に導入され、TLR9 による応答をバイパスするためと考えられている。

エプトープ DNA ワクチン

ウイルスの慢性感染(細胞内感染)、結核菌、レジオネラ、サルモネラなどの細胞内寄生菌による感染、原虫の感染に対する防御には抗体は無効であり、細胞性免疫の発動が必要となることはよく知られている。また、感染防御に必要な細胞性免疫の種類も病原体の寄生部位によって異なる。ウイルス、リケッチア、原虫などの細胞質内に寄生するものに対しては CTL が、結核菌、サルモネラ、レジオネラなどの食胞内に寄生するものに対しては Th1 が防御免疫として働くことが知られている。もちろん前述したように、食胞内に寄生した病原体に対しては cross-priming のメカニズムで、CTL も有効である。

これらの細胞性免疫の感染防御機構はどのようなものであろうか。

Th1 細胞は、マクロファージの殺菌能を IFN- γ などで高めることにより、食胞内に寄生した病原

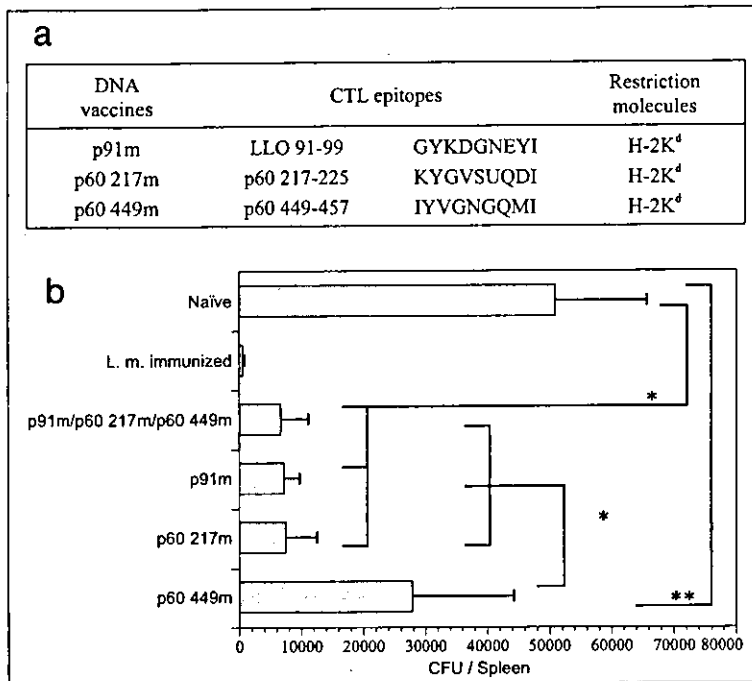


図3 リステリアに対する CTL 誘導型 DNA ワクチンとこれらによって誘導される感染防御能

a: リステリアの H-2K^d 拘束性 CTL エピトープとこれを発現する DNA ワクチン

b: 3 種の CTL 誘導型 DNA ワクチンによるリステリア感染防御能. リステリア感染 3 日後の脾臓における菌数 (CFU) を測定した.

Naïve: 非免疫マウス

L.m. immunized: リステリア生菌免疫マウス

*P < 0.01, **P = 0.02

(Yamada T et al., 2001¹⁶⁾より)

体を排除すると考えられている。CTL のウイルス感染細胞に対する効果については考えやすい。感染ウイルスの増殖の場である宿主細胞を破壊すれば、ウイルス核酸の複製およびウイルス構造蛋白の合成、およびそれらを集合しウイルス粒子をつくることは不可能となる。しかし、細菌の場合はどうであろうか。

感染細胞を破壊しても細菌は放出され、他の宿主細胞に侵入する可能性がある。CTL の有効性に対しては二つの可能性がある。一つ目は、CTL が産生する“グランニューライシン”が標的宿主細胞に移行し、細胞内寄生細菌を殺菌するという機構である¹²⁾。二つ目は、CTL により感染細胞を破壊することで、細菌を追い出し、食細胞に貪食、殺菌させる機序である。このどちらが生体内で実際に機能しているかについて、筆者らは現在イメージング解析で研究中である。

筆者らは、目的の病原体に応じて感染防御に必要な CTL または Th1 細胞を任意に感作できるエピトープ DNA ワクチンの研究を行った。エピトープ DNA ワクチンの利点はほかに、抗原全長をコードする DNA ワクチンよりも遥かに強い免疫

を誘導できること(これは抗原の細胞内プロセッシングをスキップし、効率よくエピトープのみをつくるためと考えられる)、および毒素を抗原として用いる場合も毒性を排除できるなどがあげられる。反対に欠点としては、MHC(HLA)タイプに応じたエピトープを用意しなければならず、煩雑な点がある。

エピトープ DNA ワクチンの研究を行うため、細胞内寄生菌としてリステリアを用いた。その理由は、この細菌の感染防御には CTL と Th1 細胞の両方が有効であるため、両細胞性免疫を誘導するワクチンの研究に適しているからである。リステリアは宿主細胞の食胞に入ると、LLO を分泌することにより食胞を破壊し細胞質へ移行する性質を持っている。このため CTL と Th1 細胞の両者が有効と考えられる。

1. CTL 誘導型 DNA ワクチン

CTL 誘導型 DNA ワクチンを作製するためには、防御抗原のうち MHC クラス I 結合性ペプチドを発現するプラスミドを構築すればよい。リステリアの防御抗原としては LLO, p60(murein

hydrolase), Mpl(metalloprotease) が知られている。筆者らは、図 3a に示すような H-2K^d 拘束性 DNA ワクチンを作製した。発現ベクターとしては、CMV プロモーター/エンハンサーを持つ pCI を用いた。

まず、筆者らが遭遇した問題は、細菌と哺乳類とのコドンの使用頻度の違いであった。p91 プラスミドで LLO91-99 をコードする DNA 塩基配列を野生型のもの(p91w)とコドンをマウス(哺乳類)に適合させたもの(p91m)を作製し、BALB/c マウス(H-2^d)に免疫したところ、コドンを適合させたものが CTL 誘導能にすぐれていることが判明した^{13,14)}。さらに、p91m は CD4⁺T 細胞非依存性に CTL を誘導することがわかった¹⁵⁾。

図 3a には、リステリアに対する 3 種の DNA ワクチンが示してある。これらを遺伝子銃で接種し、CTL 誘導能を比較したところ、p91m > p60 217m > p60 449m であった。この結果より、LLO91-99 が最も優勢なエピトープであり、p60 449-457 が劣勢エピトープであることが判明した。さまざまな実験結果より、各エピトープに対する CTL 間の干渉は存在しないことがわかった。

また、CTL 誘導能は感染防御能と一致したが、興味あることに、これら 3 種の DNA ワクチンを同時に免疫しても、その感染防御能は p91m 単独のものを超えなかった¹⁶⁾(図 3b)。このことは、CTL 誘導型ワクチンの場合、最も優勢なエピトープ単独で十分感染防御能が得られることを意味する。

2. Th 誘導型 DNA ワクチン

CTL 誘導型ワクチンは、CTL エピトープのコドンを宿主動物に適合させ、発現ベクターに挿入するだけで有効であった。これに対し、Th 細胞誘導型 DNA ワクチンの作製は困難を極めた。MHC クラス II 結合性の Th エピトープのみを発現するプラスミドでは Th 細胞をまったく感作できなかった。これは細胞質内でエピトープが発現するため当然の帰着であった。そこで、Th エピトープにシグナルシーケンスをつけ分泌型にし、MHC クラス II 経路に乗せることをもくろ

んだが失敗に終わった。最終的に不変鎖(Ii 鎖)をヴィーグルとして用いることで Th 細胞の感作に成功した。

不変鎖は粗面小胞体内で MHC クラス II 分子に会合しており、特にその CLIP 領域は MHC クラス II 分子のペプチド結合溝に結合している。そこで、筆者らは、この CLIP 領域を Th エピトープと置換し、エピトープを強制的にクラス II 分子に結合させることを計画した¹⁷⁾。図 4a に、Th 誘導型 DNA ワクチンの構造を示す。不変鎖(Ii p41)の CLIP 領域を H-2E^k 結合性の LLO215-226 に置換した。これを C3H/He マウス(H-2^k)に遺伝子銃で免疫したところ、IFN- γ を産生する特異的 Th1 細胞を誘導することができた¹⁸⁾。

この結果はある意味で予想と異なった。なぜなら、前述したように遺伝子銃による DNA ワクチンの接種は Th2 細胞を選択的に誘導することが知られているからである。筆者らは、DNA エピトープワクチンは抗原全長を発現するワクチンに比し、APC によって提示されるペプチド/MHC 分子の量が多いと考えている。T 細胞レセプターの強い刺激は、Th1 へのシフトを促すのかもしれない。この Th1 細胞誘導性に一致して、DNA ワクチン(pCI-mIip41-LLO215m)はリステリアに対する感染防御能をリステリア生菌免疫(*Listeria*)と同等のレベルまで誘導することができた(図 4b)。

3. 多エピトープワクチン(polyepitope vaccine)

前述したようにエピトープ DNA ワクチンの欠点は、各種 MHC(HLA)タイプに対応したエピトープワクチンを用意し、被接種者の HLA タイプを同定し、適応したワクチンを接種しなければならないという煩雑性にある。これを克服する方法として、多エピトープワクチンがある¹⁹⁾。

これは、各エピトープ DNA をタンデムに連結して発現ベクターに挿入したものである。この場合、各エピトープ間に酵素による切断を考慮した配列を挿入する方法、あるいはまったくこのことを考慮せずエピトープを直接連結する方法がある。また、多エピトープワクチンには、一定の MHC タイプに対応した各種ウイルスのエピトープ

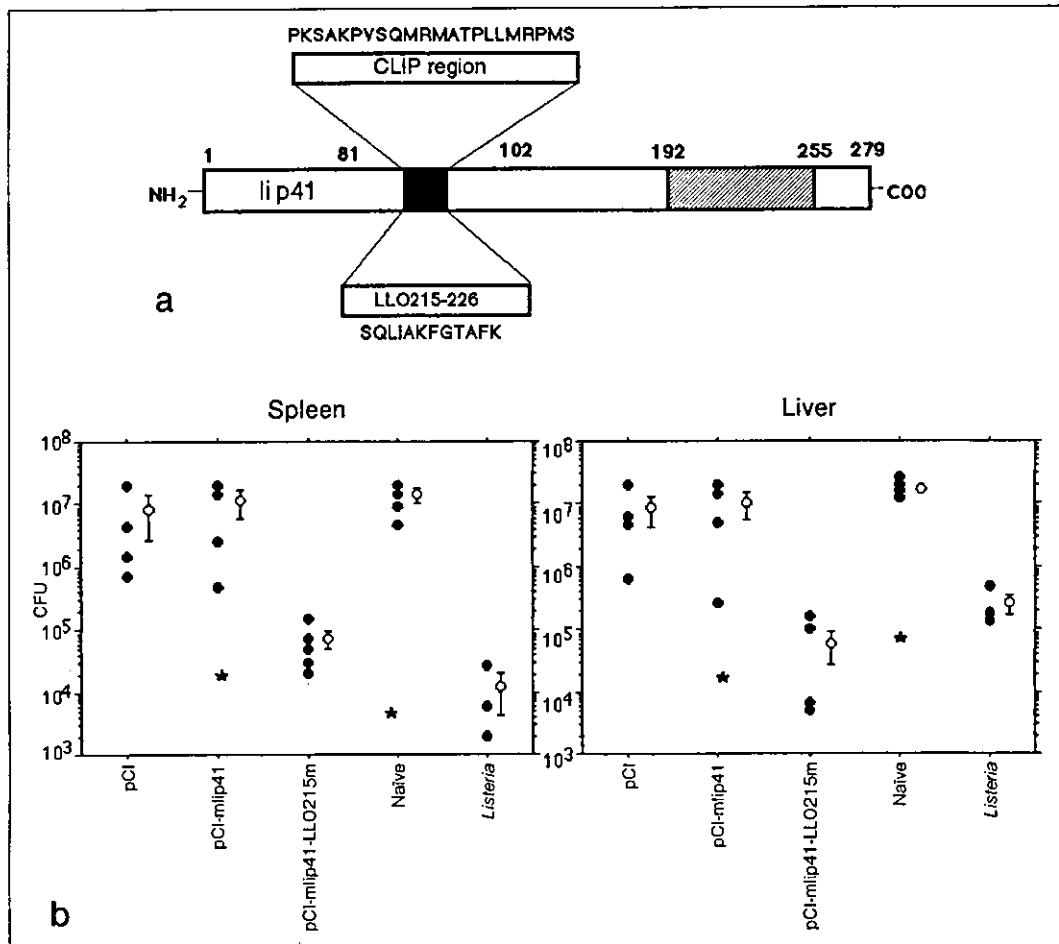


図4 Th 誘導型 DNA ワクチン

a: 不変(li)鎖の CLIP 領域を LLO215-226(H-2E^b 拘束性)に置換した DNA ワクチン(pCI-mlip41-LLO215m).
 b: この DNA ワクチンによるリステリア感染防御能の脾臓, 肝臓における誘導能.
 pCI: ベクター・コントロール. pCI-mlip41: 不変鎖ヴィーケルのコントロール.
 Naive: 非免疫マウス・コントロール. Listeria: リステリア生菌免疫

ブ DNA を連結して発現させる方法も報告されている。

4. エピトープ DNA ワクチンの改良

MHC 分子へのペプチドの結合親和性を高めるために, MHC 分子に対するアンカー残基を最適なものに置換する試みが行われている²⁰⁾. これを人工 T 細胞エピトープとよぶ. これとは逆に, T 細胞レセプターへの親和性を高め, T 細胞の反応性を高める試みも行われている²¹⁾.

前者の方法は MHC 分子のタイプによりアンカ

ー残基が判明しているため, 比較的容易に行うことができるが, 後者の方法は試行錯誤が必要であり, 簡単ではない。

リステリア弱毒株をキャリアとした抗結核 DNA ワクチン

DNA ワクチンを効率よく宿主細胞内へ導入するため, 細胞内寄生菌の弱毒株をキャリアとして用いる方法が試みられている. *Shigella flexneri*²²⁾ および *Salmonella typhimurium*²³⁾ の栄養素要求株に

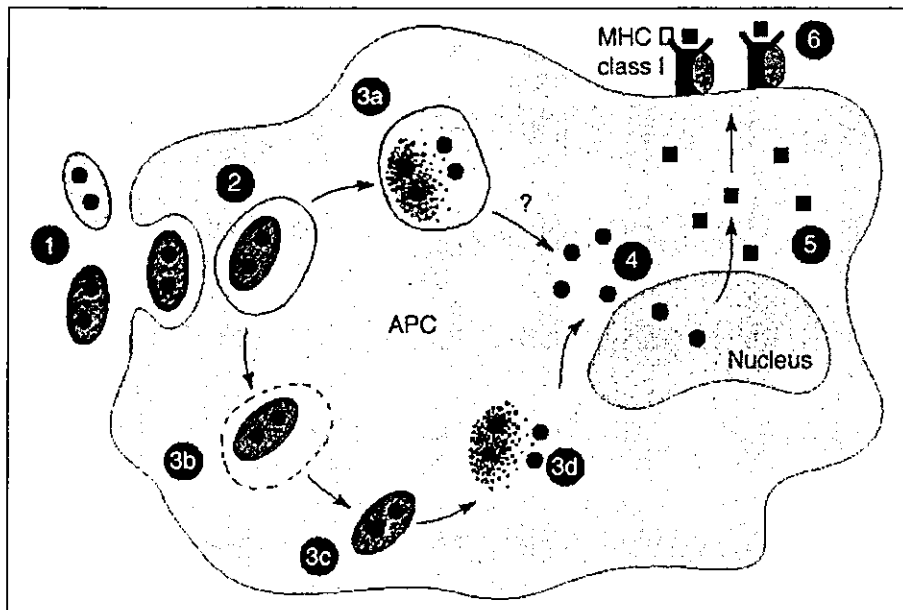


図5 細胞内寄生菌をキャリアとしたDNAワクチン
3aはサルモネラ, 3b, 3cはリステリア, 赤痢菌によるDNAワクチンの運搬経路を示す。

真核細胞の発現ベクターを使ったDNAワクチンを導入し、動物に接種するものである(図5)。

サルモネラをキャリアにした場合は、宿主細胞の食胞に取り込まれ、不明のメカニズムを介して細胞質内、そして核内に移行してDNAワクチンの遺伝子発現が行われると考えられる。一方、リステリア、赤痢菌は食胞から細胞質にエスケープする能力を持っているため、そこでDNAワクチンを放出すると考えられる。筆者らは、*S. typhimurium* をキャリアとしたDNAワクチンを作製したが、期待どおりの結果は得られなかった。

多くの *S. typhimurium* は宿主のAPCに取り込まれたのち、食胞内で壊れ、DNAワクチンを放出するため、転写、翻訳に支障をきたす可能性がある。また、グラム陰性菌をキャリアとして用いるとLPSがプラスミドからの蛋白合成を阻害する可能性がある。

そこで、筆者らは、グラム陽性細胞内寄生菌であるリステリアの弱毒株をキャリアとして、DNAワクチンを宿主細胞(APC)内に導入することを計画した。リステリアは食胞から細胞質内へ

移行することから、キャリアとしての効率がよいと考えられる。弱毒リステリア株としては、レシチナーゼ・オペロン(*mpl, actA, plcB*)を欠失した弱毒リステリア株を用いた。これにリステリア溶菌性ベクター(リステリアに対するファージのリジン遺伝子(PLY118)の上流に *actA* プロモーターを配したプラスミド)に結核菌の主要な分泌抗原であるAg85A, Ag85B, MPT51をコードする遺伝子を挿入し、エレクトロポレーションで導入した。この組換えリステリア株をC57BL/6マウスに腹腔投与したところ、結核菌特異的Th1細胞の誘導に成功した²⁴⁾。

また、重要なことに、これらのワクチンはどれも結核菌に対する感染防御能も誘導できた。特に、MPT51が主要防御抗原であることは筆者らがはじめて確認した。このワクチンは経口投与可能で、結核菌の感染防御に重要と考えられる粘膜ホーミング性T細胞($\alpha4\beta7$ インテグリン陽性)の誘導に有効である可能性もある。前述のとおり、結核に対する生菌ワクチンであるBCGはその有効性について議論があり、米国では使用されていない。BCGの有効性について一致した見解は、

小児期の有効性と血行転移(粟粒結核)の阻止のみである。したがって、BCGよりも有効なワクチンの開発は重要な課題の一つである。

組換えレトロウイルス導入 DC ワクチン

DCは、ナイーブT細胞を有効に感作するプロフェッショナルAPCである。DCにペプチドをパルスして免疫する試みは、腫瘍免疫の分野で盛んに行われている²⁵⁾。

筆者らはこれをさらに改善するため、抗原遺伝子をレトロウイルスでDCに導入し、効率よく抗原提示を行うDCの作製法を確立した。プラスミドpMXとパッケージ細胞株Phoenixを用いてリステリアのCTLエピトープLLO91-99を発現するレトロウイルスを作製した。これをBALB/cマウスの骨髄由来DCに感染させ、マウスに経静脈的に投与した。筆者らの方法によるレトロウイルスのDCへの導入効率は、30～40%であった。この免疫法で誘導されるCTL活性および感染防御能は、DNAワクチンによるものより強力であることを証明した²⁶⁾。

感作-ブースト・ヘテロ免疫法

DNAワクチンで最近最もホットな話題は、感作-ブースト・ヘテロ免疫法である。これは感作とブーストを異なったベクターで行う方法である²⁷⁾。これにより、同じワクチンで感作-ブーストを行った場合に比し、約50～100倍のCTL活性を誘導できる。この方法は主に、HIV²⁸⁾、マラリア原虫²⁹⁾感染に対するワクチン研究で実施されている。

通常DNAワクチンで感作したのち、組換えワクシニアウイルス(MVA: modified vaccinia Ankara. Ankara株は高度に弱毒化したワクシニア)でブーストが行われる。ブーストに組換えfowlpox(鶏痘)ウイルスが使われる場合もある³⁰⁾。しかしながら、この逆、すなわち感作を組換えワクシニアで行い、ブーストをDNAワクチンで行った場合は、増強効果は認めない。HIV-1

またはSIV特異的組換えDNAワクチン-fowlpoxプロトコルでサルを免疫すると、強い細胞性免疫が誘導されサルにHIV-1またはSIVに対する感染防御能が賦与される³⁰⁾。

現在、HIV-1特異的組換えDNA-MVAプロトコルで臨床治験が行われており、①CTL誘導能、②CTLの持続期間、③HIV-1に対する感染防御能、④AIDS発症防御能について検討されている。

同様の方法で、エボラ出血熱ウイルスに対するワクチンの研究が行われている³¹⁾。サルに組換えDNA-アデノウイルスで免疫を行い、エボラウイルスをチャレンジ感染させると、感染が防御されたと報告されている。結核に対しても組換えDNA-MVA免疫が有効であることがマウスで証明されている。

粘膜ワクチン

多くの重要な感染症、すなわち気道感染症、腸管感染症、性器感染症などは粘膜を侵入門戸とする。したがって、これらに対する感染防御には粘膜免疫を誘導することが必須となる。

たとえば、HIVのウイルス複製は主に腸管粘膜で起こることがわかっている。このため、粘膜ホーミング型($\alpha 4\beta 7$)CTLの誘導がHIVの血中への播種を防ぐ意味で重要である。実際、マウスにHIVワクチンを粘膜接種したあと、HIVgp160を発現する組換えウイルスを粘膜チャレンジすると粘膜ホーミング性CTLによって感染が防御されることがわかっている。この場合、全身性CTLは粘膜感染を防御するには不十分であった。

粘膜免疫を誘導するため、DNAワクチンを粘膜接種、特に経鼻免疫する方法が試みられている。粘膜免疫のアジュバントとしてCT(cholera toxin)とLT(*E.coli* labile toxin)が知られている。これらをDNAワクチンの粘膜接種の際にアジュバントとして用いることができる。しかし、CTはLTに比しIL-12産生を抑制する作用があり、Th1誘導が必要な場合は適当ではないかもしれない。

表3 DNA ワクチンの効果増強戦略

a: サイトカイン, ケモカイン, 副刺激因子			
サイトカイン, ケモカイン, 副刺激因子	Th1	Th2	CTL
IL-2	+		
GM-CSF	+	+	+
IL-12	+	-	+
GM-CSF + IL-12	+	-	+
GM-CSF + IL-12 + TNF- α	+	+	+
IL-15		+	+
CD80 + IL-12	+		+
CD86 + GM-CSF + IL-12			+
CD80 + ICAM-1 + LFA-3 (TRICOM)	+		+
CD154	+		+
CXCL10(IP-10) + CCL7(MCP-3)	+	+	+
CCL3(MIP-1C)			+
CCL5(RANTES)			+

b: 免疫抑制回路の阻害		
阻害法	Th	CTL
抗 CTLA-4		+
抗 CD25	+	+
抗 CTLA-4 + 抗 CD25		+
IL-13R α 2-Fc		+

+ : 増強, - : 抑制, ブランク : 不明

前項の感作-ブースト・ヘテロ免疫で、ワクシニア-DNA ワクチンのプロトコールは免疫増強効果がないと記した。しかし、粘膜免疫を誘導するためには、最初組換えワクシニアで粘膜感作を行い、その後にDNA ワクチンでブーストをかければ強い粘膜細胞性免疫を誘導できるようである。

DNA ワクチン効果の増強

近年解明された免疫応答の分子機構に基づき、DNA ワクチンの効果を高めるさまざまな方法が考えられる。

DNA ワクチンでは、さまざまなサイトカイン、ケモカイン、副刺激因子を同じプラスミドで発現させたり、抗原との融合蛋白として発現させ、免疫効果を増強させることが可能である

(表3a)、GM-CSF, IL-12, TNF- α の組み合わせはCTLの誘導に効果的である。また、IL-15は記憶CTLを誘導することが知られている。副刺激因子に関しては、3種類、すなわち、CD80, ICAM-1(CD54), LFA-3(CD58)を同時に発現するTRICOMが作製されている。これはDCを“super APC”に形質転換できる。

DNA ワクチンの効果を増強する方法として、免疫抑制回路を阻害する方法も考えられる(表3b)。CTLA-4(CD152)が活性化T細胞に発現し、CD80/86をリガンドとしてT細胞に抑制シグナルを送ることはよく知られている。CD4⁺CD25⁺T細胞は抑制性T細胞として働く。また、NK T細胞が産生するIL-13は、IL-4R α /Stat6経路を介してマウスCD8⁺T細胞を抑制する。これら抑制回路を阻害することで、DNA ワクチンの効果を増強することも可能である。

おわりに

DNA ワクチンは、細胞内寄生体に対する感染防御に必要な細胞性免疫を誘導できることで注目されている。危惧される副反応として、① 抗DNA抗体の誘導と、② DNA ワクチンの宿主ゲノムへの取り込みによる発がんの危険性があげられるが、膨大な実験例にもかかわらず現在までこれらの現象は認められていない。

DNA ワクチンは生ワクチンに代わる安全なワクチンとして期待されているが、実際の免疫誘導能はこれまで生ワクチンを凌駕できなかった。しかし、最近“感作-ブースト・ヘテロ免疫法”の考案により、DNA ワクチンの臨床的役割が明確になりつつある。

文 献

- 1) Wolff JA, Malone R, Williams P et al.: Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. Science 247: 1465-1468, 1990.
- 2) Liu MA, Yasutomi Y, Davies ME et al.: Vaccination of mice and nonhuman primates using HIV-gene-containing DNA. Antibiot Chemother 48: 100-104, 1996.
- 3) Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE et al.: Heterologous protection against influenza by injection DNA encoding a

- viral protein. *Science* 259 : 1745-1749, 1993.
- 4) Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR: Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J Virol* 70 : 6119-6125, 1996.
 - 5) Yoshida A, Nagata T, Uchijima M et al.: Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses. *Vaccine* 18(17) : 1725-1729, 2000.
 - 6) Corr M, Lee DJ, Carson DA et al.: Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J Exp Med* 184 : 1555-1560, 1996.
 - 7) Torres CA, Iwasaki A, Barber BH et al.: Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol* 158 : 4529-4532, 1997.
 - 8) Delphine L, Zhenlin L, Maryline M et al.: Muscle-Specific Expression of Hepatitis B Surface Antigen: No Effect on DNA-Raised Immune Responses. *Virology* 260 : 74-83, 1999.
 - 9) Krieg AM: An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J Lab Clin Med* 128 : 128-133, 1996.
 - 10) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T et al.: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408 : 740-745, 2000.
 - 11) Charbonnier A-S, Kohrgruber N, Kriehuber E et al.: Macrophage Inflammatory Protein 3 Is Involved in the Constitutive Trafficking of Epidermal Langerhans Cells. *J Exp Med* 190 : 1755-1768, 1999.
 - 12) Stenger S, Rosat JP, Bloom BR et al.: Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cells. *Immunol Today* 20 : 390-394, 1999.
 - 13) Uchijima M, Yoshida A, Nagata T, Koide Y: Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *J Immunol* 161 : 5594-5599, 1998.
 - 14) Nagata T, Uchijima M, Yoshida A, Kawashima M, Koide Y: Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells: analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms. *Biochem Biophys Res Commun* 261 : 445-451, 1999.
 - 15) Yoshida A, Nagata T, Uchijima M, Koide Y: Protective CTL response is induced in the absence of CD4⁺ T cells and IFN- γ by gene gun DNA vaccination with a minigene encoding a CTL epitope of *Listeria monocytogenes*. *Vaccine* 19(30) : 4297-4306, 2001.
 - 16) Yamada T, Uchiyama H, Nagata T et al.: Protective CTL responses induced by DNA immunization against immunodominant and subdominant epitopes of *Listeria monocytogenes* are noncompetitive. *Infect Immun* 69(5) : 3427-3430, 2001.
 - 17) Nagata T, Higashi T, Aoshi T et al.: Immunization with plasmid DNA encoding MHC class II binding peptide/CLIP-replaced invariant chain (Ii) induces specific helper T cells *in vivo*: the assessment of Ii p31 and p41 isoforms as vehicles for immunization. *Vaccine* 20 : 105-114, 2001.
 - 18) Nagata T, Aoshi T, Suzuki M et al.: Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* by immunization with plasmid DNA expressing a helper T-cell epitope that replaces the class II-associated invariant chain peptide of the invariant chain. *Infect Immun* 70(5) : 2676-2680, 2002.
 - 19) Smith SG: The polypeptide approach to DNA vaccination. *Curr Opin Mol Ther* 1 : 10-15, 1999.
 - 20) Ruppert J, Sidney E, Celis R et al.: Prominent Role of Secondary Anchor Residues In Peptide Binding to HLA-A2.1 Molecules. *Cell* 74 : 929-937, 1993.
 - 21) Slansky JE, Rattis FM, Lisa F, Boyd LF et al.: Enhanced Antigen-Specific Antitumor Immunity with Altered Peptide Ligands that Stabilize the MHC-Peptide-TCR Complex. *Immunity* 13 : 529-538, 2000.
 - 22) Sizemore DR, Branstrom AA, Sadoff JC: Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270 : 299-302, 1995.
 - 23) Darji A, Guzman CA, Gerstel B et al.: Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* 91 : 765-775, 1997.
 - 24) Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim YH, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y : Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infect Immun* 72 : 2014-2021, 2004.
 - 25) Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M et al.: Murine dendritic cells loaded *in vitro* with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen *in vivo*. *J Exp Med* 183 : 317-322, 1996.
 - 26) Nakamura Y, Suda T, Nagata T et al.: Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* with dendritic cells retrovirally transduced with a cytotoxic T lymphocyte epitope minigene. *Infect Immun* 71 : 1748-1754, 2003.
 - 27) Ramshaw IA, Ramsay AJ: The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* 21 : 163-165, 2000.
 - 28) Allen TM, Vogel TU, Fuller DH et al.: Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from Rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *J Immunol* 164 : 4968-4978, 2000.
 - 29) Schneider J, Gilbert SC, Blanchard TJ et al.: Enhanced immunogenicity for CD8⁺ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 4 : 397-402, 1998.
 - 30) Kent SJ, Zhao A, Best SJ et al.: Enhanced T-Cell Immunogenicity and Protective Efficacy of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vaccine Regimen Consisting of Consecutive Priming with DNA and Boosting with Recombinant Fowlpox Virus. *J Virol* 72 : 10180-10188, 1998.
 - 31) Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE: Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 408 : 605-609, 2000.

INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

Evidence for the critical role of interleukin-12 but not interferon- γ in the pathogenesis of experimental colitis in mice

KOTARO TOZAWA,* HIROYUKI HANAI,[†] KEN SUGIMOTO,* SATOSHI BABA,[‡]
HARUHIKO SUGIMURA,[§] TAIKI AOSHI,[¶] MASATO UCHIJIMA,[¶] TOSHI NAGATA[¶]
AND YUKIO KOIDE[¶]

*First Department of Internal Medicine, [†]Department of Endoscopic and Photodynamic Medicine, [‡]Second Department of Pathology, [§]First Department of Pathology and [¶]Department of Microbiology and Immunology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan

Abstract

Background and Aims: The imbalance between helper T (Th)1/Th2 cytokines has been observed in human inflammatory bowel disease and various animal models. Because interleukin (IL)-12 and interferon- γ (IFN- γ) productions are known to be a hallmark of Th1-dominant intestinal inflammation such as 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis, we strictly addressed the roles of IFN- γ and IL-12 in the development of colitis, employing knockout mice with IFN- γ receptor (IFN- γ R) or IL-12 p40 gene disruptions and mice administered with neutralizing monoclonal antibodies (mAbs) against IFN- γ or IL-12.

Methods: To induce colitis, 2.5 mg of the hapten reagent TNBS in 50% ethanol was administered into the colon. Two milligrams of rat anti-mouse IFN- γ mAb, rat anti-mouse IL-12 mAb, or control rat IgG were administered intraperitoneally into mice before TNBS administration. Change in the body weight of mice was evaluated and the degree of inflammation of the colon of these mice was investigated histologically. Immunohistochemical and immunofluorescence analyses were performed to detect CD4⁺ T cells, macrophages and IL-12 in TNBS-induced colitis lesions. The profile of Th1 and Th2 cytokine expressions in colonic tissues was examined by cytokine-specific semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: Single rectal administration of TNBS developed significant colitis in IFN- γ R^{-/-} mice and anti-IFN- γ mAb-pretreated mice, as well as control wild-type mice. Conversely, administration of TNBS produced no signs of colitis in IL-12 p40^{-/-} and anti-IL-12 mAb-pretreated mice.

Conclusions: IL-12, but not IFN- γ , plays a pivotal role in the pathogenesis of TNBS-induced colitis.

© 2003 Blackwell Publishing Asia Pty Ltd

Key words: interferon- γ , interleukin-12, 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis.

INTRODUCTION

Inappropriate CD4 T cell response in mucosal immunity is considered the cause of two forms of inflammatory bowel disease (IBD); ulcerative colitis and Crohn's disease.^{1,2} CD4 helper T (Th) cells have been divided into two functionally distinct subsets; Th1 and Th2 cells, according to their cytokine profiles. Th1 cells primarily secrete interferon- γ (IFN- γ) and interleukin (IL)-2, while Th2 cells predominantly produce IL-4,

IL-5, IL-10, and IL-13. The difference in cytokines produced by Th1 and Th2 cells is believed to play a pivotal role in the development of IBD.¹ Accumulating evidence has suggested that Th1 cytokines predominate in Crohn's disease,^{1,3-5} whereas Th2 cytokines predominate in ulcerative colitis.¹

Recently, various animal models of chronic intestinal inflammation have been established.⁶⁻⁹ One of these models is based on the local exposure of murine colonic mucosa to the contact-sensitizing agent, 2,4,6-tri-

Correspondence: Dr Y Koide, Department of Microbiology and Immunology, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Hamamatsu 431-3192, Japan. Email: koidelb@hama-med.ac.jp

Accepted for publication 28 November 2002.

trobenzene sulfonic acid (TNBS),⁶ which is a covalently reactive compound that attaches to autologous proteins and stimulates a delayed-type hypersensitivity response to the hapten-modified self antigens.¹⁰ This TNBS-induced mouse model of chronic intestinal inflammation shows several features that are consistent with those observed in human Crohn's disease. First, both exhibit transmural and granulomatous inflammation with infiltrates of macrophages and T cells. Second, T cells responsible for both diseases secrete high amounts of Th1 cytokines such as IFN- γ , but low levels of Th2 cytokines such as IL-4. In addition, several mice in which the genes for IL-2, IL-10, or the α -chain of T-cell receptors are inactivated by homologous recombination have been shown to develop spontaneous colitis.⁷⁻⁹ An imbalance between Th1/Th2 cytokines has also been observed in these models.

IFN- γ production is considered to be a hallmark of Th1-dominant intestinal inflammation because IFN- γ may function in numerous ways to affect inflammation, such as augmenting the production of pro-inflammatory mediators by activated macrophages, influencing cell trafficking by regulating expression of adhesion molecules, and altering the permeability of the intestinal epithelial barrier.¹¹ The potential importance of this cytokine in the pathogenesis has been further suggested by the finding that neutralization of IFN- γ by using anti-IFN- γ monoclonal antibody (mAb) significantly attenuates colitis development in both young IL-10^{-/-} mice^{12,13} and *scid* mice reconstituted with naïve CD4⁺CD45RB^{high} T cells.¹⁴

As IL-12 has been shown to drive naïve CD4⁺ T cells to Th1 differentiation and IFN- γ production,^{15,16} a direct role for IL-12 in promoting T cell-mediated colonic inflammation was investigated in two different models of colitis. Neutralizing anti-IL-12 mAb has been demonstrated to abrogate TNBS-induced colitis^{6,17} and prevent 2,4,6-trinitrophenol-keyhole limpet hemocyanin-induced colitis in IL-2^{-/-} mice.¹⁸

Taken together, these reports suggest that both IL-12 and IFN- γ play pivotal roles in the pathogenesis of TNBS-induced and other Th1 cytokine-dominated inflammations. In the present study, we strictly addressed the role of IFN- γ and IL-12 in the development of TNBS-induced colitis, employing both mice with IFN- γ receptor (IFN- γ R) and IL-12 p40 gene disruptions, and mice administered with neutralizing mAbs against IFN- γ and IL-12.

METHODS

Animals

IFN- γ R^{-/-} mice and the wild-type littermates on the 129/Sv/Ev background were provided by the Institute of Molecular Biology, University of Zurich, Switzerland. IL-12 p40^{-/-} mice on the C57BL/6 background were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). C57BL/6 mice were purchased from Japan SLC (Hamamatsu, Japan). All mice were maintained under specific pathogen-free conditions in the animal

facilities of the Hamamatsu University School of Medicine, Japan, and handled according to the 'Rules of Animal Experimentation' and the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' of this university. Mice used were between 9 and 11 weeks of age.

Induction of colitis

To induce colitis, 2.5 mg of the hapten reagent TNBS (Sigma Chemical, St. Louis, USA) in 50% ethanol (to break the intestinal epithelial barrier) was slowly administered into the lumen of the colon via the catheter fitted onto a 1 mL syringe under pentobarbital anesthesia. The animals were then kept in a vertical position for 30 s. Control mice received 50% ethanol in phosphate-buffered saline (PBS) using the same technique described above. The total injection volume was 100 μ L in both groups. All mice were killed 7 or 8 days following the TNBS enema.

Grading of histological changes

Colons were histologically investigated on microscopic cross-sections. The histological changes were graded semi-quantitatively from 0 to 4 according to previously described criteria.⁶ Briefly, these were: 0, no signs of inflammation; 1, very low level; 2, low level of leukocyte infiltration; 3, high level of leukocyte infiltration, high vascular density and thickening of the colon wall; 4, transmural infiltration, loss of goblet cells, high vascular density and thickening of the colon wall.

Neutralization of interferon- γ and interleukin-12 *in vivo* with monoclonal antibodies

Hybridoma cell lines producing neutralizing rat anti-mouse IFN- γ mAb (R4-6A2) and anti-mouse IL-12 mAb (C17.8) were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and donated by the Wistar Institute (Philadelphia, PA, USA), respectively. Ascites were prepared in nude mice according to the standard procedure, and antibodies were purified using the E-Z-SEP purification kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Two milligrams of rat anti-mouse IFN- γ mAb, rat anti-mouse IL-12 mAb, or control rat IgG (Cortex Biochem, San Leandro, CA, USA) was administered intraperitoneally into mice 1 h before TNBS administration.

Histological or immunohistochemical analysis

For histological analysis, tissues were fixed in 10% formalin and paraffin-embedded tissue sections were stained with hematoxylin and eosin using standard techniques. For immunohistochemical analysis, tissues

were freshly frozen in Tissue-Tek optical cutting temperature (OCT) compound (Sakura Finetech, Tokyo, Japan). Five-micrometer cryostat sections were fixed in ice-cold acetone for 10 min and dried. To inactivate internal peroxidases, sections were incubated in 0.3% H₂O₂-PBS for 30 min, and washed with PBS. Sections were then incubated with biotin-conjugated rat anti-mouse CD4 mAb, GK1.5 (PharMingen, San Diego, CA, USA) or goat anti-mouse IL-12 p40 polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 4°C overnight. After washing with PBS, the sections were visualized with streptavidin-peroxidase (Organon Teknica Corp., West Chester, PA, USA) and diaminobenzidine (Sigma) for CD4 staining, or with Histofine Simple Stain MAX-PO (G) system (Nichirei Corp., Tokyo, Japan) for IL-12 p40 staining. The sections were lightly counterstained with hematoxylin.

The immunofluorescence staining of Mac-1 (CD11b) was performed as follows. Sections were incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse Mac-1 mAb (PharMingen) for 1 h at room temperature. After another washing with PBS, the sections were mounted in a Vectashield mounting medium (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA). A Zeiss Axiophot epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with an HBO 100-W/z mercury lamp was used.

Reverse transcription-polymerase chain reaction

This method has been described previously.¹⁹ Briefly, after extraction of total RNA from distal colon tissue by the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method,²⁰ the RNA was converted to cDNA using random hexonucleotides in 20 µL of reverse-transcription (RT) reactions and then used for PCR. The primer pairs used were as follows: β-actin sense, 5'-GCACCA CACCTTCTACAATGAG-3'; antisense, 5'-AAATAG CACAGCCTGGATAGCAAC-3'; IFN-γ sense, 5'-TC TGAGACAATGAACGCTAC-3'; antisense, 5'-GAAT CAGCAGCGACTCCTTT-3'; IL-4 sense, 5'-ACAGA GCTATTGATGGGTCT-3'; antisense, 5'-GTGATG TGGACTTGGACTCA-3'; IL-6 sense, 5'-TATGAAG TTCCTCTCTGCAA-3'; antisense, 5'-CTTTGTAT CTCTGGAAGTTT-3'; TNF-α sense, 5'-AGCCCAC GTCGTAGCAAACCACCAA-3'; antisense, 5'-ACAC CCATTCCTTCACAGAGCAAT-3'; TGF-β sense, 5'-TGAAACGGGAAGCGCATCGAA-3'; antisense, 5'-GTAACGCCAGGAATTGTTGC-3'; IL-12 p40 sense, 5'-GGGACATCATCAAACCAGACC-3'; antisense, 5'-GCCAACCAAGCAGAAGACAGC-3'.

Statistics

Statistical significance was determined by the Mann-Whitney *U*-test. *P*-values of <0.05 were considered significant.

RESULTS

Role of interferon-γ in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis

In order to clarify the role of IFN-γ in TNBS-induced colitis, we performed a TNBS enema on 129/Sv/Ev wild-type and IFN-γR^{-/-} mice. TNBS enema resulted in body weight loss in 129/Sv/Ev wild-type and IFN-γR^{-/-} mice (Fig. 1). Administration of 50% ethanol without TNBS showed little effect on body weight in both mice groups (Fig. 1). Consistent with these observations,

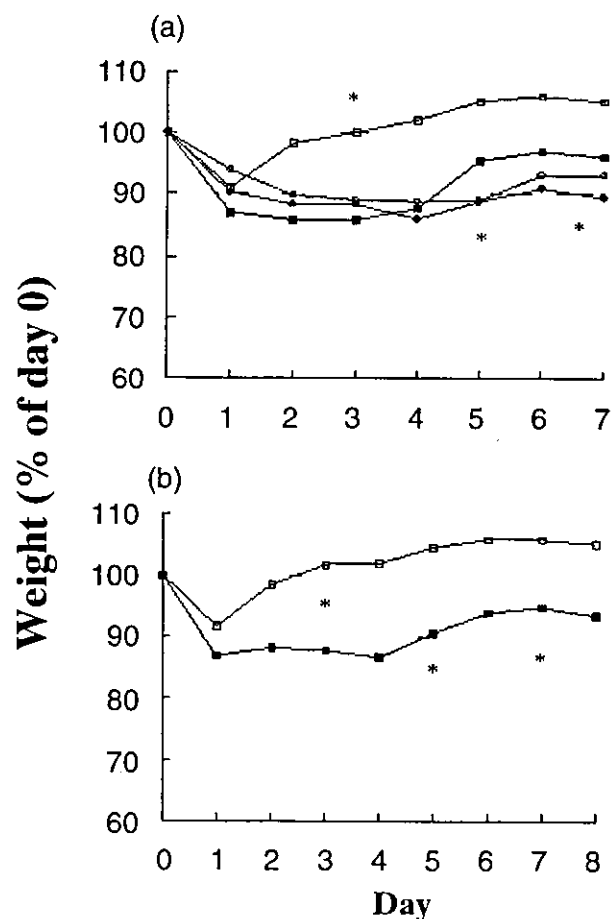


Figure 1 Wasting disease in 129/Sv/Ev wild-type and IFN-γR^{-/-} mice given a 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) enema. (a) 129/Sv/Ev wild-type mice were treated with TNBS in 50% ethanol (■) or 50% ethanol alone (□). Some mice were treated with TNBS after intraperitoneal administration of rat anti-mouse IFN-γ mAb (●), or rat IgG as a control (○). (b) IFN-γR^{-/-} mice were treated with TNBS in 50% ethanol (■) or 50% ethanol alone (□). The change in body weight over a 7 or 8-day period of observation was expressed as a percent of the original weight at the start of the experiment. Seven to 11 mice were used for each group. The data shown represent average values. The weights of mice treated with ethanol alone were significantly higher than those of other groups on day 3, 5, and 7 (indicated by *; *P* < 0.01).

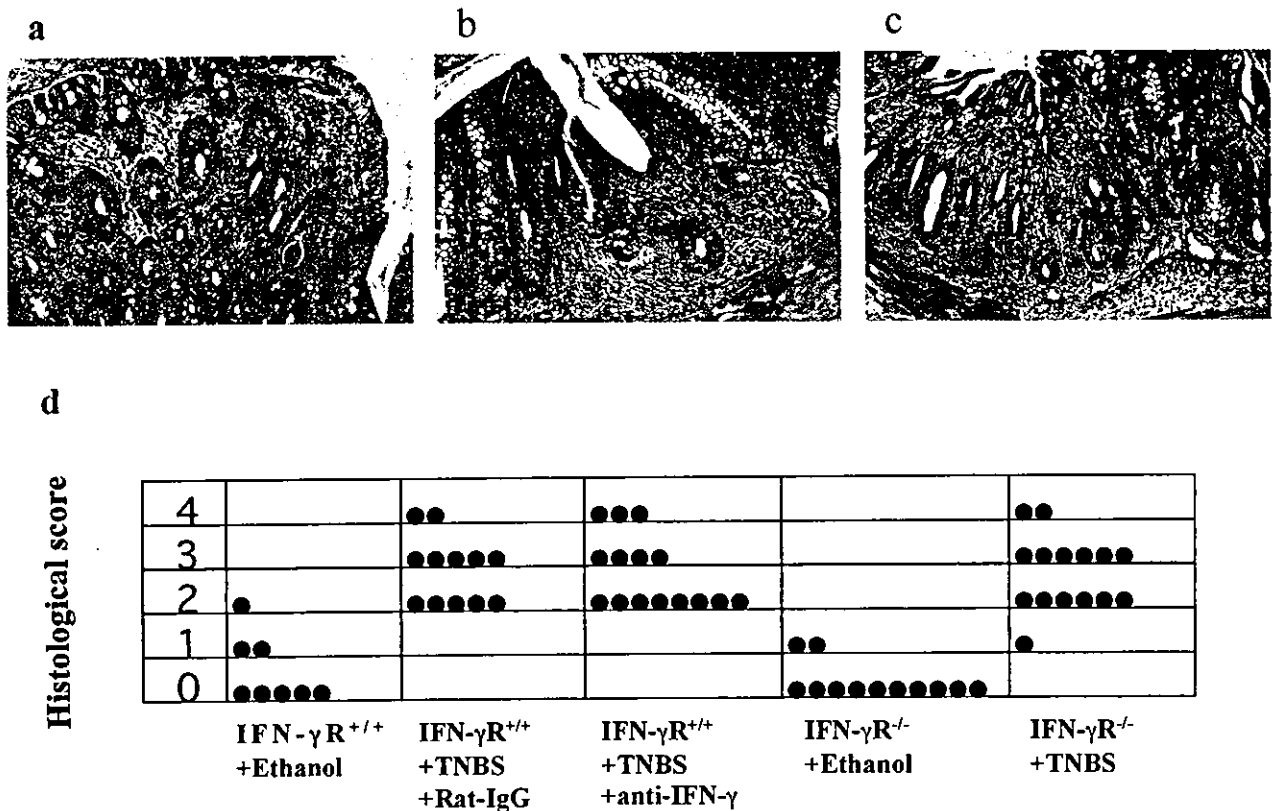


Figure 2 Histological evaluation of the colonic tissues of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-administered IFN- γ R^{-/-} or anti-IFN- γ mAb-pretreated wild-type mice. Hematoxylin/eosin-stained colon cross-sections of TNBS-induced colitis in 129/Sv/Ev wild-type (a) IFN- γ R^{-/-}; (b) anti IFN- γ mAb-pretreated wild-type; (c) mice. The magnitude of inflammatory changes in the colons was analyzed 7 or 8 days after TNBS administration. Original magnification was 85 \times . Differences in inflammatory activity were confirmed by histological grading of the colon sections. Colon specimens in 129/Sv/Ev wild-type or IFN- γ R^{+/+} mice treated with TNBS or 50% ethanol alone were taken on day 8. Each filled circle indicates an individual mouse. Data were pooled from two independent experiments.

pretreatment of wild-type mice with neutralizing anti-IFN- γ mAb failed to prevent body weight loss as compared to the control IgG-treated mice (Fig. 1a).

Histological analysis of the colonic tissues in the TNBS-administered mice followed. Administration of 50% ethanol alone produced no or mild colitis in both mice groups (data not shown). The pathological features of TNBS colitis in 129/Sv/Ev wild-type and IFN- γ R^{-/-} mice were revealed to be essentially the same (Fig. 2). TNBS-administered wild-type and IFN- γ R^{-/-} mice showed moderate infiltration of mononuclear cells, frequent cryptitis and crypt abscess, and moderate to severe loss of goblet cells (Figs 2a,b). Pretreatment of 129/Sv/Ev wild-type mice with anti-IFN- γ mAb (Fig. 2c) failed to prevent the development of TNBS-induced colitis as compared to the control IgG-treated mice (data not shown). The major colitis lesion was observed in the distal half of the colon.

As shown in Fig. 2d, IFN- γ R^{-/-} mice treated with TNBS showed higher histological scores than ethanol-treated control mice. Similarly, TNBS administration of 129/Sv/Ev wild-type mice pretreated with anti-IFN- γ mAb, as well as control IgG, gave higher histological

scores compared with control ethanol administration in the same mice groups. We also examined whether a TNBS enema induces hypertrophy of colonic patches in both 129/Sv/Ev wild-type and IFN- γ R^{-/-} mice. We performed a TNBS or ethanol enema on 129/Sv/Ev wild-type and IFN- γ R^{-/-} mice and examined the number and size of colonic patches in colon cross-sections. As shown in Table 1, we did not observe significant differences in the number and size of colonic patches in colon cross-sections after ethanol alone or a TNBS enema in both 129/Sv/Ev wild-type and IFN- γ R^{-/-} mice.

Role of interleukin-12 in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis

Next, we analyzed the role of IL-12 in TNBS-induced colitis. C57BL/6 wild-type mice showed significant weight loss, diarrhea and severe colitis after TNBS administration as did 129/Sv/Ev wild-type mice (data not shown). Administration of 50% ethanol without TNBS showed little effect on body weight (data not

Table 1 Number and size of colonic patches in colon cross-sections after ethanol alone or 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) enema in both 129/Sv/Ev wild-type and IFN- γ R^{-/-} mice

Mice type [†]	No. mice	Ratio of colonic patches observed to no. of cross-sections examined (%)		Size of colonic patches (m) [‡]	No. colonic patches observed
IFN- γ R ^{+/+} + Ethanol	7	10/39	(25.8)	84 ± 32.7	4
IFN- γ R ^{+/+} + TNBS	16	18/71	(25.2)	102 ± 20.9	7
IFN- γ R ^{-/-} + Ethanol	7	6/35	(19.2)	114 ± 24.2	4
IFN- γ R ^{-/-} + TNBS	20	18/108	(16.1)	103 ± 20.9	7

[†] Colon specimens from 129/Sv/Ev wild-type and IFN- γ R^{-/-} mice treated with 50% ethanol alone or TNBS; [‡] mean ± SD.

shown). As shown in Fig. 3a, C57BL/6 wild-type mice pretreated with neutralizing anti-IL-12 mAb showed only a transient weight loss upon TNBS treatment. On the contrary, control IgG-treated mice showed significant weight loss. In IL-12 p40^{-/-} mice, administration of TNBS, as well as ethanol alone, appeared to induce only a small effect on body weight (Fig. 3b).

The histology of anti-IL-12 mAb-treated mice showed less severe TNBS-induced colitis compared to that of the control IgG-treated mice (Figs 4a,b). TNBS administration failed to induce colitis in IL-12 p40^{-/-} mice (Fig. 4c). In addition, inflammatory activities were confirmed by histological grading of the colon-sections (Fig. 4d). TNBS administration of anti-IL-12 mAb-treated wild-type mice and IL-12 p40^{-/-} mice gave significantly lower histological scores compared to TNBS administration of control IgG-pretreated wild-type mice.

Infiltration of CD4⁺T cells and macrophages, and expression of interleukin-12 in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis lesions

Immunohistochemical staining of CD4 showed that CD4⁺ T cells were increased in the colon of TNBS-treated 129/Sv/Ev wild-type and IFN- γ R^{-/-} mice on day seven (Figs 5a,b). In the colon of mice treated with ethanol alone, CD4⁺ T cells were barely detectable on day seven (data not shown). Thus, TNBS-treated wild-type and IFN- γ R^{-/-} mice appeared to develop the pattern of colitis characterized by CD4⁺ T cell infiltration. We also examined infiltration of macrophages in the colonic mucosa of TNBS-administered 129/Sv/Ev wild-type, IFN- γ R^{-/-} and anti-IFN- γ mAb-pretreated mice by immunofluorescence with anti-Mac-1 mAb. As shown in Fig 5c-e, Mac-1-positive cells were significantly increased in the colonic mucosa in these mice. Few Mac-1-positive cells were observed in the colonic mucosa of ethanol-alone administered mice (data not shown). In addition, we performed immunohistochemical analysis with anti-IL-12 p40 mAb to examine the expression of IL-12 in TNBS-induced colitis lesions. As shown in Fig. 6, we observed IL-12 expression in the colonic tissues of TNBS-administered C57BL/6 wild-type, but not IL-12 p40^{-/-} mice.

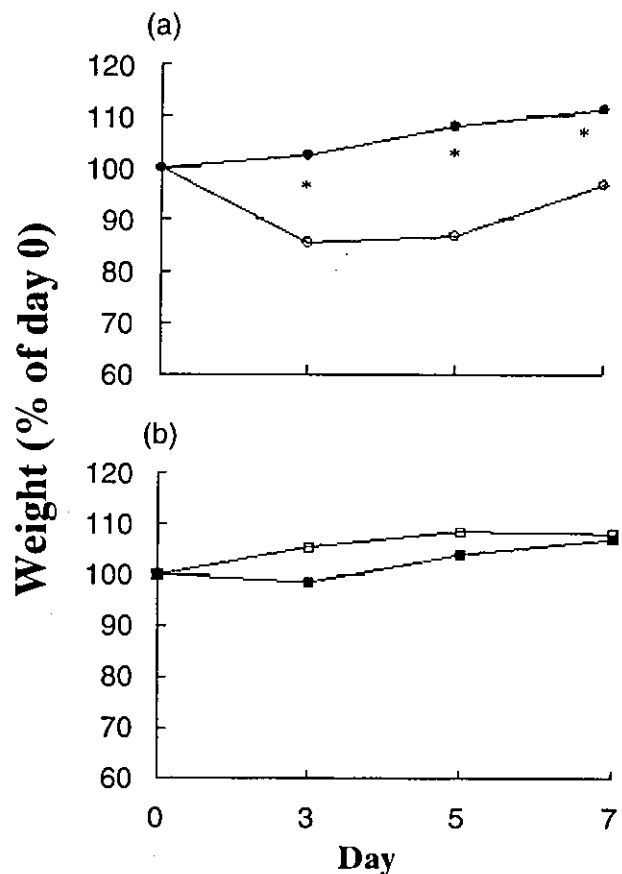


Figure 3 Wasting disease in C57BL/6 wild-type and IL-12 p40^{-/-} mice given a 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) enema. (a) C57BL/6 wild-type mice were treated with TNBS after intraperitoneal administration of rat anti-mouse IL-12 mAb (●), or rat IgG as a control (○); (b) IL-12 p40^{-/-} mice were treated with TNBS in 50% ethanol (■) or 50% ethanol alone (□). Change in body weight over a 7–8 day period of observation was expressed as a percent of the original weight at the start of the experiment. Six to nine mice were used for each group. The data shown represent average values. The body weights of mice treated with anti-IL-12 mAb were significantly higher than those of mice treated with rat IgG on day 3, 5, and 7 (indicated by *; $P < 0.01$). In IL-12 p40^{-/-} mice, no significant difference in weight was observed on day 3, 5, and 7.

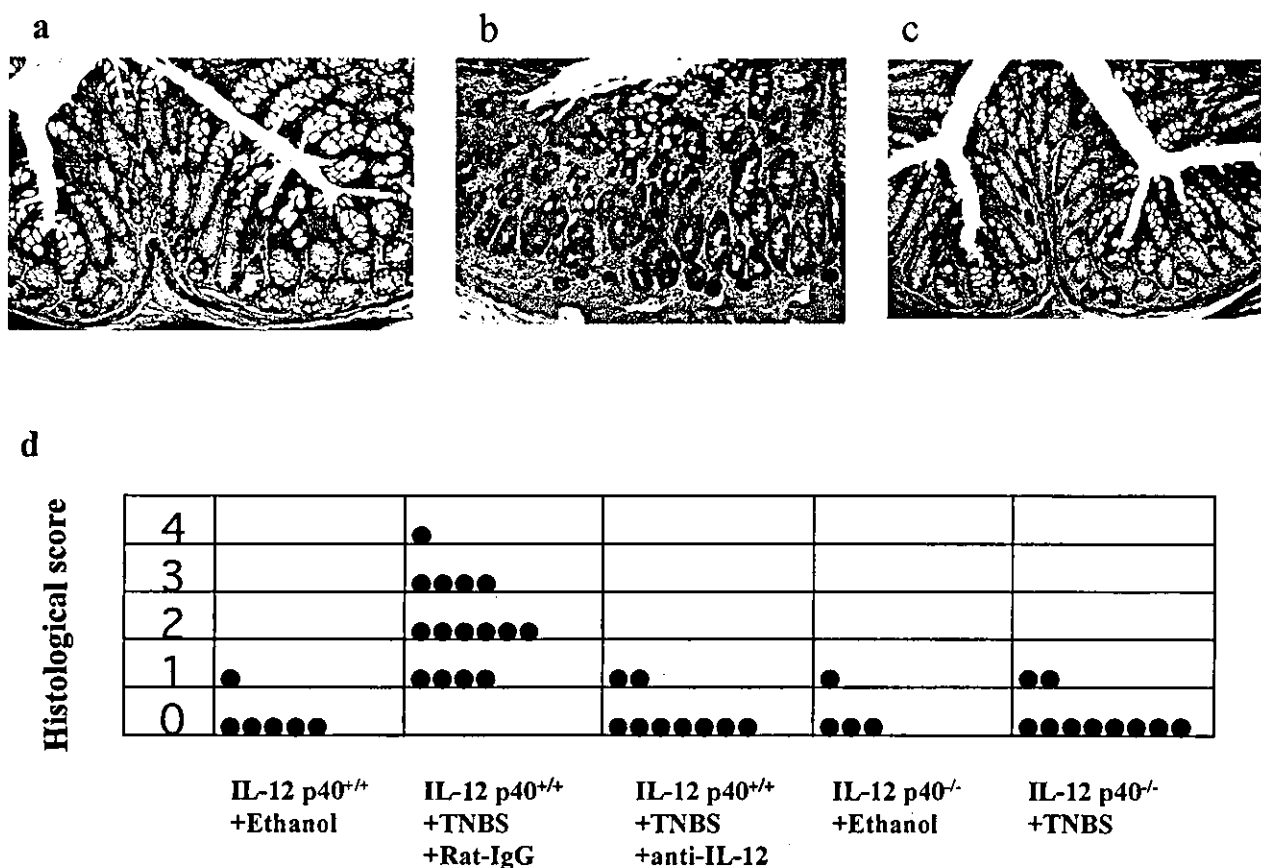


Figure 4 Histological evaluation of the colons in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-administered C57BL/6 wild-type, IL-12 p40^{-/-}, and wild-type mice pretreated with anti-IL-12 p40 mAb. Hematoxylin/eosin-stained colon cross-sections from TNBS-administered anti-IL-12 p40 mAb-pretreated C57BL/6 wild-type (a) wild-type; (b) IL-12 p40^{-/-}; (c) mice. The magnitude of inflammatory changes in the colons was analyzed 7 or 8 days after TNBS administration. Original magnification was 50 ×. Differences in inflammatory activity were confirmed by histological grading of the colon sections. Colon specimens in C57BL/6 wild-type or IL-12 p40^{-/-} mice treated with TNBS or 50% ethanol alone were taken on day 8. Each filled circle indicates an individual mouse. Data were pooled from two independent experiments.

Cytokine mRNA expressions in the colonic tissues of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-administered mice

We examined the expression of several cytokine mRNAs in the colonic mucosa of 129/Sv/Ev wild-type, anti-IFN-γ mAb-pretreated and IFN-γR^{-/-} mice treated with either 50% ethanol alone or TNBS. As shown in Fig. 7a, the expression of mRNAs for IFN-γ, IL-6, and TNF-α was up-regulated on day seven of TNBS administration in these mice. Interestingly, expression of IFN-γ mRNA in the colonic tissues was detected in both ethanol-treated and TNBS-treated IFN-γR^{-/-} mice (Fig. 7a). Conversely, IL-4 mRNA expression was under the detection level in all mice examined. TGF-β mRNA expression was somewhat reduced in all the TNBS-administered mice (Fig. 7a).

Furthermore, we performed RT-PCR analysis for TGF-β and IL-12 p40 on the colonic mucosa of C57BL/6 wild-type, anti-IL-12 p40 mAb-pretreated wild-type and IL-12 p40^{-/-} mice treated with either 50%

ethanol alone or TNBS (Fig. 7b). Interestingly, TGF-β mRNA expression was increased in TNBS-administered anti-IL-12 p40 mAb-pretreated wild-type and IL-12 p40^{-/-} mice. IL-12 p40 mRNA expression was strongly induced in the colonic tissues of TNBS-administered C57BL/6 wild-type mice compared to ethanol-alone administered wild-type mice (Fig. 7b). In contrast, IL-12 p40 mRNA expression was not induced in TNBS-administered anti-IL-12 p40 mAb-pretreated wild-type and IL-12 p40^{-/-} mice (Fig. 7b).

DISCUSSION

IBD is characterized by the imbalance of regulatory cytokines. IFN-γ mainly produced by Th1 cells is thought to provide the main damaging effects by facilitating macrophage secretion of inflammatory cytokines, because TNBS-induced colitis has been reported to be associated with increased mucosal IFN-γ production.^{6,21} A critical role for IFN-γ has been demonstrated

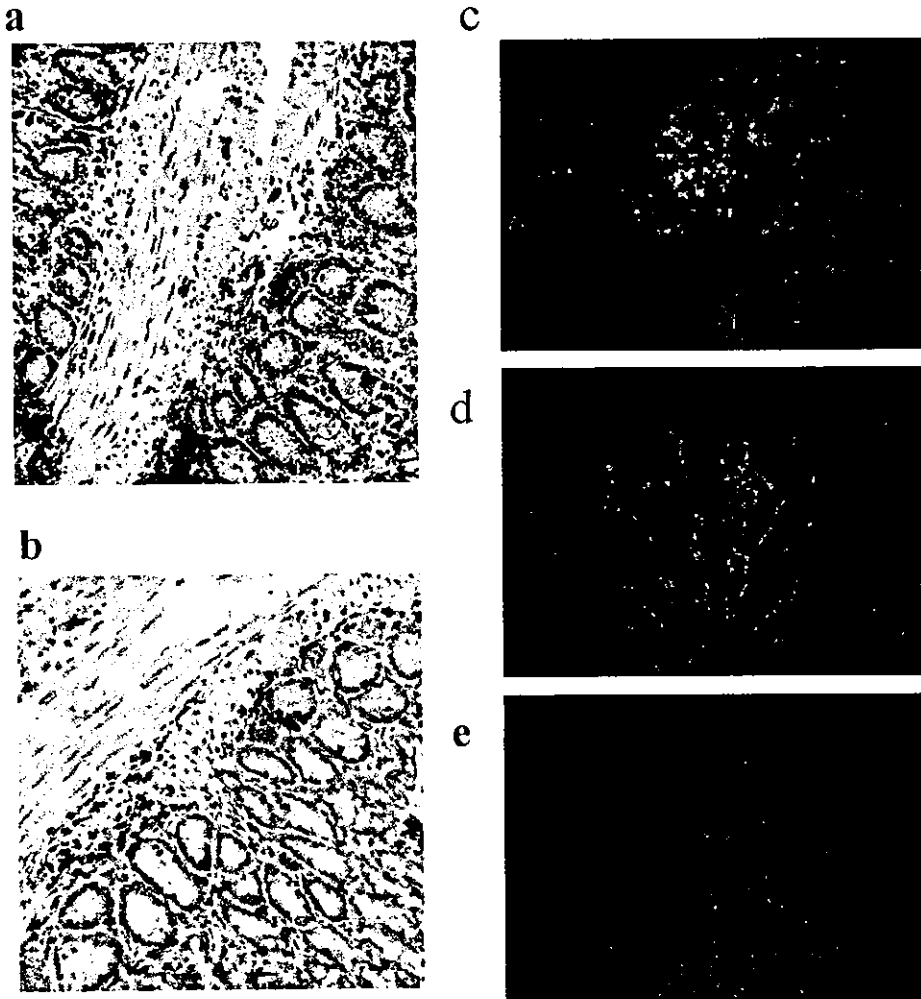


Figure 5 Infiltration of CD4⁺ T cells and macrophages in the colon of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-administered 129/Sv/Ev wild-type and IFN- γ R^{-/-} mice. Detection of CD4⁺ T cells in the colon of 129/Sv/Ev (a) wild-type and (b) IFN- γ R^{-/-} mice on day 7 of TNBS treatment by immunohistochemistry using anti-CD4⁺ mAb. Original magnification $\times 100$. Detection of macrophages in the colon of 129/Sv/Ev wild-type; (c) anti-IFN- γ pretreated; (d) IFN- γ R^{-/-}; (e) mice on day 7 of TNBS treatment by immunofluorescence using anti-Mac-1 mAb. Original magnification $\times 100$.

by neutralizing anti-IFN- γ mAb in spontaneous colitis in IL-10^{-/-} mice¹² and in colitis of CB-17 *scid* mice received CD4⁺CD45RB^{high} T cells.¹⁴ However, we observed that IFN- γ R^{-/-} and anti-IFN- γ mAb-treated 129/Sv/Ev wild-type mice developed TNBS-induced wasting disease as wild-type mice (Figs 1 and 2). Dohi *et al.*²² first reported that TNBS colitis develops in the absence of IFN- γ in BALB/c genetic background. They also reported that treatment of wild-type mice with anti-IFN- γ mAb did not prevent the development of wasting disease. They showed that the TNBS-induced colitis lesions were characterized by an enlargement of lymphoid follicles in the colon and that the inflamed colon in IFN- γ R^{-/-} BALB/c mice was accompanied by hypertrophy of colonic patches resembling Peyer's patch, where Th2-type cytokine responses are prominent.

We also observed that intracolonic administration of TNBS was able to induce body weight loss and colitis in IFN- γ R^{-/-} mice. However, we did not observe expansion of colonic patches in the colonic tissues of TNBS-induced colitis of IFN- γ R^{-/-} mice. In addition, we were not able to show the Th2-type cytokine responses in the colitis. TNBS-treated IFN- γ R^{-/-} mice exhibited Th1-type immune responses in the present study: IFN- γ mRNA, but not IL-4 mRNA, could be detected in

colonic tissues (Fig. 7). This discrepancy is possibly due to the difference in genetic background (BALB/c compared to 129/Sv/Ev) rather than the difference between ligand and receptor knockout mice. In fact, it has been reported that BALB/c IFN- γ ^{+/+} mice induce Th2-biased immune responses to *Leishmania major* infection,²³ whereas 129/Sv/Ev IFN- γ R^{-/-} mice induce Th1-biased responses to the same pathogen.²⁴ Dohi *et al.*²⁵ reported that the number of colonic patches in TNBS-induced colitis in C57BL/6 mice were smaller than those in BALB/c mice and no hypertrophy of colonic patches was seen in TNBS-induced colitis in IL-4^{-/-} C57BL/6 mice. Therefore, the increased number and hypertrophy of colonic patches may be associated with the Th2-type cytokine responses, but not with TNBS-induced colitis itself.

Our results are in agreement with those reported by Camoglio *et al.*²⁶ which demonstrated that 129/Sv/Ev IFN- γ R^{-/-} mice showed elevated Th1 and undetectable Th2 responses in TNBS-induced colitis. They showed augmentation of expression of TNF- α mRNA in splenic cells and caudal lymph node cells in TNBS colitis-induced IFN- γ R^{-/-} mice.

There exists the possibility that mice with IFN- γ R or IFN- γ gene disruptions show immunological compen-