

で誘導される12の活性化遺伝子、2つの抑制性遺伝子が見つけた。そのうち4つの活性化遺伝子 (multidrug resistance gene, NF-IL6 $\delta$ , ezrin, HO-2) と1つの抑制性遺伝子 (Clara cell secretory protein) のプライマを作製し、結核菌感染肺胞マクロファージ、結核菌感染肺組織を用いて RT-PCR を行った。いずれも、感染後1日に高く、感染後7日で低下した。*M. avium* 感染では、18の活性化遺伝子、15の抑制性遺伝子が見つかった。

#### D. 考察

本実験は、感染後1日で高くなり7日後に低下する遺伝子を見つける試みである。実験によっては、7日後に高くなり、14日後に低下する遺伝子を見つけることが可能である。今回の研究の目的は、できるだけ早期の結核でどのような遺伝子の変化が見られるかを調べた。*M. tuberculosis* で誘発されたこれらの遺伝子は、*M. avium* 感染では認められず、結核菌感染に特徴的である。また、感染後1日、7日の血清中のサイトカインを感度の良い測定システム (Bio-Plex Cytokine Assay) で測定したが、感染後7日 TNF- $\alpha$  が測定できたのみで、他のサイトカインは、検出限界以下であった。

#### E. 結論

結核菌感染初期の病態を把握するには、血清診断は有用ではなく、DNA

microarray を用いて結核菌感染後に発現する mRNA の経時変化を調べた方が、結核早期診断に役立つ可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. K. Hiramatsu, A. Azuma, H. Takizawa, S. Kudoh, I. Sugawara:

**The effects of inhalation of diesel exhausts on murine mycobacterial infection.**

*Exp. Lung Res.*, 31: 405-416, 2005.

2. H. Yamada, T. Udagawa, S. Mizuno, K. Hiramatsu, I. Sugawara:

**A reliable and reproducible method for evaluating cytokine and iNOS mRNA expression in guinea pig lung tissues by RT-PCR using newly designed primer sets.** *Experimental Animals*, 54: 163-172, 2005.

3. I. Sugawara, Y. Kazumi, K. Otomo, K. Ooki, S. Mitarai, K. Mori:

***Mycobacterium branderi* isolated pus of a right pulmonary cavity lesion.** *Jap J Infect Dis*, 58: 187-188, 2005.

4. R. Shi, K. Otomo, H. Yamada, T. Tatsumi, I. Sugawara:

**Temperature-mediated heteroduplex analysis for the detection of drug-resistant gene mutations in clinical isolates of *Mycobacterium***

*tuberculosis* by denaturing HPLC and SURVEYOR nuclease. *Microbes and Infection*, 2005 (in press).

5. I. Sugawara, H. Yamada, S. Mizuno:  
Nude rat (F344/N-rnu) tuberculosis. *Cell. Microbiol.* 2005 (in press).

6. I. Sugawara, K. Otomo, H. Yamada, G. Wang, C. Du, R. Shi, G. Zhang:  
The molecular epidemiology of ethambutol-resistant *M. tuberculosis* in Henan province, China. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58: 393-395, 2005.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

自然免疫系による結核感染防御機構に関する研究

分担研究者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所 教授

研究要旨：TLR を介した自然免疫系の活性化が消失する TRIF/MyD88 二重欠損マウスを用いて、結核感染における自然免疫系の関与について検討した。正常マウス、MyD88 欠損マウス、TRIF 欠損マウスでは BCG 感染による肺病変は観察されないが、MyD88/TRIF 二重欠損マウスの肺では、BCG 菌数の増加を伴う多数の壊死性病変が観察され、約半数が死亡した。また結核菌 MtbH37Ra 株の経気道的感染でも、TRIF/MyD88 二重欠損マウスは感受性が高かった。この結果は、TLR を介した自然免疫系の活性化が結核感染防御にも生体レベルで重要な役割を担っていることを示している。結核感染においては、Th1 応答が感染防御に重要な役割を担っている。MyD88 欠損マウスでは、BCG 感染後の Th1 応答が正常と比べて 3 分の 1 程度に低下するが、TRIF/MyD88 二重欠損マウスでも Th1 応答の障害は同程度しか認められなかった。この結果は、TLR を介した自然免疫シグナル以外にも Th1 誘導機構が存在し、さらに自然免疫系が Th1 誘導以外の分子機構により結核感染を制御していることを示唆している。

A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。しかしながら、B, T 細胞が主役を演じる獲得免疫系の分子機構が詳細に解析されてきているのに対し、自然免疫系の作動メカニズムはほとんど理解されていない。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーが、病原体の構成成分の認識に関与していることが明らかになってきた。結核菌に対する生体防御においても、TLR ファミリーによる結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核などの病原体の生体内への侵入を察知するメカニズムを Toll-like receptor (TLR)を中心とした受容体の解析から明らかにし、結核感染における免疫系作動の分子機構を解明することを目的とする。

B. 研究方法

まず、TLR を介した自然免疫系の活性化の制御機構を解析した。自然免疫系の活性制御機構を解析するためのモデルとして、自然免疫系の活性制御機構の破綻により慢性大腸炎を発症する、自然免疫系特異的 Stat3 欠損マウス、IL-10 ノックアウトマウスを用いて解析を行った。正常マウスの大腸の粘膜固有層には少数のマクロファージや樹状細胞が存在している。これらの細胞群の単離法を

確立し、高純度のマクロファージや樹状細胞を培養できるようになった。正常マウスの大腸の粘膜固有層由来の細胞は、IL-12 などの炎症性サイトカインを産生しない。一方、慢性腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウスや Stat3 変異マウスの大腸の粘膜固有層では、たとえ慢性腸炎を発症する前の若いマウスでも、マクロファージや樹状細胞の数が極めて増加しており、さらにこれらの細胞は IL-12 などの炎症性サイトカインを産生することを明らかにした。そこで、正常マウスの細胞がサイトカイン産生を示さない分子機構を、正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの細胞間で遺伝子発現の差を DNA microarray で解析し、核に発現する IκB 分子 IκBNS が、正常マウスの細胞に選択的に発現していることを見いだした。IκBNS をマクロファージ系細胞株に発現させると、LPS 刺激による TNF-α 産生は抑制しないが、IL-6 産生を抑制することを見いだした。そこで、IκBNS の生理機能を明らかにし、この個体レベルでの役割を明らかにするため、ノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析した。

さらに、自然免疫系の結核感染における役割を解析した。これまで、TLR を介した自然免疫系の活性化機構の解析から、TLR を介したシグナル伝達経路では、TIR ドメインを有するアダプター MyD88 と TRIF が重要な役割を担っていて、TRIF/MyD88 二重欠損マウスでは、TLR シグナルが完全に消失することを

明らかにしている。そこで、TLR を介した自然免疫系の活性化の結核感染防御における役割を、TRIF/MyD88 二重欠損マウスを作製し解析した。正常マウス、TRIF 欠損マウス、MyD88 欠損マウス、および TRIF/MyD88 二重欠損マウスにワクチン株である BCG を感染させ、肺病変を解析し、また感染後の生存率を測定した。また結核菌 MtbH37Ra 株を経気道的に感染させ、肺内の菌数を測定し、また生存率を測定した。

### C. 研究結果

IkBNS ノックアウトマウスは正常に出生し、外見上異常は認めなかった。IkBNS ノックアウトマウスより腹腔マクロファージを単離、あるいは骨髓由来樹状細胞を分化させ、TLR 刺激による TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12 産生を解析した。その結果、IkBNS ノックアウトマウスでは、TNF- $\alpha$  産生に変化はないが、IL-6、IL-12 産生が有意に亢進していた。次にこれら遺伝子の mRNA の発現誘導を real time RT-PCR 法で解析した。TNF- $\alpha$  mRNA の誘導は刺激後 1 時間以内に認められるが、この誘導パターンには正常マウスと IkBNS ノックアウトマウス間で変化はなかった。IL-6 mRNA は刺激後 3 時間から誘導がみられるが、3 時間までは両マウス間で差はなかった。正常マウスでは 3 時間以降 mRNA の発現量は低下するが、IkBNS ノックアウトマウスでは mRNA 量は高いままであった。他の遺伝子にも刺激後 1 時間以内の早期に誘導されてくる遺伝子(IL-1 $\beta$ , IL-12p19 など)と遅れて時間以後に誘導される遺伝子(IL-12p40, IL-18 など)があるが、早期に誘導される遺伝子群の発現誘導パターンは両マウス間で差がないが、遅れて誘導されてくる遺伝子群は 5 時間以降 IkBNS ノックアウトマウスで有意に発現が高かった。次に、TLR 刺激によるまた TLR 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化をゲルシフト法、および NF- $\kappa$ B p65 の細胞内局在により解析した。その結果、IkBNS ノックアウトマウスでは NF- $\kappa$ B の活性が遷延化し、刺激後 3 時間でもまだ NF- $\kappa$ B の活性が残存していることが明らかになった。次に、TNF- $\alpha$ 、IL-6 プロモーターへの NF- $\kappa$ B p65 の会合をクロマチン免疫沈降法で解析した。TNF- $\alpha$  プロモーターへの p65 の会合は刺激後 1 時間をピークに観察され、これは正常マウスと IkBNS ノックアウトマウスの間で差は認められなかった。一方 IL-6 プロモーターへの p65 の会合は刺激後 3 時間をピークに正常マウスでは認められた。IkBNS ノックアウトマウスでも 3 時間までは正常マウスと同様に p65

の会合が誘導されたが、3 時間以降正常マウスでは p65 の会合が減少していくのに対し、IkBNS ノックアウトマウスでは持続したままであった。これらの結果から、IkBNS は刺激後遅れて誘導されてくる遺伝子のプロモーターにおいて選択的に NF- $\kappa$ B の活性を抑制することにより、遺伝子発現を抑制していることが明らかになった。さらに個体レベルでも、LPS 投与によるエンドトキシンショックに対する感受性が高くなり、また dextran sodium sulfate の経口投与による腸管炎症に対する感受性も極めて高くなっていった。

また、自然免疫系の結核感染防御における役割に解析では、マウスにワクチン株である BCG を感染させたところ、正常マウス、TRIF 欠損マウス、MyD88 欠損マウスでは肺組織に著明な変化は認められないが、TRIF/MyD88 二重欠損マウスでは感染 2 週間以内に壊死を伴った病理変化が観察された。抗酸菌染色を行ったところ TRIF/MyD88 二重欠損マウスの肺では、多数の抗酸菌が観察された。生存率を測定しても、他のマウスと異なり、TRIF/MyD88 二重欠損マウスは約半数が死亡した。また、結核菌 MtbH37Ra 株を感染させたところ、MyD88 欠損マウスは正常マウスよりやや感受性が高いが、TRIF/MyD88 二重欠損マウスはさらに感受性が高くなっており、肺内の結核菌数も多くなり、生存率も低下していた。これらのことから、TRIF/MyD88 二重欠損マウスは結核感染に高感受性を示すことが明らかになった。この結果は、自然免疫系の活性化シグナルが、結核菌感染防御に重要な役割を担っていることを示している。BCG 感染による Th1 応答を、CD4 陽性 T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を指標に解析したところ、MyD88 欠損マウスでは正常に比べて 1/3 程度に低下していたが、TRIF/MyD88 二重欠損マウスでも MyD88 欠損マウスと同程度の低下しか認めず、有意に Th1 応答が観察された。このことは、結核感染においては TLR 非依存性に Th1 細胞の分化が誘導されることを示している。

### D. 考察

以上の結果から、核に発現する IkBNS が、自然免疫系の細胞において NF- $\kappa$ B の活性を抑制することにより、あるサブセットの遺伝子発現を抑制し、個体レベルで炎症抑制に関与していることが明らかになった。

また、TRIF/MyD88 二重欠損マウスを用いた結核感染実験から、TLR を介した自然免疫系の活性化が、

結核感染防御に重要であることが明らかになった。さらに結核感染に対する Th1 応答には、TLR 非依存的なメカニズムが存在することも明らかになった。今後、TRIF/MyD88 二重欠損マウスが結核感染に高感受性になる分子機構、Th1 分化の誘導機構を解析する。

#### E. 結論

自然免疫系の TLR を介した活性化が、結核感染防御に重要であることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

##### 1. 論文発表

1. Kuwata, K., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsu, T., Koga, R., and Takeda, K.: IkBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41-51 (2006).
2. Ogawa, A., Tagawa, T., Nishimura, H., Yajima, T., Abe, T., Arai, T., Taniguchi, M., Takeda, K., Akira, S., Nimura, Y., and Yoshikai, Y.: Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas-dependent apoptosis in Peyers patch and liver at an early stage after bile duct ligation in mice. *Gut* 5, 105-113 (2006).
3. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
4. Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S.: Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6, 1087-1095 (2005).
5. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable *Haemophilus influenzae* from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
6. Yukawa, K., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Bai, T., Maeda, M., Takeda, K., Akira, S., and Iso, H.: Reduced prepulse inhibition of startle in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 16, 673-675 (2005).
7. Matsukawa, A., Kudo, S., Maeda, T., Numata, K., Watanabe, H., Takeda, K., Akira, S., and Ito, T.: Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J. Immunol.* 175, 3354-3359 (2005).
8. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S.: Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19-28 (2005).
9. Ohkawara, T., Takeda, H., Nishihira, J., Miyashita, K., Nihiwaki, M., Ishiguro, Y., Takeda, K., Akira, S., Iwanaga, T., Sugiyama, T., and Asaka, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 412-421 (2005).
10. Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A., and Moreno, E.: MyD88, but not Toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 73, 5137-5143 (2005).
11. Yang, S., Takahashi, N., Yamashita, T., Sato, N., Takahashi, M., Mogi, M., Uematsu, T., Kobayashi, Y., Nakamichi, Y., Takeda, K., Akira, S., Takada, H., Udagawa, N., and Furusawa, K.: Muramyl dipeptide enhances osteoclast formation induced by lipopolysaccharide, IL-1b, and TNF-a through nucleotide-binding oligomerization domain 2-mediated signaling in osteoblasts. *J. Immunol.* 175, 1956-1964 (2005).
12. Shindou, H., Ishii, S., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Shimizu, T.: Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A: lysoplatelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J. Immunol.* 175, 1177-1183 (2005).
13. Kitching, A. R., Turner, A. L., Wilson, G. R., Semple, T., Odobasic, D., Timoshanko, J. R., O'sullivan, K. M., Tipping, P. G., Takeda, K., Akira, S., and Holdsworth, S. R.: IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-

- 12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2023-2033 (2005).
14. Yang, R., Murillo, F. M., Delannoy, M. J., Blosser, R. L., Yutzy, W. H. 4th, Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., Roden, R. B.: B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88. *J. Immunol.* 174, 7912-7919 (2005).
  15. Yang, R., Wheeler, C. M., Chen, X., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Pastrana, D. V., Viscidi, R. P., and Roden, R. B.: Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J. Virol.* 79, 6741-6750 (2005).
  16. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., and Barsh, G. S.: PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J. Clin. Invest.* 115, 951-958 (2005).
  17. Yukawa, K., Iso, H., Tanaka, T., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: Down-regulation of dopamine transporter and abnormal behavior in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 15, 819-825 (2005).
  18. Kumanogoh, A., Shikina, T., Suzuki, K., Uematsu, S., Yukawa, K., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Ko-Mitamura, E. P., Takegahara, N., Marukawa, S., Ishida, I., Morishita, H., Prasad, D. V., Tamura, M., Mizui, M., Toyofuku, T., Akira, S., Takeda, K., Okabe, M., and Kikutani, H.: Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: Defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity* 22, 305-316 (2005).
  19. Hirotsu, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K.: The nuclear I $\kappa$ B protein I $\kappa$ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* 174, 3650-3657 (2005).
  20. Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S., and Watanabe, M.: MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J. Gastroenterol.* 40, 16-23 (2005).
  21. Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yoshie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T., Akira, S., Ogawa, K., and Harada, M.: Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. *Stem Cells* 23, 252-263 (2005).
  22. Yukawa, K., Kishino, M., Goda, M., Liang, X. M., Kimura, A., Tanaka, T., Bai, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Ueyama, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., and Akira, S.: STAT6 deficiency inhibits tubulointerstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 225-230 (2005).
  23. Akamine, M., Higa, F., Arakaki, N., Kawakami, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 352-361 (2005).
  24. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
  25. Vossenkämper, A., Went, T., Alvarado-Esquivel, C., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Förster, I. and Liesenfeld, O: Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii* but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur. J. Immunol.* 34, 3197-3207 (2004).
  26. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., Kaneda, Y., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model. *Gene Ther.* 11, 1753-

1762 (2004).

27. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M. H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Ther.* 11, 1763-1771 (2004).
  28. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
  29. Takeda, K.: Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity. *Cur. Med. Chem. AIAA.* 4, 3-11 (2005).
  30. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).
  31. Takeda, K.: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 11, 51-55 (2005).
2. 学会発表
1. Kiyoshi Takeda, The roles of STATs in inflammatory responses: Lessons from the knockout mouse. (symposium, invited), American Thoracic Society 2005, 2005.5-20-25, San Diego, USA
  2. Kiyoshi Takeda, Makoto Matsumoto, Toll-like receptor-dependent innate immune responses in mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program. 40<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2005.7.28-30, Seattle, USA
  3. Kiyoshi Takeda, Regulation of Toll-like receptor-mediated gene expression by nuclear IκB proteins. The 6th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, 2005.9.28-10.2, Heidelberg, Germany
  4. 竹田 潔, Toll-like receptors and pathogen recognition (Symposium, invited) 第 78 回日本細菌学会総会、2005.4.4-6、東京
  5. 竹田 潔, Toll-like receptor と結核感染 (シンポジウム) 第 80 回日本結核病学会、2005.5.12-13、埼玉
  6. 竹田 潔, 自然免疫シグナルの制御機構 (ワークショップ、招待講演) 第 5 回日本蛋白質科学会年会、2005.7.1、福岡
  7. 竹田 潔, Toll-like receptor を介した自然免疫系の制御 (特別講演) 第 45 回日本リンパ網内系学会総会、2005.7.14-15、福岡
  8. 竹田 潔, 自然免疫系と炎症性腸疾患 (シンポジウム、招待講演) 第 42 回日本消化器免疫学会総会、2005.8.4-5、東京
  9. Kiyoshi Takeda: Regulation of innate immune responses against intracellular pathogen infection (Symposium) 第 35 回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
  10. 桑田啓貴、竹田 潔、Regulation of Toll-like receptor dependent gene induction by nuclear IκB protein IκBNS. 第 35 回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
  11. 古賀律子、濱野真二郎、松本真琴、久枝一、審良静男、姫野國介、竹田 潔、Involvement of Toll-like receptor-dependent activation of innate immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. 第 35 回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
  12. 松本真琴、桑田啓貴、山本雅裕、審良静男、吉開泰信、竹田 潔、The role of Toll-like receptor signaling in mycobacterial infection. 第 35 回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学研究協力事業）  
分担研究報告書

結核菌による臓器侵襲の分子機構

分担研究者 大原 直也 長崎大学大学院助教授

研究要旨

骨結核の病態および BCG ワクチン接種による骨炎が生じるメカニズムを明らかにする目的で BCG 感染による破骨細胞分化への影響を調べた。M-CSF/RANKL で誘導される破骨細胞の分化初期に BCG が感染するとその分化は抑制され、分化後期に感染すると破骨細胞の形成が促進された。MyD88 欠損マウスの破骨細胞前駆細胞に BCG が感染すると分化初期における抑制はみられたことから、この現象は MyD88 非依存的であることが示唆された。このときに Interferon- $\beta$  および Interferon- $\gamma$  の産生はみられなかった。MyD88 欠損マウスの細胞では BCG 感染による分化後期における破骨細胞形成の促進はみられなかったことから、この現象は MyD88 依存的であることが示唆された。

A. 研究目的

骨結核は肺外結核の中で頻度が高いとともに、脊椎カリエス、脊椎の癒合等の特徴的な病変像を表す。また BCG ワクチン接種の副作用としてもしばしば骨炎が生じる。骨はダイナミックな組織であり、骨芽細胞による骨添加と破骨細胞による骨吸収が常にバランスよく行われている。破骨細胞は単球系の破骨細胞前駆細胞から分化・成熟する。破骨細胞の分化・成熟には必須とされる RANKL、M-CSF 以外にも種々のサイトカインが影響する。骨結核の特異的な病変が生じるメカニズムについては明らかにされていないが、骨芽細胞による骨添加と破骨細胞による骨吸収のバランスが崩

れた結果生じると考えられる。これまでに、BCG 感染骨芽細胞から産生される CD137 (4-1BB) は M-CSF/RANKL で誘導される破骨細胞分化に抑制的に働くことを明らかにした。また BCG を破骨細胞前駆細胞に直接感染させた場合にも破骨細胞分化に抑制的に働くことを明らかにした。今年度ではこの抑制作用のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

骨髄細胞は 4~5 週齢雄 C57BL/6 マウスおよび MyD88 欠損マウスの脛骨から調製した。さらに、骨髄細胞から付着細胞を除去し、浮遊細胞を M-CSF 存在下で培養することにより付着能

を持った細胞を破骨細胞前駆細胞とした。破骨細胞形成は、破骨細胞前駆細胞に M-CSF (10ng/ml) と RANKL (20ng/ml) を添加し、5日間培養することによりおこなった。破骨細胞への分化・成熟は酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色により評価した。

BCG Tokyo 株は 0.05 % Tween80 添加 7H9-ADC 培地を用いて培養した。BCG の感染は細胞対菌数比 1:100~1:0.01 の間でおこなった。

マウスマイクロアレイは Sigma 社製 Panorama Mouse Micro Array を用い、得られたデータはジーンスプリングで解析した。破骨細胞前駆細胞に M-CSF (10ng/ml) と RANKL (20ng/ml) を添加し、同時に BCG を感染させ、24 時間培養した細胞の全 RNA を用いた。

IFN- $\beta$  および IFN- $\gamma$  の測定は Biosource 社製 ELISA キットを用いておこなった。

### C. 研究結果

C57BL/6 マウス由来破骨細胞前駆細胞に M-CSF/RANKL を添加し培養すると、3 日後に単核 TRAP 陽性細胞、5 日目に多核 TRAP 陽性細胞が形成された。培養開始とともに BCG を感染させると、菌数依存的に 3 日目における単核 TRAP 陽性細胞、5 日目における多核 TRAP 陽性細胞の形成がともに抑制された。次に、この培養系に BCG を入れる時点を 1 日ずつ遅らせていくと、抑制効果は減少し、2 日以降に

感染させた場合には菌非存在下と差は認められなかった。培養の最終 24 時間のみ BCG を感染させた場合には逆に多核 TRAP 陽性細胞の形成が顕著に促進された。MyD88 欠損マウス由来破骨細胞前駆細胞では、培養開始時あるいは培養開始 3 日後までに BCG を感染させると C57BL/6 マウス細胞の場合と同様の結果が得られた。しかし、培養の最終 24 時間のみに BCG を感染させた場合には C57BL/6 マウス細胞の場合とは異なり、多核の TRAP 陽性細胞形成の促進は認められなかった。

マイクロアレイ解析の結果、破骨細胞形成開始 (M-CSF/RANKL 添加) 時点より 24 時間 BCG を感染させることにより、非感染細胞に比し 1.5 倍以上発現量の増加した遺伝子は、C57BL/6 マウス破骨細胞では 220 遺伝子、MyD88 欠損マウス破骨細胞では 180 遺伝子であり、共通する遺伝子が 64 遺伝子であった。このなかに Interferon に関係する遺伝子が 12 種存在した。感染により発現の減少する遺伝子は、C57BL/6 マウス破骨細胞では 195 遺伝子、MyD88 欠損マウス破骨細胞では 307 遺伝子であり、共通する遺伝子が 33 遺伝子であった。

BCG 感染により破骨細胞前駆細胞から産生される Interferon- $\beta$  および Interferon- $\gamma$  の量を ELISA により測定したが、破骨細胞形成開始時 24 時間の感染においてはいずれも産生がみとめられなかった。

#### D. 考察

骨組織では骨を形成する骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞が中心的な細胞であり、破骨細胞は骨芽細胞から産生される RANKL と M-CSF の刺激を受けることによって、単球系の前駆細胞から分化・成熟する。そして、骨組織は常に、骨芽細胞を主とした骨の添加と、破骨細胞を主とした骨の破壊がおこなわれており、正常な場合には両者のバランスがとれている。ところが感染の場合などはこのバランスが崩れ、いわゆる炎症性骨代謝と呼ばれる病的な骨代謝がおこなわれる。これまでの実験で破骨細胞への分化初期に BCG が感染した場合には破骨細胞への分化が抑制され、分化後期に感染した場合には、逆に破骨細胞の分化・成熟が促進されることを明らかにした。今回の実験で、分化初期における BCG 感染の効果は MyD88 欠損マウス細胞においても同様にみられたことから、MyD88 は関与していないと考えられる。しかし、分化後期における BCG 感染の効果は MyD88 欠損マウス細胞においてはみられなかったことから、MyD88 依存性的と考えられる。

DNA マイクロアレイを用いた解析では、BCG 感染による破骨細胞前駆細胞の分化初期段階における抑制には Interferon の関与が示唆されたが、今回の実験では、Interferon- $\beta$  および Interferon- $\gamma$  のいずれの産生もみられなかったことから、他の分子を介するものと考えられる。今後この経路を明らかにすることで、骨結核病態の解明に

つながることが期待できる。

#### E. 結論

破骨細胞の分化初期に BCG が感染するとその分化が抑制された。この現象は MyD88 非依存性的であり、また Interferon- $\beta$  および Interferon- $\gamma$  非依存性であることが示唆された。また分化後期には BCG 感染により破骨細胞の形成が促進されたことから、この現象は MyD88 依存性的であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

一般の組み換え DNA 実験に準ずる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

大原直也 (2005) BCG を用いた抗酸菌の抗原性および病原性に関する研究. 日本細菌学雑誌 60:349-356.

Takahashi H, Sasaki K, Takahashi M, Shigenori N, Honda S, Arimitsu H, Ochi S, Ohara N, Tsuji T. (2006) Mutant *Escherichia coli* enterotoxin as a mucosal adjuvant causes specific CD4+ and CD8+ T cells to produce IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in response to nasal killed-bacillus Catmette-Guerin vaccine in mice. **Vaccine** 印刷中.

##### 2. 学会発表

Ohara N, Yoshimura M, Saito K, Hotokezaka H, Nakayama K. (2005) Bacterial infection inhibits

osteoclastogenesis in vitro. 11th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division, Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2005 (San Francisco, U.S.A.), Abstracts p6.

Okada M, Tanaka T, Yoshida S, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Kaneda Y, Nakajima T, Ohara N, Takai H, Fukunaga Y, Inoue Y, Matsumoto M, Gelber R, Tan VE, Dela Cruz EC, Abalos RM, Young LJ, Burgos JA, McMurray, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M. (2005) Novel vaccination (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against tuberculosis using cynomolgus monkey. Fortieth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Seattle) Program & Abstracts p.46-50.

Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Uemura Y, Oyama M, Ohara N, Namisato M, Kogoe N, Yamada N, Terada N, Matsushita S. (2005) Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor b2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. Fortieth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Seattle) Program & Abstracts p.100-104.

Ohara N, Yoshimura M, Shoji M, Nakayama K. (2005) Effect of BCG infection on in vitro osteoclastogenesis. Fortieth Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. (Seattle) Program & Abstracts p.230.

岡田全司、田中高生、吉田栄人、井上義一、武本優次、大原直也、内藤真理子、山田毅、金田安史、坂谷光則:ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しいワクチン開発と結核免疫誘導(2)、第35回日本免疫学会総会・学術集会、横浜、12月{第35回日本免疫学会総会・学術集会記録 35、174、2005}

大原直也:組み換え BCG ワクチンの作製とその応用。シンポジウム「ホストパラサイトインターフェイス研究—基礎から応用へ—」。第47回歯科基礎医学会学術大会、仙台、{Journal of Oral Biosciences, 47 Suppl, 73, 2005}

大原直也, 吉村満美子, 庄子幹郎, 中山浩次:*P. gingivalis* および BCG 感染の破骨細胞分化への影響, 第47回歯科基礎医学会学術大会, 仙台, 9月 {Journal of Oral Biosciences, 47 Suppl, 142, 2005}

大原直也, 吉村満美子, 齋藤幹, 佛坂斉社, 中山浩次:骨芽細胞と骨髄細胞の

共存培養系における BCG および *P. gingivalis* 感染の効果, 第 78 回日本細菌学会総会, 東京, 4月 {日本細菌学雑誌, 60, 160, 2005}

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

抗酸菌感染における免疫防御誘導機構

（分担）研究者 吉開泰信 九州大学教授

研究要旨

Interleukin (IL)-15 は、NK、NKT、腸管上皮型 $\gamma\delta$ 型 T 細胞だけでなくメモリータイプ CD8T 細胞の分化増殖因子として知られている。今回、*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) に対する感染防御機構における IL-15 の役割を調べるため、IL-15 ノックアウト(KO)マウスを用いて BCG 感染実験をおこなった。各臓器内菌数は、感染早期の 7、14、28 日後では、コントロールマウスと顕著な差を認めなかったが、120 日目では、IL-15 KO マウスで肺または肝臓で有意に増加していた。PPD 特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞の産生は、感染 28 または 120 日目で肺及び脾臓において顕著な差を認めなかった。一方、OVA 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞は、感染 120 日目で IL-15 KO マウスで著明に減少していた。以上の結果から IL-15 は抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の非リンパ組織での維持に重要であることが明らかとなった。

A 研究目的

結核菌などの細胞内寄生性細菌に対する感染防御機構では、 $\gamma$ インターフェロン ( $\gamma$  IFN) 産生の CD4 Th1 細胞に加えて、一方、CD8 キラーT 細胞は慢性感染症の肺における菌の排除に重要であることが報告されているが、その役割は不明な点が多い。インターロイキン 15 (IL-15) は活性化マクロファージ、樹状細胞や上皮系細胞から産生され、そのレセプターは IL-15R $\alpha$  と IL-2R $\beta/\gamma c$  であり、その生物活性は IL-2 と類似している。IL-15 遺伝子ノックアウトマウスではNK細胞、NKT 細胞や $\gamma\delta$ 型腸管上皮間リンパ球の分化が阻害されていることに加えて、メモリー型 CD8T 細胞の減少が認められた。今回、*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) に対する感染防御機構における IL-15 の役割を IL-15 ノックアウト(KO)

マウスを用いて調べ、IL-15 のワクチンアジュバントとしての効用について考察した。

B 研究方法

マウス：C57BL/6-背景 IL-15 KO マウス (Taconic Germantown, NY) およびコントロール C57BL/6 マウスに BCG (東京株) またはリコンビナント卵白アルブミン産生 BCG (rBCG-OVA : Dr. Subash Sad ,Institute for Biological Sciences, Ontario)を腹腔内投与し、感染後 7、14、21、120 日目の腹腔内、肝臓、脾臓、肺の臓器内菌数を測定した。

細胞調整：脾臓細胞と肺の単核球を常法に従って回収した(4)。

フローサイトメーター解析：脾臓細胞と肺細胞を以下の抗体で染色した。FITC-conjugated anti-CD3e (145-2C11), CD44 (IM7), and IFN- $\gamma$  (XMG1.2) mAbs; PE-conjugated anti-NK1.1 (PK136), TCR $\gamma\delta$  (UC7) and CD8 $\alpha$  (53-6.7)

mAbs; Cy-chrome-conjugated anti-CD4 (GK1.5), CD8a (53-6.7), and TCR $\beta$  (H57-597) mAbs; allophycocyanin (APC)-conjugated streptavidin; biotin-conjugated anti-Ly5.1 mAb (A20) 、 FITC-conjugated hamster anti-mouse Bcl-2 mAb (3F11) or its isotype FITC-conjugated control Ab to hamster (BD Pharmingen) OVA<sub>257-264</sub>-H-2K<sup>b</sup> tetramers (MBL). 細胞を PE-, FITC-, and biotin-conjugated mAbs/Cy-Chrome-conjugated streptavidin で染色したあと、FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA)で解析した。

細胞培養：脾臓または肝臓からリンパ球を回収し、CD4 または CD8 T 細胞に分離して、PPD および抗原提示細胞（マイトマイシン処理 C57/BL6 脾臓細胞）を加えて培養し *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. でサイトカイン産生を測定した。細胞内のサイトカインは 10 mg/ml Brefeldin A (Sigma Chemical CO., St.Louis, MO)で処理して、固定して FITC-conjugated IFN- $\gamma$  mAb or FITC-conjugated isotype control rat IgG (PharMingen)で染色して、フローサイトメーターで測定した。

*In vivo* 細胞障害活性: B6-Ly5.1+ 脾臓細胞を (5 mM) または(0.5 mM) CFSE. でラベルして CFSE<sup>high</sup> 細胞のみ 5 mg/ml OVA<sub>257-264</sub> peptide をパルスした。CFSE<sup>high</sup> 細胞と CFSE<sup>low</sup> 細胞を rBCG-OVA 感染マウスに静注して 24 h 時間後フローサイトメーターで解析した。

統計処理: Student's *t* test. で統計処理を行った。 $p < 0.05$  を有意とした。

## C 研究結果

### 臓器内菌数の動態

2x10<sup>6</sup> の BCG(Tokyo 株)を腹腔内に投与した各臓器内菌数は感染早期の 7、14、28 日後では、コントロールマウスと顕著な差を認めなかったが、120 日目では、IL-15 KO マウスで非リンパ組織である肺または肝臓で有意に増加していた。

### CD4T 細胞のサイトカイン産生能

IL-15KO マウスにおける BCG 特異的 Th1 細胞応答を調べるために、脾臓細胞と肺細胞から CD4T 細胞を単離して PPD に対する  $\gamma$  IFN の産生を調べたところ、PPD 特異的 CD4<sup>+</sup> Th1 細胞の産生は、感染 28 または 120 日目で IL-15KO マウスとコントロールマウスで肺及び脾臓において顕著な差を認めなかった。

### 抗原特異的 CD8T 細胞の産生

抗原特異的 CD8T 細胞の産生を比較するために IL-15K マウスに rBCG-OVA を感染させて OVA<sub>257-264</sub> 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞をテトラを用いて経時的に解析した。その結果、OVA 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞は、感染 28 日目では各臓器でコントロールマウスと同程度であったが、感染長期の 70、120 日目では IL-15 KO マウスで著明に減少し特に肺においてその差は顕著であった。次に OVA<sub>257-264</sub> ペプチドを用いて細胞内サイトカイン染色をおこなったところ、テトラ染色の結果と一致して、OVA 特異的  $\gamma$  IFN 産生 CD8<sup>+</sup> T 細胞は、感染 28 日目では各臓器でコントロールマウスと同程度であったが、感染長期の 70、120 日目では IL-15 KO マウスで著明に減少して

いた。またアポトーシス細胞数を活性化型カスパーゼ3染色で調べてところ、OVA 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞のアポトーシス細胞数は、感染 28 日目では各臓器でコントしてロールマウスと同程度であったが、感染長期の 70、120 日目では IL-15 KO マウスで著明に増加していた。

#### In vivo 細胞傷害活性

次に OVA<sub>257-264</sub> ペプチドパルス脾臓細胞を用いて In vivo 細胞傷害活性細胞を比較した。テトラー染色の結果と一致して、OVA 特異的キラーCD8<sup>+</sup> T 細胞活性は、感染 28 日目では各臓器でコントしてロールマウスと同程度であったが、感染長期の 70、120 日目では IL-15 KO マウスで著明に減少していた。

#### D 考察

長期の BCG 感染に対して、IL-15 KO マウスでは抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞が非リンパ組織で著明に減少し臓器内菌数が増加していた。IL-15 KO マウスは、BCG 感染後の抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞の維持が低下している可能性が考えられる。正常マウスに IL-15 誘導剤や IL-15 そのものを投与してメモリーCD8<sup>+</sup> T 細胞を増加させることによって BCG ワクチンの効果を強める可能性が示唆される。

#### E 結論

BCG 感染に対して、IL-15 ノックアウト(KO) マウスでは抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞が肺で著明に減少し、臓器内菌数が増加していた。IL-15 は BCG 感染後エフェクターメモリーCD8<sup>+</sup> T 細胞の非リンパ組織での維持に重要であると考えられる。

#### G 研究発表

##### 論文発表

1. Yajima, T., H. Nishimura, S. Sad, H. Shen, H. Kuwano, and Y. Yoshikai. 2005. A novel role of IL-15 in early activation of memory CD8<sup>+</sup> CTL after re-infection. *J. Immunol.* 174:3590-7
2. Yajima T., Yoshihara K., Nakazato K., Kumabe S., Koyasu S., Sad, S., Shen H., Kuwano H., and Yoshikai 2006. IL-15 regulates CD8<sup>+</sup> T cell contraction during primary infection *J.Immunol.* 176:507-15.
3. Saito, K, Yajima T, Kumabe S, Doi T, Nishimura H, Sad S, Shen H and Yoshikai Y. 2006 Impaired protection against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin infection in IL-15 deficient mice *J.Immunol* 176: 2496-2504

#### H 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

抗酸菌 DNA の宿主免疫賦活機構

分担研究者 山本 三郎 国立感染症研究所細菌第二部第四室室長

研究要旨 ヒト PDC では IFN- $\gamma$  産生に必要なシグナルが NF- $\kappa$ B に制御されて発現されていた。CpG DNA は NF- $\kappa$ B と p38 MAPK の相互活性化を起こし IRF-7 を誘導すると考えられた。さらに IRF-7 の活性化にも関わり、そのため IFNAR 非依存性の経路で IFN- $\gamma$  が産生されると考えられた。

A. 研究目的

結核菌を含む細菌 DNA やウイルス DNA に高頻度に存在する非メチル化 CpG モチーフを含むオリゴヌクレオチド(CpG DNA)は、B 細胞や形質細胞様樹状細胞 (PDC) に TLR9 を介してサイトカイン、ケモカイン産生を誘導し、免疫応答を活性化する。分担者らはこれまでに、ヒト PDC では、NF- $\kappa$ B family member のうち p50 と p65 が構成的に活性化されており、その活性は CpG DNA 刺激により p38 MAPK に依存して亢進すること、IFN- $\alpha$  遺伝子の転写因子である IRF-7 も構成的に発現されているが、その発現は、CpG DNA 刺激後、p38 MAPK と NF- $\kappa$ B の下流で形成される ISGF3 を介して亢進すること、IFN 誘導性遺伝子である IP-10 や MIP-1 $\alpha$  も p38 MAPK や NF- $\kappa$ B の下流で誘導されること、これらの経路は IFNAR に非依存性に始動されることを報告してきた。本研究では、CpG DNA による PDC の活性化を NF- $\kappa$ B を介した経路から検討するとともに、遺伝子操作細胞やマウス PDC で IFN- $\alpha$  産生への関与が示唆されている他の IRF family member のヒト PDC 活性化への関与、および CpG DNA による IRF-7 の活性化が PDC に IFN- $\alpha$  の大量産生をも

たらず可能性について検討した。

B. 研究方法

ヒト PDC は、インフォームドコンセントにより供与された健常成人の末梢血から、BDCA4<sup>+</sup> または Lin<sup>-</sup>/CD11c<sup>-</sup> 細胞として精製した。NF- $\kappa$ B の DNA 結合活性は ELISA、遺伝子の発現は Real-time PCR、蛋白の定量とリン酸化は ELISA、Western Blot またはフローサイトメトリー法により測定した。polyG を結合したパリンドローム型 CpG DNA を PDC の TLR9 リガンドとして用いた。

C. 研究結果

最近、IFN- $\alpha/\beta$  とはレセプターを異にする I 型 IFN 様サイトカイン、IL-28A/B(IFN- $\lambda$  2/3) と IL-29(IFN- $\lambda$  1)、が同定されたことから、I 型 IFN 産生細胞である PDC がどのタイプの IFN を発現するかを、リアルタイム PCR 法によりスクリーニングした。PDC は IFN- $\kappa$  を構成的に発現していたが、IFN- $\alpha$  のすべてのサブタイプ - $\beta$ 、- $\omega$ 、および IL-28A/B、-29 の発現は検出下限以下であった。CpG DNA で刺激すると IFN- $\kappa$  を除く全てが誘導された。

PDC では NF- $\kappa$ B が活性化された状態で検出され、その活性は CpG DNA 刺激が加わると増強する。そこで、この構成的活性化と CpG DNA による活性の増強が、PDC の IFN- $\alpha$  産生にどのように関わるかを検討した。

PDC では、その分化に関わると考えられている IRF-8、TLR9 シグナリングに関わる p38 MAPK や STAT1 に加えて、I 型 IFN の転写因子 IRF-3、-5、-7 が構成的に発現されていた。I $\kappa$ B のリン酸化を阻害する PDTC の存在下に非刺激培養すると、これらの発現は IRF-3 を除いて全て抑制された。

CpG DNA と共に 4 時間培養した PDC について IRF-3、-5、-7、-8 の mRNA レベルを比較したところ、IRF-7 のみ、発現が亢進し、蛋白の増加も Western Blot で確認された。NF- $\kappa$ B の DNA 結合を阻害する dexamethasone (DEX) を共存させると、IRF-7 の発現は、遺伝子レベルと蛋白レベル、いずれも低下した。

既に報告したように、CpG DNA 刺激 PDC では p38 MAPK が活性化され、その下流で IRF-7 が誘導される。そこで、NF- $\kappa$ B と p38 MAPK の関係をそれぞれの阻害剤を用いて検討した。CpG DNA 刺激により亢進する NF- $\kappa$ B p50 と 65 の活性は、p38 MAPK 阻害剤(SB203580)を共存させておくと抑制された。また、CpG DNA によって誘導される p38 MAPK のリン酸化とその下流でおこる STAT1 のリン酸化は、NF- $\kappa$ B 阻害により抑制された。

分担者らは、CpG DNA による IFN- $\alpha$  の産生には p38 MAPK 依存性の STAT1 リン酸化と IRF-7 の発現が必要であり、IRF-3 の関与は少ないことを報告してきた。今回の検討により、PDC では、CpG DNA による活性化に必要なシグナル蛋白、p38 MAPK、STAT1、IRF-7、は、NF- $\kappa$ B に制御されて恒常的に発現されていることが

示された。このような特性を有する PDC に、CpG DNA 刺激が加わると NF- $\kappa$ B の経路と p38 MAPK の経路が相互に活性化されるため、IFNAR 非依存性に STAT1 リン酸化がおこり、その結果 IRF-7 が誘導されると考えられる。

PDC は IFN- $\alpha$  の転写因子である IRF-7 を構成的に発現するが、IFN- $\alpha$  は刺激が加わって初めて誘導される。そこで、CpG DNA による IRF-7 の活性化をその核内移行を指標に検討した。非刺激 PDC の核画分に IRF-7 は検出されなかった。一方、CpG DNA 刺激後、IRF-7 遺伝子が新たに誘導される前 (CpG DNA 添加後 3 時間) に抽出した核画分には IRF-7 が検出された。この結果は、CpG DNA がもたらす細胞内シグナルが IRF-7 を活性化することを示唆しており、現在、CpG DNA による IFN- $\alpha$  の誘導に、構成的 IRF-7 と新たに合成された IRF-7 のいずれが関与しているかについて検討を行っている。

#### D. 考察

CpG DNA (g10GACGA) は CpG パリンドローム配列 GACGATCGTC の両側にそれぞれ 10 個の G の繰り返しを有し、ヒト PDC に IFN- $\alpha$  や IP-10 の産生を強く誘導する。このタイプの CpG DNA は D/A タイプとされ、IFN- $\alpha$  誘導能が高いのに対し、TCG の繰り返しを有しすべてがチオール化されている K/B タイプの配列は、IFN- $\alpha$  誘導能は低く、成熟化能が高いことが知られている。最近、IFN- $\alpha$  誘導産生能、成熟化能ともに高い C タイプの CpG DNA が報告されているが、その配列には両タイプの特性が取り込まれている。CpG DNA による IFN- $\alpha$  産生はエンドソームの酸性化を阻害するクロロキンで完全に抑制される。したがって CpG DNA 自体はエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれんらかの修飾を受ける過程が重要である。TLR2 や TLR4 がそれぞれのリガンドと細胞膜表面で結合するのと異なり、CpG

DNA は細胞に取り込まれた後エンドソーム内で TLR9 によって認識される。TLR9 からのシグナルはアダプター分子である MyD88 経由で TRAF 以下のカスケードを刺激して NF- $\kappa$ B や MAPK の活性化をもたらす。種々のサイトカインやケモカインが誘導される。しかし IFN- $\alpha$  の誘導経路についてはよくわかっていない。われわれは CpG DNA で刺激したヒト PDC において、p38 MAPK 依存的に STAT1 がリン酸化して IFN- $\alpha$  遺伝子の転写因子 IRF-7 の発現が亢進すること、NF- $\kappa$ B の活性化が増強することを見出した。ウイルス感染に伴う IFN- $\alpha$  の産生は、IFN- $\beta$  によるオートクラインが引き金になっているが、CpG DNA による IFN- $\alpha$  産生誘導は IFN- $\alpha/\beta$  に支配されず、p38 MAPK であってウイルス刺激のシグナルと異なる。

## E. 結論

ヒト PDC では、構成的に活性化されている NF- $\kappa$ B が、IFN- $\alpha$  の誘導に必要なシグナル、STAT1、p38 MAPK、IRF-7 の恒常的発現に関わっていることが示された。

PDC は IRF-3、IRF-5、IRF-7、IRF-8 を構成的に発現していたが、その発現は、CpG DNA 刺激後、IRF-7 のみが亢進した。

CpG DNA 刺激 PDC では、NF- $\kappa$ B を介した p38 MAPK の活性化と p38 MAPK を介した NF- $\kappa$ B の活性化が協調して起こり、その結果 STAT1 がリン酸化され、IRF-7 が誘導されると考えられた。

また構成的 IRF-7 が核へ移行したことから、CpG DNA がもたらす TLR9 シグナルが IRF-7 の活性化に関わることが示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ohishi K., Takishita K., Kawato M., Zenitani

R., Bando T., Fujise Y., Goto Y., Yamamoto S. & Maruyama T. (2005) Chimeric structure of omp2 of *Brucella* from Pacific common minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*). *Microbiology and Immunology* 49, 7889-7893.

Matsumoto, S., Matsumoto, M., Umemori, K., Ozeki, Y., Furugen, M., Tatsuo, T., Hirayama, Y., Yamamoto, S., Yamada, T. and Kobayashi, K. (2005) DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Immunol.* 175: 441-449.

### 2. 学会発表

Matsumoto, S., Matsumoto, M., Umemori, K., Ozeki, Y., Furugen, M., Tatsuo, T., Hirayama, Y., Yamamoto, S., Yamada, T., Kobayashi, K.: DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. 40th Annual U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program's Tuberculosis and Leprosy Conference. July 28-30, 2005, Seattle, Washington, U.S.A.

Yamamoto, S., Haga, S., Yamazaki, T., Yamazaki, T., Ski, M., Honda, I., Ikeda, N.: Biological and immunological activity of BCG Tokyo 172 subpopulations. 40th Annual U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program's Tuberculosis and Leprosy Conference. July 28-30, 2005, Seattle, Washington, U.S.A.

松本壮吉、小林和夫、松本真、尾関百合子、山本三郎、山田毅：結核菌のヒストン様蛋白質 Mycobacterial DNA-binding protein 1 の抗原性における DNA 介在の意義、第 80

回日本結核病学会総会、2005年5月11-13日、大宮市。

平山幸雄、松本壮吉、小林和夫、和田崇之、尾関百合子、西内由起子、山本三郎：抗酸菌の肺胞上皮細胞侵入における Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) とヒアルロン酸の役割、第 80 回日本結核病学会総会、2005年5月11-13日、大宮市。

瀧井猛将、山本三郎、高橋光良：*M.bovis* BCG 亜株間の NO 感受性と NO 産生誘導能の差異に関する研究、第 80 回日本結核病学会総会、2005年5月11-13日、大宮市。

平山幸雄、松本壮吉、和田崇之、尾関百合子、梅森清子、山本三郎、西内由紀子、松本真、小林和夫：結核菌の肺胞上皮細胞への接着/侵入におけるヒアルロン酸-MDP1 結合の役割、第 78 回日本細菌学会総会、2005年4月4-6日、東京都江戸川区。

松本壮吉、松本真、梅森清子、尾関百合子、山本三郎、山田毅、小林和夫：結核菌の核酸結合性蛋白質と DNA の複合体に対する免疫応答解析、第 78 回日本細菌学会総会、2005年4月4-6日、東京都江戸川区。

Matsumoto Sohkiichi, Umemori Kiyoko, Ozeki Yuriko, Yamamoto Saburo, Yamada Takeshi, Kobayashi Kazuo: The role of mycobacterial DNA-binding protein 1-DNA complex in the host protection against *Mycobacterium tuberculosis*. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会、2005年12月13-15日、横浜市。

Ozeki Yuriko, Matsumoto Sohkiichi, Umemori Kiyoko, Yamamoto Saburo, Kobayashi Kazuo: Extracellular occurring mycobacterial DNA-binding protein 1 is involved in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through binding to hyaluronic acid. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会、2005年12月13-15日、横浜市。

Osawa Youko, Iho Sumiko, Takatsuka Hisakazu, Matsuki Takasumi, Fujieda Shigeharu, Yamamoto Saburo. NF- $\kappa$ B/p38 MAPK-dependent and independent pathways are involved in CpG DNA-induced IFN- $\gamma$ , CXCL10, and CCL3 production in human pDC. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会、2005年12月13-15日、横浜市。

前山順一、山本三郎、後藤紀久：CpG-DNA のジフテリアトキシソイドに対するアジュバント効果、第 35 回日本免疫学会総会・学術集会、2005年12月13-15日、横浜市。

H. 知的財産権の出願 ・ 登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)

分担研究報告書

結核菌由来因子による宿主免疫応答の誘導機構に関する研究

分担研究者：田村 敏生 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 室長

研究要旨

Peptide-25(結核菌分泌タンパク Ag85B 由来)特異的 T 細胞抗原受容体(TCR)を発現するトランスジェニックマウス(P25 TCR-Tg)を用い、Peptide-25 特異的ナイーブ CD4<sup>+</sup> 細胞が選択的に Th1 細胞へと分化する機構に関して解析した。その結果、P25 TCR-Tg ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞は Peptide-25/MHC クラス 2 分子との相互作用による TCR からの活性化シグナルのみで Th1 分化誘導サイトカイン IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-18 非依存性に Th1 細胞へと分化出来ること、この Peptide-25 による Th1 分化には、Th1 分化特異的転写因子 T-bet に依存した分化と非依存的な分化誘導機構が存在することが明らかとなった。また、Peptide-25 によるアジュバント活性について検討した結果、Peptide-25 によって誘導される Th1 細胞への分化・活性化が IFN- $\gamma$ 非依存的に抗原提示細胞のクロスプレゼンテーションを増強することが明らかとなった。

A. 研究目的

Th1 細胞は IFN- $\gamma$ や TNF- $\beta$ を産生し、抗結核免疫のエフェクター細胞（マクロファージ、細胞障害性(CD8<sup>+</sup>)T 細胞)を活性化する。したがって、選択的に結核菌特異的 Th1 免疫応答を惹起することは、結核に対する生体防御において極めて重要である。本研究は、結核菌体タンパク質の抗原ペプチドで、Th1 免疫応答を誘導し、かつアジュバント活性を示すものを探索し、抗結核免疫応答を強化するシステムを確立すること、さらに Th1 応答誘導の分子機構を明らかにすることを研究目的としている。

B. 研究方法

1.細胞

野生型、IFN- $\gamma$ 欠損または T-bet 欠損 Peptide-25 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス(P25 TCR-Tg)より IMag システム、FACSAria(共に Beckton Dickinson)を用い、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を調製した。OVA 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス (OT-1)より IMag システムを用い CD8<sup>+</sup> T 細胞を調製した。野生型または IFN- $\gamma$ 欠損 C57BL/6 マウス脾臓細胞より T 細胞、NK 細胞を IMag システムを用いて除き抗原提示細胞として用いた。また、場合によって I-A<sup>b</sup> 遺伝子を導入した Chinese