

り全身に疾患が引き起こされるということは経験的に知られていた。病巣感染とは「細菌を有するところの限局した慢性炎症巣存在によって引き起こされる病症、この場合病巣自身からの症状はきわめて少ないかあるいは現れない程度であって、病巣から遠隔の生体内に一定の器質的ないし機能的障害を呈する病態」として定義されている。扁桃との関連ではリウマチ性狭心症との関連が初めての報告であり、ヨーロッパ諸国を中心として病巣性感染の研究が盛んに行われることとなった。その後病巣感染の本体は抗原抗体反応を主体とする液性免疫の異常として理解されるようになり、本邦においても1963年に日本扁桃研究会が開催され扁桃を病巣とする疾患について議論されるに至った。その後も臨床において各施設から掌蹠膿疱症やIgA腎症をはじめとする口蓋扁桃摘出術(以下、扁桃術)が奏効する様々な疾患が報告され、扁桃が全身性免疫疾患の発症とその維持に重要な位置を占めることが明らかとなり関心を集めるに至った。

## 2. 掌蹠膿疱症 (PPP)

### a. PPPにおける扁桃のLES

PPPは手掌および足蹠に無菌性膿疱を生じ、左右対称性に増悪、寛解を繰り返す、ついで発赤と

角化局面をきたすきわめて難治な皮膚疾患である。病巣扁桃症の中でも扁桃術による治癒率が最も高いことから、盛んに研究が行われている疾患の一つである。臨床的にPPP患者の血清中の抗ケラチン抗体価が健常者と比べて有意に上昇しており、病態の形成には液性免疫による自己免疫疾患が関与していることが示唆されている。また反復性扁桃炎 recurrent tonsillitis (RT)とPPPの扁桃組織を抗ケラチン抗体を用いて免疫組織染色を行うと、PPPでは対照のRTに比べて扁桃の陰窩上皮層が肥厚している像が認められ、扁桃実質内へ陰窩上皮細胞が陥入する特徴的な所見がみられた<sup>17)</sup>。このように拡大したLESには陰窩上皮細胞が胚中心を全周性に取り囲むような所見が多いため、これをcircular lymphoepithelial lesion with germinal center (CLG)としてPPPとRTの扁桃を比較検討すると、PPPではRTに比べてCLGの数は有意に多いことが判明した(図2)。このことからPPP患者の扁桃では上皮の陥入異常が生じていることがわかり、異常に拡大したLESはPPPの病態形成あるいはその維持に何らかの役割を果たしているものと考えられる。

### b. 陰窩上皮細胞におけるp63の発現

上皮親和性を示すp63はp53ファミリー遺伝子に属し、p53応答性DNA配列を介する転写誘

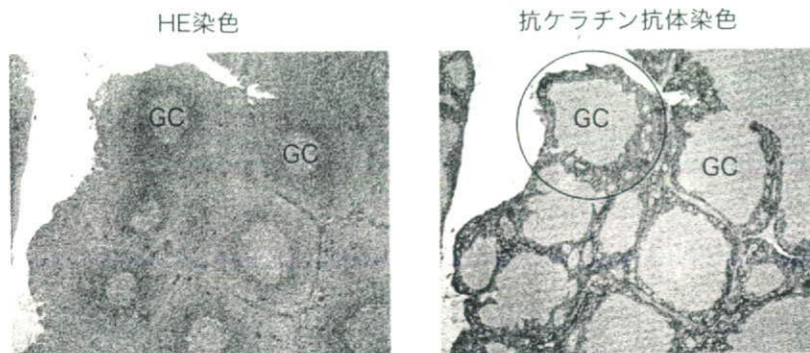


図2 circular lymphoepithelial lesion with germinal center (CLG)

LESで上皮構造が胚中心を全周性に取り囲む所見(丸印)、すなわちCLGはPPPで比較的多く認められる。

導, アポトーシス誘導, 細胞増殖抑制などに関与する<sup>18)</sup>。一方でp63ノックアウトマウスの解析からp63は発生や分化に関与するなど, p53とは全く異なる機能をもつことがわかっている。胸腺組織においてp63は皮質髄質の胸腺上皮細胞に特徴的な発現分布を示し, 胸腺上皮細胞によるT細胞の分化・成熟において重要な役割をしていることが示唆されている<sup>19)</sup>。免疫組織として胸腺と構造的な類似性を示す扁桃の上皮機能の解析を行うと正常扁桃陰窩のLESの上皮細胞ではp63は基底側から表層側に全層性に発現が認められた。一方PPP患者のLESはRT患者に比べ扁桃実質内に広くレース状に陥入するp63陽性の陰窩上皮の構造が比較的多く認められた。このことからPPP患者にみられる拡大したLESを構成する主体はp63陽性の陰窩上皮細胞であることがわかった(図3)。

扁桃初代培養で得られた上皮細胞の遺伝子発現解析では, RTに比較してPPPでは有意にp63, IL-6の増加が認められた。また上皮細胞の初代培養上清を用いたELISA解析では, PPPはRTに比べてIL-6の産生が亢進していた。さらにp63をヒト上皮細胞株に遺伝子導入しその培養上清のIL-6産生をELISAにて解析するとp63遺伝子導入細胞ではコントロール遺伝子導入細胞に比べて

IL-6の優位な増加が認められた。以上の結果から上皮細胞特異的な転写因子であるp63が扁桃上皮細胞のIL-6の発現を増加させることが示唆された。したがってPPPの扁桃においては陰窩上皮細胞のp63の発現が亢進しており, その結果IL-6の産生の亢進が惹起され, LESでB細胞を刺激する場が形成されているものと考えられる。このようなPPPにおけるLESの陰窩上皮の特徴的な形態と機能が, 臨床的に寛解再燃を繰り返し慢性的な経過を示すPPPの病態維持に関与しているのかもしれない。

### 3. IgA腎症

IgA腎症の病因はIgA1を主体としたIgAと補体C<sub>3</sub>による免疫複合体の腎糸球体メザンギウム領域への沈着であり, 高率に腎不全が進行する。慢性糸球体腎炎の中で成人では30%以上, 小児では20%以上と最大の発症頻度を占め, 20年の経過で約40%が腎不全に陥る予後不良な腎疾患である。本邦では1983年にIgA腎症の治療に対する扁桃摘術の有効性についての報告がなされ, IgA腎症発症と扁桃の関連性が注目されるようになった<sup>20,21)</sup>。XieらはIgA腎症と診断された患者を対象に扁桃摘術を施行した群と扁桃摘術を施行しなかった群の2群間で予後を比較検討すると扁桃摘術

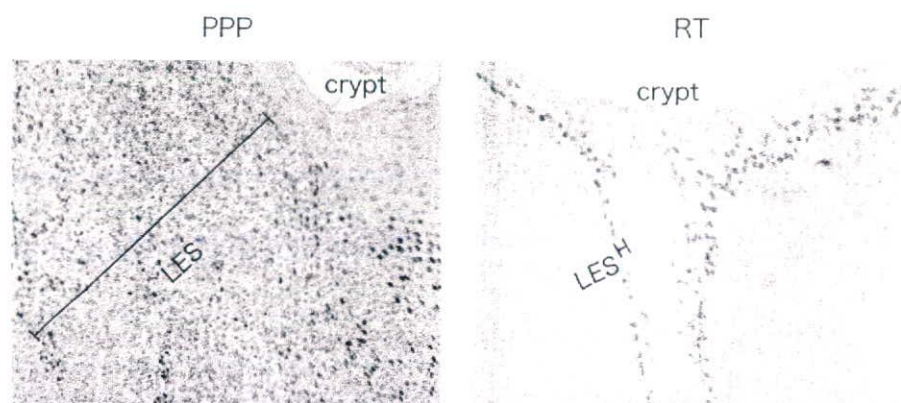


図3 PPPとRTにおけるLESの比較

PPPではRTに比べて拡大したLESが認められ, p63陽性の陰窩上皮が扁桃実質内にレース状に陥入する像がめだつ。

群の腎生存率は非扁桃摘術群に対して統計学的に有意差が認められたと報告した<sup>22)</sup>。その後IgA腎症と扁桃の関連性を示唆する報告が相次いでされるようになった。

IgA腎症患者の扁桃内リンパ球を解析すると、IgA産生形質細胞の数が増加しており、さらには *in situ* hybridization法によりIgA腎症の扁桃の胚中心には二量体形成にかかわるJ鎖のmRNA陽性細胞が多数みられる<sup>23)</sup>。すなわちIgA腎症の扁桃におけるIgAの産生は二量体IgAが中心であり、扁桃がIgA腎症において重要なIgA産生部位であることが示唆されている。さらにIgA腎症の扁桃では健常者に比べて有意にIgA1/IgA2比が上昇することも報告されている<sup>24)</sup>。またSuzukiらはIgA腎症患者の扁桃・咽頭粘膜からパラインフルエンザ菌が高率に分離されることに注目した<sup>25)</sup>。IgA腎症患者の糸球体メザンギウム領域にパラインフルエンザ菌の菌体成分が認められることから、扁桃に感染したパラインフルエンザ菌が抗原となりそれに対するIgAを主体とする免疫複合体が糸球体に沈着することが発症要因であるとの仮説を提唱した。一方で、IgA腎症患者の糸球体に沈着するIgA1のヒンジ部に糖鎖異常があることがわかり、これらの抗体は抗原非存在下で自己会合体を形成し糸球体メザンギウム領域に沈着することが報告されている<sup>26,27)</sup>。SatoらはIgA腎症患者とRT患者の扁桃を抗サイトケラチン抗体を用いてLESの陰窩上皮構造の違いを比較検討し、LESの発達低下は疾患の重症度と相関しており、IgA腎症の発症要因として重要であることを論じた<sup>28)</sup>。

近年、TNFスーパーファミリーに属するBlyS (B lymphocyte stimulator) が発見され、B細胞上に発現する受容体と結合し、成熟B細胞の増殖や免疫グロブリンの産生の増加をうながすことが知られてきている<sup>29)</sup>。BlySトランスジェニックマウスでは未熟B細胞の異常は認められないが、

脾腫、リンパ節肥大や末梢血B細胞の増多がみられ、さらに血清中に自己抗体が出現することから、BlySは自己免疫疾患の発症に関与する因子として注目されている。IgA腎症患者ではIFN- $\gamma$ の刺激下でCD1c陽性細胞のBlySの発現の上昇がみられることが報告されている。またIgA腎症の扁桃単核球でIFN- $\gamma$ の産生が亢進していることがわかっているため、産生が亢進したBlySによる扁桃B細胞の活性化がIgA腎症の発症に関与しているのかもしれない<sup>30)</sup>。

### むすび

扁桃病巣感染症の治療に対する扁桃摘術の有効性が多数報告されているにもかかわらず、疾患の明確な病態解明にはいまだ至っていないのが現状である。扁桃にはその本来の役割である外来微生物の排除という生体防御機構の一面と自己免疫疾患発症の原基となり得る扁桃病巣感染症という二面性をもち合わせている。扁桃研究は発展の途上であるが、自然免疫や粘膜免疫を対象とした研究領域の発展に牽引され徐々にその生理的機構が明らかにされ始めている。扁桃に特徴的な構造であるLESの免疫応答の解明やその主要な構成要素である陰窩上皮細胞の機能解析、LES内のB細胞ならびに樹状細胞の新しいサブセットの発見は扁桃の独自性を物語っている。扁桃のもつ生理的な機能の解明は扁桃病巣感染症に対する新しい治療法の開発に福音をもたらすに違いない。

### 文献

- 1) Slipka J. The palatine tonsil as an evolutionary novelty. *Acta otolaryngol.* 1996; 523: 8-11.
- 2) von Gaudecker B, Muller-Hermelink HK. The development of the human tonsilla palatina. *Cell Tissue Res.* 1982; 224: 579-600.
- 3) 朝倉光司, 山中 昇. 扁桃50のQ&A. 1版. In: 形浦昭克, 編. 東京: 南山堂; 1988. p. 10-4.
- 4) 磯村源蔵, 酒井一由. 上皮—リンパ共生. *生体の科学.* 2004; 55: 454-5.

- 5) Perry M, Whyte A. Immunology of the tonsils. *Immunol Today*. 1998; 19: 414-21.
- 6) Vos Q, Lees A, Wu ZQ, et al. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev*. 2000; 176: 154-70.
- 7) Fields ML, Metzgar MH, Hondowicz BD, et al. Exogenous and endogenous TLR ligands activate anti-chromatin and polyreactive B cells. *J Immunol*. 2006; 176: 6491-502.
- 8) Kerner JD, Appleby MW, Mohr RN, et al. Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk. *Immunity*. 1995; 3: 301-12.
- 9) Reid RR, Prodeus AP, Khan W. Endotoxin shock in antibody-deficient mice: unraveling the role of natural antibody and complement in the clearance of lipopolysaccharide. *J Immunol*. 1997; 159: 970-5.
- 10) Martin F, Kearney JF. Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity*. 2000; 12: 39-49.
- 11) Takahashi K, Nishikawa Y, Sato H, et al. Dendritic cells interacting mainly with B cells in the lymphoepithelial symbiosis of the human palatine tonsil. *Virchows Arch*. 2006; 448: 623-9.
- 12) Hatzivassiliou G, Miller I, Takizawa J, et al. IRTA1 and IRTA2, novel immunoglobulin superfamily receptors expressed in B cells and involved in chromosome 1q21 abnormalities in B cell malignancy. *Immunity*. 2001; 14: 277-89.
- 13) Miller I, Hatzivassiliou G, Cattoretti G, et al. IRTAs: a new family of immunoglobulinlike receptors differentially expressed in B cells. *Blood*. 2002; 99: 2662-9.
- 14) Attygalle AD, Liu H, Shirali S, et al. Atypical marginal zone hyperplasia of mucosa-associated lymphoid tissue: a reactive condition of childhood showing immunoglobulin lambda light-chain restriction. *Blood*. 2004; 104: 3343-8.
- 15) Falini B, Tiacci E, Pucciarini A, et al. Expression of the IRTA1 receptor identifies intraepithelial and subepithelial marginal zone B cells of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). *Blood*. 2003; 102: 3684-92.
- 16) 形浦昭克. 扁桃病巣感染症—発現機序の解明と臨床への応用—. In: 形浦昭克, 編. 第87回日本耳鼻学会総会宿題報告モノグラフ; 1987. p. 1-217.
- 17) Koshiba S, Ichimiya S, Tonooka A, et al. Tonsillar Crypt Epithelial Cells of Palmoplantar Pustulosis Produce Interleukin-6 under the Control of p53-Homologues. *IMMUNOLOGY* 2006. 2006 May 12-16; Boston, MA. USA.
- 18) Yang A, McKeon F. P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. 2000; 1: 199-207.
- 19) Kikuchi T, Ichimiya S, Kojima T, et al. Expression profiles and functional implications of p53-like transcription factors in thymic epithelial cell subtypes. *Int Immunol*. 2004; 16: 831-41.
- 20) 杉山信義, 増田 游. 慢性扁桃炎を伴うIgA腎症8例の扁桃摘効果. *日扁桃誌*. 1983; 22: 132-7.
- 21) 相馬新也, 三部重雄, 氷見徹夫, 他. 扁桃摘により軽快したIgA腎症の1例. *日扁桃誌*. 1983; 22: 138-43.
- 22) Xie Y, Nishi S, Ueno M, et al. The efficacy of tonsillectomy on long-term renal survival in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2003; 63: 1861-7.
- 23) Bene MC, Hurault De Ligny B, Kessler M, et al. Confirmation of tonsillar anomalies in IgA nephropathy: a multicenter study. *Nephron*. 1991; 58: 425-8.
- 24) Itoh A, Iwase H, Takatani, et al. Disordered balance of IgA subclass production in the tonsils of some IgA nephropathy patients. *J Nephrol*. 2005; 18: 575-81.
- 25) Suzuki S, Nakatomi Y, Sato H, et al. Haemophilus parainfluenzae antigen and antibody in renal biopsy samples and serum of patients with IgA nephropathy. *Lancet*. 1994; 343: 12-6.
- 26) Mestecky J, Tomana M, Crowley-Nowick PA, et al. Defective galactosylation and clearance of IgA1 molecules as a possible etiopathogenic factor in IgA nephropathy. *Contrib Nephrol*. 1993; 104: 172-82.
- 27) Wang Y, Zhao MH, Zhang YK, et al. Binding capacity and pathophysiological effects of IgA1 from patients with IgA nephropathy on human glomerular mesangial cells. *Clin Exp Immunol*. 2004; 136: 168-75.
- 28) Sato Y, Hotta O, Taguma Y, et al. IgA nephropathy with poorly developed lymphoepithelial symbiosis of the palatine tonsils. *Nephron*. 1996;

- 74: 301-8.
- 29) Mackay F, Schneider P, Rennert P, et al. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 231-64.
- 30) Goto T, Bandoh N, Yoshizaki T, et al. BAFF up-regulates in vitro IgA production stimulated with CpG-ODN in tonsillar mononuclear cells. *International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways.* 2006 Aug 31-Sep 3; Siena, Italy.

### 3. 結核病巣と T 細胞免疫応答

札幌医科大学病理学第 1 講座 重原 克則

同 講師 田村 保明

同 教授 佐藤 昇志

札幌鉄道病院呼吸器科 四十坊典晴

**key words** *M. tuberculosis*, dormancy, reactivation, host immuneresponse

#### 動 向

結核症はいまだ、発展途上国を中心に世界人口の約 1/3 が感染し、毎年約 800 万人以上が新規発病し、約 175 万人が死亡している人類にとって最大の感染症の 1 つである (2003 年, WHO 推定)。結核菌の属する抗酸菌群は原核細胞に属し、地球上の生命誕生からほどなく発生したと考えられている。*M. ulcerans* は数億年前にゴンドワナ超大陸に生息していたという証拠がある<sup>1)</sup>。現在の遺伝子解析からはヒト型結核菌は結核菌群の共通祖先から分化し、ヒトを中心に宿主を絞り進化を遂げたと考えられる<sup>2)</sup>。結核菌は免疫不全状態がなければ、通常は結核菌に対する感受性の高い宿主に 10~30% くらい感染し、さらにその約 1 割が発病をすると考えられる。感染した宿主は遅延型過敏症を主体とする特異的な肉芽腫性免疫反応が成立するが、それにもかかわらず約 1 割の宿主は一生の間に発病に至る。最近、結核菌は低酸素状態の肉芽腫内に呼吸、代謝を変化させ、低活動状態で長期間潜伏し発病に至ることが明らかになってきた (菌にとっては dormancy, 宿主にとっては latency)<sup>3,4)</sup>。感染症からの“疫”を免れるという本来の目的からは、この成立した特異的抗結核免疫は不完全であるといわざるをえない。本稿

ではこれらにかかわる要因を宿主の免疫反応の側面から最新の知見を通じて検討したい。

#### A. 結核病巣の成立

##### 1. 肺マクロファージ系細胞への感染

空気感染による感染様式で結核菌が呼吸細気管支や肺胞に到達するとマクロファージを中心に一部に感染が起こると考えられている。図 1a に示す通り、マクロファージ表面に存在するレセプター [補体レセプター, mannose レセプター, Toll-like receptor (TLR), Fc $\gamma$  レセプター, surfactant protein (SP) レセプター] を介してマクロファージ内に侵入する。マクロファージには病原菌を消化、殺菌する種々の機構が存在するが、結核菌はこれらの機構に抵抗性のメカニズムを有し細胞内寄生菌としマクロファージ内で増殖する [tryptophane-aspartate containing coat protein (TACO) による phagosome-lysosome fusion の阻害, phagosome 内の pH 低下の抑制, lipoarabinomannan (LAM) による活性酸素産生の抑制等] (図 1a)。

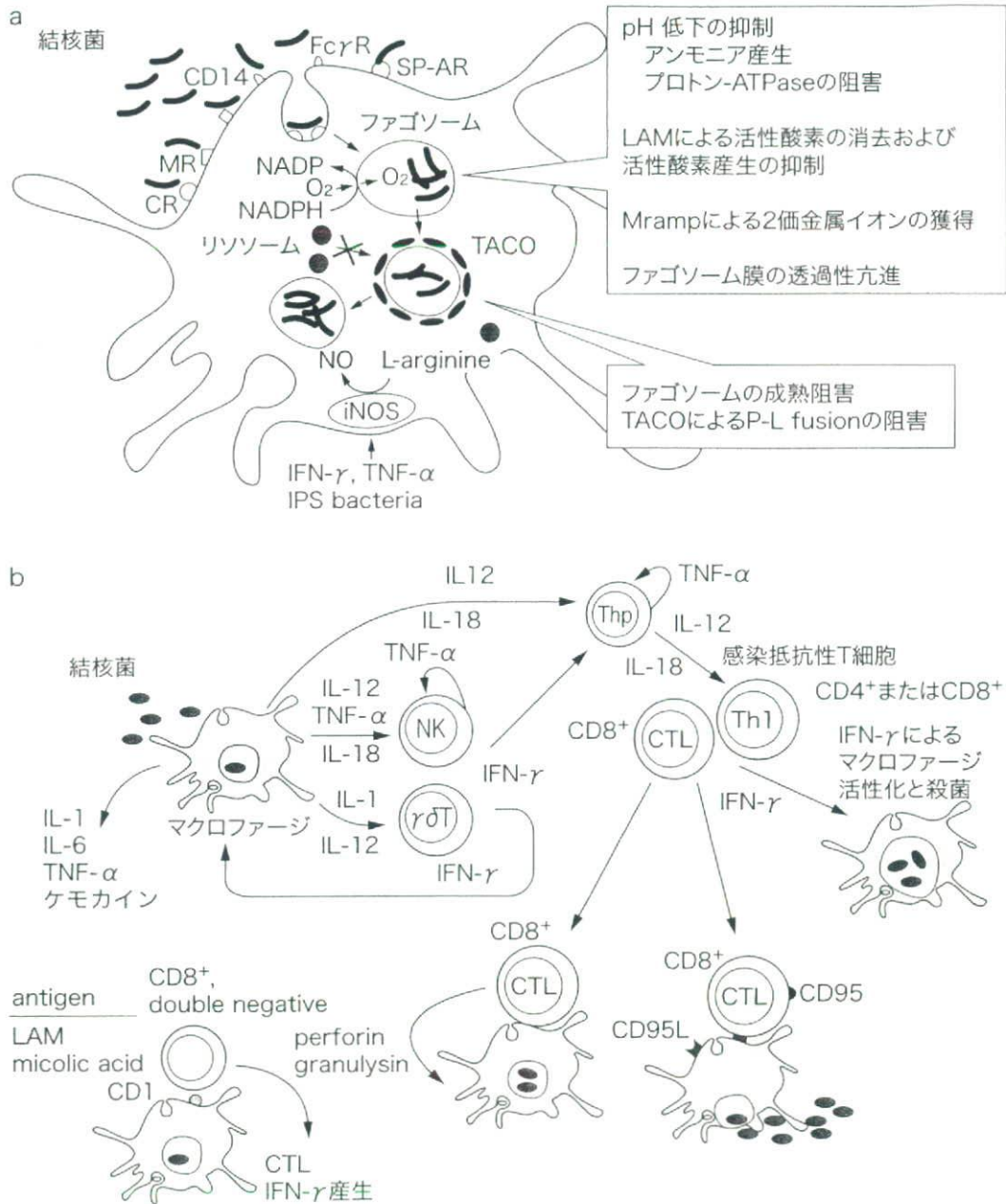


図1 マクロファージ内における結核菌の抵抗性と抗結核防御免疫の成立

- a. マクロファージの殺菌機構と結核菌の抵抗性。  
 CR: 補体レセプター, MR: mannoseレセプター, SP-AR: surfactant protein Aレセプター, TACO: tryptophane-aspartate containing coat protein
- b. 抗結核防御免疫（特に初感染時）の全体像。多くの免疫担当細胞やサイトカイン、ケモカインの関与で成立する。同時に特異的肉芽腫の形成も進行する。

## 2. 初感染防御反応

マクロファージは結核菌を貪食するとそれが引き金となって種々のサイトカインやケモカインを産生し、感染の場にT細胞やその他の炎症細胞を動員する。また、IL-12、IL-18、TNF- $\alpha$ やIL-1

はNK細胞や $\gamma\delta$ T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を誘導する。IFN- $\gamma$ はマクロファージを活性化してその殺菌能を高め、特異的防御免疫が成立するまでの間、菌の増殖を最小限に抑える（図1b）。また、マクロファージ上にTLRが発現しており、特に、

TLR2, 4が結核菌体成分と結合しマクロファージ内にシグナル伝達することが判明している。TLR2は19-kDa mycobacterial lipoproteinと結合し、細胞内のIL-12やnitric oxide synthase 2 (NOS2) を誘導する<sup>5)</sup>。TLRからのシグナルはMyD88からNF- $\kappa$ Bを介して特異免疫の成立に必要なサイトカインを誘導する。

### 3. 結核菌特異的感染 (防御) 免疫の成立

感染マクロファージや樹状細胞 dendritic cell (DC) が抗原提示細胞 antigen presenting cell (APC) となりT細胞応答を惹起する。CD4<sup>+</sup>T細胞では感染マクロファージファゴソーム内の菌体成分はclass II transactivator (CIITA) を介してMHC class IIの経路に入り<sup>6)</sup>、Th1に分化したCD4<sup>+</sup>T細胞が誘導され大量のIFN- $\gamma$ を産生する。一方、CD8<sup>+</sup>T細胞ではvesicleやファゴソーム膜の孔から菌体成分がcytosolに移行し、transporter of antigen processing (TAP) に運ばれclass Iの経路に入るのに加え、同菌体成分やアポトーシスによる感染マクロファージ死細胞の菌体成分をDCが捕捉し、cross presentationとして、IL-12やIL-18の存在下に補助分子とともに抗原提示を行い、CD8<sup>+</sup>T細胞を誘導すると推測されている。最近、結核感染細胞がmethylglyoxalを産生し、結核感染細胞のアポトーシスをうながしDCによるcross presentationを促進している報告がある<sup>7)</sup>。誘導されたCD8<sup>+</sup>T細胞はキラー活性を有しIFN- $\gamma$ 産生を伴う。結核菌の脂質抗原はCD1を介してCD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup>細胞やCD8<sup>+</sup>細胞を、さらに抗原特異的 $\gamma\delta$ T細胞も誘導される。これらに加え、サイトカイン、ケモカインカスケードとともに、感染マクロファージを中心にリンパ球や単球系細胞が集積し肉芽腫が形成され、抗原の処理やさらなる感染の拡大を防ぎ、特異的感染防御免疫が成立する (図1b, 図3)。このように種々の細胞や液性因子の協調のもとに成

立している反応であるが、どの要因が相対的に感染防御に寄与しているかKOマウスを用いて実験した結果が図2である<sup>8)</sup>。IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>、NOS2<sup>-/-</sup>、 $\alpha\beta$ TCR<sup>-/-</sup>、class II<sup>-/-</sup>の順に結核菌は増殖し、class I<sup>-/-</sup>とWT+ $\gamma\delta$ <sup>-/-</sup>は増殖後一定数でとどまる (図2)。

いままでの観察により、結核感染した人の10%前後の人が生存中に結核を発病し (再発, 再感染), 遺伝的に感受性個体と考えられるが, 現在, ヒトの遺伝子解析は進行中であり詳細な結果が明らかとなるには時間を要す。最近の結核菌の免疫組織学的検討から空洞病変のみならず, 安定している結核腫からも免疫応答は認められるにもかかわらず, ほとんどの例で結核菌が検出可能である。Seiler<sup>9)</sup>とUlrichs<sup>10)</sup>らはpolyclonal rabbit anti-*M. bovis* Bacille-Calmette-Guérin serum (pAbBCG) を使用して, 従来のZiehl-Neelsen染色では染まらない結核菌の検出を報告しており, 多くは結核菌のdormancy (臨床的にはlatency) による細胞壁の変化によるものと推測している。このように結核菌は感染防御免疫の成立後, dormant stateに移行し, 宿主内の免疫機構から逃避しながら生き長らえ (latent infection), 時に再活性化 (resuscitation and reactiva-

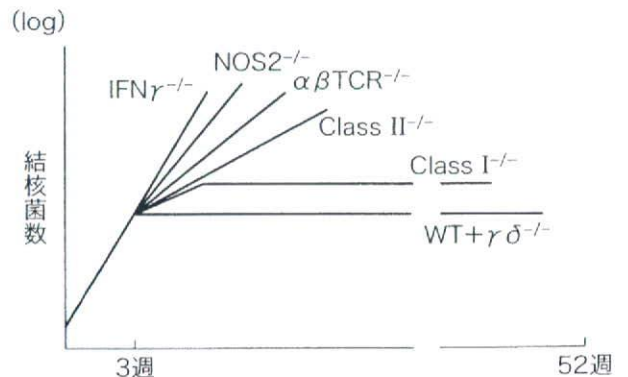


図2 結核関連免疫応答分子のノックアウトマウスにおける結核感染の予後

C57BL/6マウスのIFN- $\gamma$ , NOS2,  $\alpha\beta$ TCR, MHC class I, class II,  $\gamma\delta$ 分子をそれぞれノックアウトし, 気道感染における予後を比較した。WTマウスも最終的には呼吸不全で死亡する (文献8を改変)。



tion) すると考えられる。この問題は今後の結核研究の上で最も大きな問題である。菌と宿主側の要因に分けて最近の知見をもとに考察したい。

## B. Dormant stateの結核菌

結核肉芽腫内は一般に血管に乏しく、周囲を線維芽細胞で囲まれており、類上皮細胞が変成を起こすと酸素や栄養素の供給が乏しくなると考えられるが、そのような状況下で菌は分裂せずに冬眠状態のように存在していると考えられる。このような結核菌のモデルとして、Wayne modelがある。Muttucumaru<sup>11)</sup>らは aerobic, microaerophilic [O<sub>2</sub> concentration 1%, non-replicating persistence 1 (NRP1)], anaerobic (O<sub>2</sub> concentration 0.06%, NRP2) の条件で結核菌を培養した。NRP2では菌の増殖は停止する。Voskuil<sup>12)</sup>らは 0.2%O<sub>2</sub>と低濃度のNOを用いて結核菌のmRNAの発現をDNA microarrayで検討したところ、発現する48の dormancy survival regulator (DosR) geneを見出し、dormancy regulonと名づけた。これらの検討で、Rv3134c, *dosR* (3133c), Rv313c2が他の遺伝子の発現に関与していることやheat shock protein Xの $\alpha$ -crystallinは*dosR*により誘導されることが示された。 $\alpha$ -crystallinは結核患者の血清中にも存在するが、dormant stateで発現が増加するタンパクである<sup>13)</sup>(表1)。現在のところ結核菌は酸素や栄養の供給に応じ、その環境に対応して代謝を変化させると考えられるが、現在同定された遺伝子産物の役割は不明なことが多く、今後さらなる検討が必要である。また、最近*Micrococcus luteus*で明らかになった resuscitation promoting factor (Rpf) と同様な働きをする *rpf*-like geneの存在が結核菌でも認められ、結核菌の dormant stateからの生き返りの役目に関与することが明らかとなった<sup>14)</sup>。

## C. Dormant stateの結核菌に対する宿主側の免疫応答

前述のように剖検や生検等で認められる結核腫や治癒巣で、免疫応答が認められる一方で結核菌の検出が確認される。実験的にもCosma<sup>15)</sup>らはカエルとzebrafishの系に*M. marinum*を感染させ肉芽腫を形成した後に、再度同菌が感染するか試したところ再感染が確認され、防御免疫が十分に作用していないことが明らかとなった。これを裏づけるように、Shi<sup>16)</sup>らはマウスの系でTh1 immunityが成立すると結核菌のtranscription patternがdormancyの状態に変化することを実証している。これらのことをふまえ、潜在性感染状態を呈する宿主の免疫応答が十分に作用できず、再発をきたす原因は、いくつか考えられる。

### 1. 結核菌処理細胞の遺伝的感受性

結核発病者も結核菌に強く曝露した未発病者に比べTh1型の免疫はやや低下しているが成立はしている。むしろ、マクロファージ等の処理能力に低下があるのではないかという疑問がある。実際に、マウスでは結核菌を吸入させても抵抗性の系統では肉芽腫性反応を形成することなく、菌を処理できる。これらの現象にかかわる要因としては、マクロファージの自然抵抗性を司るnatural resistance macrophage protein 1 (Nramp1) やTACOが候補にあげられる。

### 2. 結核菌特異的記憶T細胞

結核菌に対する免疫反応が成立すれば記憶T細胞も出現するが<sup>4)</sup>、結核菌がdormant stateに移行するとともに*DosR*遺伝子に支配され抗原も変化し発現量も少なくなることが考えられる。結核菌感染増殖期から誘導された炎症局所に存在するeffector memory T細胞(T<sub>EM</sub>)は抗原の変化で徐々に消失し、流入リンパ節に存在するcentral

表1 低酸素状態で発現が増加する結核菌遺伝子群

結核菌 (H37Rv) を0.2%O<sub>2</sub>, 2時間で培養し, コントロール (O<sub>2</sub>>20%) と比べmRNAの発現量が2倍以上増加した遺伝子を列挙した (DNA マイクロアレイにより解析). HP: hypothetical protein, CHP: conserved hypothetical protein (文献13を改変)

Rv no.	遺伝子	Ratio (>2)	遺伝子産物
Rv0079		11.6±3.5	HP
Rv0080		7.6±2.1	HP
Rv0081		3.5±1.1	Transcriptional regulator
Rv0569		18.4±4.0	CHP
Rv0572c		13.9±7.8	HP
Rv0574c		3.8±1.7	CHP
Rv1264		2.4±0.2	Similar to adenylate cyclases
Rv1592c		3.1±0.7	CHP
Rv1733c		12.6±4.1	Possible membrane protein
Rv1734c		9.8±7.8	HP
Rv1736c	<i>narX</i>	3.0±0.8	Fused nitrate reductase
Rv1737c	<i>nark2</i>	12.0±3.0	Nitrite extrusion protein
Rv1738		63.3±37	CHP
Rv1739c		3.9±1.1	Possible sulfate transporter
Rv1813c		14.7±9.8	CHP
Rv1997	<i>ctpF</i>	8.8±6.0	Probable cation transport ATPase
Rv1998c		4.7±1.2	CHP
Rv2003c		11.4±7.2	CHP
Rv2005c		8.5±2.7	CHP
Rv2007c	<i>fdxA</i>	22.0±9.9	Ferredoxin
Rv2028c		3.3±1.2	CHP
Rv2029c	<i>pfkB</i>	12.2±6.9	Phosphofructokinase II
Rv2030c		19.1±14	CHP
Rv2031c	<i>acr,</i> <i>hspX</i>	13.6±3.1	14-kDa antigen, heat shock protein
Rv2032		43.9±16	CHP
Rv2428	<i>ahpC</i>	3.8±1.2	Alkyl hydroperoxide reductase
Rv2623		6.8±2.3	CHP
Rv2624c		44.3±34	CHP
Rv2625c		6.3±2.8	CHP
Rv2626c		37.4±7.4	CHP
Rv2627c		17.0±6.3	CHP
Rv2628		4.8±1.1	HP
Rv2629		6.8±1.3	HP
Rv2630		3.9±1.1	HP
Rv2659c		3.7±1.5	PhilRV2 integrase
Rv3126c		20.9±7.3	HP
Rv3127		33.1±14	CHP
Rv3128c		11.7±4.6	CHP
Rv3129		38.6±15	CHP
Rv3130c		26.6±16	CHP
Rv3131		4.3±1.1	CHP
Rv3132c		9.1±3.9	Sensor histidine kinase
Rv3133c	<i>dosR</i>	13.8±10	Two-component response regulator
Rv3134c		10.6±2.5	CHP
Rv3841	<i>bfrB</i>	8.1±2.9	Bacterioferritin
Rv3842c	<i>glpQ</i>	16.9±1.4	Phosphodiesterase
Rv3908		3.7±1.5	CHP

memory T細胞 (T<sub>CM</sub>) のみが存在することになると推測される。このような状況になれば、結核菌の再活性化の時に、十分なT<sub>EM</sub>やT<sub>CM</sub>細胞が防御免疫として作用しない可能性が生じる。また、一方で、抗原の持続的刺激はeffector T細胞 (T<sub>Eff</sub>) のみ誘導し、記憶 T細胞を枯渇化もしくは生じさせない可能性も報告されている<sup>17)</sup>。

**3. Th1型免疫反応優位性の低下と抑制性T細胞非結核性抗酸菌の曝露や寄生虫感染の多い発展**

途上国では初回BCG接種の成績が悪いが、原因としてこれらの持続的曝露や感染により個体の免疫反応の基盤がTh2型にシフトしていて、その状況で高濃度の結核感染が起こるとTh1型のみならずTh2型の免疫反応を誘導することが報告されており、産生されるIL-4の作用により抗結核免疫の抑制につながる<sup>18,19)</sup>。また、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>regulatory T細胞 (Treg) は本来自己抗原との免疫反応を抑制するが、最近TLRを介して結核菌体成分に反応することが示され

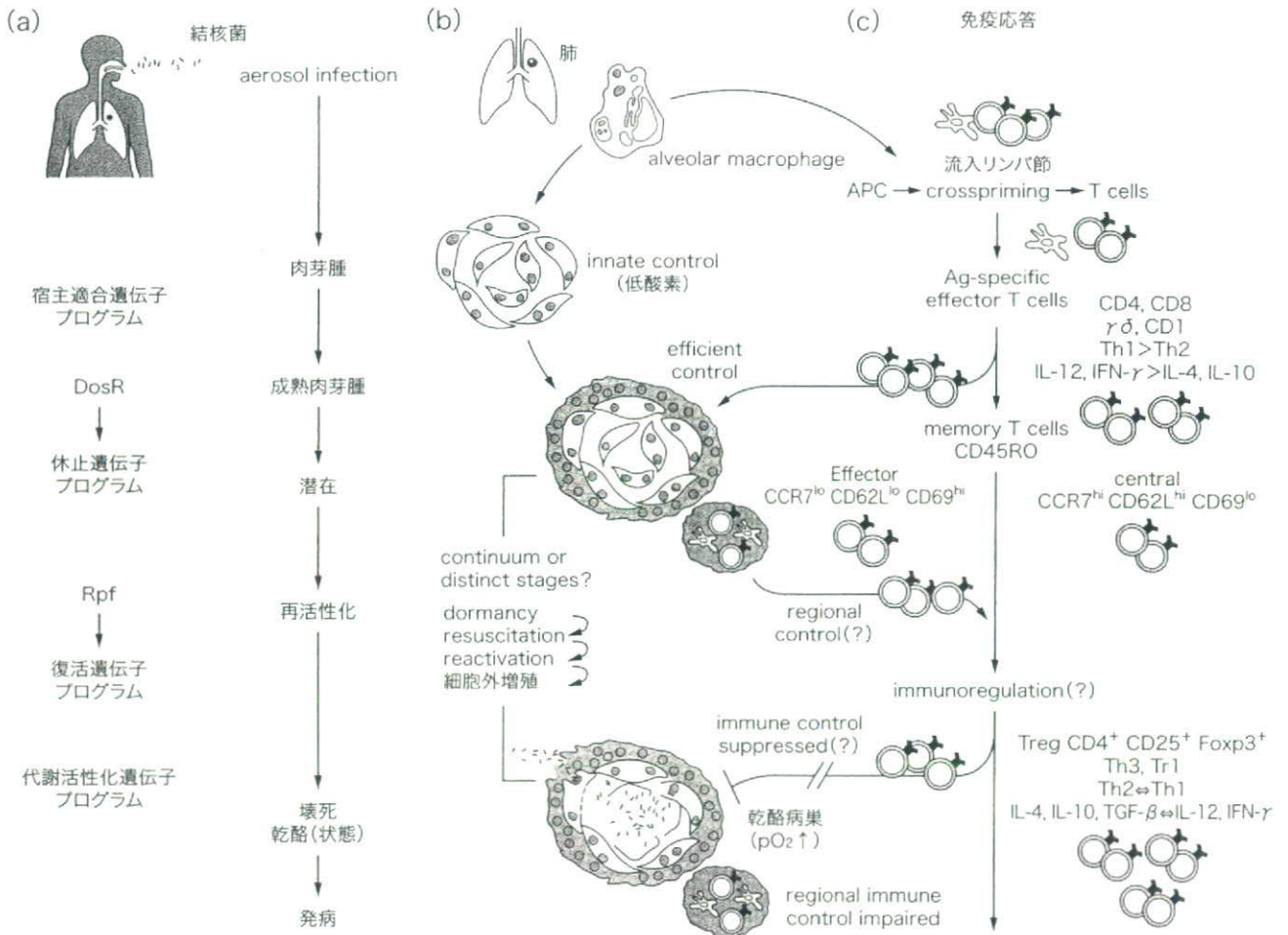


図3 (a) 結核菌遺伝子プログラム、(b) 生体の結核病変と (c) 結核免疫応答との相互関係

結核菌の遺伝子プログラムが宿主への感染から特異的結核病巣が形成されると、肉芽腫内の結核菌は低酸素状態やNOの作用で潜伏感染 (dormancy gene) プログラムに変化する。これにより結核菌の抗原性が変化し、結核病巣成立時の免疫応答は保たれているが、肉芽腫内の潜伏結核菌に対する局所的免疫応答が存在するかは明らかではない。その後、何らかの原因で結核菌が復活遺伝子 (resuscitation gene) プログラムに移行し、結核菌が復活から再活性化し増殖する。この時に、初感染時に成立した抗結核免疫の記憶が保たれて有効であるかも明らかではない。これはあくまでも1つの仮説であるが系統的に理解しやすく、これからの研究の方向性も示唆する仮説であろう (文献4を改変)。

ている<sup>20)</sup>。この場合、IL-10やTGF- $\beta$ の産生によりTh1反応が抑制される可能性が考えられる。実際に最近の実験ではヒトやマウスの結核症にTreg細胞が存在することが確認されている<sup>21)</sup>(図3)。

ここで述べた仮説はあくまで現在判明していることをもとにして推測したものである。結核菌のlatency, resuscitationおよびreactivationにはまだまだ知見が乏しいのが実情である。T細胞免疫応答1つをとっても、特にヒトにおける記憶T細胞による長期特異免疫維持機構の解明、Th1免疫反応以外の他の免疫反応との関係、BCGワクチンの不十分さの免疫的解明など精力的に進めなければならない。この解決がなされなければ結核菌はヒトというリザーバーを通して絶えず再発を繰り返し、宿主の寿命が尽きる前に新たなヒトに移り住み、巧妙な結核菌の高笑いを聞き続けることになるだろう。最近、世界中で新しい抗結核ワクチンの開発やその候補が多く報告されているが、真に菌と宿主の相互関係をしっかり解明することがワクチン開発の一番の早道と考えられる。

#### 4. 結核感染診断の進歩

従来、世界中で結核感染の診断にはツベルクリン皮内反応(ツ反)が用いられてきたが、これは結核菌体に対する獲得した免疫記憶を再度多種類の菌体タンパク抗原を皮内に投与して反応をみるものであった。しかし、日本をはじめ結核の中等度以上の蔓延国では予防としてBCG菌の接種が広く行われている。BCG菌は*M. bovis*の弱毒変異菌であり、*M. tuberculosis*と遺伝子的には大部分が一致しており、抗原交差が多く判定に苦慮した。近年early secretory antigenic target-6 (ESAT-6)とculture filtrate protein-10 (CFP-10)が同定され、ゲノム上*M. tuberculosis*のRD1領域に存在し、BCG菌や*M. avium-intracellulare complex* (MAC)をはじめとする大部分の非結核性抗酸菌には存在

しない。同抗原を使用して全血または末梢血単核球を用いて産生されるIFN- $\gamma$ を定量する診断法が確立し、ツ反の代わりに結核菌感染を診断することが可能となり、特に潜在性結核感染の診断に威力を発揮している<sup>22,23)</sup>。今後の課題としては、治療後長期間経った臨床的には陳旧性結核と判断できる患者に一部陽性が認められること、免疫不全患者に使用可能か、幼年者と高齢者の反応が不明である等の解決が必要である。ツ反時に観察されるブースタ効果がないことから、筆者らは循環血中のT<sub>eff</sub>やT<sub>EM</sub>を刺激しIFN- $\gamma$ の産生をみているものと考えている。ESAT-6やCFP-10は菌の活動期に産生される分泌性タンパク質であるが、陳旧性患者に陽性が出るということはまだ増殖している結核菌が一部存在するのか、T<sub>CM</sub>にESAT-6やCFP-10の既存の免疫記憶が存在し続けるのかは今後の課題である。最近、関節リウマチ患者の抗TNF- $\alpha$ 阻害剤使用による結核の発病が国際的に問題となっている<sup>24)</sup>。筆者<sup>25)</sup>らはこれらの患者に対する結核感染の検討を重ねてきた。患者血液のPHA刺激によるIFN- $\gamma$ の産生は健常人

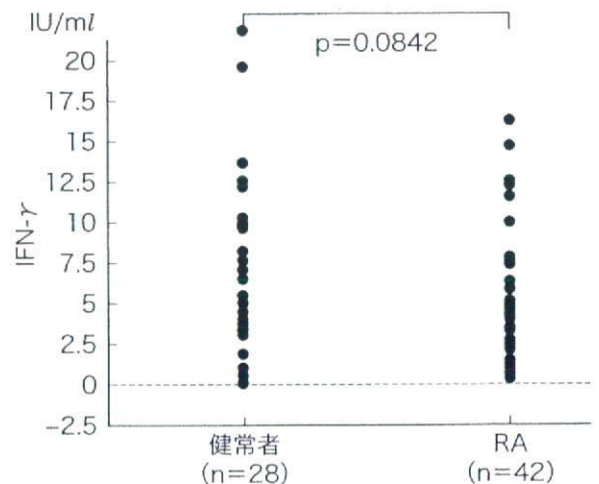


図4 (a) 抗TNF- $\alpha$ 阻害薬使用中関節リウマチ患者の末梢血におけるPHAに対するIFN- $\gamma$ の応答

健常者と同薬剤使用関節リウマチ患者の比較では有意差はなく、患者のPHAに対する反応は保たれている。

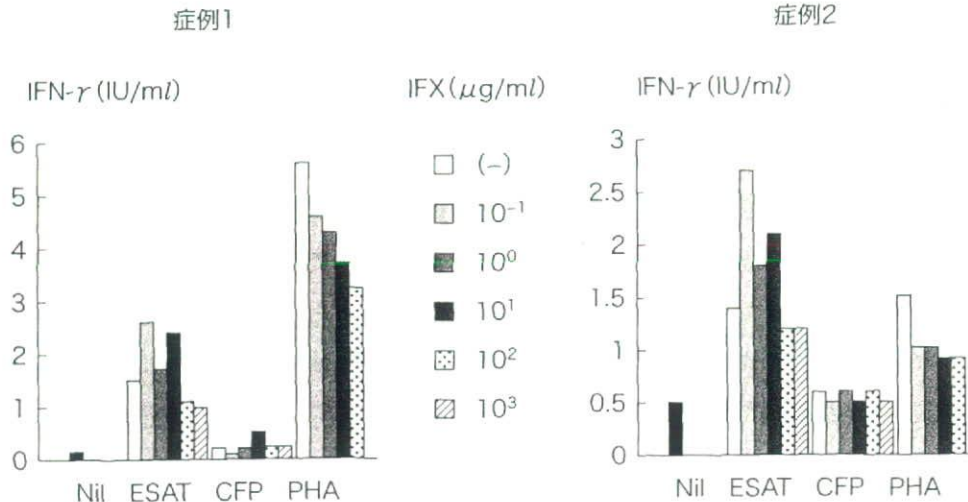


図4 (b) 抗TNF- $\alpha$ 阻害薬の前処置による結核患者末梢血における結核特異抗原ESAT-6とCFP-10に対する応答

抗TNF- $\alpha$ 阻害薬infliximab (IFX) を $10^{-1}$ ~ $10^3$   $\mu\text{g/ml}$ で2時間前処置を施行した後、陰性コントロール、ESAT-6、CFP-10、PHAで*QuantIFERON-TB 2G*と同様に培養しIFN- $\gamma$ を定量した。高濃度のIFX処理でもESAT-6、CFP-10群はIFX未処理群と比べ低下は著しくなく、低濃度ではむしろESAT-6群は高値であった。実際の患者の想定血中濃度は1~100  $\mu\text{g/ml}$ である。

と比べても保たれており、また、*in vitro*で結核患者の末梢血を抗TNF- $\alpha$ 阻害剤を処理後、ESAT-6とCFP-10で刺激した結果ではIFN- $\gamma$ 産生は陰性コントロールと比べ減少は認めず、同患者の抗TNF- $\alpha$ 阻害薬使用における潜在性結核感染の診断に充分に適応可能と考えている (図4)。

### むすび

1998年のColeらによるH37Rvの全genome解明以来、免疫学の進歩もあり急速に結核菌の性状や宿主の免疫応答の解析が新たな状態を迎えているが、まだまだ未知のことが多いのが現状である。今後結核の撲滅を目指し、新たな強力なワクチンが求められている。そのためにも基礎研究のさらなる発展を願いたい。

### 文献

- 1) Hayman J. *Mycobacterium ulcerans*: An infection from Jurassic time? *Lancet*. 1984; 2: 1015-6.
- 2) Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium*

- tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99: 3684-9.
- 3) Boshoff HI, Barry CE. Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth. *Nat Rev Micro*. 2005; 3: 70-80.
- 4) Kaufmann SHE. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol*. 2005; 26: 660-7.
- 5) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoprotein through toll-like receptors. *Science*. 1999; 285: 732-6.
- 6) Flynn JL, Chan J. Immunology tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 93-129.
- 7) Schaible UE, Winau F, Sieling PA, et al. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nature Med*. 2003; 9: 1039-46.
- 8) North RJ, Jung Y-J. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 599-623.
- 9) Seiler P, Ulrichs T, Bandermann S, et al. Cell-wall alterations as an attribute of *Mycobacterium tuberculosis* in latent infection. *J Infect Dis*. 2003; 188: 1326-31.
- 10) Ulrichs T, Lefmann M, Reich M, et al. Modified

- immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue. *J Pathol.* 2005; 205: 633-40.
- 11) Muttucumaru DGN, Roberts G, Hinds J, et al. Gene expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* in a non-replicating state. *Tuberculosis.* 2004; 84: 239-46.
  - 12) Voskuil MI, Schnappinger DC, Visconti K, et al. Inhibition of respiration by nitric oxide inducers a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J Exp Med.* 2003; 198: 705-13.
  - 13) Sherman DR, Voskuil M, Schnappinger D, et al. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding  $\alpha$ -crystallin. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98: 7534-9.
  - 14) Downing KJ, Mischenko VV, Shleeva MO, et al. Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five *rfp*-like genes are defective for growth *in vivo* and for resuscitation *in vitro*. *Infect Immun.* 2005; 73: 3038-43.
  - 15) Cosma CL, Humbert O, Ramakrishnan L. Superinfecting mycobacteria home to established tuberculosis granulomas. *Nat Immun.* 2004; 5: 828-35.
  - 16) Shi L, Jung Y-J, Tyagi S, et al. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100: 241-6.
  - 17) Gourley TS, et al. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol.* 2004; 16: 323-33.
  - 18) Rook GAW, Dheda K, Zumla A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 661-7.
  - 19) Demissie A, Abebe M, Aseffa A, et al. Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-402. *J Immunol.* 2004; 172: 6938-43.
  - 20) Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, et al. Regulatory T cells express Toll-like receptor and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 2003; 197: 403-11.
  - 21) Kaufmann SHE, Cole ST, Mizrahi V, et al. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *J Exp Med.* 2005; 201: 1693-7.
  - 22) Mori T, Sakatani M, Yamagishi, et al. Specific detection of tuberculosis infection. An interferon  $\gamma$ -based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170: 69-74.
  - 23) Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, et al. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170: 65-9.
  - 24) Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor  $\alpha$ -neutralizing agent. *N Engl J Med.* 2001; 345: 1098-104.
  - 25) Shigehara K, Takahashi H, Tamura Y, et al. An interferon  $\gamma$ -based assay using new antigens is capable of detecting tuberculosis infection in Japanese rheumatoid arthritis patients treated with Anti-TNF- $\alpha$  antagonist. in preparation.

## CHAPTER 19

# PILOTING OF EXOGENOUS ANTIGEN INTO CROSS-PRESENTATION PATHWAY BY HEAT SHOCK PROTEINS

YASUAKI TAMURA, GORO KUTOMI, JUN OURA, TOSHIHIKO TORIGOE AND NORIYUKI SATO

*Department of Pathology, Sapporo Medical University, School of Medicine, South 1 West 16, Cho-ku, Sapporo 060-8556, Japan*

**Abstract:** Recent evidences have been indicating that heat shock proteins (HSPs) play an important role as a “danger signal” in the extracellular milieu on behalf of immune surveillance. Above all, Hsp70, gp96 and Hsp90 have been shown to elicit intriguing efficient CTL responses by so called “cross-presentation” with yet entirely unknown mechanism. Here, we discuss that the immunologic roles of HSPs, particularly Hsp90, in the MHC class I-restricted cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells (DCs). We show that Hsp90-peptide complex enters the endocytic pathway via putative Hsp90 receptor and associated peptide might be transferred onto endosomal MHC class I molecules. Moreover, we show that immunization with Hsp90-peptide complex efficiently elicits CTL responses and antitumor effect. Interestingly, this presentation is TAP-independent, but rather follows endocytic pathway. Meanwhile, when Hsp90-whole protein (OVA) antigen complex was pulsed to DCs, this protein antigen could enter at least in part via TAP-dependent pathway to the ER, and finally was presented to MHC class I molecules. However, OVA alone without Hsp90 could not enter into this pathway, but rather into MHC class II pathway.

Here we discuss novel insights into the immunologic role of Hsp90 in cross-presentation of antigens, efficient induction of MHC class I-restricted CTL responses, and application to peptide/protein antigen-based immunotherapy of cancers

**Keywords:** Heat shock protein, antigen presentation

## INTRODUCTION: HSP-MEDIATED CROSS-PRESENTATION BY ANTIGEN-PRESENTING CELLS

It has been well demonstrated that immunization with tumor-derived HSPs or HSP complexed with an antigen peptide elicits tumor- or antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses (also See: *Bonorino & Souza*, Chapter 10, *Gong & Calderwood*, Chapter 18, this volume). Above all, Hsp70- and gp96-antigen complexes are well-studied and have been shown to be immunogenic and potent in stimulating the

generation of tumor-specific CTLs. Hsp70- and gp96-based vaccines have been tested in early-phase clinical trials in solid tumors as well as in lymphoma and leukemias; all showed minimal toxicity and potential efficacy (Castelli et al., 2004; Mazzaferro et al., 2003; Rivoltini et al., 2003). Phase III clinical trials using tumor-derived Hsp70 and gp96 as vaccines are ongoing for melanoma and renal cell carcinoma.

The ability of HSPs to facilitate the cross-presentation of MHC class I-restricted epitopes and to prime CD8<sup>+</sup> T cell effector responses is well established (Delneste, 2004; Doody et al., 2004). Although, immunized HSPs are exogenous antigens, these HSP-antigen complexes can gain access to the class I antigen presentation pathway, resulting in cross-presentation. The immune response has been attributed to the ability of HSPs to form stable complexes with tumor-derived antigenic peptides, thereby facilitating the cross-presentation of MHC class I-restricted epitopes and priming of CD8<sup>+</sup> T cell responses.

Dendritic cells (DCs) are main conductor for efficient cross-presentation. Recent reports have shown that antigen-presenting cells (APCs) such as dendritic cells can internalize HSPs by receptor-mediated endocytosis and direct chaperoned proteins/peptides into the intracellular pathway for MHC class I-restricted presentation to CD8<sup>+</sup> T cells, concomitant with the induction of dendritic cell maturation and cytokine secretion. In fact, some HSP receptors expressed on APCs have recently been identified. CD91 (Binder et al., 2000), LOX-1 (Delneste et al., 2002), CD40 (Becker et al., 2002) and SR-A (Berwin et al., 2003) have been proved to be common receptors for HSPs. However, the underlying mechanism for efficient cross-presentation, in particular, how the HSP-antigen complex can enter the MHC class I pathway, remains unclear.

Furthermore, recent studies have also shown that HSP-peptide complexes can also lead to antigen presentation on MHC class II molecules, thus activating CD4<sup>+</sup> T cells (Haug et al., 2005; SenGupta et al., 2004). Therefore, it is possible that uptake of HSP-peptides complexes leads to antigen presentation on both MHC class I and class II molecules on dendritic cells, thus activating CD8<sup>+</sup> CTL as well as CD4<sup>+</sup> T cells. However, Shild et al. have reported that, although antigen peptides chaperoned by gp96 can be presented in the context of both MHC class I and class II molecules, immunization with gp96 elicits CD8-biased T cell responses (Ramirez et al., 2005). Doody et al have also demonstrated same results (Doody et al., 2004). Therefore, it is essential to know the effects of the HSP-antigen complex on tumor antigen presentation via class I and class II pathways *in vivo* because such knowledge is crucial for the development of effective HSP-based immunotherapies, especially in the case of protein antigens in association with HSPs.

In contrast to Hsp70 and gp96, the role of Hsp90 in cross-presentation remains unclear. Hsp90 is the most abundant protein in the cytoplasm; therefore it is assumed that Hsp90 also plays an important role in cross-presentation. However, it is not clear whether Hsp90 is involved in tumor immunity. Udono reported, for the first time, that immunization with Hsp90 purified from tumor elicited tumor-specific CTL responses (Udono and Srivastava, 1994). Very recently, Kunisawa and Shastri reported that Hsp90 chaperoned C-terminal flanking antigenic peptides



(Kunisawa and Shastri, 2006). These results have led to much interest in the importance of Hsp90 in antigen presentation. Taking these facts into consideration, it is conceivable that Hsp90 does participate in antigen presentation and possibly cross-presentation. In this chapter, we will discuss the mechanism of HSP-mediated cross-presentation and the players involved in this intriguing immune response.

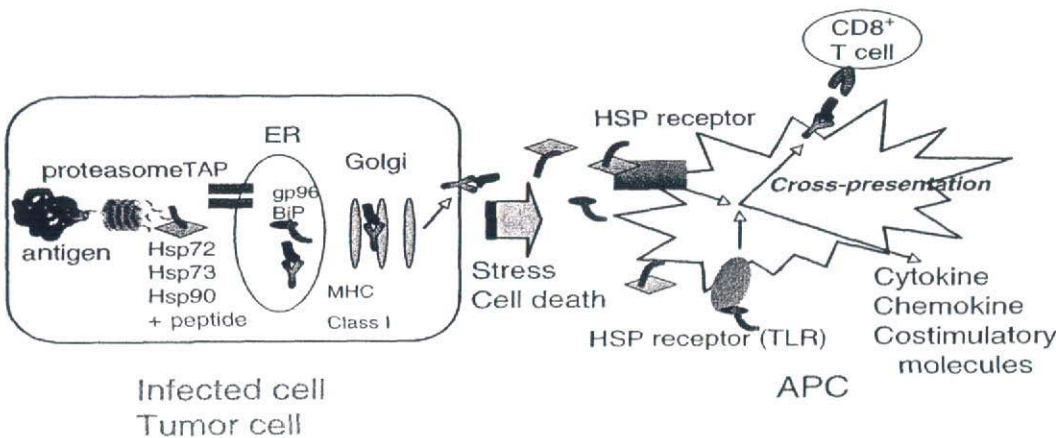
**HSPS ACT AS DANGER SIGNALS TO THE IMMUNE SYSTEM THROUGH HSP RECEPTORS EXPRESSED ON APCS**

It is suggested that extracellular HSPs act as “danger signals” to the immune system in the case of life-threatening events (Figure 1).

When viral infection or tumor cell damage occurs, cell-associated antigens, such as HSPs-antigen complexes are released into the extracellular milieu, APCs such as dendritic cells and macrophages, detect the signals through certain receptors, resulting in intracellular signaling (Basu et al., 2000). HSP receptors are divided into 2 categories, one is toll-like receptor (TLR) for mainly signaling for DC maturation and activation, and the other is endocytic receptors for cross-presentation. TLR-2 has been shown to be the receptor for Hsp70 (Asea et al., 2002). TLR-4 is the receptor for Hsp70 (Asea et al., 2002; Vabulas et al., 2002). However, doubts were raised as to what extent this effect was due to lipopolysaccharide contaminations of the

***HSP chaperones innate and adaptive immunity***

— a mechanism for efficient crosspresentation —



**Figure 1. Role of extracellular HSP-peptide complexes as danger signals.** HSP-antigen complexes are acquired by bone marrow-derived antigen presenting cells (APCs) and are cross-presented to cytotoxic T lymphocytes (CTLs). HSP-antigen complexes bind to Toll-like receptor (TLR) and induce maturation and activation of dendritic cells (DCs). On the other hand, HSP-antigen complexes also bind to HSP receptor, such as CD91, LOX-1, SR-A, on the DCs, followed by endocytosis. Internalized HSP-antigen complexes are shuttled into MHC class I pathway and induce antigen-specific CTL response. The HSP-antigen complexes elicit both innate and adaptive immunity simultaneously, indicating that HSP-peptide complexes act as effective danger signals

HSP preparations. It is required re-examination for this phenomenon using HSPs, nominally endotoxin-free. In contrast, HSP-specific endocytic receptors expressed on the APCs, including CD91 for gp96, Hsp70 and Hsp90 (Basu et al., 2001; Binder et al., 2000), SR-A for gp96 and calreticulin (Berwin et al., 2003), LOX-1 for Hsp70 (Delneste et al., 2002), and CD40 for Hsp70 (Becker et al., 2002), were identified. However, it is still unknown how HSP-antigen complexes are transported and where HSP releases chaperoned antigens. What is the fate of HSPs after endocytosis? What actors are responsible for translocating the antigen from the endosome to cytosol? Additional studies will be required to understand these unsolved issues.

## THE ROADS TO MHC CLASS I PRESENTATION

MHC class I molecules principally present peptides derived from endogenous protein to cytotoxic T cells. However, in certain antigen-presenting cells, peptides derived from exogenous antigens also are presented by MHC class I molecules. At least four independent pathways of protein processing and subsequent peptide presentation by class I molecules have been described. The dominant pathway uses endogenously synthesized proteins that have been processed in the cytosol by proteasomes. Peptides are transferred by transporter-associated antigen processing (TAP) to the ER where they bind in the grooves of nascent MHC class I molecules. The peptide/class I MHC heavy chain/ $\beta_2$ M complex is then transported via the Golgi apparatus to the cell surface. In second and third pathways, exogenous antigens are internalized and processed into peptides that are transported to the ER to bind MHC class I. One is the cytosolic leak of internalized antigens by phagocytosis, macropinocytosis, and endocytosis, resulting in degradation by proteasomes (Hotta et al., 2006; Rodriguez et al., 1999). Degraded peptides are then transported through TAP into the ER. However, the mechanism for the translocation of exogenous antigens to cytosol and players involved in this translocation remain unknown. Another pathway is via an ER-phagosome fusion. When exogenous antigens are engulfed into phagosomes, the phagosomal membrane and ER membrane fuse with each other, forming ER-phagosome compartments (Guermónprez et al., 2003; Houde et al., 2003). These ER-phagosome fusion compartments involve TAP molecules and proteasomes outside of the membrane (Ackerman et al., 2003). Phagocytosed antigens are pumped out the ER-phagosome fusion compartment through sec61. This is called the ER-associated degradation (ERAD) mechanism. Then proteasomes, which are attached to the outer face of the membrane of ER-phagosome fusion, degrade antigens into peptides, followed by entry into the ER again through TAP molecules, and the resulting antigen peptides bind to MHC class I molecules (Ackerman et al., 2005; Ackerman et al., 2006). In contrast, at least some exogenous peptides or proteins appear to reach MHC class I through a pathway completely independent of the ER. In this fourth pathway, endosomal processing and endocytosed class I MHC molecules may be involved. MHC class I molecules have been shown to internalize from the cell surface in T cells, B cells, fibroblasts, and macrophages. Recycling of endocytosed class I MHC molecules back to the

cell surface has also been observed (Gromme et al., 1999). The endocytosis and recycling of class I MHC may facilitate peptide exchange, allowing class I MHC molecules to bind multiple peptides in one lifetime. Antigen presentation mediated by the three types of pathways mentioned above is called cross-presentation, allows display of exogenous antigens in the context of MHC class I molecules. This is particularly important in host defense against infectious diseases and cancers that cannot access the classical pathway for MHC class I presentation.

Internalization of exogenous antigens may allow cell fragments, intracellular pathogens and proteins to be degraded in the endocytic pathway by mechanisms involving reduction, unfolding and lysosomal proteolysis. Such a process could contribute to cross-presentation by facilitating the exchange of previously loaded MHC class I-associated peptides for newly generated peptides derived from exogenous proteins. MHC class I internalization from the cell surface is regulated via monoubiquitination of a conserved lysine in the MHC class I cytoplasmic tail. Lysine modification also regulates the inclusion of MHC class I molecules into multivesicular bodies, where they colocalize with MHC class II on the membranes of the internal vesicles. In a number of recent studies, MHC class I molecules were detected within all of the described endocytic compartments (Kleijmeer et al., 2001). Early endosomes, characterized by the presence of transferring receptor, were shown to contain 17% of class I heavy chain (HC) within endocytic compartments. The multivesicular late endosomes (LEs) and lysosomes, identified by the presence of LAMP-2 and CD63, contained 56% and 27% of endocytic class I HC, respectively. Importantly,  $\beta_2$ M could also be detected within each of these endocytic compartments, suggesting the possibility that stable MHC class I complexes exist in these compartments. Cycloheximide treatment, which blocks the biosynthetic pathway of MHC I, indicated that the class I present in the endocytic compartments was derived from the cell surface. We have confirmed the presence of MHC class I in the endocytic compartments of murine bone marrow-derived DCs. Furthermore, as described recently, we have demonstrated that co-localization of the receptor-mediated endocytosed exogenous Hsp70/90-antigen complex with MHC class I in the early endosomes of the DCs. These observations suggest that antigens derived from the exogenous Hsp70/90 may be loaded onto recycling MHC class I, after which the MHC class I/peptide complex is transported to the cell surface.

Considering the significance of the HSP-peptide complex in cross-presentation, this model suggests that a 'pre-processed antigen' would be required as it would be inefficient for a whole protein to be degraded non-specifically within the endocytic compartments by resident catabolic enzymes. Not only would this be a slow process, it would be by chance alone that an appropriate peptide capable of binding the MHC class I groove would be generated. The notion of such preprocessed antigens fits well with a role for HSPs as chaperones for peptide antigens. Proteins synthesized within the cell would be processed within the endogenous class I antigen presentation pathway leading to the generation of HSP-peptide complexes. These complexes are ideal chaperones of antigenic peptides for the transfer of antigens to DCs for a number of reasons. Once generated within the cell, the HSP-peptide complex

might be released into the extracellular milieu during cell necrosis because of viral infection and intervention of cancer, resulting in taking-up by the immature DC and acting as a danger signal. At the same time, antigenic peptides chaperoned by HSPs are efficiently presented in the context of MHC class I and class II molecules and immediately activate the host's immune responses. As described earlier, Hsp90 binds precursor (pre-processed) peptides generated in the cells and thus, endosomal processing is a suitable mechanism for pre-processed peptides. HSP would also serve to protect the peptide antigen from degradation upon entry into the endocytic compartment of the DC. Finally, it has been suggested that some HSP family members may be capable of facilitating the loading of MHC class I molecules by an unknown mechanism. In addition, an as yet uncharacterized lysosomal enzyme may play a role in the processing of internalized antigens for generation of MHC I epitopes. Recently, Rock et al. have demonstrated that DC-restricted cathepsin S plays an important role in the processing of exogenous antigens for the generation of MHC I antigenic determinants in the early endosome (Shen et al., 2004).

#### **SIGNIFICANCE OF CROSS-PRESENTATION IN VIVO: IMPACT ON EPITOPE GENERATION VIA ENDOSOMAL PROCESSING AND PROTEASOMAL PROCESSING**

Although DCs are capable of using an endocytic exchange mechanism to create MHC class I-peptide complexes, typical somatic cells have only the classical pathway for the generation of MHC class I-presenting peptides. For CD8<sup>+</sup> T cells induced by cross-presentation to be functionally useful against pathogen-infected cells, it would seem that the epitope generation mechanism used should be the same as those in classical MHC class I processing. An endosomal exchange mechanism in which peptides are generated by different proteases in radically different conditions from those in the endogenous pathway, therefore seems unlikely to contribute substantially to the CD8<sup>+</sup> T cell repertoire. Cytoplasmic processing, including proteasomal proteolysis, and ER-based trimming would be expected to be involved to generate the same peptide sequences as those made by nonhematopoietic cells. In fact, although partial proteolysis may occur in the endocytic pathway, extensive experimental evidence suggests that exogenous antigens must reach the cytoplasm to be efficiently cross-presented. In DCs, the presentation of exogenous antigens is unaffected by both chloroquine and inhibitors of lysosomal proteolysis. Exogenous antigen presentation is, however, highly sensitive to specific inhibitors of the proteasome, indicating that cytoplasmic proteolysis is the main form of epitope generation in the cross-presentation pathway. In contrast, the HSP-mediated cross-presentation pathway has been shown to involve both a proteasomal pathway and an endocytic-recycling pathway. We have demonstrated that a tumor-derived Hsp70-peptide complex is efficiently cross-presented to peptide-specific CTLs by DCs and this presentation is dependent on TAP molecules. In addition, *in vitro* generated Hsp70- and gp96-antigen complexes have been shown to be cross-presented via