

B. 研究方法

結核菌感染実験

結核菌に対する感染防御における inflammasome の活性化および PD-1 シグナルの意義を明らかにするため、C57BL/6 野生型マウス、PD-1 欠損マウス、NLRP3 欠損マウスおよび ASC 欠損マウスに結核菌を経鼻感染させた。また、抗 PD-1 抗体の抗結核菌感染防御への影響を解析するため、C57BL/6 マウスに結核菌を経鼻感染させた後、抗 PD-1 抗体またはコントロール抗体を感染 14、17 および 20 日後に静脈内投与した。さらに、C57BL/6 野生型マウスおよび PD-1 欠損マウスに BCG を皮下接種し、その 4 週後に結核菌を経鼻感染させ、その後のマウスの生存率を調べた。さらに別の実験群では、マウスを BCG 免疫し、その 14、17 および 20 日後に抗 PD-1 抗体を静脈内投与した。BCG 免疫 4 週後に結核菌を経鼻感染させ、その後のマウスの生存日数を調べた。

菌数測定と組織学的解析

結核菌感染 2 および 4 週間後に感染マウスより肺を回収し、ホモジネートを作製した。段階希釈したホモジネートを Middlebrook7H10 寒天培地に塗抹し、3 週間培養後にコロニー数を数え、生菌数を算出した。また、結核菌感染マウスの肺を採取し、10%ホルマリンで固定した後、HE 染色および Zeil-Neilsen 染色して解析した。さらに、肺に浸潤してきた細胞を flow cytometry で解析した。

サイトカインおよびケモカイン産生応答

結核菌感染 2 および 4 週間後にマウスの肺を採取し、ホモジネートを作製した。ホモジネート中の各種サイトカイン量を ELISA で測定した。

倫理面への配慮 本研究は、マウスを用いた感染動物実験を含み、実験は京都大学動物実験指針に基づいて行われた。

C. 研究結果

PD-1 シグナルの障害が BCG ワクチン効果に与える影響

正常マウスに結核菌を経鼻感染させると、感染後 9 ヶ月で死亡するマウスが観察され

るようになり、感染後約 1 年で全てのマウスが死亡した。一方、マウスを予め BCG 免疫した後に結核菌を感染させた群では、結核菌のみを感染させた群と比較して感染 4 週後の肺内生菌数は明らかに少なく、感染後 1 年を経過した時点でマウス生存率は 100%であった。しかし、その後徐々に生存率が低下し、感染 500 日後には全てのマウスが死亡した。また、BCG 免疫後に抗 PD-1 抗体を投与し、その後結核菌を感染させた群では、BCG 免疫のみの場合と同様に結核菌感染 4 週後の肺内生菌数の有意な低下が観察された。また、結核菌感染後 17 ヶ月経過した時点での抗 PD-1 抗体併用群の生存率は 80%であり、BCG 免疫単独群（この時点での生存率は 20%）との間には差があると考えられたが、その後マウスの生存率が急速に低下し、最終的に BCG 免疫のみの群と抗 PD-1 抗体を併用した群との間には生存率に明らかな違いは認められなかった。結核菌感染後の肺における各種サイトカインおよびケモカイン産生量を比較したところ、結核菌感染 4 週後の肺では強いサイトカイン産生が誘導されていることが示された。BCG 接種後に結核菌を感染させた群でも強いサイトカイン産生が誘導されたが、そのレベルは結核菌単独感染の場合に比較して明らかに低かった。また、抗 PD-1 抗体を投与してもそのサイトカイン産生レベルは亢進しなかった。さらに、結核菌に対して感受性を示す PD-1 欠損マウスを BCG で免疫し、その後結核菌を感染させるとマウスは抵抗性を発揮することが示された。以上の結果から、結核菌感染では PD-1 を介した抑制性シグナルはナイーブ CD4⁺ T 細胞のエフェクター細胞への分化を正常に誘導するために必要であり、すでにエフェクター/メモリー細胞に分化した細胞の機能制御にはその抑制効果を発揮しないことが示唆された。抗結核菌感染防御における ASC の重要性

結核菌感染マクロファージでは、NLRP3 依存的な inflammasome が形成され、IL-1 β 産生が誘導される。そこで、感染防御の発現における NLRP3-inflammasome 活性化の意義を明確にする目的で、各種

inflammasome の構成因子である NLRP3、ASC あるいは caspase-1 を欠損させたマウスに結核菌を感染させた。NLRP3 および caspase-1 欠損マウスは結核菌感染に対して野生型マウスと同様の抵抗性を示した。しかし、ASC 欠損マウスでは野生型マウスに比較して肺内菌数の著明な増加が認められ、感染 10 週目までに 8 割のマウスが死亡した。また、感染後の ASC 欠損マウスの肺では多数の炎症性細胞の浸潤が認められ、強い炎症反応が惹起されていることが示された。しかし、肺における各種炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IFN- γ 、TNF- α 、IL-12p40) 産生量を比較したところ、野生型マウスと各種欠損マウス間に明確な違いは認められなかった。結核菌感染マウスの足蹠に PPD を注射して DTH 反応を測定したところ、野生型マウスに比べて ASC 欠損マウスで認められる DTH 反応は、著しく弱いものであった。以上の結果から、ASC は NLRP3 依存的な inflammasome 形成や、caspase-1 活性化に依存せずに感染抵抗性を担う T 細胞の分化あるいは機能発現に関与することで結核菌に対する感染防御に寄与する可能性が示された。

D. 考察

結核菌を感染させた PD-1 欠損マウスの肺では、炎症性サイトカインやケモカイン産生の亢進、マクロファージや好中球を中心とした炎症性細胞の著明な浸潤、および壊死を伴う広範な炎症性病変が認められる。これは、IFN- γ 産生能を有する抗原特異的 CD4⁺ T 細胞による過剰な免疫応答が誘導された結果である。従って、PD-1 シグナルは結核菌感染初期に誘導される CD4⁺ T 細胞の機能を適度に制御し、過剰な炎症反応を引き起こさないための重要な役割を果たしていると考えられる。一方、PD-1 シグナル経路を阻害するために抗 PD-1 抗体をマウスに投与したが、BCG ワクチンの効果を増強することはできなかった。また、PD-1 欠損マウスを BCG 免疫した場合には、その後の結核菌感染に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。これらの結果から、結核菌

感染の場合、PD-1 を介したシグナルはエフェクター/メモリー細胞に分化した細胞の機能制御にはその効果を発揮しないことが示唆された。またこの結果は、結核菌感染の慢性期に抗 PD-1 抗体を投与しても菌の感染動態には影響がないという報告 (IAI 77: 4621-4630, 2009) とも矛盾しない。その一方で、結核菌を感染させた正常マウスの肺におけるサイトカイン産生応答は、BCG 免疫後に結核菌を感染させたマウスの肺におけるサイトカイン産生よりも強いことが示された。この結果は、結核菌感染宿主体内では感染抵抗性 T 細胞の機能を抑制するシステムが働いており、それは PD-1 シグナル以外の抑制経路に依存することを示唆するものである。今後、この機序を明らかにし、新たなワクチンへの応用に結び付けたい。

これまで、ASC は inflammasome 形成時にアダプターとして機能することが報告されている。しかし、結核菌感染に対して NLRP3 欠損マウスや caspase-1 欠損マウスは抵抗性を示したのに対して ASC 欠損マウスのみ感受性を示したことから、ASC は inflammasome 形成以外のメカニズムで感染防御に関与することが示された。さらに、正常マウスと比較して ASC 欠損マウスでは DTH 反応が著しく弱いことから、結核菌感染後の抗原特異的 T 細胞の分化あるいは機能発現に ASC が重要な役割を果たしていることが示唆された。今のところその機序は明らかではないが、分子レベルで解析を進めることで、結核に対するワクチン開発に有用な情報を提供できるものと考えている。

E. 結論

PD-1 を介した抑制性シグナルはナイーブ CD4⁺ T 細胞のエフェクター細胞への分化を正常に誘導するために必要であり、すでにエフェクター/メモリー細胞に分化した細胞の機能制御には PD-1 シグナル以外の抑制経路が関与する可能性が示された。さらに、ASC は NLRP3 依存的な inflammasome 形成や caspase-1 活性化に依存せず、感染抵抗性を担う T 細胞の分化あるいは機能発現に関与する可能性が示唆された。これら

の機序を明らかにすることが今後の重要な課題である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yang, R., C. Xi, D. R. Sita, S. Sakai, K. Tsuchiya, H. Hara, Y. Shen, H. Qu, R. Fang, M. Mitsuyama, and I. Kawamura. 2013. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the maturation and secretion of IL-1 α from infected macrophages through the elevation of cytoplasmic calcium levels and calpain activation. *Pathog Dis.*, in press.
- 2) Hara, H., K. Tsuchiya, I. Kawamura, R. Fang, E. Hernandez-Cuellar, Y. Shen, J. Mizuguchi, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, and M. Mitsuyama. 2013. Phosphorylation of ASC acts as a molecular switch controlling the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nature Immunol.*, 14: 1247-1255.
- 3) Yokobori, N., B. Lopez, L. Geffner, C. Sabio y Garcia, P. Schierloh, L. Barrera, S. de la Barrera, S. Sakai, I. Kawamura, M. Mitsuyama, V. Ritacco, and C. Sasiain Mdel. 2013. Two genetically-related multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains induce divergent outcomes of infection in two human macrophage models. *Infect. Genet. Evol.*, 16: 151-156.

2. 学会発表

- 1) Kawamura, I., S. Sakai, and M. Mitsuyama. Blockade of PD-1 signal pathway causes exacerbation of *Mycobacterium tuberculosis* infection via excessive IFN- γ production by antigen-specific Th1 type CD4⁺ T cells. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 2) Kawamura, I., and M. Mitsuyama. Blockade of PD-1 signal pathway causes exacerbation of *Mycobacterium tuberculosis* infection via excessive IFN- γ production by antigen-specific Th1 type CD4⁺ T cells. 15th International Congress of Immunology. 22-27 August, 2013. Milan, Italy.
- 3) 河村伊久雄. 結核菌に対する宿主感染防御の発現制御. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月さいたま市
- 4) 河村伊久雄. 結核菌に対する宿主感染防御の発現制御. The impact of PD-1 inhibitory signal on the resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. 第87回日本細菌学会総会 2014年3月 東京都

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

平成25年度 厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

結核感染肺における IL-17 依存性肉芽腫形成メカニズムの解明

分担研究報告書

研究分担者

梅村 正幸

(琉球大学・准教授)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

結核感染肺における IL-17 依存性肉芽腫形成メカニズムの解明

研究分担者 梅村 正幸（琉球大学熱帯生物圏研究センター・生体防御学・
准教授）

研究要旨.

結核は未だに人類にとって脅威な感染症である。成人の肺結核に対するより効果的なワクチン開発のために、結核菌感染における病態形成の特徴のひとつである肉芽腫形成に関与する可能性が考えられる IL-17A 依存的な遺伝子発現プロファイルを検討した。さらに、IL-17A と相同性の高い IL-17F の抗結核免疫応答の解明を追究した。

A. 研究目的

結核は世界中で毎年約 880 万人の新規患者の発生が認められる。我が国では約 20 人/10 万人の新規罹患率が報告されており、世界的には中程度発症国となっている。さらに、多剤耐性結核菌の出現や免疫不全患者での重複感染の併発により社会的問題である。結核は人から人へ空気感染する疾患であるために、対策にはワクチンが必須となる。現行の結核に対する唯一のワクチンは *Mycobacterium bovis* bcillus Calmette-Guérin (BCG) である。BCG は長期に渡って使用され、小児の結核性髄膜炎ならびに粟粒結核に対しては 70% 以上の防御効果を示しているが、成人の肺結核に対しての予防効果が認められていない。これらのことから、新規ワクチン開発は急務であり、わが国はもとより、世界的な重要課題でもある。

これまでに我々は、炎症性サイトカインとして知られる interleukin(IL)-17A に注目し、その細胞内寄生性細菌に対する感染防御機構について長年に渡って追究してきた。一方、2005 年に Th17 細胞の概念が確立し、獲得免疫における IL-17A の解析が飛躍的に進んだが、それ以前より我々は自然免疫における IL-17A に着目して、Th17 細胞にとらわれずに IL-17A の解析を進めてきた。ここ数年は、この両者を結合させて、細胞内寄生性細菌に対する防御としての

IL-17A の重要性を見出し報告している。すなわち、IL-17A は単に炎症のメディエーターであるだけでなく、炎症のような自然免疫応答から抗原特異的な細胞性および液性獲得免疫まで、広範な免疫応答を制御する機能を有するということである。これまでの研究過程において、結核菌を経気道感染させた IL-17A 遺伝子欠損 (KO) マウスの肺組織では正常マウスに比べて肉芽腫の形成が軽減されていることを見出している。このことは結核菌感染における防御機構のひとつである肉芽腫の形成、成熟ならびにその維持に IL-17A が深く関与していることを意味する。そこで本研究は、IL-17A の感染免疫制御を解明し、結核菌感染に対するより有効なワクチンの開発に繋げることを目的に、まず、マイコバクテリア感染による肺組織における IL-17A 依存性肉芽腫形成メカニズムの解析を遂行し、IL-17A の肺内での肉芽腫誘導に対する影響とその作用機序について考察した。

さらに、IL-17 サイトカイン・ファミリーは IL-17A から IL-17F までの 6 つで構成されており、前述したように、IL-17A が結核菌に対する感染防御に重要な役割を担っていることを明らかにしている。一方、IL-17 ファミリーの中でも特に IL-17F は、IL-17A とアミノ酸レベルで最も相同性が高く、共通の受容体を利用することから、両者は炎症性疾患に対して同程度の機能性を

有すると考えられてきた。そこで、結核菌慢性感染における IL-17F の関与を各 IL-17 KO マウスを用いて検証したところ、結核菌感染において著しい生存率の低下が IL-17A KO マウスで認められたのに対し、IL-17F KO マウスは野生型マウスとほぼ同等レベルであった。また、慢性感染肺の菌の排除能も IL-17F KO マウスは野生型マウスと差が認められなかった。これらのことから、結核菌の慢性感染肺では IL-17A に比べ IL-17F は積極的に感染防御に関与していないと考えられた。その仮説をより詳細に検証するため、比較的慢性感染早期における IL-17F の結核菌に対する感染防御能を検討した。

B. 研究方法

(1) IL-17A 依存性肉芽腫形成に関与する候補遺伝子の検索

8-10 週齢雌の C57BL/6 マウスおよび IL-17A KO マウスに *Mycobacterium bovis* BCG を経気道的に 5×10^6 cfu 接種し、接種後 14 日および 28 日目に肺組織を採取した。採取した肺の一部は 10%ホルマリン固定ならびにパラフィン包埋を行った後、薄層切片を作製した。組織学的観察はヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色を行い、菌の局在性はチール・ネールゼン (ZN) 染色法で確認した。同時に、肺ホモジネートから total RNA を精製し、cDNA に合成した後、real-time RT-PCR 法を用いて細胞間接着分子や細胞走化性分子の発現レベルを測定した。次いで、組織病理解析および既知の遺伝子発現に IL-17A 依存性かつ顕著な表現型を示した群を選択し、DNA マイクロアレイ解析に供した。供試サンプルはバイオアナライザで品質チェックした RNA を用い、Cyanine3 のラベル化 (1 色法)、ハイブリダイゼーションを行った後、マイクロアレイをスキャニングし、データを抽出した。データ解析は Gene Spring GX を用いた。

マイクロアレイ解析により両マウス間で発現レベルの異なる遺伝子候補を検索し、そのうち肉芽腫形成に関与する遺伝子については、再現性を得るために real-time RT-PCR 法を用いて検証した。

(2) 結核菌慢性感染における IL-17F の防御機構の解析

1×10^3 cfu の *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株を野生型 (C57BL/6)、IL-17A KO および IL-17F KO マウスに経気道感染させ、60 日後の臓器内菌数を調べた。同時に、結核菌感染における肉芽腫形成への IL-17F の関与は、肺の病理組織学的解析を行った。さらに、IL-17F が欠損することによる炎症性サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α) の発現および産生能を real-time RT-PCR 法および ELISA 法により検討した。また、感染肺における IL-17F 産生細胞を同定するため、BCG 感染 28 日目の肺組織からリンパ球を調整し、フローサイトメトリー (FCM) による解析ならびに肺組織の凍結切片を作製し、蛍光免疫染色法を試みた。

倫理面への配慮 本研究で行われる遺伝子組換え生物等使用実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」およびこれに係る施行規則並びに省令に従って計画され、琉球大学遺伝子組換え生物等使用安全管理規則の定めるところによって安全委員会の認可を受けたのちに実施された。また、本研究での動物使用実験については、琉球大学動物実験委員会に研究計画の審査を受け、動物実験における生命倫理に適合することを承認された後に行なわれた。

C. 研究結果

(1) IL-17A 依存性肉芽腫形成に関与する候補遺伝子の検索

結核菌感染により形成される肉芽腫は、病原菌の他臓器への播種を防ぐという観点からも重要な生体防御機構のひとつと考えられる。結核菌感染における肺組織での IL-17A 依存性肉芽腫形成不全を明確化にするため、野生型および IL-17A KO マウスに BCG (マイコバクテリアのプロトタイプとして使用) を経気道接種させた後に経時的に肺を採取し、肉芽腫の形成頻度とその構成細胞を HE 染色および ZN 染色法で調べた。肺組織の組織病理所見の比較では、BCG 感

染により形成されるマクロファージ集簇を取り囲むリンパ球浸潤、すなわち肉芽腫の形成不全が IL-17A KO マウスで認められた。同時に、感染局所への細胞の集簇に重要であると考えられる細胞間接着分子(LFA-1 および ICAM-1)の発現を real-time RT-PCR 法で調べた結果、BCG 感染肺において、IL-17A KO マウスでは肉芽腫構成細胞の菌局在部への集簇が明らかに不完全であり、細胞間接着分子および単球走化性因子/CCL2 の発現も有意に低いことが明らかになった。

次いで、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果より、BCG感染局所へのエフェクター細胞の動員に参与するケモカインレセプターとして、CCR5、CCR8、CCR9、CXCR6などがIL-17A依存的に発現上昇していることが明らかになった。また、肉芽腫形成段階で重要な因子と考えられるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)のうち、MMP-2やMMP-9の活性化を誘導するMMP-13の発現レベルの上昇がIL-17A KOマウスでは認められなかった。非常に興味深いことに、野生型マウスにBCGを接種させ、経時的に(0、1、3、5、7、10、14、21および28日)感染肺を採取して、MMP-2およびMMP-9の発現推移をreal-time RT-PCRで確認したところ、MMP-9よりもMMP-2の方が発現レベルの顕著な増加が認められた。なお、その他のBCG接種によるIL-17A依存的な遺伝子発現の変化は現在解析中である。

(2) 結核菌慢性感染における IL-17F の防御機構の解析

結核菌感染における慢性感染 60 日後の各臓器内(肺、肝臓および脾臓)の菌数を解析した結果、IL-17F KO マウスでは、IL-17A KO マウス同様、野生型マウスに比べ有意に増加していた。また、肉芽腫形成においても、IL-17F KO マウスでは、IL-17A KO マウスと同様に異常が認められた。感染 60 日後の感染肺での Th1 型免疫応答を IFN- γ および TNF- α の発現・産生能を調べたところ、mRNA レベルならびにタンパクレベル両者において、IL-17F KO、IL-17A KO マウス共に野生型マウスに比べ有意に低下していた。

これらのことから、結核菌感染早期の肺では IL-17A 同様、IL-17F も感染防御に重要な役割を担っていることが考えられた。一方、BCG を経気道感染させ、経時的に肺組織を採取し real-time RT-PCR で IL-17F 発現の動態を調べた結果、感染後 IL-17F の発現増強が認められた。BCG 感染 28 日目のリンパ球を調製し、FCM で IL-17F 産生細胞の同定を試みた結果、リンパ球からの IL-17F 産生は観察できなかった。このことから、IL-17F 産生細胞は非造血系細胞である可能性が考えられた。そこで、肺組織切片を抗 IL-17F 抗体で染色したところ、肺胞上皮細胞から恒常的に産生している可能性が示唆された。現在、感染肺における IL-17F の局在性と肉芽腫形成に及ぼす影響を検討している。

D. 考察

結核菌感染動物の肺局所における T 細胞免疫の詳細な動態はほとんど報告されていない。我々は、結核菌肺感染マウスを用いた実験システムを確立していることから、肺における結核菌特異的 T 細胞免疫の誘導機構をマウス個体を用いて検討してきた。そのマウスの結核菌感染モデルを用いた宿主免疫応答の解析から、IL-17A が結核菌をはじめとするマイコバクテリアに対する免疫応答に重要であることを見出した。IL-17A KO マウスを用いた感染実験の結果から、IL-17A が BCG 感染肺において自然免疫レベルで感染防御に参与し、さらに感染初期の IL-17A 発現がそれに引き続く CD4⁺ T 細胞による Th1 型免疫応答の誘導に重要であることを明らかにしてきた。さらに、その解析過程において、結核菌感染における病態形成の特徴のひとつである肉芽腫形成においても IL-17A KO マウスの感染肺では肉芽腫形成不全が引き起こされることを見出した。宿主側からの立場でこの肉芽腫形成の意義を考えると、感染した細胞内寄生性細菌の封じ込めには理に適った生体防御機構である。組織学的には、ヒトでの肉芽腫は類上皮細胞と呼ばれる細胞から構成される結節状病変で、結核以外にもさまざま

まな病変で起こるが、ヒトでは結核結節(肉芽腫の中心部に乾酪壊死とよばれる壊死巣を伴う)を形成すること、多核の巨細胞(Langhans細胞)の出現を認められることで、他の肉芽腫とは区別されるが、マウスでは肉芽腫構成がヒトとは異なるので、T細胞とマクロファージ系細胞の集積による病巣を観察した。野生型マウスではT細胞とマクロファージ系の構成による典型的な肉芽腫形成が認められたが、IL-17A KOマウスではT細胞もマクロファージ系も一定量見られるものの、肉芽腫の形成が不完全であることが明らかになった。これらのことから、感染肺では、活性化されたT細胞がIL-17Aを産生し、その細胞表面に発現するCD40Lを介した細胞間相互作用と協同して接着分子ICAM-1およびLFA-1の発現増強を誘導するものと考えられた。この接着分子の発現誘導を介して強固に細胞間が密に接着することにより成熟肉芽腫が形成され、殺菌能の増強さらには菌の他臓器の播種を制御していると推察された。しかし、実際に肉芽腫構造を形成するには、正常な肺胞構造を崩すことが必要不可欠である。要するに、エフェクター細胞が感染局所に速やかに浸潤するために、コラーゲンをはじめとする細胞周辺の細胞外基質(ECM)の分解が必要であり、そこに関与するMMPを検索することが重要と考えた。今回のDNAマイクロレイ解析では、特に肺組織において重要と推定されたMMP-2およびMMP-9に注目したところ、予想通りこれらのIL-17A KOマウスでの発現低下が認められた。さらに、解析を進めた結果、これまで結核菌感染肺において発現増強が報告されているMMP-9よりも同機能性を有するMMP-2発現に大きな変動が観察できた。これは組織病理学的な解析結果から導き出せる現象に相関するものと考えられた。さらに、それらMMPsの活性化を誘導するMMP-13にもIL-17A依存性の関与が推定され、今後より詳細な機能解析が必要と考えられた。

一方、近年、IL-17ファミリーサイトカインであるIL-17Fの気道や腸管といった粘膜組織での感染モデルでの解析が報告さ

れ、IL-17A同様注目されている。IL-17ファミリーサイトカインの中でも特にIL-17Fは、IL-17Aとアミノ酸レベルで最も相同性が高く、共通の受容体を利用することから、両者は炎症性疾患に対し同等に働くものと考えられてきた。しかし近年、*C. rodentium*や*S. aureus*の感染モデルではIL-17AよりもむしろIL-17Fの方が感染防御に強く働くことが報告された。我々のBCGの経気道感染モデルを用いた予備実験においてもIL-17Aのみならず、IL-17Fも肺組織から産生されたことより、IL-17AおよびIL-17Fが感染防御に深く関与している可能性が推定されたが、感染肺におけるIL-17Fによる免疫応答誘導制御機構は全く不明であった。先行研究として行った結核菌感染において結核菌の慢性感染肺ではIL-17Aに比べIL-17Fは積極的に感染防御に関与していないと考えられたが、慢性感染早期の肺ではIL-17A同様、IL-17Fも感染防御に重要な役割を担っていることが明らかになった。一方、IL-17F産生細胞は、IL-17A産生細胞と異なることが示されたことから、両者の機能分担がその局在により規定される可能性が考えられた。この点に関して、より詳細な組織学的解析が必要であると思われた。

E. 結論

IL-17A KOマウスを用いた肉芽腫形成モデルを作製し、肺組織での発現遺伝子のマイクロレイ解析を行った結果、IL-17Aは細胞間接着分子以外にマトリックスメタロプロテアーゼの発現増強に深く関与していることが明らかになった。また、IL-17Aと相同性の高いIL-17Fの抗結核応答機構を理解するためにその防御効果を検討し、IL-17AとIL-17Fとの間に時間的・空間的相違があることが明らかになった。

今回、結核菌感染において最も顕著な病態形成である肉芽腫の形成におけるIL-17Aの関与という新しい視点からのアプローチは獲得免疫応答の制御を理解する為には重要であると考えている。今後、今回得られた結果からIL-17依存性抗結核防御メカニズムに関与する遺伝子候補を抽出すること

により、その情報を活用して、有効な抗結核予防および治療法が開発できるものと期待している。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Umamura, M., and G. Matsuzaki. 2013. Innate and acquired immune responses to mycobacterial infections: involvement of IL-17A/IL-23 axis in protective immunity. Jpn. J. Lepr., in press.

2. 学会発表

- 1) Umamura, M., S. Touyama, M. Fukui, A. Yahagi, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. Involvement of IL-17A-producing TCR $\gamma\delta$ T cells in late protective immunity against pulmonary mycobacterial infection. IMMUNOLOGY 2013, 3-7 May, 2013, Hawaii, USA.
- 2) Fukui, M., M. Umamura, and G. Matsuzaki. Eicosapentaenoic acid induces apoptosis in human pancreatic cancer cells; Role of ROS accumulation, caspase 8 activation, and autophagy induction. IMMUNOLOGY 2013, 3-7 May, 2013, Hawaii, USA.
- 3) Matsuzaki, G., Y. Okita, T. Shiono, S. Hamada, and M. Umamura. Mechanism of IL-17A-mediated enhancement of protective immunity against *Listeria monocytogenes* infection. 15th International Congress of Immunology, 22-27 August, 2013, Milan, Italy.
- 4) Umamura, M., S. Touyama, M. Fukui, Y. Yoshida-Okamoto, A. Yahagi, C. Fukui, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. Role of interleukin-17F in pulmonary mycobacterial infection. 第78回日本

インターフェロン・サイトカイン学会/
第21回マクロファージ分子細胞生物学
国際シンポジウム合同学術集会 2013
年5月 東京都

- 5) 梅村正幸, 松崎吾朗. マイコバクテリア感染に対する IL-17A 産生 T 細胞の防御機構の解明. 第86回日本ハンセン病学会学術大会 2013年5月 さいたま市
- 6) 梅村正幸, 當山清悟, 福井雅之, 福井知穂, 中江進, 岩倉洋一郎, 松崎吾朗. マイコバクテリア感染肺における IL-17F 産生細胞の同定とその局在性. 第24回日本生体防御学会学術集会 2013年7月 熊本市
- 7) 梅村正幸. 結核菌感染における IL-17ファミリーサイトカインの役割. 沖縄感染免疫シンポジウム2013 2013年7月 沖縄県西原町
- 8) Umamura, M., S. Touyama, M. Fukui, C. Fukui, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. Identification of IL-17F-producing cells during mycobacterial infection. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 2013年12月 千葉市
- 9) Fukui, M., M. Umamura, T. Miyata, T. Harakuni, T. Arakawa, and G. Matsuzaki. Induction of early immunity against pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice by combination of BCG priming vaccine and boosting mycobacterial vaccine with a recombinant mycobacterial antigen. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 2013年12月 千葉市

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

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Mukai, Y. Tsukamoto, Y. Maeda, T. Tamura, M. Makino.	Efficient Activation of Human T Cells of Both CD4 and CD8 Subsets by Urease Deficient-Recombinant BCG that Produced Heat Shock Protein 70- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Derived Major Membrane Protein-II Fusion Protein.	Clin. Vaccine Immunol.	in press		2013
M. Umemura, G. Matsuzaki.	Innate and acquired immune responses to mycobacterial infections: involvement of IL-17A/IL-23 axis in protective immunity.	Jpn. J. Lepr.	in press		2013
R. Yang, C. Xi, D. R. Sita, S. Sakai, K. Tsuchiya, H. Hara, Y. Shen, H. Qu, R. Fang, M. Mitsuyama I. Kawamura	The RD1 locus in the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> genome contributes to the maturation and secretion of IL-1 α from infected macrophages through the elevation of cytoplasmic calcium levels and calpain activation.	Pathog. Dis.	in press		2013
T. Tamura, Y. Shimohakamada, M. Makino.	Towards novel tuberculosis and leprosy vaccine development : The role of Th1-inducing peptide in cytotoxic T cell differentiation.	Japanese Journal of Leprosy	in press		2013
H. Wang, Y. Maeda, Y. Fukutomi, M. Makino.	An <i>in vitro</i> model of <i>Mycobacterium leprae</i> induced granuloma formation.	BMC Infectious Diseases	13	279	2013
M. Kai, N. Nakata, M. Matsuoka, T. Sekizuka, M. Kuroda, M. Makino.	Characteristic mutations found in the ML0411 gene of <i>Mycobacterium leprae</i> isolated in Northeast Asian countries.	Infection, Genetics and Evolution	19	200-204	2013

H. Hara, K. Tsuchiya, <u>I. Kawamura</u> , R. Fang, E. Hernandez- Cuellar, Y. Shen, J. Mizuguchi, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz M. Mitsuyama.	Phosphorylation of ASC acts as a molecular switch controlling the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity.	Nature Immunol.	14	1247- 1255	2013
N. Yokobori, B. Lopez, L. Geffner, C. Sabio y Garcia, P. Schierloh, L. Barrera, S. de la Barrera, S. Sakai, <u>I. Kawamura</u> , M. Mitsuyama, V. Ritacco, C. Sasiain Mdel.	Two genetically-related multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains induce divergent outcomes of infection in two human macrophage models.	Infect. Genet. Evol.	16	151- 156	2013
Y. Yamashita, Y. Hoshino, M. Oka, <u>S. Matsumoto</u> , H. Ariga, H. Nagai, M. Makino, K. Ariyoshi, Y. Tsunetsugu- Yokota.	Multicolor Flow Cytometric Analyses of CD4(+) T Cell Responses to <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Related Latent Antigens	Jpn. J. Infect. Dis.	66	207- 215	2013

RESEARCH ARTICLE

Open Access

An *in vitro* model of *Mycobacterium leprae* induced granuloma formation

Hongsheng Wang^{1,2}, Yumi Maeda^{2*}, Yasuo Fukutomi² and Masahiko Makino²

Abstract

Background: Leprosy is a contagious and chronic systemic granulomatous disease caused by *Mycobacterium leprae*. In the pathogenesis of leprosy, granulomas play a key role, however, the mechanisms of the formation and maintenance of *M. leprae* granulomas are still not clearly understood.

Methods: To better understand the molecular physiology of *M. leprae* granulomas and the interaction between the bacilli and human host cells, we developed an *in vitro* model of human granulomas, which mimicked the *in vivo* granulomas of leprosy. Macrophages were differentiated from human monocytes, and infected with *M. leprae*, and then cultured with autologous human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Results: Robust granuloma-like aggregates were obtained only when the *M. leprae* infected macrophages were co-cultured with PBMCs. Histological examination showed *M. leprae* within the cytoplasmic center of the multinucleated giant cells, and these bacilli were metabolically active. Macrophages of both M1 and M2 types co-existed in the granuloma like aggregates. There was a strong relationship between the formation of granulomas and changes in the expression levels of cell surface antigens on macrophages, cytokine production and the macrophage polarization. The viability of *M. leprae* isolated from granulomas indicated that the formation of host cell aggregates benefited the host, but the bacilli also remained metabolically active.

Conclusions: A simple *in vitro* model of human *M. leprae* granulomas was established using human monocyte-derived macrophages and PBMCs. This system may be useful to unravel the mechanisms of disease progression, and subsequently develop methods to control leprosy.

Keywords: Mycobacteria, Leprosy, Granuloma

Background

Leprosy is a chronic mycobacterial infection that presents an extraordinary range of cellular immune responses in humans. Regulation of cell-mediated immunity against *Mycobacterium leprae* through the fine-tuning between cells, cytokines and chemokines continues to be unraveled. Similar to other mycobacterial infections, granulomatous inflammation in the skin lesion defines certain forms of leprosy [1,2]. The bacilli enter and replicate within macrophages, resulting in the production of cytokines and chemokines, which in turn triggers an inflammatory response leading to the recruitment of macrophages and lymphocytes at the infectious site. Granulomas mainly contain

macrophages, epithelioid cells (ECs), multinucleated giant cells (MGCs), surrounded by a rim of T lymphocytes [3]. The organization and the cellular constituents of the developing *M. leprae* granulomas vary with the status of the host immune response. Presumptively, granulomatous lesions can be categorized within two polar forms [4]. At one extreme, tuberculoid granulomas are organized as nodular lesions with ECs and MGCs in the lesion center surrounded by a rim of fibrous connective tissue, lymphocytes along the periphery of the granuloma, and acid-fast bacilli are rarely demonstrable in the lesions. At the other extreme, the pathological feature of lepromatous leprosy skin lesions are characterized by a lack of organization of cells, with very high numbers of foamy macrophages containing very large numbers of bacilli, and disorganized lymphocyte infiltration.

* Correspondence: yumi@nih.go.jp

²Department of Mycobacteriology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aobacho, Higashimurayama, Tokyo 189-0002, Japan

Full list of author information is available at the end of the article

Granulomas have long been believed to benefit the host by containing and restricting the growth of mycobacteria in a localized area, to prevent the spread of the disease to other parts of the tissue or organs [5]. However, some studies in zebra fish infected with *M. marinum* and *M. tuberculosis* suggested that the granulomas contribute to early bacterial growth and expanding infection [6-10].

The structure, function, and evolution of granulomas have been studied using various animal models [11,12], high-resolution chest computed tomography scans of pulmonary tuberculosis patients [13], and explanted tissues [5,14]. Interestingly, the *in vitro* models of human mycobacterial granulomas have been studied by infection with Bacillus Calmette-Guérin (BCG) or stimulation with antigens such as purified protein derivatives or artificial beads coated with mycobacterial components [15,16]. These studies have identified infected macrophages, ECs, and several types of MGCs, which are thought to play important roles in the formation and maintenance of granulomas. In addition, macrophages demonstrate considerable plasticity that allows them to efficiently respond to environmental signals. These cells are generally classified as M1 (classic) macrophages, which produce proinflammatory cytokines and mediate resistance to pathogens and contribute to tissue destruction, or M2 (alternative) macrophages, that produce anti-inflammatory cytokines and promote tissue repair [17-19]. However, so far, we know little about the relationship between the polarization of macrophages within mycobacterial granulomas.

In this study, we developed an *in vitro* model of *M. leprae* granulomas, which mimicked the human granulomatous skin lesion with progressive recruitment of monocytes around macrophages infected by *M. leprae*, and their differentiation into ECs and MGCs as well as recruitment of activated lymphocytes. This model may be useful for unravelling the mechanisms of disease progression, and find effective strategies to control the spread of bacilli.

Methods

Ethics statement, cell culture and preparation of the bacteria

Peripheral blood was obtained from healthy Japanese individuals with informed consent. The study was approved by the ethics committee of the National Institute of Infectious Diseases (NIID). In Japan, BCG vaccination is compulsory for children aged 0–4 years old. Macrophages were differentiated from monocytes using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) as described previously [20,21]. Animal experiments were carried out in strict accordance with the recommendations of Japan's Animal Protection Law. The protocol was approved by the Experimental Animal Committee of NIID Tokyo (Permit

Number: 211002). *M. leprae* (Thai-53 strain) was propagated in athymic BALB/c-*nu/nu* mice (Clea Co, Tokyo) [22]. At 8–9 months post-infection, mouse footpads were processed to recover *M. leprae* [23]. For all experiments, *M. leprae* was freshly prepared. Human cells without the bacilli were cultured at 37°C but when infected with the bacilli, the cells were cultured at 35°C to maintain the viability of *M. leprae* in host cells.

Culture of macrophages and peripheral blood mononuclear cells for the formation of cellular aggregates

Macrophages, differentiated from monocytes using GM-CSF after 4 days culture in RPMI containing 20% fetal calf serum (FCS) were transferred into 24-well tissue culture plates (Falcon) ($1 \sim 2 \times 10^5$ cells/well). Freshly prepared *M. leprae* were then added to each well. The multiplicity of infection (MOI: 50) was determined based on the assumption that macrophage were equally susceptible to infection with *M. leprae* [24]. After 24 hr, autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were cultured with *M. leprae* infected macrophages at a ratio of 5:1 (PBMCs: macrophages). In some cases, macrophages were infected with *M. leprae* without PBMCs and in others, macrophages and PBMCs were co-cultured and macrophages alone were used as negative controls. The cells were cultured at 35°C for periods from 24 h to 10 days with medium changes every other day. To detach the cells from plates TrypLE Express (Gibco) was used, and then the cells were maintained in medium containing 10%FCS for 30 min, before processing for flow cytometric analyses. In other experiments we have also isolated T lymphocytes and monocytes were isolated using Dynabeads Untouched Human T cells and Dynabeads MyPure Monocyte kit 2 (Invitrogen), and used instead of PBMCs.

Phase-contrast microscopy and fluorescence microscopy

Macrophages grown on a 13-mm coverslip in a 24-well plate, were infected with *M. leprae* for 24 h. Autologous PBMCs were then co-cultured with macrophages for additional 9 days. Macrophages were fixed in 2% paraformaldehyde, or methanol pre-chilled to -20°C, and then observed under a phase-contrast microscope (Olympus CKX41 with $\times 10$ and $\times 20$ objective lenses). Photographs were taken with an Olympus DP50 system. Image acquisition and data processing were performed using DP controller software. In other experiments, cells were stained with May-Grünwald-Giemsa stain (MGG) (Sigma-Aldrich) or by TB Carbol-fuchsin ZN stain according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences).

Cell imaging was performed using LSM5-Exciter laser scanning microscope equipped with a 568 nm laser (Carl Zeiss). Fixed cells were stained with anti-human CD163 monoclonal antibody (mAb: BioLegend) and the

secondary antibody used was an Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen/Molecular Probes). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 dye (Sigma-Aldrich). *M. leprae* was stained by auramine O (BD Biosciences). Images were obtained under a fluorescence confocal microscope. Data were processed using LSM software ZEN 2007.

Analysis of cell surface antigens on macrophages by flow cytometry and microscopy

Macrophages were collected after time points of 1 and 9 days of co-culture with the PBMCs or *M. leprae* stimulation. The expression of cell surface antigens on macrophages, was analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Dead cells were eliminated from the analysis by staining with 7-amino actinomycin D. For the analysis of cell surface antigens, the following mAb were used: FITC-conjugated mAb against CD68 (KP) was purchased from Dako, FITC conjugated TLR4 (HTA125) and CD206 (19.2), and PE conjugated mAb against CD86 (FUN-1) was all purchased from BD Biosciences and PE conjugated mAb to CD14 (HCD14) and CD163 (RM3/1) were from BioLegend. The numbers in the insets indicate the mean fluorescent values of the cells stained with the respective mAbs.

Determination of cytokine levels

The levels of the cytokines: Interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-2, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-12p40, IL-1 β and IL-10 in the culture supernatants were quantified using enzyme assay kits, OptEIA Human ELISA Set (BD Biosciences) and processed according to the manufacturer's instructions. IL-4 and IL-13 was purchased from MABTECH AB. Cytokine levels were expressed as pg of protein/ml of protein. Real-time PCR analysis of mRNA extracted using an RNeasy Mini kit (Qiagen), was performed using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with specific primers according to the manufacturer's instructions. The instrument used for the detection of the expression of mRNA was StepOnePlus with StepOne software.

Determination of *M. leprae* viability

The viability of *M. leprae* recovered from the macrophages of different groups was detected by radiorespirometry, that measures the oxidation of ^{14}C palmitic acid to $^{14}\text{CO}_2$, as described previously [25]. Briefly, the adherent macrophages and granulomas with bacilli were lysed in 300 μl of a 0.1 N NaOH solution to release intracellular *M. leprae*. After neutralization with 0.1 N HCl solution, an equal volume of 2 times concentrated Middlebrook 7H9 broth was added. ^{14}C labeled palmitic acid was added to the lysates of macrophages or granulomas, followed by incubation at 33°C. After 7 days, cumulative amounts of oxidized palmitic

acid released as $^{14}\text{CO}_2$ by metabolically active *M. leprae* were measured using a Packard 1500 TRI-CARB liquid scintillation analyzer. The unpaired Student's t-test was used to determine the statistical significance of the two data sets.

Results

Granuloma-like aggregates formed by co-culture of *M. leprae* infected macrophages and autologous PBMCs

When PBMCs were incubated with *M. leprae* infected macrophages in a 24-well tissue culture plate, the cells aggregated to form a multilayered granuloma-like aggregates by day 9 as shown in Figure 1A, whereas control groups did not recruit any cells at this stage (Figure 1B, C). We observed formation of a granular ball-like structure caused by some synapses around aggregates. These *in vitro* granulomas exhibited a cellular structure similar to that in histopathological specimens of tuberculoid leprosy lesions showing T lymphocytes surrounding the differentiated, ECs and MGCs that may be involved in cytokine production for intercellular communication. (Figure 1D). Confocal microscopic analysis of *M. leprae*-induced granuloma showed a multilayered structure (about 3–4 cell layers in transverse and straight sections), and some cells were positive for CD163 (red), a macrophage marker (Figure 1E).

Characterization of the cell populations recruited within *in vitro* granuloma-like aggregates

To identify and characterize the different cell types in granuloma-like aggregates, the cells were plated on glass slides and stained on day 9 of co-culture. MGG staining showed that activated macrophages with larger cytoplasm, and MGCs were observed, which resembled those in the granulomas of leprosy (Figure 2B, D). MGCs are thought to be formed as a result of fusion of macrophages, monocytes and ECs (Figures 2A, C). The presence of *M. leprae* in MGCs was confirmed by staining with TB Carbol-fuchsin ZN (arrows in Figure 2E, F). In addition, confocal microscopy revealed the presence of MGCs with auramine O stained *M. leprae*, in the cytoplasmic region (Figure 2G, H). To characterize macrophages, ECs and MGCs in the granuloma-like aggregates, we performed immunofluorescence staining for macrophage markers CD68, CD1a and CD163 (data not shown). Both the macrophages and the MGCs could express the CD68 and CD1a marker, but the expression level of CD68 on the macrophages was higher than that on the MGCs. With the increasing number of nuclei in MGCs, lower levels of CD68 was observed (not shown), although there was no significant difference in the expression levels of CD1a between macrophages and MGCs. These data indicate that MGCs belong to the monocyte/macrophage lineage.

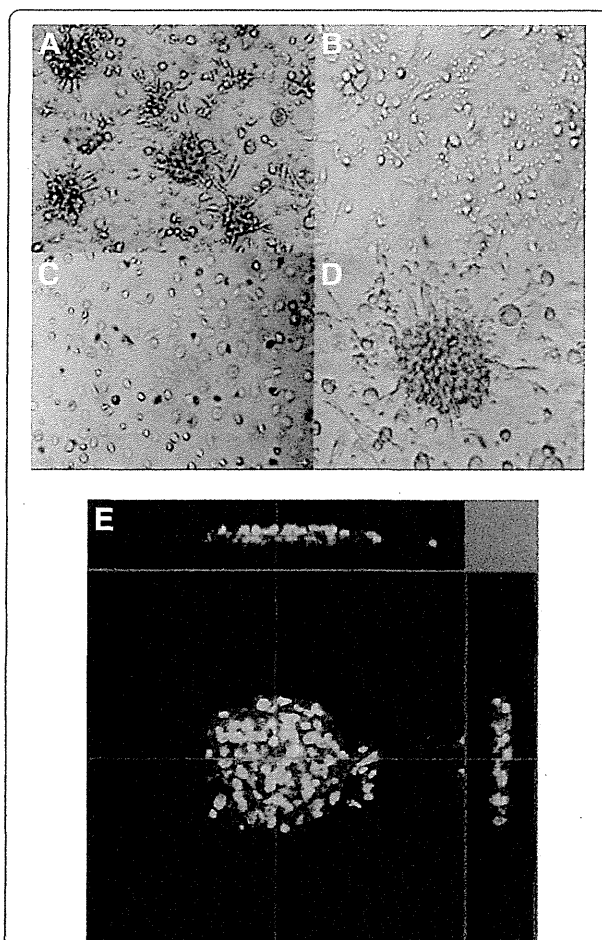


Figure 1 Formation of granuloma-like cellular aggregates by co-culture of PBMCs and macrophages infected with *M. leprae*. (A) Co-culture of macrophages (1×10^5), infected with *M. leprae* (MOI:50) and autologous PBMCs (5×10^5) in a 24 well-plate resulted in the formation of granuloma-like aggregates by day 9. (B) Culture of macrophages (1×10^5) and autologous PBMCs (5×10^5) for 9 days, without the bacilli. No formation of granuloma-like aggregates was observed. (C) Macrophages (1×10^5) infected with *M. leprae* (MOI:50) after 9 days co-culture. (D) Higher magnification (2x) of the cell-aggregates in (A). (E) Confocal microscopic (LSM5 Exciter) analysis of *M. leprae*-induced granuloma revealed a multilayered structure (about 3–4 cell layers cells in transverse and straight sections). The cells in aggregates were positive for CD163 (red), a marker of macrophages. Nuclei were stained with Hoechst 33343 (blue). Representative data from a single donor are shown.

Expression levels of cell surface antigens on macrophages at different time points

We investigated the expression levels of cell surface antigens on macrophages from different groups at two different time points, day 1 and day 9. On day 1, there was no significant difference in the expression of cell surface antigens on macrophages between groups. Compared with day 1 macrophages, day 9 macrophages, which were infected with *M. leprae* and co-cultured with PBMCs to

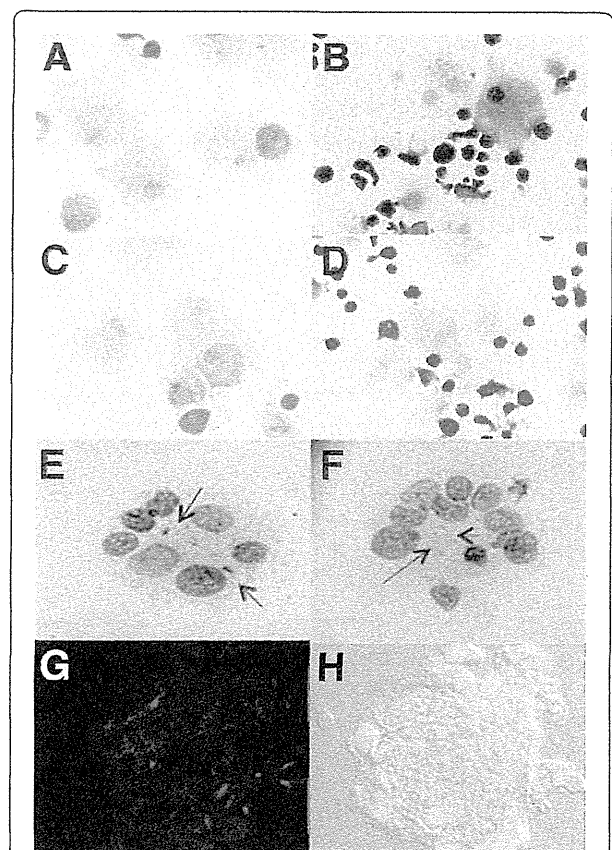


Figure 2 Cell populations in granuloma-like aggregates. May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining showed that there are mainly macrophages, ECs (A, D) and MGCs in the aggregates (B, D). MGCs were formed by the intercellular fusion and phagocytosis of cells (C). *M. leprae* were stained with Ziehl-Neelsen (shown with arrows) and the bacilli were found to be restricted to the central cytoplasmic region of the MGCs (E, F). Confocal microscopy of MGCs showed *M. leprae* stained with auramine O (green) and the nuclei stained with Hoechst (G, H).

form granuloma-like aggregates, showed higher expression of CD14 (pattern recognition receptor), CD68 (macrophage marker related to phagocytic activities), CD163 (scavenger receptor) and CD206 (mannose receptor), although the expression of major histocompatibility complex (MHC) class-II, CD86, and toll-like receptor (TLR)-4 did not change (Figure 3). Interestingly, in our long-term culture (9 days) of macrophages infected with *M. leprae*, the expression of CD14, CD68, CD163, TLR4, CD86 and CD206 was significantly lower than that in macrophages infected with *M. leprae* and co-cultured with PBMCs. CD206 expression was the lowest in macrophages co-cultured with PBMCs, although CD163 expression was significantly high (Figure 3). CD163 and CD206 are markers of M2 macrophages, whereas CD86 expression is associated with M1 macrophages. Therefore, the M1 and M2 macrophages appeared to coexist in granulomas.

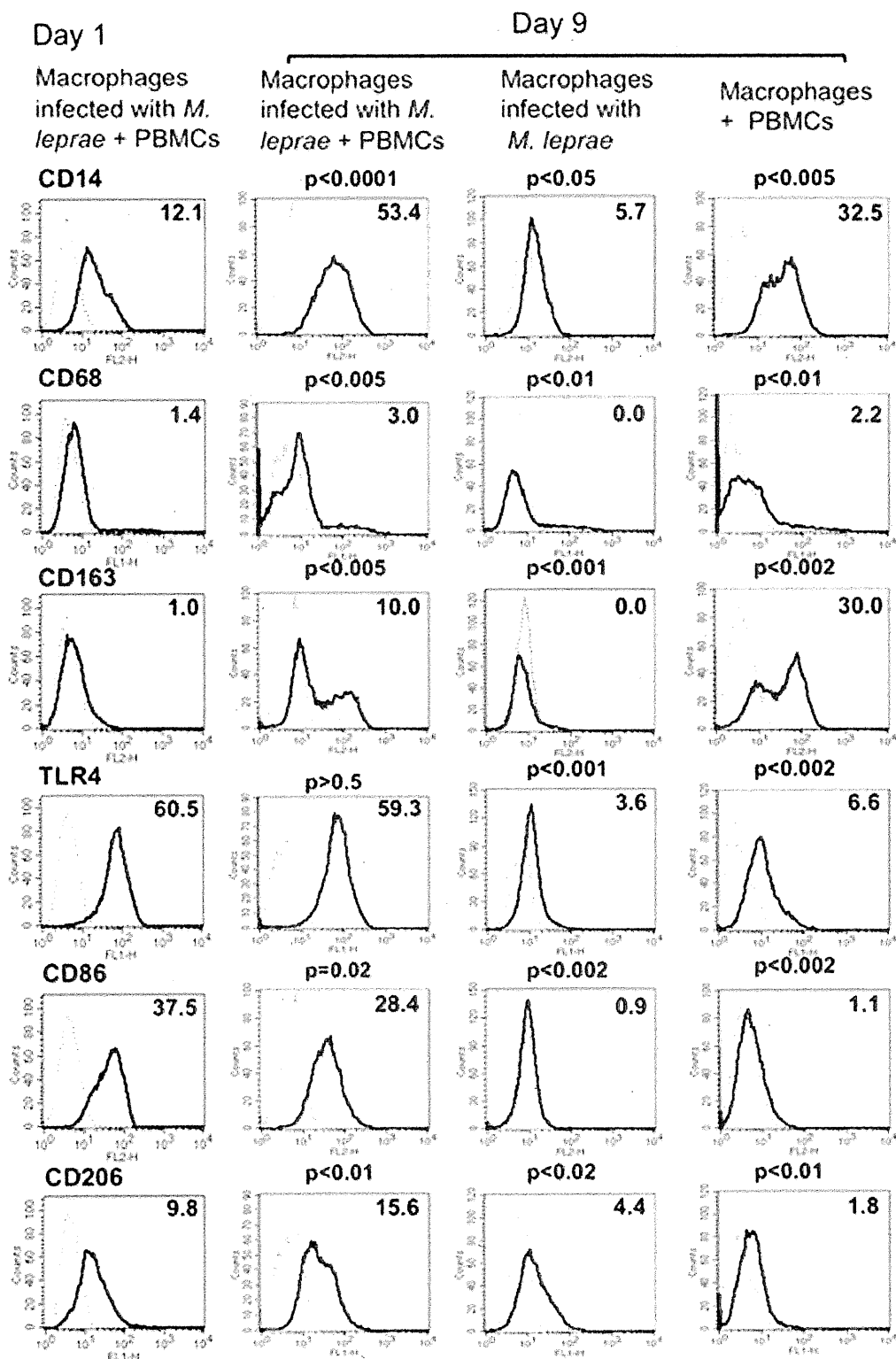


Figure 3 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 3 Expression of cell surface antigens on macrophages at two different time points. Compared with the control group on day 1, day 9 macrophages infected with *M. leprae* and co-cultured with T lymphocytes showed relatively higher expression of CD14, CD163 and CD206. While in macrophages infected with *M. leprae*, the expression level of CD14, CD68, CD163, TLR4, CD86 and CD206, were downregulated as compared to those infected macrophages co-cultured with PBMCs. Representative data of one donor, from three independent experiments are shown. P-values were calculated using the Welch unpaired t-test in comparison with day 1 macrophages.

Cytokines in culture supernatants

The culture supernatants from different groups were collected on days 1, 3 and 9 after the start of macrophage culture. The release of IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-12p40, IL-1 β , IL-4 and IL-13, was evaluated by ELISA (Figure 4). Interestingly, the expression levels of the various cytokines in supernatants, from different groups showed significant differences that were associated with the formation of granuloma-like aggregates and changes of cell surface antigen expression on macrophages. In the group with *M. leprae* infected macrophages co-cultured with PBMCs, the concentrations of IL-2, IL-1 β and TNF- α peaked on day 1 after infection and then declined gradually. The level of IL-12 p40 also declined slowly by day 9. IFN- γ levels were low on day 1, but increased 7 fold by day 4, and then remained unchanged till day 9. A high level of IL-10 expression in macrophages and macrophages cultured with PBMCs was observed, but the expression was significantly decreased when macrophages were infected with *M. leprae* as observed in the day 9 cytokine expression levels. However,

when macrophages were differentiated with M-CSF, the expression of IL-10 was significantly high when macrophages were infected with *M. leprae* (Additional file 1: Figure S1). IL-4 and IL-13 were not detected in any groups on days 1 and 9 from the start of macrophage culture (data not shown). Real time PCR results further confirmed the cytokine expression and showed similar results except for the IL-2 and TNF- α , whose expression was observed in control groups of macrophages infected with *M. leprae* in addition to those co-cultured with PBMCs (Figure 5).

The viability of *M. leprae* in granuloma-like aggregates

We determined the viability of *M. leprae* at days 1 and 9, when granuloma-like aggregates were observed in co-cultures of *M. leprae* infected macrophages with PBMCs, whereas in cultures of macrophages infected with *M. leprae*, there was no granuloma formation. The amount of radioactive CO₂ evolved which reflects the rate of ¹⁴C-palmitic acid oxidized by *M. leprae*, which was measured by a scintillation counter. No significant difference in ¹⁴CO₂

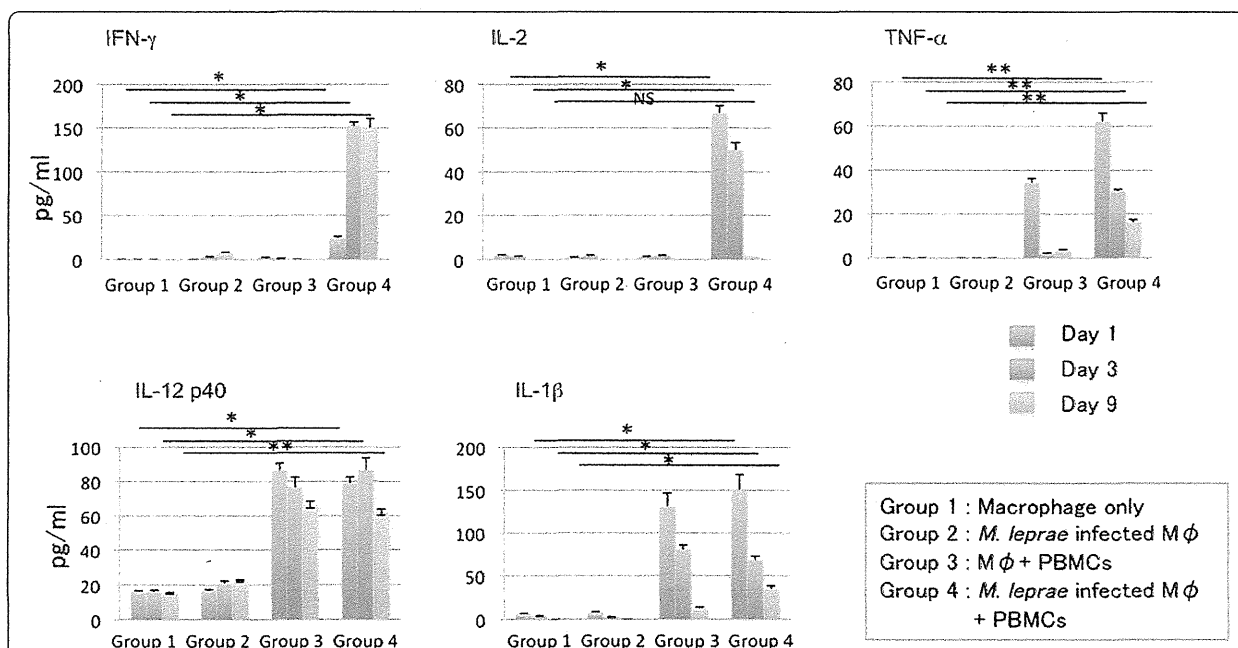
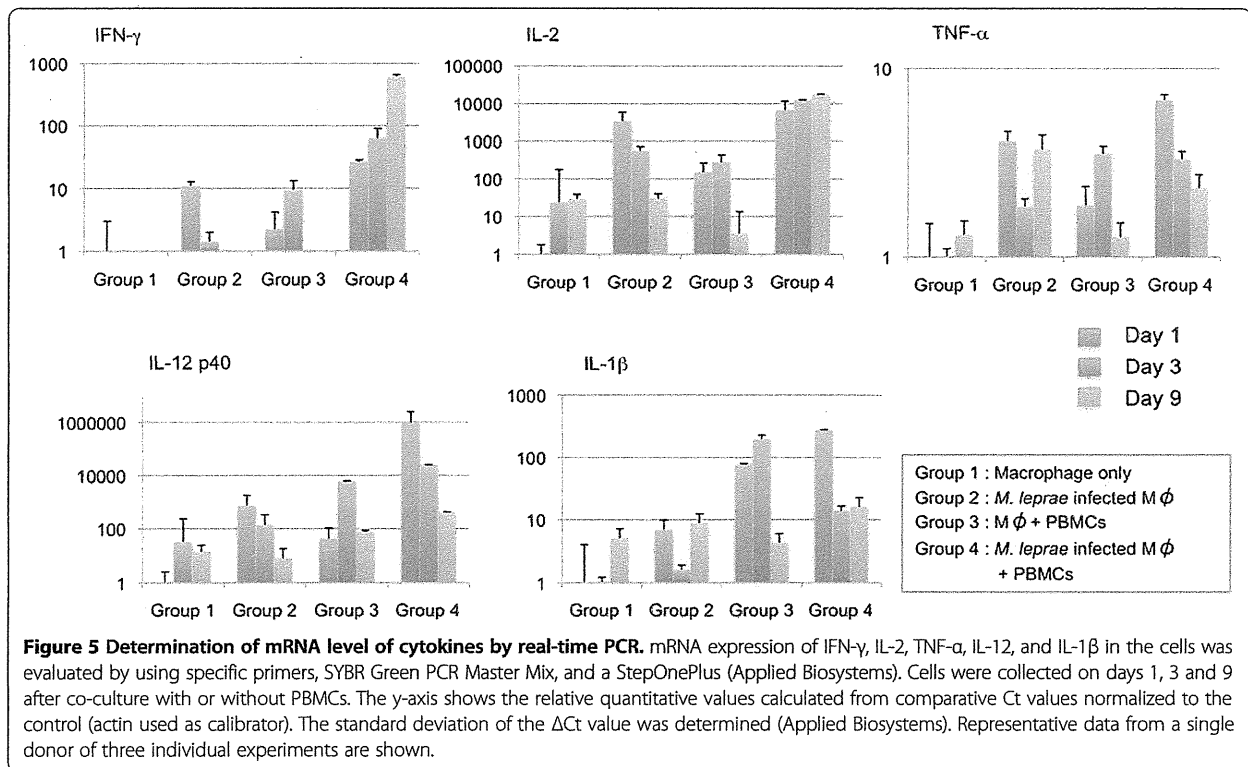


Figure 4 Measurement of cytokines secreted into the culture medium by ELISA. Measurement of IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-12, and IL-1 β secreted in the culture medium from different groups of cells at day 1, 3 and 9. Representative data from three individual experiments of a single donor are shown. Unpaired Student's t-test was performed. NS: not significant, *p < 0.001, **p < 0.01.



production was observed from macrophage in either groups on days 1, and 9. However, the amount of radioactive CO₂ released from macrophages infected with *M. leprae* and co-cultured with PBMCs for 9 days was lower but not significantly lower than that released from macrophages infected with *M. leprae* alone (Figure 6).

Discussion

In the 1960s, Ridley and Jopling proposed a histological classification scheme for leprosy [26]. At one extreme, called the polar tuberculoid, leprosy patients show a high degree of cell-mediated immunity, lesions revealing well-developed granulomatous inflammation and rarely acid-fast bacilli are detected. At the other extreme, termed polar lepromatous patients have no apparent resistance to *M. leprae*, and skin biopsies reveal sheets of foamy macrophages in the dermis containing very large numbers of bacilli and microcolonies called globi. Currently, the formation and maintenance of granulomas are considered to be critical components of the host response to *M. leprae* infection, which determine not only whether primary disease occurs, but also the clinical manifestation. Granuloma formation is studied in mouse models but little is known about the human granuloma due to the ethical problems of using human samples and the difficulties in establishing a good model using human cell lines.

The formation of small, rounded granuloma-like-structure, was previously described by co-culture of blood lymphocytes

with autologous macrophages infected with *M. tuberculosis*, or BCG or stimulation with other mycobacterial antigen such as purified protein derivatives. These granuloma-like structures showed abundance of CD68 positive macrophages with small round lymphocytes scattered throughout the

