

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18073015

研究課題名(和文) 細菌感染時の樹状細胞による自然免疫系と獲得免疫系の連結機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms controlling innate and adaptive immune responses against bacterial infection by dendritic cells.

研究代表者

小安 重夫 (KOYASU SHIGEO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90153684

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫、獲得免疫、粘膜免疫

### 1. 研究計画の概要

腸管における病原細菌の検知機構として、樹状細胞、上皮細胞、肥満細胞、そして抗原の補足を主たる目的とすると思われる器官としてパイエル板や孤立リンパ小節などの腸管関連リンパ組織(GALT)が挙げられる。*Listeria monocytogenes* (以下リステリア)感染において上皮細胞が破壊されることや上皮細胞が生産するサイトカインが炎症に重要である可能性は高いが、同時に樹状細胞やマクロファージを介した感染の検知も重要である。しかしその経路がGALTを介するのか、上皮の間隙から突起を伸ばす樹状細胞などが重要なのか、明らかではない。これまで樹立した様々な遺伝子改変マウスと上記のトランスジェニックマウスと交配したマウスを利用してこれらの問題に迫る。どのような細胞が感染を検知し、初期には炎症性サイトカインによって増殖を抑えつつ、抗原特異的な反応の起動につなげ、さらに長期にわたる記憶の成立につなげるか、その分子機構を明らかにすることを目指す。これらの研究を推進することで、細菌と宿主の相互作用の本質を理解するための研究を展開する。

### 2. 研究の進捗状況

リステリアの腸管感染の成立にはリステリア菌の *inlA* 遺伝子産物と腸管上皮細胞の E-カドヘリンの結合が重要とされ、マウスの E-カドヘリンのアミノ酸配列がヒトの E-カドヘリンのアミノ酸配列と異なるがゆえにマウスにおいては腸管感染が成立しないと考えられてきた。しかし、実際にはリステリアを経口投与することで脾臓や肝臓への菌の一過的な播種が観察され、その後免疫系

によって排除され、菌は腸管内にのみ存在するようになる。この事実はカドヘリンとの相互作用の必要性に疑問を投げかける。この点を確認するために、ヒトの E-カドヘリンを腸管上皮で発現するトランスジェニックマウスを用いた経口感染実験を行ったが、感染効率に大きな変化は見られなかった。さらに、2007 年にマウスの E-カドヘリンに結合が可能な *InlA* の変異が報告されたことから、同様な *inlA* 変異株を作製した。この変異体はマウス腸管上皮細胞株への感染効率は野生型のリステリアと比較しての 2 倍程度に上昇したが、その効率はヒトの細胞株には遠く及ばず、またマウスへの経口感染を行っても著しい変化は見られなかった。また、*inlA* 欠損株を作製したが、感染効率に大きな差は見られなかった。これらの結果から、カドヘリンと *InlA* の相互作用は腸管感染に重要な機能は果たしておらず、別の経路が機能している可能性が浮かび上がった。

*inlA* 変異株を作製する際に、*InlB* を欠損するリステリアを構築したところ、野生型と比較して 10 倍から 100 倍低い感染効率を示した。これらの結果から、マウスの経口感染系においては *InlB* が重要な働きをすることが明らかになった。

上記の一連の実験において感染経路を検討する中で宿主の胆嚢が経口感染後の初期のリステリアの急激な増殖に重要な臓器として浮かび上がり、現在胆嚢を摘出したマウスを用いてさらに検討を重ねている。

一方、リステリア脳症の新たなモデルを開発し、リステリアの排除に CD4 陽性細胞に比べて CD8 陽性細胞がより重要であり、リステリアに感染したミクログリアを Fas-FasL 系

を介して殺傷することを明らかにした。これまで脳炎において CD4 陽性の Th17 細胞の重要性が示唆されてきたが、我々のモデルにおいては CD4 陽性の Th17 細胞よりも  $\gamma\delta$  型 T 細胞が主に IL-17 を発現することが明らかとなった。MHC テトラマーを用いた解析からは、脳内に多数のリステリア特異的な CD8 陽性細胞が浸潤することが明らかになり、今後免疫記憶の成立の解析に有用な手法が確立できた。

### 3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。予定を変更する部分もあるがそれを補う新たな発見もあり、全体としてはおおむね順調に進展していると考えられる。

### 4. 今後の研究の推進方策

当初に計画した E-カドヘリンを標的とした解析は我々の一連の実験結果がこれまでの報告を支持していないために In1A と E-カドヘリンに注目してきた当初の方針を方向転換することとした。病原因子の中では In1B の重要性が浮かび上がっていることから、こちらの重点を置く予定である。

腸管感染における In1B の機能解析を継続する。In1B が宿主細胞の c-Met に結合することで宿主細胞の PI3K 経路を活性化することから、我々がこれまで樹立してきた PI3K 遺伝子改変マウスも駆使し、今後は宿主細胞の PI3K 経路の機能も合わせて解析する予定である。我々はこれまで PI3K が樹状細胞からの IL-12 の発現を主に制御することを明らかにしてきた。事実、PI3K ノックアウトマウスにおいては樹状細胞からの IL-12 の生産が亢進しており、結果として Th1 反応の増強と Th2 反応の誘導不全が見られる。多くの細菌は宿主細胞と共培養した場合、TLR を介した刺激を介して細胞内の PI3K を長時間にわたって活性化する。c-Met は樹状細胞にも発現していることから「*L. monocytogenes* が樹状細胞の PI3K 活性を増強することで IL-12 の発現を抑制し、自らに有利な Th2 反応を誘導する戦略をとっている」という仮説を立て、これを検証したい。

さらに、腸管感染における記憶細胞の分化経路は必ずしも明らかではない。腸管における病原細菌の検知機構として、樹状細胞、上皮細胞、肥満細胞、そして抗原の補足を主たる目的とすると思われる器官としてパイエル板や孤立リンパ小節などの腸管関連リンパ組織 (GALT) が挙げられる。リステリア感染において上皮細胞が破壊されることや上皮細胞が生産するサイトカインが炎症に重要である可能性は高いが、同時に樹状細胞やマクロファージを介した認識も重要である可能性がある。その経路も GALT を介する

のか、上皮の間隙から突起を伸ばす樹状細胞などが重要なのか、明らかではない。これまでに樹立した様々な遺伝子改変マウス系を用いて、これらの問題に迫りたい。この点からは、胆嚢が感染初期の菌の急激な増殖に関わることは興味深く、その理由や機能を明らかにしてゆく予定である。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Hayashi, T. Nagai, S., Baba, Y., Ikeda, E. Kawase, T. and Koyasu, S. (2009) Critical roles of NK and CD8<sup>+</sup> T cells in distinct phases of CNS listeriosis. *J. Immunol.* in press. 査読有

Suzue, K., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Suzuki, M. and Koyasu, S. (2008) Critical role of dendritic cells in determining the Th1/Th2 balance and the disease outcome upon *Leishmania major* infection. *Int. Immunol.* 20:337-343. 査読有

Ohteki, T., Tada, H., Ishida, K., Sato, T., Maki, C., Yamada, T., Hamuro, J. and Koyasu, S. (2006) Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo. *J. Exp. Med.* 203:2329-2338. 査読有

[学会発表](計 34 件)

林俊行, 永井重徳, 馬場夕紀子, 小安重夫. 中枢神経系リステリア感染症における IFN $\gamma$  と IL-17 の役割. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (2008 年 12 月 1 日-12 月 3 日)(京都) 2008 年 12 月 2 日発表

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし