

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590489

研究課題名（和文） NOD1 を介した免疫ホメオスタシスの調節

研究課題名（英文） Nod1-mediated regulation of immunological homeostasis

研究代表者

佐藤 卓（SATO, TAKU）

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：40375259

研究成果の概要：本研究では、細菌由来ペプチドグリカンの細胞内センサーである Nod1 を介したシグナルが、CD8 α ⁺樹状細胞（DC）のクロスプレゼンテーション能を増強し、より効果的に抗原特異的細胞障害性 T 細胞の増殖及び活性化を誘導しうることを明らかにした。他方、Nod1 刺激物質を投与したマウスはエンドトキシンショックに対する感受性が高まることから、同刺激が強力なアジュバンド活性を有することが判明した。これらの結果は、これまでに知られていなかった Nod1 シグナルを介する防御免疫応答機構を明らかにするとともに、新たな抗腫瘍免疫治療の開発に繋がる可能性を含む重要な知見と考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：抗原, NOD1, Cross-priming, dendritic cell, Cytotoxic T lymphocyte, Endotoxin shock,

1. 研究開始当初の背景

(1)細胞質に発現する non-Toll-like receptor (TLR)は、新規の病原体センサーとして注目されており、細胞膜、エンドソーム及び小胞体に発現する TLR とは異なる機能が示唆されている。

(2) 完全フロイントアジュバンド(complete freund adjuvant; CFA)は細胞性免疫を誘導するが、CFA のアジュバンド活性の一部は細

菌の細胞壁の骨格をなすペプチドグリカン(peptidoglycan; PGN)の要構造であるムラミルジペプチド(muramyl dipeptide; MDP)により誘導されることが明らかにされている。しかしながら、MDP によるアジュバンド活性の誘導機構は不明であった。

(3) PGN の構成成分である γ -グルタミル-メソ-ジアミノピメリン酸 (γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid; iE-DAP) 及び

MDP のレセプターは nucleotide-binding oligomerization domain (Nod)1 及び Nod2 であり、共に細胞質に発現することが明らかになっていた。Nod1 が様々な組織及び細胞で広範囲に発現しているのに対し、Nod2 は単球や樹状細胞 (dendritic cell; DC) などの抗原提示細胞に限局して発現していることが確認されていた。従って、Nod1 と Nod2 は共に DC に発現すること明らかにされていたが、その機能はほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、*in vivo* における Nod1 及び Nod2 を介した自然免疫応答及び抗原特異的獲得免疫応答の誘導メカニズムについて、炎症性反応モデル、感染モデル及び卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) 特異的クロスプライミング誘導モデルなどを用いて明らかにすることを目的とした。特に、各々の免疫応答に中心的な役割を担う DC の機能が、Nod シグナルの活性化によりどのように修飾されるかを解明しようと考えた。

(1) Nod1 リガンドによる DC の MHC クラス I 分子 (MHC-I) を介した抗原提示増強作用の解明

DC は病原細菌、ウイルスなどに感染した細胞を貪食し、これら由来の外來性抗原を MHC-I 分子を介して CD8⁺T 細胞に提示する (クロスプレゼンテーション)。このようなシステムで CD8⁺T 細胞が活性化される現象はクロスプライミングと呼ばれるが、これまでに TLR リガンド刺激は、DC のクロスプライミング効果を増強することが明らかにされている。これは、TLR リガンド刺激が、食作用並びにファゴソームとリソソームの融合を促進する結果と考えられている (*Science*, 304:1014-1018, 2004)。また、DC がウイルス感染細胞を貪食すると TLR3 シグナルを介してクロスプライミングが増強され、結果として細胞障害性 CD8⁺キラー T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) 誘導の亢進、及びこれによる効率的なウイルスの排除が行われることが報告されている (*Nature*, 433:887-892, 2005)。しかしながら、Nod1 を含む細胞質レセプターがクロスプライミングに及ぼす影響については不明であった。本研究では、Nod1 シグナルが、他の TLR シグナルと同様に、DC のクロスプライミング能を増強しうるかを検討した。

(2) エンドトキシンショックモデルを用いた

炎症性応答メカニズム

MDP を前投与したマウスに LPS を投与すると Nod2 依存的にエンドトキシンショックが誘発される (*Science*, 307:731-734, 2005)。我々は、Nod1 リガンドを前投与した野生型マウスに LPS を投与する場合にも、同様にエンドトキシンショックが誘発され、一方、*Nod1*^{-/-}マウスでは誘発されないことを見出していた (未発表)。同知見は、Nod1 リガンドが Nod2 リガンドと同様に *in vivo* におけるアジュバンド活性を有することを示唆している。本研究では、Nod1 シグナルを介したアジュバンド活性の誘導に関わる細胞及びサイトカインについて検討した。

3. 研究の方法

(1) Nod1 リガンドによる DC の MHC-I による抗原提示増強作用の解明

in vivo におけるクロスプライミング効果を評価する実験系として、本研究ではモデル抗原として OVA をマウスに静脈注射し、同抗原のクロスプレゼンテーションを誘導する方法を用いた。

また、クロスプライミングの誘導における Nod リガンドの作用を評価するために、Nod1 リガンドである iE-DAP、FK156、FK565、あるいは Nod2 リガンドである MDP を OVA と共に野生型マウスと *Nod1*^{-/-}マウスに投与後、CFSE 標識した OVA 特異的 T 細胞である OT-I 細胞を移入して、*in vivo* における OT-I 細胞の増殖及び IFN- γ の生産を観察した。また、CTL 活性については、*in vivo* killing assay により解析した。具体的には、OT-I 細胞によって認識される OVA ペプチドを脾細胞にパルスし、これを標的細胞にみため、予め OVA クロスプライミングを誘導したマウスに移入した。その後、これらの標的細胞が個体から排除される程度を指標に検討した。さらに、FK565、MDP によるクロスプライミングの増強メカニズムについて、特に DC における抗原提示に関わる分子群の発現変化に着目し、リアルタイム PCR 法により解析した。さらに、当該現象の抗腫瘍活性に及ぼす効果について EG-7(OVA を発現する癌細胞) を用いた *in vivo* での癌細胞の増殖を指標に検討した。

(2) エンドトキシンショックモデルを用いた炎症性応答メカニズム

Nod1 リガンド前処置によって誘発されるエンドトキシンショック (上記) に関わる細胞集団を同定するために、T 細胞、B 細胞を

欠損する *Rag2*^{-/-}マウス、あるいは DC、ナチュラルキラー(natural killer; NK)細胞、マクロファージを特異的に除去したマウスに上記の方法でエンドトキシンショックを誘導した。さらに、FK565 によるエンドトキシンショックの誘導に関わる TNF- α などの炎症性サイトカインを ELISA 法で測定するとともに、TNF- α 中和抗体の投与で、この現象が回避できるかを検討した。

4. 研究成果

(1) Nod1 リガンドによる DC の MHC-I による抗原提示増強作用の解明

Nod1 リガンドを OVA と共に投与した野生型マウスでは、OVA を単独投与した野生型マウスに比べ、移入した OT-I 細胞の増殖、IFN- γ の生産、CTL 活性が亢進した。対照的に、Nod1 リガンドを投与した *Nod1*^{-/-}マウスでは OT-I 細胞の活性化亢進が認められなかった。このような Nod1 リガンド投与によるクロスプライミングの亢進は、CD8 α ⁺DC 特異的な抗原提示能の増強によることが明らかとなり、また、Nod2 リガンドにも同様の効果があることが判明した。これを裏付けるように CD8 α ⁺DC では Nod1 リガンド刺激により、抗原提示に関わる分子群 (Sec61 α 、Tap1、calnexin など) や共刺激分子 (CD40、CD86) の発現亢進を認めた。さらに、Nod1 リガンドを OVA と共に投与した野生型マウスでは、EG-7 の有意な増殖抑制が観察され、抗腫瘍活性の増強効果が証明された。

(2) エンドトキシンショックモデルを用いた炎症性応答メカニズム

Rag2^{-/-}マウス及び DC あるいは NK 細胞を特異的に除去したマウスでは、野生型マウス同様、Nod1 リガンド前処置によって、エンドトキシンショックが誘発された。他方、マクロファージ除去マウスでは、同様の処置によってもエンドトキシンショックは誘発されなかった。従って、同現象の誘発には、T、B、NK 細胞及び DC は関与せず、マクロファージが必須であることが明らかとなった。

また、野生型マウスでは、ショックの誘発に伴い、血清中に炎症性サイトカインである TNF- α が検出されたのに対し、*Nod1*^{-/-}マウスでは、同様の処置によっても TNF- α がほとんど検出されなかった。この際、野生型マウスにおける、TNF- α の主要な生産源はマクロファージであることが確認された。さらに、TNF- α 中和抗体を投与することで、野生型マウスに誘発されたエンドトキシンショックを

回避することができたことから、Nod1 リガンド前処置によって誘発されるエンドトキシンショックには、マクロファージから生産される TNF- α が必須であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(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 8 件)

- ① Sato, T., Onai, N., Yoshihara, H., Arai, F., Suda, T., and Ohteki, T., IRF-2 protects quiescent HSCs from type-I interferon-dependent exhaustion. Nat. Med., (2009) in press, 査読有
- ② Kuroda, S., Nishio, M., Sasaki, T., Horie, Y., Kawahara, K., Sasaki, M., Natsui, M., Matozaki, T., Tezuka, H., Ohteki, T., Förster, I., Mak, T.W., Nakano, T., and Suzuki, A., Effective clearance of intracellular *Leishmania major* in vivo requires Pten in macrophages. Eur. J. Immunol. 38, 1331-1340, (2008), 査読有
- ③ Onai, N. and Manz, M.G., The STATs on dendritic cell development. Immunity, 28, 490-492, (2008), 査読有
- ④ Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G., Identification of clonogenic common Flt3⁺M-CSFR⁺ plasmacytoid and dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. Nat. Immunol., 8, 1207-1216 (2007), 査読有
- ⑤ Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T., Akira, S., and Ohteki, T., Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. Nature, 448, 929-933 (2007), 査読有
- ⑥ Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M. and Manz, M.G., Flt3 in regulation of type-I interferon producing and dendritic cell development. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1106, 253-261, (2007), 査読有
- ⑦ 榑木俊聡、多田浩之、IL-15 による炎症反応の制御、感染・炎症・免疫、37、10-16、(2007)、査読無
- ⑧ 多田浩之、榑木俊聡、樹状細胞からの IL-15 生産と炎症、臨床免疫・アレルギー科、48、340-346、(2007)、査読無

[学会発表] (計 2 件)

- ① Asano, J., Critical roles for Nod-like receptor in dendritic cell-mediated cross-priming

induction *in vivo*. 第38日本免疫学会総会・
学術集会、2008年12月1-3日、京都

- ② Asano, J., Critical roles for Nod-like receptor
in dendritic cell-mediated cross-priming
induction *in vivo*. The 10th International
Symposium on Dendritic Cells, 2008年10月
1-5日、神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~kisei/Default.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 卓 (SATO, TAKU)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：40375259

(2) 研究分担者

小内 伸幸 (ONAI, N. OBUYUKI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：50323605

手塚 裕之 (TEZUKA, H. IROYUKI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：30375258

多田 浩之 (TADA HIROYUKI)

秋田大学・大学院医学系研究科

・特別研究員

研究者番号：70431632

(平成19年度研究代表者：海外留学のため
平成19年度のみ参画)

(3) 連携研究者