

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590388

研究課題名（和文）NK細胞のリステリア感染における役割と二本鎖RNAによる感染抵抗性増強機構の解明

研究課題名（英文）Amelioration of murine listeriosis in the absence of NK cells and NKT cells and the analysis of the influence of double-stranded RNA on anti-bacterial resistance

研究代表者

江本 善子 (EMOTO YOSHIKO)

群馬大学・大学院保健学研究科・研究員

研究者番号：30542344

研究成果の概要（和文）：これまでNK細胞は感染後 Interferon- γ を多量に産生することから、細胞内寄生細菌（リステリア）に対して防御的に働いていると考えられていたが、実際は増悪的に働くこと、また逆に PolyI:C を投与するとリステリアに対する感染抵抗性が増大するだけでなく、そこにNK細胞が深く関与していることが明らかとなった。このように、本研究はこれまでの既成概念を打ち破るだけでなく、細胞内寄生細菌感染におけるNK細胞の新たな役割を明らかにしたという点において、細菌学、更には免疫学の発展に寄与するところが極めて大である。

研究成果の概要（英文）：NK1.1⁺ cells have been considered to play a protective role in various bacterial infections by secreting IFN- γ upon infection. Yet, we have obtained the first evidence that NK cells play a detrimental role in protection against intracellular bacteria, *Listeria monocytogenes*. In contrast, we also found that anti-listerial resistance was markedly enhanced by PolyI:C and that NK cells participate in this mechanism. Thus, because our findings clearly demonstrated the new role of NK cells in intracellular bacterial infection, we consider it likely that our study contributes to the development not only of bacteriology, but also of immunology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：リステリア、細胞内寄生細菌、NK細胞、二本鎖RNA、PolyI:C

1. 研究開始当初の背景

リステリアはマクロファージ(M ϕ)内において増殖可能な細胞内寄生細菌で、本菌に対する防御にはインターフェロン(IFN)- γ が必

須である。NK1.1+細胞は感染により迅速かつ大量にIFN- γ を産生することから、リステリアに対する防御に必須の細胞であると考えられていた。しかし、その後NK1.1+細胞を消失させると、リステリア感染に対する抵抗性が逆に増大するという報告がなされたことから、NK1.1+細胞の防御的役割について疑問視されるようになった。当時、NK1.1+細胞はNK細胞と考えられていたが、一部のT細胞(NKT細胞)も本分子を発現していることから、NK1.1+細胞の消失によるリステリア感染抵抗性の増大がNKT細胞の消失に起因する可能性も考えられる(実際、NKT細胞はリステリア感染において増悪的に働くと考えられているインターロイキン(IL)-4を感染直後より産生する)。また、NKT細胞の中にはNK1.1を発現しない細胞も存在すること、並びに本細胞がリステリア感染後に増加することから、抗NK1.1抗体の投与による細胞消失実験だけでは、NK細胞の役割を明確にすることはできない。NK細胞の表面には高頻度にアシアロGM1(ASGM1)が発現されている(NKT細胞上には発現されていない)ことから、抗ASGM1抗体もNK細胞を消失させるツールとして用いられてきたが、これまでに報告された投与量では、リステリアの標的臓器である肝臓に存在するNK細胞は殆ど消失しないことから、NK細胞がリステリア感染に対して防御的に働いていると結論付けることはできない。

このように、NK細胞が発見されてから多くの歳月を経ているにもかかわらず、抗体の性状並びに生体内に存在する細胞の特徴を十分に把握しきれていなかったことから、リステリア感染に対するNK細胞の役割が、これまでに示された結論と大きく異なる可能性がある。そのため、リステリア感染におけるNK細胞の真の役割を検討するに至った。

申請者等はこれまでに、invariant (i)NKT細胞がリステリア感染に対して増悪的に働くことを明らかにしたが、リステリア感染に対するNK細胞の役割については未だ不明のままである。そのため、リステリア感染におけるNK細胞の真の役割を明らかにするべく、鋭意検討を行った。その結果、NK細胞もリステリア感染に対して増悪的に働くと共に、感染による炎症を助長する可能性のあることを見出した(注：本実験では、高濃度の抗ASGM1抗体を投与した：高濃度の抗ASGM1抗体を投与すると肝臓のNK細胞も消失する)。更に、NK細胞を活性化するPolyI:Cを投与すると、リステリア感染に対する抵抗性が著しく増大すること、並びにそ

れに付随してiNKTも活性化されることを見出した。

2. 研究の目的

細胞内寄生細菌感染症におけるNK細胞の真の役割を、マウスリステリア感染症をモデルに明らかにすると共に、NK細胞を活性化する2本鎖RNA(Polyinosinic-polycytidylic acid: PolyI:C)を投与することにより認められるリステリア感染抵抗性の増大にどのような機構が存在するのかを細胞・分子・タンパクレベルで明らかにし、細胞内寄生細菌感染症に対する新たな予防法・治療法への応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

NK細胞のリステリア感染症における真の役割を明らかにするため、各種遺伝子欠損マウスおよび/または各種抗体を用いてNK細胞を消失させたマウスにリステリアを感染し、感染抵抗性を比較検討すると共に、その機構を細胞・分子・タンパクレベルで検討した。また、PolyI:Cを投与することにより認められるリステリア感染抵抗性増強機構を、各種遺伝子欠損マウスおよび/または各種抗体を用いてNK細胞を消失させたマウスを用いて細胞・分子・タンパクレベルで検討した。

(1) マウスリステリア感染症におけるNK細胞の役割を明らかにするべく、(1) iNKT細胞欠損マウス、NK細胞・iNKT細胞欠損マウス、抗体投与によりNK細胞・iNKT細胞両細胞を消失させたマウス並びにコントロール(C57BL/6)マウスに *Listeria monocytogenes* (EGD株)を感染し、感染抵抗性(臓器内菌数)、標的臓器の肉眼的・病理学的変化、標的臓器に存在・集積する各種細胞の動態、血中のサイトカイン量、並びに標的臓器である肝臓内のサイトカイン産生細胞数等を測定した。

(2) PolyI:Cにより認められるリステリア感染抵抗性増強機構を明らかにするべく、PolyI:C投与後の標的臓器における各種細胞の動態を解析すると共に、*L. monocytogenes* (EGD株)を感染し、感染抵抗性(臓器内菌数)、標的臓器の肉眼的変化、標的臓器に存在・集積する各種細胞の動態、血中のサイトカイン量等を測定した。また、PolyI:Cによるリステリア感染抵抗性の増大に関与する細胞を、NK細胞および/またはiNKT細胞を欠損あるいは消失させたマウスのリステリアに対する感染抵抗性を比較した。

(3) PolyI:C投与後、投与局所に集積するM ϕ の貪食・殺菌能並びにその増強機構を明らかにした。

4. 研究成果

(1) iNKT 細胞欠損マウス、NK 細胞・iNKT 両細胞欠損マウス、抗体投与により NK 細胞・iNKT 両細胞を消失させたマウス並びにコントロール (C57BL/6) マウスに *L. monocytogenes* (EGD 株) を感染し、感染抵抗性(臓器内菌数)、標的臓器の肉眼的・病理学的変化、血中のサイトカイン量、標的臓器に存在・集積する各種細胞の動態等を測定したところ、NK 細胞を欠損したあるいは/または消失させたマウスの臓器内菌数の著しい減少が認められ、脾臓と肝臓の炎症が完全に抑制された。リステリア感染に対する防御には、I 型の免疫応答が重要である。そのため、I 型の免疫応答の誘導に最も重要である IFN- γ 並びに IFN- γ 産生を誘導する IL-12 の血中並びに標的臓器である肝臓内におけるこれらサイトカイン産生細胞数を測定したところ、確かに NK 細胞の存在しないマウスのほうが、これらサイトカイン産生量並びに産生細胞数の少ないことが明らかとなった。更に、リステリア感染後、標的臓器である肝臓内に浸潤あるいは増殖する細胞を解析したところ、樹状細胞と思われるユニークな細胞の集積が認められ、本細胞を消失すると、感染抵抗性の減弱が認められた。このことは、NK 細胞がリステリア感染に対して増悪的に働くことを示唆していると共に、NK 細胞から産生される IFN- γ はリステリア感染に対して無効であることを示唆している。更に、NK 細胞非存在下では、リステリア感染後、非常にユニークな細胞が出現し、本細胞が増悪的に作用していることが明らかとなった。

(2) NK 細胞自体はリステリア感染に対して増悪的に働くにも関わらず、PolyI:C を投与すると、逆に感染抵抗性の増加し、炎症反応の著しく抑制されることが明らかとなった。また、NK 細胞を欠損あるいは/または消失させたマウスでは、PolyI:C によるリステリア感染に対する防御能の亢進が全く認められなかったことから、本現象には NK 細胞の関与していることが明らかとなった。

(3) PolyI:C を投与すると、M ϕ の増加することが明らかとなった。そのため、M ϕ のリステリア貪食能並びに殺菌能を解析した。その結果、貪食能は若干低下するものの、殺菌能は有意に増加することが明らかとなった。

(4) PolyI:C は TLR-3、RIG-I あるいは MDA5 によって認識されることが知られている。PolyI:C によるリステリア感染抵抗性の増大に何れの分子が関与しているのかを明らかにするため、最も可能性の高い TLR3 遺伝子欠損マウスのブリーディングペアを購入した。本マウスは C57BL/6 バックグラウンド

ではなかったことから、C57BL/6 マウスにバッククロスを行っていたが、繁殖が非常に悪かったこともあり、バッククロスが予想以上に手間取り、その結果、本マウスを用いて感染実験を行うことは出来なかった。現在、バッククロスを継続しており、C57BL/6 マウスのバックグラウンドに近づいてきたことから、近々本実験を行う予定である。

(5) 性状の異なる M ϕ (レジデント M ϕ ・炎症性 M ϕ)、並びにファゴソームからのエスケープ能力を有する EGD 株とその能力を欠損する *Ahly* 株を用いて、PolyI:C による M ϕ の殺菌能の亢進がファゴソーム内でのイベントか、細胞質内でのイベントかを明らかにするべく、鋭意検討を行ったが、研究途中で機器が故障してしまい、解析をすることが出来なくなった。

(6) 本研究とは直接関係がないが、研究を行っている中で、PolyI:C の投与により M ϕ の感染局所への浸潤が認められていることだけでなく、ファゴソームからエスケープできると考えられている EGD 株であっても、レジデント M ϕ のファゴソームからはエスケープできない(炎症性 M ϕ 内ではエスケープできる)ことを見出した。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江本 善子 (EMOTO YOSHIKO)
群馬大学・大学院保健学研究科・研究員
研究者番号：30542344

(2) 研究分担者

江本 正志 (EMOTO MASASHI)
群馬大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：70232981

(3) 連携研究者

()

研究者番号：