

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 5月30日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890087

研究課題名（和文） 結核菌感染における免疫抑制受容体 PD-1 の機能解析

研究課題名（英文） Role of PD-1 in *Mycobacterium tuberculosis* infection

研究代表者

酒井 俊祐 (SAKAI SHUNSUKE)

京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50609063

研究成果の概要（和文）：結核菌の感染に対する防御免疫においては、CD4陽性T細胞が細胞性免疫の司令塔として必須な役割を果たしている。研究代表者は本研究課題において、免疫抑制受容体PD-1を欠損したマウスが結核菌感染後にIFN- γ 産生性CD4陽性T細胞による著しい肺組織傷害によって死亡することを明らかにした。IFN- γ 産生性CD4陽性T細胞は抗結核免疫を司る免疫細胞としてよく知られてきたが、T細胞応答制御分子のPD-1を欠損した場合には、宿主に本来有益なCD4陽性T細胞も感染病態の増悪を引き起こしうるという新規の知見が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：CD4 T cell-mediated immune response is essential for the control of *M. tuberculosis* (Mtb) infection. Recent studies of the programmed cell death 1 (PD-1) receptor have provided novel insights into the inhibition of T-cell activation in infectious diseases. To clarify the role of PD-1 in Mtb infection, I investigated the course of Mtb infection in PD-1 KO mice. After infection, PD-1 KO mice die rapidly owing to severe lung damage. PD-1 KO mice developed higher numbers of IFN- γ -producing CD4 T cells compared to control mice. By using adoptive transfer and antibody blockade experiments, PD-1 deficiency in CD4 T cells and IFN- γ production by CD4 T cells are sufficient to cause the increased susceptibility to infection. These data show that PD-1 is essential in limiting CD4 T cell-mediated pathology in Mtb infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1200,000	360,000	1560,000
2012年度	1200,000	360,000	1560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2400,000	720,000	3120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：細菌学・感染症・免疫学

1. 研究開始当初の背景

結核は、グラム陽性桿菌の結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の感染によって引き起こされる慢性感染症である。世界人口の約 1/3 が結核菌に感染し、毎年 170 万人の命を奪う結核は、AIDS・マラリアと共に世界三大感染症の一つに位置づけられている。従って、結核の病態解明を含むこれらの感染症への対策は、国際社会の重要な課題である。

細胞内寄生細菌である結核菌に対する感染防御では、マクロファージを活性化し、その殺菌能を高めるサイトカインであるインターフェロン-ガンマ (IFN- γ) を産生する CD4 陽性 T 細胞が主要な役割を果たしている。この細胞性免疫応答は、結核菌の排除・封じ込めに必須な「生体防御機構」である一方、免疫応答が過剰に引き起こされた場合には、結核病巣にみられる乾酪性壊死のような「組織傷害の原因」となる。従って、抗結核免疫では、“宿主に対して防御的にはたらく応答と組織傷害をもたらす応答のバランスの調節”が重要と考えられる。しかしながら、この免疫応答の正負のバランスが、どのような機構によって調節されているかについてはほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、T 細胞応答を調節する免疫抑制受容体 PD-1 に着目し、結核菌感染における免疫応答のバランス調節機構についての理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

研究代表者は、結核菌を肺感染させる結核モデルを用いた予備的検討から、PD-1欠損マウスが著しい肺組織傷害を伴って早期に死亡することを既に明らかにしている (図 1)。こ

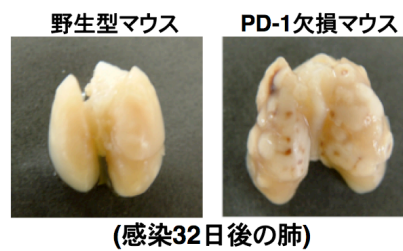
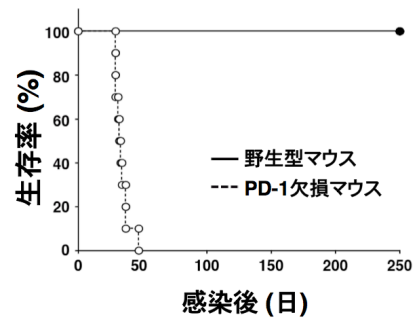


図1. PD-1欠損による結核病態の悪化

の感染感受性の原因を解明するため、以下の点に着目して実験を行った。

- (1) 感染マウス肺における炎症応答の動態
 - ①肺浸潤細胞種の解析
 - ②肺の炎症性サイトカインとケモカイン産生応答の解析
- (2) 致命的な感染病態の原因となる細胞および細胞由来因子の同定
 - ①PD-1欠損の影響が予想される細胞 (T細胞とマクロファージ) の機能解析
 - ②PD-1欠損細胞と細胞由来因子の感染病態への関与の検証

以上の PD-1 欠損マウスの「免疫応答の動態」と「感染病態の原因細胞・因子」を解析し、結核菌感染における PD-1 の機能を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

- (1) 感染マウス肺における炎症応答の動態
 - ①PD-1 欠損マウスの肺では、結核菌感染後に肺の細胞数が野生型マウスと比較して 2 倍程度増加し、その大半 (~80%) はマク

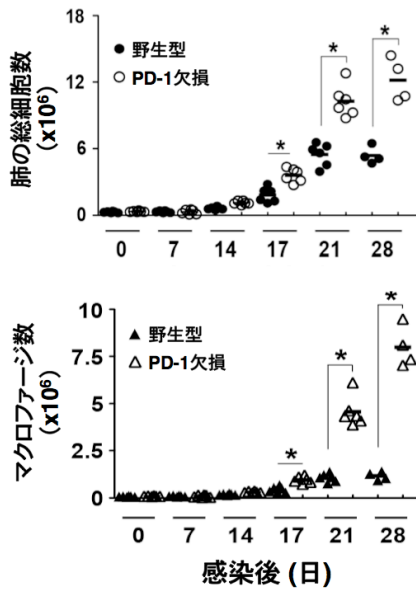


図2. 感染肺の浸潤細胞数

ロファージから構成されていた (図 2)。
 ②PD-1 欠損マウスの肺では、TNF- α 、IL-6、IFN- γ や IL-17A 等の炎症性サイトカインの産生が著しく増加していた。これらのサイトカインの主要な産生細胞はマクロファージと CD4 陽性 T 細胞であることから、これらの細胞が PD-1 欠損マウスの病態形成に関与している可能性が示唆された。

(2) 致死的な感染病態の原因となる細胞および細胞由来因子の同定

①マクロファージにおける PD-1 欠損の影響を明らかにするため、野生型および PD-1 欠損マウス由来の結核菌感染マクロファージの機能解析を行なったが、細胞内殺菌能や TNF- α 、IL-6 等のサイトカイン産生能に有意な差は認められなかった。一方、CD4 陽性 T 細胞の機能解析から、PD-1 欠損マウスの肺では抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞数が顕著に増加していることが分かった。また、この抗原特異的 T 細胞は抗原刺激に対して IL-17A を産生せず、IFN- γ を多量に産生することが分かった (図 3)。一方、CD8 陽性

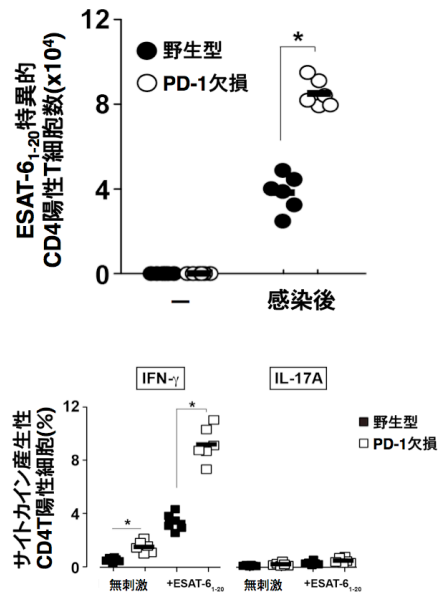


図3. PD-1欠損による抗原特異的CD4陽性T細胞の増加

T 細胞についても同様の解析を行なったが、PD-1 欠損および野生型マウス由来の CD8 陽性 T 細胞の機能に優位な差は認められなかった。以上の結果より、結核菌を感染させた PD-1 欠損マウスの病態形成には、CD4 陽性 T 細胞の過剰な応答 (抗原特異的 T 細胞数と IFN- γ 産生能の増加) が関与している可能性が示唆された。

②T細胞欠損 (RAG2欠損) マウスをレシピエントに用いて、野生型あるいはPD-1欠損マウスから単離したCD4陽性およびCD8陽性T細胞を移入し、結核菌肺感染後のマウスの生存日数の観察を行なった。野生型T細胞を移入したマウスは、感染後120日以上生存し、野生型マウスと同様の感染抵抗性を示した。一方、PD-1欠損マウス由来のCD4陽性T細胞を移入したマウスは、PD-1欠損マウスと同様に早期に死亡することが分かった (図4)。さらに、PD-1欠損マウス肺におけるIFN- γ の産生およびIFN- γ 産生性CD4陽性T細胞の著明な増加という所見に基づき、PD-1欠損CD4陽性T細胞由来の病態増悪因子としてのIFN- γ の関与を検討した。

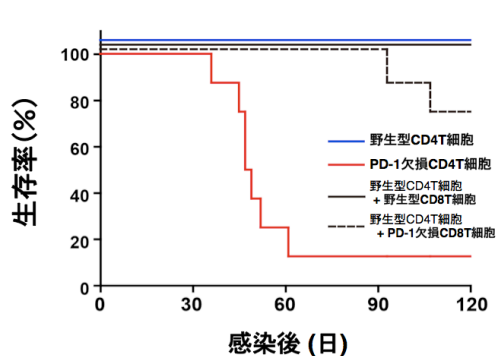


図4. PD-1欠損T細胞移入後の生存率

結核菌を感染させたPD-1欠損マウスにIFN- γ の中和抗体を投与し生存日数を観察したところ、PD-1欠損マウスの生存日数がIFN- γ の中和によって有意に延長することが分かった。また、生存日数の延長は肺の組織傷害の減少と相関し、マクロファージなどの炎症細胞の肺への浸潤も顕著に減少することが分かった (図5)。

以上の結果より、結核菌感染におけるPD-1欠損マウスの病態増悪は、IFN- γ 産生性CD4陽性T細胞により惹起されることが明らかとなった。これまでIFN- γ 産生性CD4陽性T細胞は、結核感染に対する防御免疫に必須の免疫細胞として考えられてきた。しかし、宿主に本来有益なCD4陽性T細胞も過剰な応答を引き起こした場合には感染病態の増悪を引き起こしうることが明らかとなった。そして本研究は、PD-1が抗結核免疫において感染防御応答と組織傷害をもたらす応答の正負バランスを調節する必須の分子であること示した非常に重要な研究であると考えられる。一方、研究代表者は以前の研究において、結核菌と近縁種の弱毒ウシ型結核菌 (BCG) の感染では、PD-1は抗原特異的なT細胞応答を低下させ、むしろ菌の持続感染に寄与していることを明らかにしている。従って、本研究は抗酸菌 (結核菌とBCG) の感染において、宿主の1つの分子が防御免疫に正と負の両面の役割を果たすと

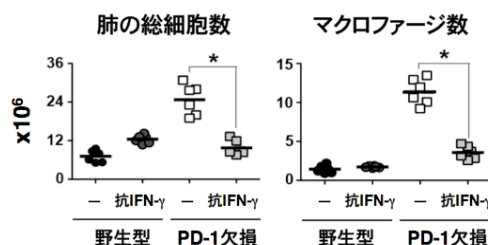
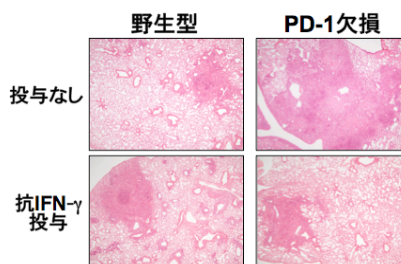
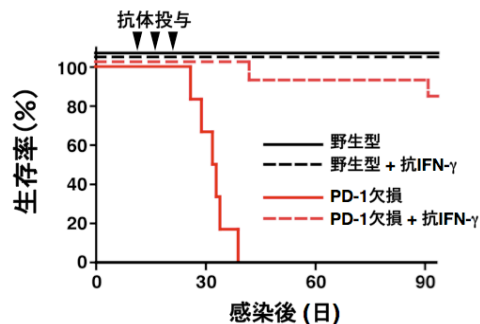


図5. 抗IFN- γ 抗体投与と感染病態

いう非常に興味深い知見をもたらす研究である。結核は感染から発病、潜伏感染、再燃に至るまでの過程で、菌の病原性と宿主免疫応答が密接に関係した疾患である。従って、高酸感染時の宿主免疫防御と持続感の相互関係のさらなる研究成果の蓄積が、結核感染病態の解明だけでなく、新たな予防ワクチンや結核治療法の開発の基礎となり、結核の撲滅に結びつくものと期待される。

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4件)

- ① Yokobori, N., Lopez, B., Geffner, L., Sabio y Garcia, C., Schierloh, P., Barrera, L., Barrera, S., Sakai, S., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Ritacco, V. and del Carmen Sasiain, M. Two

genetically -related multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains induce divergent outcomes of infection in two human macrophage models. ***Infection, Genetics and Evolution*** (査読有) 2013, 16: 151-156
DOI: 10.1016/j.meegid.2013.01.007

② Hernandez-Cuellar, E., Tsuchiya, K., Hara, H., Fang, R., Sakai, S., Kawamura, I., Akira, S. and Mitsuyama, M. Cutting Edge: Nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. ***Journal of Immunology*** (査読有) 2012, 189: 5113-5117
DOI: 10.4049/jimmunol.1202479

③ Fang, R., Tsuchiya, K., Kawamura, I., Shen, Y., Hara, H., Sakai, S., Yamamoto, T., Fernandes Alnemri, T., Yang, R., Hernandez-Cuellar, E., Dewamitta, S. R., Xu, Y., Qu, H., Alnemri, E. S. and Mitsuyama, M. Critical role of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. ***Journal of Immunology*** (査読有) 2011, 187, 4890-4899
DOI: 10.4049/jimmunol.1100381

④ Daim, S., Kawamura, I., Tsuchiya, K., Hara, H., Kurenuma, T., Shen, Y., Dewamitta, S. R., Sakai, S., Qu, H., Nomura, T. and Mitsuyama, M. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein in *M. smegmatis* induces low TNF- α and IL-6 production in murine macrophages. ***Journal of Medical Microbiology*** (査読有) 2011, 60, 582-591
DOI: 10.1099/jmm.0.026047-0

[学会発表] (計3件)

① Sakai, S., Kawamura, I., Tsuchiya, K. and Mitsuyama, M. PD-1 deficiency causes CD4 T cell-mediated exacerbation of *Mycobacterium*

tuberculosis infection. 第85回日本細菌学会総会, 3/28/2012 (長崎ブリックホール)

② 酒井 俊祐, 河村 伊久雄, 土屋 晃介, 光山 正雄. 結核菌感染において免疫抑制受容体 PD-1 は、Th1 型免疫応答を制御し宿主に対して防御的にはたらく. 第64回日本細菌学会関西支部総会, 11/19/2011 (大阪府立大学)

③ Sakai, S., Kawamura, I., Tsuchiya, K., Okazaki, T. and Mitsuyama, M. PD-1 regulates the balance between protective and pathologic immune responses during murine tuberculosis. The 13th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 9/8/2011 (札幌コンベンションセンター)

[図書] (計1件)

酒井 俊祐, 光山 正雄. 基礎各論 結核菌感染の病態. 「臨床と微生物」2012, Vol.39/No.2

[その他]

ホームページ等

京都大学大学院 医学研究科 微生物感染症学
http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1204/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 俊祐 (SAKAI SHUNSUKE)

京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50609063

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし