

平成 23 年 4 月 28 日現在

機関番号：17301  
 研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2008年度 ～ 2010年度  
 課題番号：20590424  
 研究課題名 (和文) リーシュマニア感染防御免疫の誘導に関わるIL-12産生調節機構の解析  
 研究課題名 (英文) Regulation of IL12 production in the induction of protective immune response against Leishmania infection  
 研究代表者  
 本間季里 (HONMA KIRI)  
 長崎大学・大学院・医歯薬学総合研究科・講師  
 研究者番号：70307940

研究成果の概要 (和文)：リーシュマニア感染初期にはIRF4 KOでは抵抗性マウスより防御免疫が亢進している (足趾の肥厚が減弱) が、Rag2 KO/IRF4 DKOに正常CD4 T細胞を移入したマウス実験系、マクロファージあるいは樹状細胞のIRF4のみが欠損しているconditional IRF4 KOを用いた解析から、その原因はCD4 T細胞ではなく樹状細胞に発現しているIRF4により制御されていることが判明した。また、脾臓の樹状細胞と異なり、IRF4 KOでも膝下リンパ節ではCD4陽性DCが存在しており、脾臓とリンパ節ではDCの分化におけるIRF4依存性が異なることも明らかとなった。感染後、IRF4 KOでは野生型に比べ皮膚DCのひとつであるCD103+DCの所属リンパ節への移行が遅延することも判明した。

研究成果の概要 (英文)：Reduction of footpad swelling in IRF4 KO after Leishmania infection compared to resistant mice revealed to be due to defect of IRF4 in dendritic cells not macrophages by the experiments using conditional KO. Unlike splenic DC, CD4+ DC subset was observed in lymph node in IRF4 KO. It suggested that DC differentiation in LN was different from that in spleen. Recruitment of CD103+ DC, which was a kind of skin DC, in IRF4 KO was slower than WT within 48 hrs after infection.

交付決定額

(金額単位：円)

		間接経費	合計
平成20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：免疫学・寄生虫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学 (含衛生動物学)

キーワード：リーシュマニア、IRF4、マクロファージ、樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

リーシュマニア感染防御免疫の主体は抗原特異的Th1の分化であり、これは感染マクロファージ、あるいは病原体によって活性化し

た樹状細胞が産生するIL12によって誘導される。一方、我々は転写因子の一つであるinterferon regulatory factor-4 (IRF4)が免疫担当細胞にのみ発現していることに着目

し、IRF4遺伝子欠損マウス (IRF4 KO) を用いて、感染免疫における解析を行ってきた。リーシュマニア感染実験においては以下の結果が得られている。

(1) IRF4 KOでは感染初期には抵抗性マウスであるB6よりもむしろ足趾の肥厚は減弱していた。

(2) IRF4 KOのマクロファージはリーシュマニア感染後のTNF $\alpha$ 産生は野生型より高い。

(3) IRF4 KOのマクロファージはリーシュマニア感染後のIL12産生は野生型より低い。

(4) 感染後期になると、IRF4 KOでは所属リンパ節の細胞数が激減し、足趾の肥厚も増悪した。

しかしながらこれまでの解析では conventionalな手法で作成したIRF4 KOを用いているため、特に*in vivo*の解析においてはT細胞を含むすべてのIRF4が欠損しているマウスを使用せざるを得ず、結果がマクロファージ/樹状細胞の影響なのか、T細胞の影響なのか判断が難しかった。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究課題ではRag2 KOあるいは conditional IRF4 KOを主として用いることによりリーシュマニア感染防御免疫の解析を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Rag2 KOにIRF4 KOを掛け合わせ、Rag2/IRF4ダブルノックアウトマウス (DKO) を作成した。このマウスはT細胞、B細胞を欠損しており、さらにマクロファージ/樹状細胞のIRF4が欠損したマウスである。DKOのコントロールとしてのRag2 KOはT細胞、B細胞を欠損しており、マクロファージ/樹状細胞のIRF4は正常に発現している。これらのマウスに正常CD4 T細胞を移入し、2週間後にリーシュマニア感染を行った後、足趾の肥厚をモニターした。

(2) 感染5週後に所属リンパ節である膝下リンパ節から細胞を採取し、細胞数をカウントするとともに粗抗原で三日間培養した。培養上清中のIFN- $\gamma$ はELISA法にて測定した。

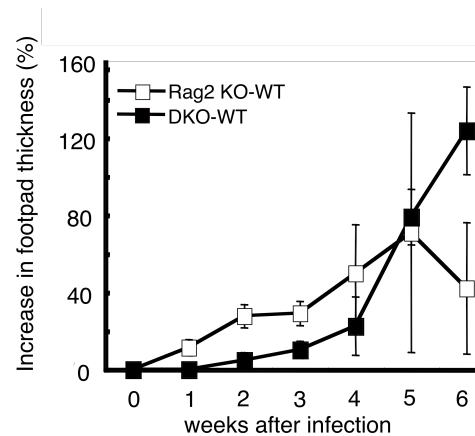
(3) CD11cプロモーターの下流および lysosomeプロモーター下流にCre recombinaseをつないだCD11c-creマウス、LysM-creとIRF4<sup>f1/f1</sup>マウスを入手し、掛け合わせを行い、CD11c陽性細胞 (樹状細胞) のみIRF4欠損のマウスとマクロファージのIRF4が欠損したマウスを作製した。これらのマウスにリーシュマニアを感染させ、経時的に足趾の肥厚をモニターした。

(4) これら conditional IRF4 KOにおける所属リンパ節のサブセットをコントロールマウ

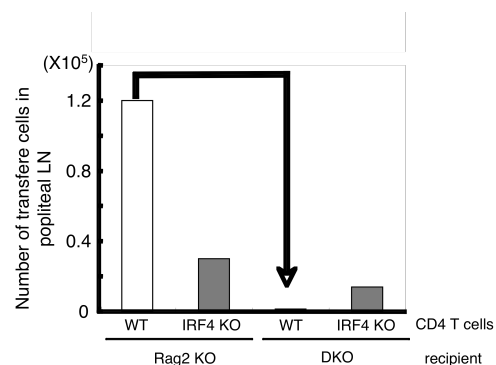
スと比較検討した。未感染、感染24時間後、48時間後に膝下リンパ節内の樹状細胞を表面マーカー (CD11c、CD11b、CD103、Langerin) で染色し、フローサイトメーターで解析した。

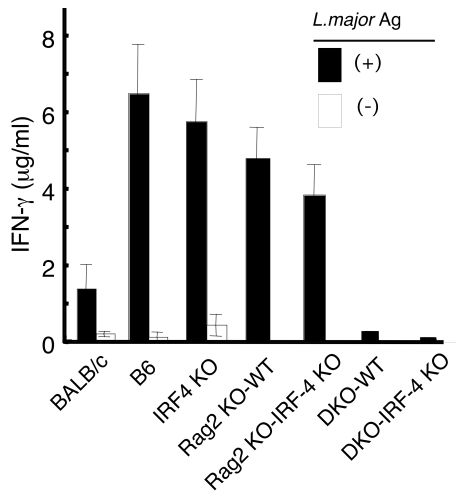
## 4. 研究成果

(1) Rag2 KOおよびDKOにそれぞれ正常CD4 T細胞を移入した後、リーシュマニア感染を行った。足趾の肥厚をモニターしたところ、感染初期にはRag2 KOに正常CD4 T細胞を移入した群に比べて、DKO群では足趾の肥厚が減弱していた。これは抵抗性マウスB6とIRF4 KOで認められた実験結果を再現していた。このことから、感染初期におけるIRF4 KOの足趾の肥厚の減弱はCD4 T細胞によるものではなく、マクロファージ/樹状細胞におけるIRF4欠損に起因していることが示唆された。

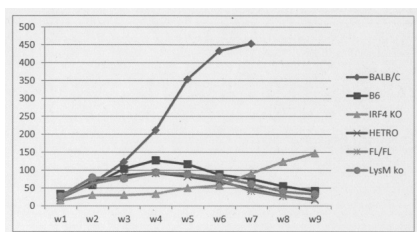
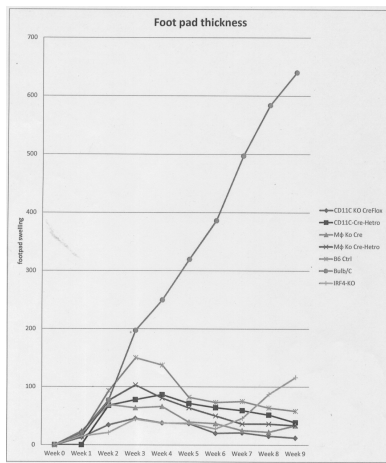


(2) 一方、感染後期では、DKO群でも足趾の肥厚は増悪した。所属リンパ節である膝下リンパ節の総細胞数を測定した。DKOに正常CD4 T細胞を移入した群ではRag2 KOへの移入群に比べて著明な細胞数の低下を認めた。また、これらリンパ節細胞をリーシュマニア粗抗原で刺激したところ、抗原特異的Th1細胞も認められなかった。感染後期における感染の増悪は抗原特異的Th1細胞が消失するためと考えられた。





(3) Rag2 KO, DKOへの移入実験ではマクロファージと樹状細胞のどちらに原因があるか明らかにはできない。そこで、LysM-IRF4 KO (マクロファージのみIRF4欠損)、CD11c-IRF4 KO (樹状細胞でのみIRF4欠損)の conditional KOにリーシュマニアを感染させ、足趾の肥厚をモニターした。CD11c-IRF4 KOでは抵抗性マウスB6に比べ感



染初期の足趾の肥厚は減弱しており、その程度はconventional IRF4 KOと同程度だった。一方、LysM-IRF4 KOでは足趾の肥厚はB6と変わらなかった。このことから、リーシュマニア感染初期のIRF4 KOにおける足趾の肥厚の減弱は、樹状細胞に発現しているIRF4によ

て制御されていることが明らかとなった。

(4) リーシュマニア感染後の所属リンパ節のDCサブセットの変化を解析した。脾臓DCでは、IRF4 KOにおいてCD4+ DCが欠損していることを既に我々は報告しているが、驚いたことにリンパ節DCではIRF4 KOでもWTと同程度のCD4+ DCが存在していた。このことは、脾臓とリンパ節ではDCの分化におけるIRF4依存性が異なることを示唆しており、今後解析を進めたいと思う。また、リーシュマニア感染後24時間、48時間で所属リンパ節に移行する皮膚DCサブセットの解析を行ったところ、WTでは24時間で既にCD103+ DCが所属リンパ節に移行しているのに対して、IRF4 KOでは48時間後に検出された。このことはIRF4 KOでは感染後のCD103+ DCの所属リンパ節への移行が著しく遅延していることを示唆している。移行を促すケモカインの産生量の違い、ケモカイン受容体の発現の違い、などいくつかの可能性は考えられるが解析はこれからである。

## 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 6件)

1. Kimura D., Miyakoda M., Honma K., Shibata Y., Yuda M., Chinzei Y., Yui K. Production of IFN- $\gamma$  by CD4+ T cells in response to malaria antigens is IL-2-dependent. *Int. Immunol.* In press
2. Satoh T., Takeuchi O., Vandenbon A., Yasuda K., Tanaka Y., Kumagai Y., Miyake T., Matsushita K., Okazaki T., Saitoh T., Honma K., Matsuyama T., Yui K., Tsujimura T., Standley D., Nakanishi K., Nakai K., Akira S. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat. Immunol.* 11: 936-944, 2010.
3. T. Taguchi, Y. Inamura, K. Honma, D. Kimura, M. Miyakoda, T. Tagawa, N. Yamasaki, T. Tsuchiya, T. Nagayasu, K. Yui. Characterization of waves of leukocyte recruitment to the lung allograft and the effect of CTLA4-Ig. *Acta Medica Nagasakiensia.* In press.
4. 本間季里, 由井克之: Th1分化に関わる転写因子、臨床免疫・アレルギー科、51: 456-461, 2009
5. Honma K., Kimura D., Tominaga T., Miyakoda M., Matsuyama T., Yui K. Interferon regulatory

factor-4 differentially regulates the production of Th2 cytokines in naïve vs. effector/memory CD4<sup>+</sup> T cells. Proc Natl Acad Sci USA: 105: 15890-15895, 2008.

6. M. Miyakoda, D. Kimura, M. Yuda, Y. Chinzei, Y. Shibata, K. Honma, K. Yui, Malaria-specific and non-specific activation of CD8<sup>+</sup> T-cells during infection with Plasmodium berghei. J. Immunol., 181: 1420-1428, 2008.

〔学会発表〕 (計 24件)

(1)Kiri Honma: Identification of the IRF-4 domain that is critical for Th2 differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. 第14回国際免疫学会、2010年8月23日、神戸

(2)本間季里: Th2非依存的なN. brasiliensis 感染排除機構の解析、第79回日本寄生虫学会、2010年5月20日、旭川

(3)Masoud akibari: The role of IRF-4 expressed in dendritic cells in the immune responses against Leishmania major. 第79回日本寄生虫学会、2010年5月20日、旭川

(4)Kiri Honma: Th2 independent N. brasiliensis expulsion. the 10th Nagasaki-Bingapore medical symposium, 2010年4月15日、シンガポール

(5)本間季里: IRF-4欠損CD4<sup>+</sup> T細胞においては、GATA-3発現 だけではTh2分化に不十分である。第39回日本免疫学会、2009年12月3日、大阪

(6)本間季里: Leishmania major感染初期の防御免疫におけるマクロファージ/樹状細胞に発現するIRF-4の役割、第78回日本寄生虫学会、2009年3月28日、東京

(7)本間季里: Differential roles of interferon regulatory factor-4 (IRF-4) in the production of Th2 cytokines in naïve vs. effector/memory CD4 T cells, 第38回日本免疫学会、2008年12月、京都

(8)本間季里: Nippostrongylus brasiliensis感染排除における転写因子IRF-4の重要性、第77回日本寄生虫学会、2008年4月、長崎

〔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

本間季里 (HONMA KIRI)

長崎大学・大学院・医歯薬学総合研究科・  
講師  
研究者番号: 70307940

(2) 研究分担者

由井克之 (YUI KATSUYUKI)

長崎大学・大学院・医歯薬学総合研究科・  
教授  
研究者番号: 90274638

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: