

機関番号：32612

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）

Role of dendritic cells in bridging innate and adaptive immune responses during bacterial infection

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

研究成果の概要（和文）：

消化管の細菌感染症に対する免疫反応がどのように誘導されるかを検討した。胃炎を誘導するピロリ菌に特異的な免疫反応が、胃ではなく、小腸のパイエル板という組織で、樹状細胞という白血球に捉えられることで開始されることを明らかにした。また、消化管から体内に侵入して食中毒を起こすリステリア菌が、小腸のパイエル板から体内に侵入すること、その際にリステリア菌が持つインターナリン B と名付けられた侵入因子が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We examined in this study how immune responses are induced against bacterial infection in the gastrointestinal tract. Immune response against *Helicobacter pylori* results in gastritis. We showed that *H. pylori* is captured by dendritic cells in Peyer's patches in the intestine but not in the stomach. *Listeria monocytogenes* invades our body through intestine and causes food poisoning. We showed that the major site of *L. monocytogenes* invasion is Peyer's patches with the aid of a bacterial protein named internalin B.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	16,800,000	0	16,800,000
2007年度	16,800,000	0	16,800,000
2008年度	16,800,000	0	16,800,000
2009年度	29,758,500	0	29,758,500
2010年度	16,800,000	0	16,800,000
総計	96,958,500	0	96,958,500

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：消化管関連リンパ組織、上皮細胞、樹状細胞、リステリア、ヘリコバクター

1. 研究開始当初の背景

細菌が充満しているといえる腸管免疫系においては、正常細菌叢が TLR リガンドを持ちながらも通常は腸管免疫系では炎症は最小限に抑制されている。しかし、病原細菌の侵入時にはそれを検知して炎症を誘起することが重要となる。それまでの研究から、上皮細胞や樹状細胞が様々なサイトカインを生産することによって感染を検知する可能

性が示唆されてきた。リステリアをはじめとする多くの細胞内寄生細菌の感染防御には初期に誘導される γ インターフェロン ($IFN\gamma$) などの炎症性サイトカインが重要である。従来は細菌感染初期 $IFN\gamma$ の生産細胞はナチュラルキラー (NK) 細胞であると理解されてきたが、研究代表者の研究も含めた最近の研究からは樹状細胞やマクロファージもまた自らが生産する IL-12 に反応してオートクリン

作用で IFN γ を生産することで自然免疫系に貢献することが明らかになりつつあった。細菌の感染ルートが一様ではないことを考えると、様々な細菌感染においてどのような細胞が感染を検知し、初期の IFN γ をはじめとする炎症性サイトカインによって増殖を抑えつつ、最終的に獲得免疫系の起動につなげ、さらに免疫記憶に繋げるかを明らかにすることは重要である。また、肥満細胞が生体防御においてエフェクター細胞として機能するだけでなく、自然免疫系における感染検知細胞としても機能することが明らかになりつつあった。

2. 研究の目的

本研究では、正常細菌叢と病原細菌とをいかにして峻別して免疫系を刺激するか、特に樹状細胞がどのように炎症の惹起と抗原の補足・提示に機能するか、その分子機構の全貌を、主としてリステリアとヘリコバクターを取り上げて明らかにすることを目指した。さらに抗原の補足にはパイエル板などの小器官が重要であることが知られるが、明確なリンパ組織を持たない胃においてどのようにして抗原特異的な免疫反応が誘起されるかを明らかにすることもヘリコバクターの保菌者の多い我国の感染症研究にとっても重要であり、これを明らかにすることを目指した。さらに、樹状細胞以外に肥満細胞にも注目して自然免疫系と獲得免疫系の橋渡し機能を解明する。同時にパイエル板や孤立リンパ小節などの小器官の機能を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

感染体として、リステリア (*Listeria monocytogenes*) とヘリコバクター (*Helicobacter pylori*) を主に取り上げた。本来リステリアは経口的に感染した後、上皮細胞から侵入して感染が成立するといわれているが、マウスでは腸管の受容体である E-カドヘリンのアミノ酸配列の違いにより感染しないとされていた。そこで、ヒトの E-カドヘリンを腸管上皮に発現させたトランスジェニックマウスを用いる計画を立てた。

「細菌の腸管感染を検知する細胞は何か」という問に答えるために、上記のモデルマウスを用い、リステリアの侵入経路を明らかにする。さらに感染を検知する細胞を同定し、獲得免疫と記憶の成立に果たすパイエル板や孤立リンパ小節の機能を明らかにすることを目指した。

胃には明確なリンパ組織は見られない。そこで、「ヘリコバクターの感染を検知し、抗原特異的な反応を誘導する細胞は何か」を検討することとした。予備実験からは、胃の上皮が炎症性サイトカインやケモカインを生産

することが、炎症の引き金であるという考えを否定し、抗原特異的な T 細胞の活性化が必要であるとする実験結果を得ていた。この結果をもとに、感染を検知し、かつ抗原特異的な免疫反応を誘起する細胞ならびに器官を、様々なモデルマウスを駆使して明らかにすることとした。胃の所属リンパ節において抗原特異的な反応が見られるにもかかわらず、胃にリンパ組織が見られないことから、腸管のパイエル板などの器官の関与を疑っている。胃においてもヘリコバクターの感染によって肥満細胞が筋層から上皮へ移動することが観察されており、肥満細胞の関与も検討した。

4. 研究成果

(1)ヘリコバクターピロリの感染検知

T 細胞も B 細胞も持たない Rag2 欠損マウスでは、ヘリコバクターは胃粘膜に感染・定着するものの、胃炎を引き起こすことができない。しかしヘリコバクターが感染した Rag2 欠損マウスに未感染マウス由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を移入することによって、T 細胞と好中球の浸潤を伴う強い炎症が誘導され、菌が排除された。したがって、炎症の誘起には T 細胞が必要である。では、T 細胞感作はどこで起こるのであろうか。様々なマウスを用いた検討から、パイエル板を欠損するマウスにおいては特異的な T 細胞の感作と胃炎が起こらないことが示され、ヘリコバクターは胃ではなく腸管のパイエル板で樹状細胞に捕捉されることが示された。

ヘリコバクターは貪食に抵抗することが知られる。しかし、嫌気性条件下ではラセン状から球状に形態を変化し、球状菌は容易に樹状細胞によって貪食された。小腸結紮モデルを用いて精査したところ、腸管内に接種したラセン状ヘリコバクターは時間経過とともに球状化し、ラセン状菌は上皮の管腔側に留まるのに対し、パイエル板から樹状細胞に取り込まれた菌体は球状化していることが示された。

以上のことから、ヘリコバクターピロリは、微好気性の胃においてはラセン状を保つが、腸管へ移行した場合には、酸素分圧の低下に伴ってラセン状から球状へ変化し、パイエル板経由で樹状細胞に取り込まれ、宿主免疫系を活性化すると結論された。活性化された CD4 陽性 T 細胞が胃上皮へ浸潤し、さらに抗原特異的にケモカインを生産することで好中球がさらに浸潤し、胃炎が発症すると考えられる。

一方、肥満細胞の関与を検討するために、肥満細胞を欠損するマウスを用いた検討を行った。フォスフォイノシチド 3 キナーゼの制御サブユニットである p85 α を欠損するマウスは消化管の肥満細胞が欠損すること

を以前報告した。このマウスにヘリコバクターを感染させたところ、野生型よりも重篤な胃炎が誘導され、肥満細胞が胃炎に対して抑制的に機能する可能性が考えられた。一方、p85 α 欠損するマウスにおいては樹状細胞からの IL-12 産生が亢進していることから全般に Th1 反応の亢進が観察されており、ヘリコバクター感染においても Th1 反応の亢進が見られ、重篤な胃炎の発症は Th1 反応の亢進が主たる原因である可能性も考えられた。さらに c-kit 変異マウスなどの他の肥満細胞欠損マウスを用いた検討が必要と思われる。

(2) リステリアの腸管侵入機構

上皮細胞への侵入を介したリステリアの腸管感染の成立には、リステリア菌のインターナリン A (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とが確認された。ヒトの E-カドヘリンを腸管上皮に発現させたトランスジェニックマウスを入手して経口感染を試みたが野生型マウスと大きく変わることはなく、報告されているような効率の良い感染は見られなかった。そのような中、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。しかし、この変異体はマウス細胞株への感染効率は野生型の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、リステリアの上皮内侵入には、InlA と E-カドヘリンの相互作用のみでは十分ではなく、別の未知の受容体の存在が示唆された。

一方、インターナリン B (InlB) を欠損するリステリアを構築したところ、腸管上皮細胞株への侵入能を評価した。その結果、InlB 欠損株は、マウスの腸管上皮細胞株への侵入能が野生型リステリアの 1/100 程度まで有意に低下した。さらに、マウスに野生株と InlB 欠損株を胃内投与し、その生存率を確認したところ、両リステリア株とも最終的な生存率は 60% 程度であるものの、InlB 欠損株を投与したマウスのリステリア症の発症と死亡時期が有意に遅れた。そこで、リステリアが上皮から侵入する際に InlB が関与している可能性が高いと考え、マウスの空腸上部と回腸下部を結紮し、そのループ内に菌を注入して、

腸管からの菌の侵入能を評価したところ、InlB 欠損株を投与したマウスでは、投与後 30 分での腸間膜リンパ節、脾臓、肝臓への菌の伝播が有意に減少した。また、野生株では大部分のリステリアが回腸のパイエル板から侵入していたが、InlB 欠損株ではその侵入が大幅に低下した。さらに、リステリアがパイエル板から侵入する像を蛍光顕微鏡にて可視化したところ、リステリアが M 細胞を介してパイエル板に侵入している像が得られた。これら結果より、リステリアが *in vivo* の腸管から侵入する際に、大部分のリステリアが InlB 依存的に回腸のパイエル板上の M 細胞から侵入していると結論した。

(3) 新規リステリア脳炎モデルの樹立

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 陽性細胞ではなく CD8 陽性細胞が重要であり、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。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った。さらに初期のリステリア防御には NK 細胞が産生する IFN γ が重要であることも見いだした。

(4) ナチュラルヘルパー細胞の発見

腸管感染における肥満細胞の機能を解析する過程で、Th2 サイトカインを多量に産生する新たなリンパ球を見いだした。腹腔内の脂肪組織の観察から、腸間膜をはじめとする腹腔内脂肪組織にこれまで報告のないリンパ集積を見だし、fat-associated lymphoid cluster (FALC) と名付けた。FALC に存在する細胞を精査したところ、c-Kit、IL-2 受容体、IL-7 受容体、IL-33 受容体を発現する新しいリンパ球を見いだした。この細胞は IL-2 によって増殖し、IL-5、IL-6、IL-13 などの Th2 サイトカインの分泌を介して腹腔内の B1 細胞の自己複製を支持することが明らかになった。また、寄生虫感染時には IL-33 あるいは IL-25 と IL-2 に反応して多量の IL-5 や IL-13 を産生し、IL-5 は好酸球増多を誘導し、IL-13 は腸管杯細胞の過形成などの炎症を介して誘導初期防御に機能することが示された。自然免疫系で機能するリンパ球であって、IL-2 によって増殖し、Th1 サイトカインを産生する NK 細胞に類似する性質を持つことから、この細胞をナチュラルヘルパー (Natural Helper: NH) 細胞と命名した。

NH 細胞が細菌感染にも機能するか否かをヘリコバクターの系を用いて検討した。NH 細胞の分化には IL-7 が必須であり、IL-7 受容体のサブユニットの一つである共通鎖 (γ_c : IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 受容体に共通に用いられるサブユニット) の欠損マ

ウスには NH 細胞は存在しない。γc と Rag2 の 2 重欠損マウスにヘリコバクターを感染させ、その後に未感染マウス由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を移入したところ、Rag2 欠損マウスの場合と異なり、胃炎が誘導されなかった。Rag2 欠損マウスには NH 細胞が存在することから、NH 細胞の関与が考えられた。しかし、ヘリコバクターが感染した野生型のマウスの CD4 陽性 T 細胞を移入したところ、2 重欠損マウスでも胃炎が誘導された。この理由を精査したところ、パイエル板の分化に IL-7 が必須であり、2 重欠損マウスにはパイエル板がないことが T 細胞の感作不全の理由であり、NH 細胞の欠損が理由ではないと考えられた。腸管感染性の細菌に対する生体防御における機能に関しては更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 28 件)

(原著論文)(すべて査読あり)

- Chiba, S., Nagai, T., Hayashi, T., Baba, Y., Nagai, S. and Koyasu, S. (2011) Listerial invasion protein internalin B promotes the entry into ileal Peyer's patches in vivo. **Microbiol. Immunol.** 55:123-129.
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J.-I., Ohtani, M., Fujii, H. and Koyasu, S. (2010) Innate production of Th2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit⁺Sca-1⁺ lymphoid cells. **Nature** 463:540-544.
- Hayashi, T., Nagai, S., Baba, Y., Ikeda, E., Kawase, T. and Koyasu, S. (2009) Critical roles of NK and CD8⁺ T cells in distinct phases of CNS listeriosis. **J. Immunol.** 182:6360-6368.
- Suzuki, M., Mimuro, H., Kiga, K., Fukumatsu, M., Ishijima, N., Morikawa, H., Nagai, H., Koyasu, S., Gilman, R. H., Kersulyte, D., Berg, D. E. and Sasakawa, C. (2009) The non-phosphorylated status of CagA is pivotal for Helicobacter pylori pathogenesis. **Cell Host Microb.** 5:23-34.
- 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.** 20:337-343.2.
- Mimuro, H., Suzuki, T., Nagai, S., Rieder, G., Suzuki, M., Nagai, T., Fujita, Y., Nagamatsu, K., Ishijima, N., Koyasu, S., Haas, R. and Sasakawa, C. (2007) Helicobacter pylori dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. **Cell Host Microbe.** 2:250-263.
- Nagai, S., Mimuro, H., Yamada, T., Baba, Y., Moro, K., Nochi, T., Kiyono, H., Suzuki, T., Sasakawa, C. and Koyasu, S. (2007) Role of Peyer's patches in Helicobacter pylori-induced gastritis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104:8971-8976.

(総説)

- Koyasu, S. and Moro, K. (2011) Type 2 innate immune responses and the natural helper cell. **Immunology** 132:475-481.
- Koyasu, S. and Moro, K. (2011) Innate Th2-type immune responses and the Natural Helper Cell, a newly identified lymphocyte population. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.** 11:109-114.
- Koyasu, S., Moro, K., Tanabe, M. and Takeuchi, T. (2010) Natural Helper Cells: a new player in the innate immune response against helminth infection. **Adv. Immunol.** 108:21-44.

〔学会発表〕(計 104 件)

(招待講演)

- Shigeo Koyasu. Natural helper cell: innate lymphocyte producing Th2 cytokines. Annual Meeting of the Austrian Society for Allergology and Immunology in co-operation with the national societies of Croatia, Czech Republic, Hungary, Slovakia and Slovenia, Vienna, Austria, 2010 年 12 月 5 日
- Shigeo Koyasu. Natural helper cell: a newly identified innate lymphocyte producing Th2 cytokines. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010 年 8 月 24 日
- Shigeo Koyasu. Role of dendritic cells in infectious immunity. The 7th Conference of the Federation of African Immunology Societies, Sharm El-Sheick, Egypt, 2009 年 11 月 4 日
- Shigeo Koyasu. Host immune response against Helicobacter pylori infection. 第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会,神戸, 2008 年 12 月 12 日

5. Shigeo Koyasu, Akiko Minowa, Satoshi Matsuda. The role of PI3K for the function of gastrointestinal mast cells. The 27th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, Curaçao, the Netherlands, 2008年5月2日
6. Shigeo Koyasu. Role of PI3K in immune receptor signaling. The 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brazil, 2007年8月25日

(一般講演)

1. Shigenori Nagai, Yutaka Kurebayashi, Yukiko Baba, Shigeo Koyasu. Role of phosphoinositide 3-kinase on helper T cell differentiation in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. The 14th International Congress of Immunology, 神戸, 2010年8月25日
2. Sayuri Chiba, Takeshi Nagai, Shigeo Koyasu. Role of internalin B in the gastrointestinal infection of and host immune response to *Listeria monocytogenes*. The 14th International Congress of Immunology, 神戸, 2010年8月25日
3. 千葉紗由利, 永井重徳, 永井武, 小安重夫. リステリア腸管感染における病原因子 Internalin B の役割. 第39回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪, 2009年12月4日
4. Shigenori Nagai, T. Yamada, Y. Baba, Y. Iwakura, Shigeo Koyasu. Critical role of IL-17A in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. The 9th World Congress of Inflammation, 東京, 2009年7月8日
5. 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 γ と IL-17 の役割. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 2008年12月2日
6. 永井重徳, 山田健人, 馬場夕紀子, 岩倉洋一郎, 小安重夫. ヘリコバクターピロリ感染による胃炎発症における IL-17A の役割. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 2008年12月1日
7. 永井重徳, 三室仁美, 山田健人, 馬場夕紀子, 茂呂和世, 鈴木敏彦, 笹川千尋, 小安重夫. 胃炎発症における球状ヘリコバクターピロリの重要性. 第13回日本ヘリコバクター学会, 滋賀, 2007年6月22日
8. Shigenori Nagai, Hitomi Mimuro, Taketo Yamada, Yukiko Baba, Kazuyo Moro, Toshihiko Suzuki, Chihiro Sasakawa, Shigeo

Koyasu. The role of coccoid form of *Helicobacter pylori* on the induction of gastritis. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2006年12月13日

9. Toshiyuki Hayashi, Shigenori Nagai, Yukiko Baba, Shigeo Koyasu. The role of acquired immunity on CNS listeriosis. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2006年12月13日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: キャリア

発明者: 小安重夫、永井重徳、笹川千尋、三室仁美

権利者: 慶應義塾

種類: 特許

番号: PCT/JP2007/072102

出願年月日: 2007/11/14

国内外の別: PCT

〔その他〕

ホームページ

<http://www.koyasu.umin.ne.jp/>

<http://www.med.keio.ac.jp/rdb/gcoe-stemcell/view.php?i=13>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし