

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間： 2006 ～ 2008
課題番号： 18590440
研究課題名 (和文) マクロファージからの IL-12 産生促進型変異 LT の細胞内情報伝達機構の解析
研究課題名 (英文) Analysis of mechanism of IL-12 induction from macrophage stimulated by the mutant of Escherichia coli enterotoxin
研究代表者 辻 孝雄 (TSUJI TAKAO) 藤田保健衛生大学・医学部・教授 研究者番号：6017199

研究成果の概要:

EPEC の LT の変異体 (mLT) は、志賀毒素 2 または死菌 BCG に対する Th2 または Th1 系 T 細胞を活性化すること、mLT はマクロファージ (Mφ) からの IL-12 と TNF α 産生を促進することを明らかにした。上昇した TNF α は IL-12 産生促進の上流に存在していたが、NF- κ および JNK 経路の活性化はなかった。そこで、CREB を介して Th2 系 T 細胞を活性化が予想されているコレラ毒素と mLT を比較検討し、mLT 特有の細胞内情報伝達機構の解析を進めている。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,500,000	0	1,500,000
平成 19 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 20 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード:粘膜アジュバント, 易熱性下痢毒素、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

コレラ毒素 (CT) と毒素原性大腸菌の産生する易熱性下痢毒素 (LT) は種々の抗原と同時に経鼻投与すると粘膜アジュバント活性を示す。CT は Th2 系 T 細胞を主に活性化し、抗原特異抗体を上昇させる粘膜アジュバントである。しかし変異 LT (mLT) は主に Th1 系 T 細胞を活性化し、TNF α 、IL-12 誘導した。これは、

mLT が従来言われている粘膜アジュバント発現機構と全く異なる発現機構を持っていることを示す。本実験がこの事実を明らかにした点、非常に独創性が高い。さらに、抗 TNF α 抗体の添付により、IL-12 の上昇が阻害されたことから、TNF α が IL-12 の上昇の上流に存在していることを明らかにした。これは、TNF α の上昇により TNF-R1 などの刺激に伴い、細胞

内情報伝達機構を介して IL-12 が上昇している可能性を示す。そこで、IFN γ 存在下で、培養マクロファージ(M Φ)を mLT で刺激し、NF κ -B 経路、JNK 経路の活性化を検討した。

2. 研究の目的

我々の分離した変異 LT(mLT)の M Φ からの IL-12 および TNF α 産生促進作用がどのような細胞内情報伝達機構で行なわれ、mLT による α β および γ δ T 細胞の抗原への特異的 Th1 系 T 細胞傾斜が起こるかを解明することを目的に企画した。そこで、以下の3点を研究目的とした。(a)mLT の種々の抗原に対する粘膜アジュバント効果の判定。(b)mLT による IL-12 および TNF α 産生増加と NF- κ 経路の関連の解析。(c) mLT による IL-12 および TNF α 産生増加と JNK 経路の関連の解析。

3. 研究の方法

(1). 骨髄からの M Φ の分離と培養: C57black 6J マウスからの骨髄細胞を利用した。

(2). 培養 M Φ の毒素による誘導サイトカインおよびその mRNA の測定: 培養 M Φ を毒素(各々10 μ g/ml)で処理し、培養上澄み液のサイトカインを kit で測定した。また細胞表面抗原を FACSscan で解析した。mRNA 量は mRNA 抽出キットを用い RT-PCR 法で測定した。

(3). RAW264.7 細胞または骨髄 M Φ の毒素による NF κ -B 活性の測定

①RAW264.7 細胞または骨髄 M Φ に NF κ -B レポータープラスミドとコントロールの pRL-TK vector を lipofectamine を用いて transfection させた。毒素を添付後、一定時間後に kit を用いて細胞を溶解して luciferase 活性を測定した。

②RAW264.7 細胞または骨髄 M Φ の核内 NF κ -B を ELISA 方法で検出した。

(4). RAW264.7 細胞または骨髄 M Φ の毒素による NF κ -B の上流の解析: 培養各細胞を各 inhibitor で処理し、細胞を破壊、SDS-PAGE と Western blotting を行なった。nitrocellulose 膜上で、anti-phospho-MEKs と anti-rabbit or mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary 抗体及び ECL システムを用い、MEKs などの伝

達物質を検出した。

(5). RAW264.7 細胞または骨髄 M Φ の JUN 経路の活性化の解析: 上記のように各細胞から標品調整し、nitrocellulose 上で anti-phospho-Erk 等の抗体を用い、Erk1/2 等の伝達物質の検出を行なった。

(6). RAW264.7 細胞または骨髄 M Φ の毒素による MAPkinase(Erk1/2)より上流の解析: MAPKK とその上流の Raf、さらに上流の Ras、PI3kinase 等、阻害剤の有無と特異抗体を用いて発現の変化、活性の変化を検討した。

4. 研究成果

(1). mLT の抗原に対する粘膜アジュバント活性: 腸管出血性大腸菌の産生する志賀毒素 2 の B サブユニット(Stx2B-His)と mLT を同時にマウスに経鼻投与(n.s.)した場合、皮下注射(s.c.)の場合と同程度に血清抗 Stx2B-His 抗体価が上昇することを明らかにした。但し、経口投与(p.o.)の場合は、上昇は顕著でなかった(*Vaccine*, 26.469-47, 2008 と *Vaccine*, 26.2092-2099, 2008)。

また、CT は Th2 系 T 細胞を主に活性化する粘膜アジュバントであるのに対し、mLT は Th1 系 T 細胞も活性化した。例えば、熱処理した BCG(killed BCG)と mLT を同時にマウスに経鼻投与した場合、killed BCG に対する細胞性免疫が増加した。また、killed BCG+mLT を同時投与し 4 週間後、マウスの脾臓細胞を結核抗原で刺激した場合、Th1 系のサイトカイン、IL-2、IFN γ 、TNF α の上昇が認められた。これにより mLT は結核抗原に対する細胞性免疫を賦活化することが明らかになった(*Vaccine*, 24.3591-3598, 2006)。

(2). mLT の骨髄性 M Φ に対する IL-12、TNF α 産生刺激の解析: 水痘ワクチンと mLT をマウスに同時経鼻投与した場合も結核抗原と同様に mLT が Th1 系 T 細胞を活性化することを明らかにした(*Vaccine*, 24.3719-3726, 2006)。そこで、in vitro でマウスの骨髄から分離した M Φ を mLT で刺激した。その結果、mLT は M Φ からの IL-12 と TNF α 、産生を促進することが明らかになった(*Vaccine*, 24.3719-3726, 2006 と 24.

3591-3598, 2006)。

一般にLTは、Th1とTh2系の両方のT細胞を活性化するといわれている。従って、mLTもLTと同様に、両方のT細胞を活性化するが、mLTが直接MΦを刺激して、IL-12とTNFαを誘導することにより、Th1/Th2バランスをTh1に傾斜している可能性が示唆される。この点、本研究の大きな成果と考えられる。

さらに、抗TNFα抗体の添付により、MΦからのIL-12の産生が抑制された。これらの結果から、TNFαがmLTのIL-12産生促進の上流に存在していることが示唆される。但し、NOには非依存性であることも明らかにした(*Vaccine*, 24. 3719-3726, 2006)。

以上の結果から、mLTはLPSのようにMΦを刺激してTNFα産生を上昇させ、TNF-R1を介して、細胞内情報伝達機構を刺激しIL-12が上昇している可能性が示唆される。則ち、TNFαの受容体のTNF-R1を通じて、NFκ-Bが活性化され、IL-12のpromoterが刺激されている可能性が示唆される。

(3). mLTによるIL-12およびTNFα産生増加とNFκ-B経路およびJNK経路の関連の解析

培養マウス骨髄MΦをmLTで刺激した場合、NFκ-Bの活性化(mRNA及び蛋白質合成)の可能性を時間経過、毒素の濃度的変化を検索した。しかしながら、抗原に対するアジュバント効果をもつLPSのように明瞭なNFκ-Bの活性化を検出出来なかった。さらに、JNK経路の活性化があるかMAP kinase(Erk1/2)活性などで検討した。その結果、NFκ-Bと同様に明瞭な上昇を示す結果を得ることが出来なかった。

そこで、CTはLTと同様粘膜アジュバント効果をもち、しかも両毒素は細胞表面に存在するGM1ガングリオシドと結合して、細胞内のcAMPを上昇させることが知られている。上記したようにCTはTh2系T細胞を主に活性化するのに対し、mLTはLTと同様にTh1, Th2系の両方のT細胞を活性化する。CTの場合、既にGM1ガングリオシド受容体を通じて細胞内cAMPを上昇させ、PKA、Raf、MEK1/2、ERK1/2、CREB経路を通じてT細胞内のIL-10を上昇させることが予想されている。

mLT、LTのBサブユニットもCTと同様にT細胞内のIL-10を上昇させることを既に明らかにしている(*Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 12.157-164, 2005.)。しかし、LT-Bはアデニル酸シクラーゼを活性化しない。一方、mLTはCTの10%程度のアデニル酸シクラーゼ活性化を行い、10%程度の細胞内cAMP濃度を上昇させる。

これらの結果をもとに現在、CTによる細胞内情報伝達系の活性化とmLTの活性化の相違を比較検討している。その結果、mLTの特有の細胞内情報伝達刺激を明らかにすることが出来ると期待される。

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15件)

- (1). Arimitsu H, Tsukamoto K, Ochi S, Sasaki S, Kato K, Taniguchi K, Oguma K and Tsuji T. Lincomycin-induced over-expression of mature recombinant cholera toxin B subunit and the holotoxin in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 査読有、2009, in press.
- (2). Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Shimizu Y, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, Sugiyama S, Taniguchi K, Neri P, Mori H. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. 査読有、*Vaccine*, 26, 469-476, 2008.
- (3). Bingium T, Yoshida H, Lin, Tsuji T, Shimizu H, Miyamura T.. Molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan Province, the People's Republic of China. 査読有、*J. Med. Virol.* 80. 670-679.2008.
- (4). Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto, M., Tsuji, T. and Kozaki, S. Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D. 査読有、*Microb Pathog.* 44.484-493.2008
- (5). Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Shimizu T, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, Taniguchi K, Noda M, Neri P, and Mori H. A nasal vaccine

comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2. 査読有、*Vaccine*. 26:2092-2099.2008.

(6). Narita K, Dong-Liang H; Tsuji T, Nakane A. Intranasal immunization of mutant toxic shock syndrome toxin 1 elicits systemic and mucosal immune response against *Staphylococcus aureus* infection. 査読有、*FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52:389-396. 2008.

(7). Arimitsu H, Sakaguchi Y, Lee J.C, Ochi S, Tsukamoto K, Yamamoto Y, Ma S, Tsuji T, and Oguma K.. Molecular properties of each subcomponent in *Clostridium botulinum* type B haemagglutinin complex. 査読有、*Microb Pathog.* 45:142-9.2008.

(8). Lee JC, Hwang HJ, Sakaguchi Y, Tsuji T, Watanabe T, Ohyama T, Tsuchiya T, Oguma K. C terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine. 査読有、*Microbiol Immunol.* 51: 445-455. 2007.

(9). Shimizu T, Sasaki K, Kato M, Tsuji T, et al. A mutant of *Escherichia coli* enterotoxin inducing a specific Th1-type of T cells to varicella-zoster vaccine enhances the production of IL-12 by IFN γ -stimulated macrophages. 査読有、*Vaccine*. 24, 3719-3726. 2006.

(10). Kobayashi H, Takahashi E, Oguma K, Fujii Y, Yamanaka H, Negishi T, Arimoto- Tsuji T, et al. Cleavage specificity of the serine protease of *Aeromonas sobria*, a member of the kexin family of subtilases. 査読有、*FEMS Microbiology Letters.* 256, 165-170, 2006.

(11). Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S. Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. 査読有、*Vaccine*, 24(15):2815-23. 2006.

(12). Takahashi H, Sasaki K, Takahashi M, Shigemori N, Honda S, Arimitsu H, Ochi S, Ohara N, Tsuji T. Mutant *Escherichia coli* enterotoxin as

a mucosal adjuvant induces specific Th1 responses of CD4(+) and CD8(+) T cells to nasal killed-bacillus calmette-guerin in mice. 査読有、*Vaccine*. 24(17): 3591-8. 2006.

(13). Kakita M, Takahashi T, Komiya T, Iba Y, Tsuji T, Kurosawa Y, Takahashi M. Isolation of a human antibody with strong neutralizing activity against diphtheria toxin. 査読有、*Infect. Immun.* 74, 3682-3683.2006.

[学会発表] (計 18 件)

1). Arimitsu H, Tsukamoto K, Ochi S, Keiko K and Tsuji T. Construction of lincomycin-induced expression system of cholera toxin B subunit in *Escherichia coli*. 43rd U.S.-Japan Cholera & Other bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting in Fukuoka. Nov 17-19.2008.

2) Ochi S, Arimitsu H, Tsukamoto K, Ohtani K, Sasaki K, Shigemori N, Kato M, Shimizu T and Tsuji T. Complete Nucleotide Sequence of Heat-Labile and Heat-Stable Enterotoxin-Encoding Plasmid of Enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407. The 42th Joint Meeting of the US-Japan Cholera and other Bacterial Enteric Infections Panel (Austin). Hyatt Regency Austin, 208 Barton Springs Road, Austin, Texas, USA, Formal poster session. Dec 5- 7. 2007.

[図書] (計 2 件)

1. 辻 孝雄

標準微生物学第10版(山西弘一、平松啓一、中込 治編)、医学書院発行、細菌の病原因子、7 ページ、2009.

2. 荒川宣親、江崎孝行、岡本敬の介、辻 孝雄、渡辺治雄、他 13 名. 病原体等安全取り扱い・管理指針、日本細菌学会発行、11 ページ、2008 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 孝雄(TSUJI TAKAO)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号:60171998

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

