

平成 23 年 5 月 27 日現在

機関番号 : 37111

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 ~ 2010

課題番号 : 20590461

研究課題名 (和文) クラミジア感染マウスモデルにおける CD1 免疫応答の基礎研究

研究課題名 (英文) Role of CD1 immune responses in murine chlamydial mucosal infection model

研究代表者

廣松 賢治 (HIROMATSU KENJI)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号 : 80252237

研究成果の概要 (和文) : 我々は肺炎クラミジア、クラミジア・トラコマチスのマウス粘膜 (肺、生殖器) 感染モデルの解析により、CD1d 拘束性 NKT 細胞が感染ルート・臓器の違いにより異なった機能を示し【生殖器 NKT: IFN γ 産生 proTH1、肺 NKT: IL-13 産生 proTH2】、IFN γ で活性化され強い細胞性免疫、炎症を惹起する M1 マクロファージ (classically activated macrophage) あるいは、IL-13 で活性化され炎症の再生・線維化に関与する M2 マクロファージ (alternatively activated macrophage) などと異なったマクロファージの分化誘導に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : We examined the role of CD1d-restricted iNKT cells on host defenses against mucosal infection (lung or genital tract) of *Chlamydia trachomatis muridarum* infection. J α 18^{-/-} gene knockout mice, which lack invariant NKT cells, and C57BL/6J wild type mice were infected intravaginally or intranasally with *C. trachomatis* (*C. muridarum*). In genital tract infection, WT mice cleared infection by day 21, whereas iNKT^{-/-} mice showed significantly delayed clearance of chlamydia. Invariant NKT cells in genital tract obtained after the infection expressed mRNA of IFN γ abundantly but scarcely of IL-4 or IL-13. There were more increment of MHC class II^{high} CD11b⁺CD11c⁺ mature myeloid type DC in the presence of iNKT cells. Collectively these suggest the protective role of iNKT cells on the resolution of *C. trachomatis* genital tract infection. On the other hand iNKT cells exacerbated *C. trachomatis* lung infection. In the lung infection, wild type mice revealed significantly severe body weight loss, increased chlamydial growth and severe lung pathological changes compared to iNKT^{-/-} mice. Systemic Chlamydia dissemination was also prominent in the presence of iNKT cells. We found that alternatively activated macrophages which express Arginase-1 but not NOS are preferentially induced in WT mice in response to increased production of IL-13 and IL-4 by CD4 T cells and this may explain the increased susceptibility of WT mice toward Chlamydia lung infection. Our findings that iNKT cells display different cytokine profiles in different mucosal area (Th1 type in genital tract and Th2 type in lung) even to the same *Chlamydia trachomatis* infection may have important insights for the better understanding of NKT cells biology.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：感染免疫、CD1、NKT細胞、クラミジア、自然免疫、生殖器粘膜、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

細胞内寄生性細菌であるクラミジアは、感染細胞内で封入体内を形成し phagolysome による殺菌機構からエスケープする。このクラミジアの排除には、Th1 型の CD4T 細胞や CD8 キラー T 細胞の誘導が必須であるが、クラミジアはペプチド抗原を CD8T 細胞や CD4T 細胞へ抗原提示する MHC クラス I 分子、クラス II 分子の発現を感染により抑制させるエスケープ機構も有しており、遷延性感染や再感染を起しやすいため。これらのクラミジアは子宮頸部等の生殖器や肺などの粘膜を感染の場とする。従って、クラミジアに対する有効な免疫制御法の開発には、クラミジアの宿主免疫系からのエスケープ機構の解明に加えて、自然免疫系、獲得免疫系を含めた粘膜免疫系の場の特徴を理解することが肝要である。

NKT (natural killer T) 細胞は自然免疫、獲得免疫系の橋渡しをする T 細胞群で、CD1d 分子により抗原提示、活性化され、様々の感染免疫や、自己免疫などの免疫制御に関与している。この CD1d 分子は病原微生物への第 1 線の防御ラインである粘膜上皮細胞（腸管上皮細胞、皮膚、生殖器粘膜など）に発現されており、種々の感染症に対する防御免疫や炎症性腸疾患の発症機構に関与している。

以上を踏まえて本研究では、細胞内寄生性細菌クラミジア・トラコマチス経膈生殖器、経気管肺感染モデルを確立し、生殖器粘膜、肺という 2 つの異なる粘膜部位における NKT 細胞のクラミジア感染防御機構における異なる役割を明らかにする。

2. 研究の目的

細胞内寄生性細菌クラミジア・トラコマチスの経膈生殖器、経気管肺感染モデルを確立し、生殖器粘膜、肺という 2 つの異なる粘膜部位における NKT 細胞のクラミジア感染防御機構における in vivo での役割、機能の違いの有無やその誘導メカニズムなどを詳細に検討することを目的とする。これらの研究により、粘膜面を主体とするクラミジア感染症の発症機構や、クラミジア感染症に対する新しい免疫制御法の開発が期待される。

3. 研究の方法

(1)クラミジア・トラコマチス経膈生殖器感染マウスモデルにおける CD1d 拘束性 NKT 細胞の生体防御機構における役割

① 膈 swab 中の感染性クラミジア (Elementary body) の径時変化 (IFU assay)

② 生殖器 (膈、子宮) 浸潤リンパ球の免疫学的解析 コラゲナーゼ処理、パーコール密度勾配分離により浸潤リンパ球を分離し、フローサイトメトリーによる表面抗原、細胞

内サイトカインの解析、MACS による NKT 細胞 sorting 後の mRNA 解析 (RT-PCR) を行った。
③NKT細胞のリガンドである糖脂質抗原 α -Gal 投与のクラミジア経膈感染に与える影響の検討

(2)クラミジア・トラコマチス経気管肺感染マウスモデルにおける CD1d 拘束性 NKT 細胞の生体防御機構における役割

①感染後の体重減少の経時変化の解析及び、経時的肺、肝臓、脾臓中のクラミジア EB の推移を IFU アッセイで検討した。

②クラミジア肺感染-免疫組織学的解析 (炎症細胞浸潤の種類、程度、径時変化を H/E 染色で評価した。)

③肺浸潤リンパ球の免疫学的解析：肺組織から細胞分離を行い、その表面マーカー、細胞内サイトカインなどの免疫学的解析をフローサイトメトリーにて行った。

(3)クラミジア感染による M1/M2 マクロファージ・ポラリゼーションの検討

4. 研究成果

(1)クラミジア・トラコマチス経膈生殖器感染マウスモデルにおける CD1d 拘束性 NKT 細胞の生体防御機構における役割 *Chlamydia trachomatis mouse pneumonitis (C. muridarum strain NiggII)* 経膈感染後の膈 swab 中の IFU (inclusion forming unit) の径時変化の検討により、クラミジアの生殖器感染後 NKT 細胞欠損マウスでは、特に感染後期のクラミジア EB (基本小体：感染性) の減少がコントロールマウスに比較して顕著に遅れており、経膈生殖器粘膜クラミジア感染における NKT 細胞の感染防御能が示唆された。このメカニズムを明らかにするために以下の実験を行った。まず、NKT 細胞の感染局所 (生殖器) における kinetics を検討した。クラミジア生殖器感染局所における NKT 細胞の表面マーカーは、CD4-CD8- であり NK1.1- であった。NKT 細胞の細胞数は感染 7 日目をピークに見られた。この NKT 細胞は IFN γ を強く発現していた。また、生殖器における他の細胞 (樹状細胞、マクロファージ、好中球、B 細胞など) の kinetics も調べたところ、樹状細胞の浸潤が WT マウスに比べて NKT 欠損マウスでは非常に低下しており、MHC クラス II 分子強発現を示す活性化樹状細胞も NKT 欠損マウスでは増加をあまり認めなかった。NKT 細胞による樹状細胞の活性化が NKT 欠損マウスでは見られないことが考えられた。この樹状細胞は NKT 細胞以外の通常の CD4T 細胞、CD8T 細胞への抗原提示、活性化に関与する抗原提示細胞である。そこで Th1 系、Th2 系のサイトカインを生殖器から分離

した mRNA を用いて調べてみると、WT マウスでは顕著な IFN γ mRNA の上昇が感染後認められるのに対して NKT 欠損マウスでは見られなかった。これらの結果として Th1 サイトカイン IFN γ で誘導される活性化マクロファージも感染 7 日目の生殖器においては明らかに WT マウスで多いのに対して NKT 欠損マウスでは非常に低下していた。以上のことからクラミジア生殖器感染モデルでは、生殖器 NKT 細胞が IL-4 ではなく IFN γ を産生し【図 1】、樹状細胞の活性化、Th1CD4T 細胞の分化誘導、活性化マクロファージの誘導 (classically activated M Φ , M1 M Φ) と導いていることが強く示唆された。また、iNKT 細胞のリガンドである糖脂質抗原 α -Gal 投与のクラミジア経膈感染に与える影響の検討したところ、 α -Gal 投与により膈 swab 中の IFU アッセイによりクラミジア EB (基本小体：感染性) の減少がコントロールマウスと比較して亢進していることが明らかとなった。

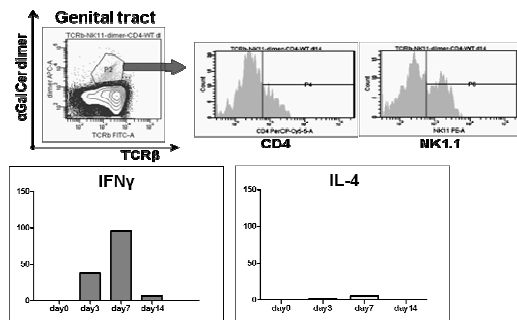


図 1 クラミジア経膈感染マウス genital tract 中の iNKT 細胞 (α -GalCer-CD1d 陽性) の細胞表面マーカー及び、IFN γ /IL-4 mRNA 解析

このように抗クラミジア感染防御の主役を担う細胞性免疫の誘導に NKT 細胞が大きく関与していることが生殖器クラミジア感染モデルでは明らかであった。この NKT 細胞は CD4-CD8⁻ (Double negative), NK1.1⁻ という特異的な細胞表面マーカーを有しており、肝臓中の NKT 細胞や肺 NKT 細胞とは異なった subpopulation が特異的な homing receptor を介して生殖器粘膜に homing している可能性も考えられる。【①、②、⑤、⑦学会発表、論文投稿中】

(2) クラミジア・トラコマチス経気管肺粘膜感染マウスモデルにおける CD1d 拘束性 NKT 細胞の生体防御機構における役割

一方、肺感染モデルでは、野生型マウスにおいて感染後の体重減少が著しく見られ、NKT 細胞欠損マウスでは体重減少は軽度であった。また、感染 5 日目、14 日目の肺の IFU アッセイでも、野生型マウスが NKT 欠損マウスより感染性クラミジア (EB 基本小体) を多く認めた。面白いことに、このクラミジア肺感染時における肺内浸潤 NKT 細胞は、生殖器クラミジア感

染時の生殖器組織中の NKT 細胞とは異なるフェノタイプを示していた。さらに、クラミジア感染後、WT マウスでは iNKT KO マウスと比べて好中球およびマクロファージの顕著な肺内への浸潤を認め、肺組織におけるサイトカインおよびケモカインの解析でも好中球走化因子である CXCL2 (MIP-2)、炎症性サイトカイン TNF \cdot およびマクロファージ遊走因子 CCL2 (MCP-1) の発現の増加を認めた。感染後肺内へ浸潤する好中球内には、感染性のクラミジア EB (基本小体) を認め、クラミジアが好中球内で増殖していることが明らかとなった。クラミジア排除が促進している iNKT KO マウスでは、肺内に誘導されるマクロファージは活性化マーカーである MHC クラス II を高度に発現しており、細胞内殺菌能を有する活性化マクロファージが強く誘導されていることが示唆された。一方、クラミジア肺感染に伴い活性化マクロファージの誘導が阻害されている WT マウスでは、代替活性化マクロファージ (alternatively activated macrophage; aaM Φ , M2M Φ) に特徴的な Arginase-1 の著しい mRNA 発現増加を認めた。さらに、WT マウス肺組織の ELISA では aaM Φ の分化誘導を促す Th2 系サイトカインである IL-4 および IL-13 の産生が有意に増加していた。以上の結果より、野生型マウスでは、クラミジア肺感染後 iNKT 細胞が MIP2, CCL2 等のケモカインや Th2 サイトカインである IL-4, IL-13 産生することにより、顕著な好中球浸潤によるクラミジアの増殖や、Th2 免疫応答の誘導に基づく aaM ϕ の増加を惹起することによりクラミジア感染抵抗性が減弱している可能性が強く示唆された。【③、④学会発表、論文投稿中】

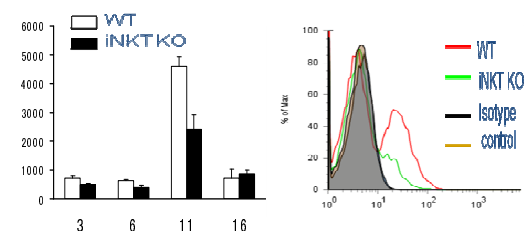


図 2 左：肺組織 homogenate 中の IL-13 (ELISA)、右：肺浸潤 CD4T 細胞 intracellular cytokine FACS (IL-13)

本研究において、生殖器、肺という粘膜免疫機構において、クラミジア感染時に誘導される NKT 細胞の機能の違い (PRO-TH1 VS. PRO-TH2) が明らかとなった。また、マクロファージや樹状細胞の活性化の程度も NKT 細胞の有無により大きな違いが認められるが、肺及び、生殖器粘膜において鏡面像を呈するなど感染免疫応答のおきる場の違いによる自然免疫—獲得免疫の連関の特殊性が強く示唆された。今後このメカニズムを明らかにすることは、クラミジア感染防御機構を

明らかにするのみならず、NKT 細胞の biology を理解する上で極めて重要な知見が得られるものと思われる。

(3) クラミジア感染による M1/M2 マクロファージ・ポラリゼーションの検討

上記の研究成果 (NKT 細胞が生殖器粘膜では、IFN \cdot を NKT 細胞が産生し強い細胞性免疫、炎症を惹起する M1 マクロファージを誘導、肺粘膜では、NKT 細胞が IL-13 を産生し炎症の再生・線維化に関与する M2 マクロファージの分化誘導) を踏まえ、次に、クラミジア感染感受性と M1/M2 マクロファージ・ポラリゼーションの有無の検討を行った。肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae*) や、動脈硬化との関連性が疑われていないクラミジア・トラコマチス *C. trachomatis* L2、*C. trachomatis* D、*C. trachomatis* mouse muridarum (MoPn) など 4 種類のクラミジアを、マウス骨髄由来マクロファージに *in vitro* 感染させ、マクロファージ内でのクラミジアの動態、感染経過、炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF α , IL-12, IL-23, IL-10 など) の産生パターンを解析した。各種のクラミジア感染により IL-6、MIP-2、TNF α 、IL-23、IL-10 などが産生されたが、AR39 株感染 M ϕ からは、さらに IL-1 β 、IL-18 の産生放出も認められ inflammasome の活性化が AR39 感染 M ϕ で特異的に誘導されていた。proIL-1 や proIL-18 の cleavage に関与する active caspase-1 の inflammasome 活性化による誘導の有無を FACS 法にて検討してみると、肺炎クラミジア *C. pneumoniae* AR39 のマクロファージ感染においてのみ active caspase-1 が強く誘導されていた (図 3)。この *C. pneumoniae* 感染特異的な M ϕ の活性化が、*C. pneumoniae* 感染に伴う動脈硬化性病変形成に何らかの役割を果たしている可能性も強く示唆された【⑩、⑪学会発表】。

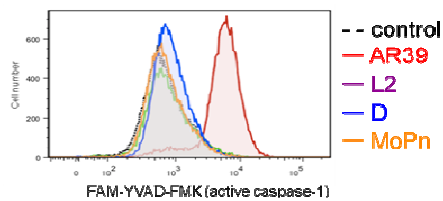


図 3 クラミジア感染後におけるマウス骨髄由来マクロファージの活性化 caspase-1

M1/M2 マクロファージ (図 4) の肺炎クラミジア感染抵抗性の検討では、M1 マクロファージでは肺炎クラミジアの増殖に抵抗性を示し (図 5)、一方 M2 マクロファージ内では lipid droplet (脂肪滴) 形成の亢進が認められクラミジアも増殖性応答を示した。さらに、我々は、肺炎クラミジア感染により、骨髄由来マクロファージ (M0 マクロファージ)

が M2 マクロファージへと polarize することや、M1/M2 マクロファージ内でクラミジアが異なった感染様式 (M1: 遷延性感染、M2: 増殖型感染) をとること、即ち、肺炎クラミジアが宿主免疫応答に対するエスケープ戦略として、M1/M2 ポラリゼーションを引き起こしている可能性を考えられた【⑥学会発表】

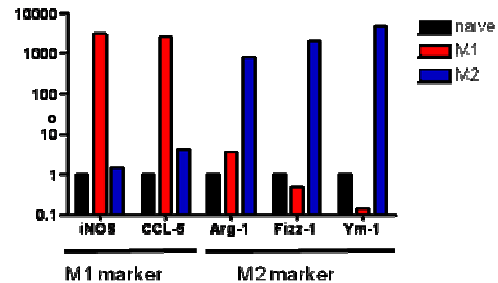


図 4 M1/M2/M0 (naive) マクロファージの M1/M2 signature 分子の real time PCR

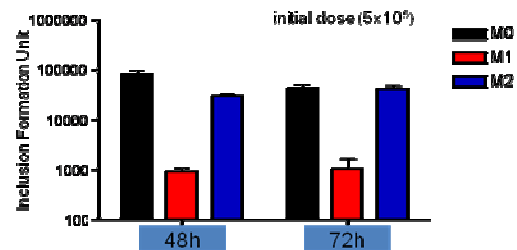


図 5 M1 マクロファージは肺炎クラミジアの増殖を抑制するが、M2 マクロファージでは増殖する。

また、M1/M2 マクロファージにおける inflammasome/caspase-1 活性化の違いと foam cell 形成の有無との相関も見いだした。現在これらの M1 \rightarrow M2 ポラリゼーションの分子機構として、クラミジア由来の III 型分泌装置 effector タンパクによる IRF5 (M1 マクロファージ特異的転写因子) や HIF1- α の degradation による可能性や、オートファジーと inflammasome/caspase-1 活性化経路の cross-talk の検討を行っている。

今後の展開： 偏性細胞内寄生性細菌クラミジア *in vivo*/ *in vitro* 感染マウスモデルを用いて、MDSC (myeloid-derived suppressor cell) や Arginase 産生マクロファージ (M2: alternatively activated macrophage) が感染において特異的に誘導されるメカニズムへの上皮細胞由来因子 (Cathelicidin など) や NKT 細胞の関与の分子メカニズムを明らかにする。次に、これらのクラミジア感染による M1/M2 マクロファージポラリゼーションと inflammasome 活性化機構との関連について検討することにより、クラミジア遷延性持続感染成立の分子基盤の解明を目指す。

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 1 件)

① Komori T, Nakamura T, Matsunaga I, Morita D, Hattori Y, Kuwata H, Fujiwara N, Hiromatsu K, Harashima H, Sugita M, A microbial glycolipid functions as a new class of target antigen for delayed-type hypersensitivity, J Biol Chem.、査読有、Vol. 286, 2011, 16800-16806

[学会発表] (計 11 件)

① Itoh Ryota、Inflammasome dependent caspase-1 activation induced in murine bone marrow derived macrophages by *Chlamydia pneumonia* but not by *C. trachomatis* or *C. muridarum*、14th International congress of Immunology、2010. 8. 25、神戸国際会議場

② Itoh Ryota、Inflammasome activation induced by *Chlamydia pneumonia* in mouse bone marrow derived macrophages、第83回日本細菌学会総会、2010年3月28日、パシフィコ横浜

③ Bin Zhou、Neutrophils induce Th1 type immunity in lung infection with *Chlamydia muridarum*、第83回日本細菌学会総会、2010年3月28日、パシフィコ横浜

④ Ishii Kazunari、Induction of CD8 T cells protective immunity against *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis strain by ubiquitin-fusion DNA vaccine、第39回日本免疫学会総会、2009年12月4日、大阪国際会議場

⑤ Ohnishi Yoshiki、Protective role of iNKT cells on the resolution of *C. trachomatis* genital tract infection、第39回日本免疫学会総会、2009年12月4日、大阪国際会議場

⑥ Itoh Ryota、Differential regulation of inflammatory cytokine secretion by M1 and M2-polarized murine macrophages upon *Chlamydia pneumonia* infection、第39回日本免疫学会総会、2009年12月4日、大阪国際会議場

⑦ Kenji Hiromatsu、Protective role of iNKT cells on the resolution of *C. trachomatis* genital tract infection、The 5th International symposium on CD1/NKT cells、2009 3. 26、Kamakura, Japan

⑧ 大西克樹、Innate and adaptive immune responses during genital tract infection with *C. trachomatis*、第82回日本細菌学会総会、2009年3月13日、名古屋国際会議場

⑨ 濱田利徳、Role of NKT cells during *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonia lung infection in mice、第82回日本細菌

学会総会、2009年3月13日、名古屋国際会議場

⑩ 濱田利徳、Role of NKT cells during *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonia (MoPn) lung infection in mice、第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年12月2日、国立京都国際会館

⑪ 大西克樹、*Chlamydia trachomatis* 経膈生殖器感染マウスモデルにおけるCD1拘束性NKT細胞の役割、第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年12月2日、国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣松 賢治 (HIROMATSU KENJI)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：80252237

(2) 研究分担者

石井 一成 (ISHI KAZUNARI)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70380954

(3) 連携研究者

()

研究者番号：