

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成14年度採択研究代表者

小安 重夫

(慶應義塾大学医学部 教授)

「病原微生物の宿主免疫系との共生戦略の解明による治療・制御法の開発」

## 1. 研究実施の概要

病原微生物は宿主の細胞機能とともに免疫反応を巧みに利用して感染を成立・持続させる。本研究では、感染の初期防御ならびに獲得免疫の起動に重要な自然免疫系の活性化機構と、それに干渉する微生物の共生機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。宿主側と感染体側のそれぞれにおいて、感染とそれに対抗する免疫系に機能に重要な因子を遺伝学的なアプローチを駆使して解析している。特に宿主側の因子としてPI3キナーゼ (PI3K) 系の役割に注目し、培養系のみならず、個体レベルでの解析を推進するべくノックアウト (KO) マウス等の遺伝子改変動物を駆使して研究を進めている。病原微生物感染において免疫系に作用する因子、およびその作用の分子機構を明らかにすることで、病原因子の影響を阻害し、一方で免疫系のバランスを適切に保つ治療・制御法の開発を目指す。

## 2. 研究実施内容

### 1) 感染時の自然免疫における樹状細胞の機能解析 :

(目的) 樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞が $\gamma$ 型インターフェロン (IFN $\gamma$ ) の生産細胞であることを報告してきた。IFN $\gamma$ は感染初期に重要なサイトカインであるが、抗原提示細胞由来のIFN $\gamma$ が生体内でも感染防御に機能するかを検討した。

(方法と結果) 抗原提示細胞によるIFN $\gamma$ 生産に欠陥を持つために極めて微生物感染に対して感受性が高い $\gamma$ cとrag-2のダブルノックアウトマウスをレシピエントとし、樹状細胞やマクロファージ等の抗原提示細胞、あるいはNK細胞を移植した後にリステリア (*L. monocytogenes*) の感染を行い、抵抗性の回復を検討した。その結果、どちらの場合にも野生型の細胞を移植した場合には抵抗性の回復が見られたが、IFN $\gamma$ ノックアウトマウス由来の細胞を移植した場合には抵抗性の回復は見られなかった。次に、野生型マウス (1)、自然免疫系は正常に機能すると思われるrag-2ノックアウトマウス (2)、rag-2ノックアウトマウスから、抗アジアロGM1抗体の投与によってNK細胞を除去したマウス (3)、IFN $\gamma$ の受容体の欠損マウス (4)、 $\gamma$ cとrag-2のダブルノックアウトマウス (5) のリステリア (*L. monocytogenes*) の急性感染に対する抵抗性をLD50の比較によって検討したところ、(1) = (2) > (3) >> (4) = (5) という結果が得られた。以上の結果から、

抗原提示細胞由来のIFN $\gamma$ もNK細胞由来のIFN $\gamma$ も自然免疫において機能することが証明された。一方、NK細胞を除去したrag-2ノックアウトマウスが、IFN $\gamma$ の受容体の欠損マウスや $\gamma c$ とrag-2のダブルノックアウトマウスに比較してリステリア感染に対する抵抗性が高いことから、感染抵抗性の付与という点からは抗原提示細胞由来のIFN $\gamma$ がNK細胞のそれを凌駕するものである可能性が示唆された。

(結論) これらの結果は、抗原提示細胞が感染初期におけるIFN $\gamma$ の重要な生産細胞であることが明らかになった(図1)。

## 2) B細胞におけるPI3Kの機能解析:

(目的) 我々はこれまでにクラスIAファミリーのPI3Kの機能をノックアウトマウスを用いて検討してきた。PI3Kのノックアウトマウスの表現系の解析結果は、PI3KがTecファミリーキナーゼのBtkの上流で機能するというこれまでの定説と矛盾しない。すなわちTecファミリーキナーゼはPHドメインを持つことからPI3Kによって生成されるフォスファチジルイノシトール3リン酸(PIP3)に結合して膜へ移行し、さらにsrcファミリーキナーゼによってリン酸化されて機能すると考えられてきた。B細胞においてはBtkと呼ばれるTecファミリーキナーゼがB細胞分化やシグナル伝達に重要であることが知られる。p85 $\alpha$  K0マウスはBtk K0マウスとよく似た表現系を示し、BtkがPI3Kの下流で機能するというドグマを支持する結果と考えられた。この仮説をさらに生化学的に検討した。

(方法と結果) B細胞におけるシグナル伝達系を詳細に検討したところ、Btkの活性化はPI3K活性とは独立に誘導されることが示された。すなわち、酵素活性を指標にしたBtkの活性化はPI3K活性を完全に阻害しても影響を受けなかった。さらに下流のシグナル伝達系の解析から、BtkノックアウトマウスとPI3Kノックアウトマウスではどちらの場合にも転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化に障害が見られた。

(結論) Btkの活性化はPI3K活性とは独立に誘導されると結論された。Btkの膜移行はBLNKなどのアダプタータンパク質への結合によると考えられる。また、BtkとPI3Kは共に転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化に必要であり、それゆえにp85 $\alpha$  K0マウスとBtk K0マウスが類似した表現系を示すことが明らかとなった(図2)。

図1 自然免疫におけるIFN- $\gamma$  生産細胞に関する新しいモデル

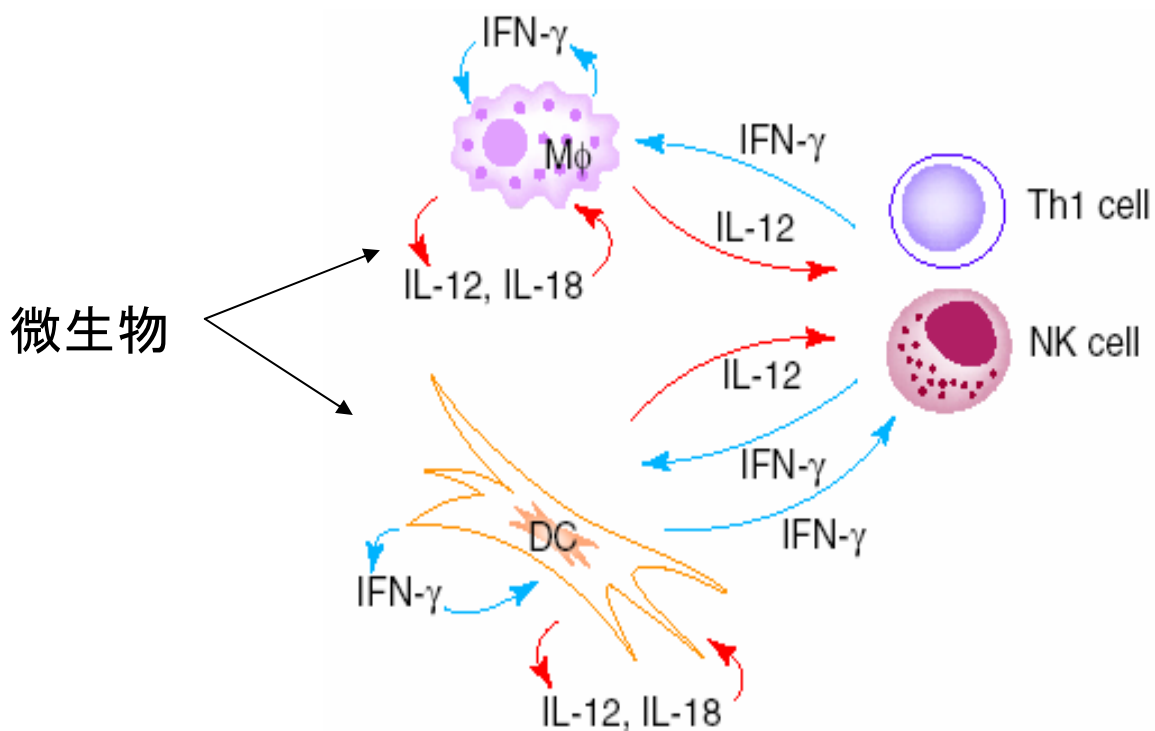
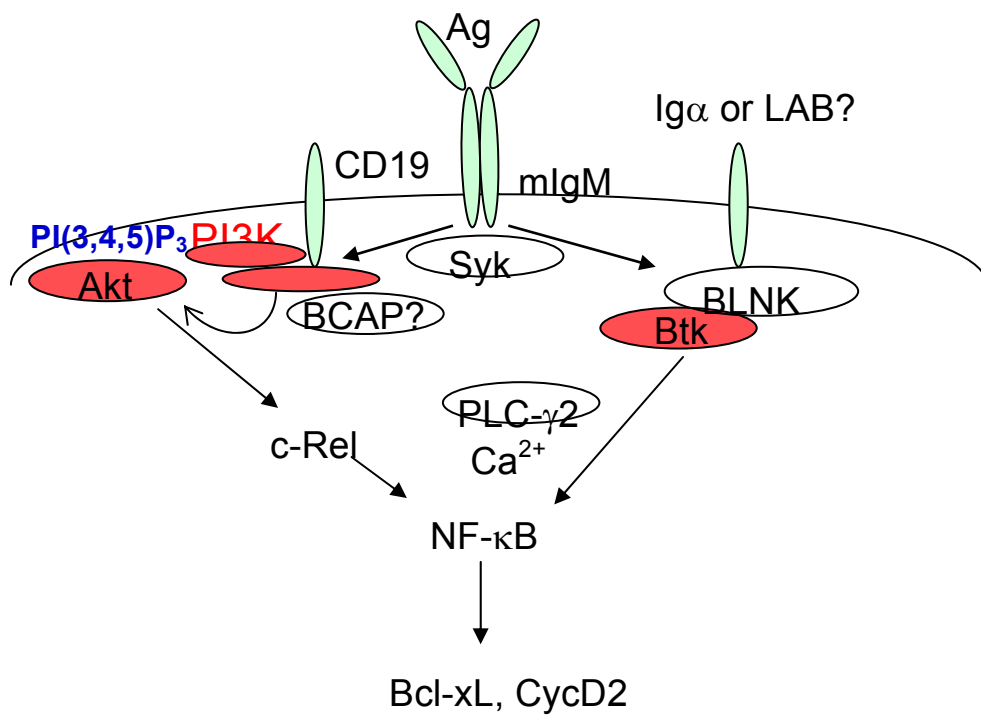


図2 B細胞におけるBtkの活性化に関する新しいモデル



### 3. 研究実施体制

#### 小安グループ

研究グループ長：小安重夫（慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 教授）

研究実施項目： 研究の総括・遺伝子改変動物の維持管理

遺伝子改変動物を用いた病原微生物の感染病態の解析

免疫担当細胞におけるシグナル伝達系の解析

樹状細胞と細菌との相互作用の解析、Th1/Th2分化の解析

#### 笹川グループ

研究グループ長：笹川千尋（東京大学医科学研究所 感染・免疫大部門 細菌感染分野 教授）

研究実施項目： 病原微生物の遺伝子改変および病原性の解析

病原細菌の粘膜感染機構の解析と病原因子の同定

#### 矢原グループ

研究グループ長：矢原一郎（株）医学生物学研究所 伊那研究所 所長）

研究実施項目： 樹状細胞による抗原提示機構の解析

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

#### (1) 論文発表

- Suzuki, H., Matsuda, S., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Ohteki, T., Asano, T., Behrens, T. W., Kouro, T., Takatsu, K., Kadowaki, T. and Koyasu, S. (2003) PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor mediated signal transduction. **Nat. Immunol.** 4:280-286.
- Glassford, J., Soeiro, I., Skarell, S. M., Banerji, L., Holman, M., Klaus, G. G. B., Kadowaki, T., Koyasu, S., and Lam, E. W.-F. (2003) BCR targets cyclin D2 via Btk and the p85 $\alpha$  subunit of PI3-K to induce cell cycle progression in primary mouse B cells. **Oncogene** 15:2248-2259.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N. H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., and Kadowaki, T. (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature** 423:762-769.
- Watanabe, N., Nakajima, H., Suzuki, H., Oda, A., Matsubara, Y., Moroi, M., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Suzuki, H., Koyasu, S., Ikeda, Y. and Handa, M. (2003) Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85 $\alpha$  null platelets characterized by an impaired response to GPVI stimulation. **Blood**

102:541-548.

- Nakaoka, Y., Nishida, K., Fujio, Y., Izumi, M., Terai, K., Oshima, Y., Sugiyama, S., Matsuda, S., Koyasu, S., Yamauchi-Takahara, K., Hirano, T., Kawase, I. and Hirota, H. (2003) Activation of gp130 transduces hypertrophic signal through interaction of scaffolding/docking protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 in cardiomyocytes. **Circ. Res.** 93:221-229.
- Suzue, K., Asai, T., Takeuchi, T. and Koyasu, S. (2003) *In vivo* role of IFN- $\gamma$  produced by antigen presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. **Eur. J. Immunol.** 33:2666-2675.
- Esashi, E., Sekiguchi, T., Ito, H., Koyasu, S., and Miyajima, A. (2003) A possible role for CD4<sup>+</sup> thymic macrophages as professional scavengers of apoptotic thymocytes. **J. Immunol.** 171:2773-2777.
- Toyama-Sorimachi, N., Tsujimura, Y., Maruya, M., Onoda, A., Kubota, T., Koyasu, S., Inaba, K. and Karasuyama, H. (2004) Ly49Q, a novel member of Ly49 family that is selectively expressed on myeloid lineage cells and involved in regulation of cytoskeletal architecture. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101:1016-1021.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：0件）