

「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

病原因子と宿主免疫担当細胞の相互作用の解析を通じ、病原微生物の共生戦略の分子機構を解明し、新たな治療法の開発に資することを目的として研究を進めた。宿主側では特に樹状細胞に注目し、病原微生物の干渉の対象としてフォスホイノシチド 3 キナーゼ (PI3K) 経路に注目した。昨年に、腸管病原性大腸菌 (EPEC) がそのエフェクター分子 EspH の機能によって樹状細胞の PI3K 経路を抑制し、IL-12 の発現を亢進して自らに有利な Th1 環境を宿主に誘導することを明らかにした。中間評価の際に「今後は、「画期的な治療法医療の創製」の観点から国民が注目する成果を上げることが期待し、EspH→PI3K→IL-12→Th1 経路に対する宿主免疫系の治療戦略の確立を目指して欲しい。」というコメントをいただいた。そこで PI3K の下流を精査し、PI3K-Akt-GSK3 β 経路が IL-12 の発現を調節することを明らかにした。それに基づき、GSK3 β 阻害剤であるリチウム製剤が樹状細胞からの IL-12 の発現を抑制し、Th1 反応誘導を阻害することによって EPEC の感染を制御できることを明らかにした。リチウム製剤が既に精神科領域で双極性障害の治療に既に用いられていることを考えると、本法は新たな病原性大腸菌下痢症の治療法となることが期待されるとともに、Th1/Th2 反応の新たな制御方法となる可能性を秘めているといえる。

もう一つの研究からヘリコバクターピロリの感染検知機構に関する新しい知見を得ることができた。明確なリンパ組織を持たない胃においていかにして宿主免疫系が活性化されるかは明らかでなかったが、本研究によりヘリコバクターが、腸管において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ことが示され、これまでの通説を覆す新たな宿主免疫系の活性化機構が明らかになった。

2. 研究実施内容

1. 腸管病原性大腸菌 (EPEC) の感染戦略の解明と治療法の開発

昨年までの研究で、EPEC から III 型分泌装置を通して注入されるエフェクターの一つである EspH が PI3K 経路を抑制すること、それによって樹状細胞による IL-12 の発現を増強すること、結果として Th1 反応が亢進することを明らかにした。さらに EspH による PI3K-Akt 経路への干渉が *in vivo* における感染においても機能するか否かを検討するために、マウス EPEC である *C. rodentium* の *espH* 変異体を作製してマウスに感染させた。その結果、*espH* 変異体では野生型の *C. rodentium* と比較して菌の定着が低く、炎症も軽微であり、感染性が低下することが明らかになった。この際に、腸間膜リンパ節由来の細胞を用いた二次免疫応答において γ インターフェロン (IFN γ) の生産が低下しており、

Th1 反応の低下が確認された。興味深いことに、同じ *espH* 変異体を PI3K ノックアウトマウスに感染させた場合には、病勢は野生型の *C. rodentium* を感染させた場合とほとんど差はなく、野生型も変異体もほぼ同程度の増殖・定着が見られた。この事実は EspH が PI3K を標的とするという解釈と矛盾しない。

これらの結果は、「EPEC が樹状細胞の PI3K 活性を抑制することで IL-12 の発現を亢進し、自らに有利な Th1 反応を誘導する戦略をとる」という我々の仮説を支持する。Th1 反応によって腸管が肥厚し面積が増大することは EPEC の付着に有利であると思われる。また下痢の誘導は宿主から見れば有害な菌を排出することであるが、病原細菌から見れば次の宿主を求めて体外へ脱出するための一つの方法とも考えられる。これも一つの共生の形であるといえる。そこで、これを逆手にとれば治療法の開発につながるはずと考え、PI3K の下流のシグナル伝達系と IL-12 発現の関係を精査した。その結果、PI3K-Akt-GSK3 β 経路が IL-12 の発現調節にかかわることが明らかになった。PI3K はフォスファチジルイノシトール(3,4,5)3 リン酸(PIP3)を生成し、PIP3 に結合する2種類のキナーゼ PDK と Akt を細胞膜へ移行させる。PDK が Akt をリン酸化することにより Akt が活性化され、Akt はさらに GSK3 β をリン酸化する。樹状細胞と EPEC を共培養した場合にも Akt のリン酸化状態と並行して樹状細胞内の GSK3 β のリン酸化は速やかに消失するのに対し、*espH* 変異株ではリン酸化が持続した。GSK3 β はリン酸化されることによって活性が低下することが知られ、したがって PI3K の活性化は GSK3 β の活性を抑制する。GSK3 β が IL-12 の発現を正に調節するという報告があり、事実 GSK3 β の阻害剤である LiCl や SB216763 は樹状細胞における IL-12 の発現が強く抑制した。そこで、マウスに *C. rodentium* を感染させた3日後に飲水中に Li₂CO₃ を添加したところ、腸管の肥厚や菌の付着のどちらも抑制された。さらに腸管膜リンパ節細胞の2次刺激によって Th1 反応を検討すると、IFN γ の発現が有意に低く、Th1 反応の抑制が観察された。これらの結果から、GSK3 β の阻害剤は EPEC の新規治療薬となり得るといえる。以上の結果をまとめたものが図1である。EPEC は EspH によって宿主の PI3K-Akt 経路を抑制し、GSK3 β を活性化することで IL-12 の発現を増強し Th1 反応を誘導するが、GSK3 β を直接阻害することで Th1 反応を抑制し、EPEC の感染を制御できる。以上の結果は論文にまとめ投稿中である。

EPEC は腸管上皮に侵入はしないが強く付着して微絨毛を破壊し下痢症を誘導するが、このような感染様式をとる病原細菌を総称して A/E 病原菌 (attaching/effacing (A/E) pathogen) と呼ぶ。A/E 病原菌には EPEC だけではなく、O157 に代表される腸管出血性大腸菌を始めとしてヒトの病原細菌のみならず家畜の病原細菌に至るまで多くの病原細菌が含まれる。EPEC における III 型分泌装置やエフェクターなどの病原因子は LEE (locus of enterocyte effacement) と名付けられた染色体領域 (LEE 病原遺伝子塊) にコードされているが、この LEE 病原遺伝子塊は A/E 病原菌に共通に見られる病原遺伝子塊である。したがって、我々の研究成果は O157 を含む A/E 病原菌に広く適用が可能と考えられ、PI3K 経路に干渉して Th1 反応を抑制するという治療法も、ヒトの下痢症のみならず畜産の分野にまで広く適用が可能と考えている。Th1/Th2 バランスの制御は感染症のみならずアレルギーや自己免疫疾患、癌治療においても重要な位置を占める。我々はこれまでに PI3K/mTOR 経路を抑制することで PI3K/GSK3 β 経路の抑制の場合とは逆に Th1 反応を亢進できることを示している (論文投稿中)。この方法は癌治療における樹状細胞療法における Th1 誘導に貢献できるものと考えてさらに研究を続けている。これらの結果から樹状細胞の PI3K 経路を標的とした免疫制御は広く応用可能な戦略となると期待している。

2. ヘリコバクターピロリの感染戦略の解明と治療法の開発

これまでに、*H. pylori* SS1 株(以下ヘリコバクターと呼ぶ)の感染による胃炎発症機構について免疫学的解析を行い、感染検知に腸管関連リンパ組織(GALT)が重要であることを示す結果を得た。

ヘリコバクター感染による胃炎の発症機構として、これまでヘリコバクター感染によって上皮細胞から生産されるサイトカインやケモカインが炎症のきっかけになると考えられてきた。ヘリコバクターをPI3K ノックアウトマウスに感染させると著しい好中球浸潤が見られ、野生型に比較して炎症度がより激しくなる。ヘリコバクターによる胃炎はTh1 反応に依存することが知られており、PI3K ノックアウトマウスはよりTh1 反応が起こりやすいため、そのことが炎症度の上昇の一因と考えられる。しかしTh1 反応増強だけでは好中球浸潤を説明できない。

Rag2 ノックアウトマウスはT 細胞もB 細胞も持たず、したがって獲得免疫系は機能しない。Rag-2 ノックアウトマウスにおいて、ヘリコバクターは胃粘膜に感染・定着するものの、胃粘膜固有層に血球浸潤を引き起こすことが出来ない。しかしこの感染 Rag-2 ノックアウトマウスにナイーブ CD4⁺T 細胞を移入することによって、好中球とともにT細胞の浸潤を伴う強い炎症が誘導され、菌の排除が観察された。この時、移植するT細胞を卵白アルブミン(OVA)に特異的なT細胞受容体を発現する T 細胞受容体トランスジェニックマウス(OT-II マウス)由来の T 細胞にした場合には全く炎症は誘導されなかった。同様に、Rag2 ノックアウトマウスと OT-II マウスを交配して得た Rag2 欠損 OT-II マウスにヘリコバクターを感染させても炎症は見られなかった。これらの結果から、ヘリコバクター感染によって上皮細胞から生産されるサイトカインやケモカインが炎症のきっかけになるという従来のモデルは否定され、抗原特異的な T 細胞の活性化が重要であることが示唆された。

さらに、Rag2 ノックアウトマウスとサイトカインの共通・鎖(・c)の欠損マウスを交配した2重欠損マウスを用いて同様な実験を行ったところ、野生型のナイーブな T 細胞を移植しても炎症は起こらず、ヘリコバクターが感染した野生型のマウスの T 細胞を移植して初めて炎症が誘導された。・c 欠損マウスにおいてはパイエル板や孤立リンパ小節などの腸管免疫系を構成する GALT が分化・発達しない。そこでさらに新生仔や妊娠中のマウスに抗 IL-7 受容体抗体や LT・-Ig 融合タンパク質を投与することによってパイエル板や孤立リンパ小節を欠損するマウスを作成したところ、これらのマウスにヘリコバクターを感染させても発症しないことが明らかになった。続いてRag2 ノックアウトマウスを用いてパイエル板や孤立リンパ小節を欠損するマウスを作成したところ、Rag2 ノックアウトマウスと・c の2重欠損マウスの場合と同様に、野生型のナイーブな T 細胞を移植しても炎症は起こらず、ヘリコバクターが感染した野生型のマウスの T 細胞を移植して初めて炎症が誘導された。これらの結果から、ヘリコバクターに対する反応の開始に GALT がかわることが示された。

これをさらに確認するために小腸結窄モデルを用いて検討したところ、菌体がパイエル板から取り込まれ、パイエル板内の樹状細胞によって貪食されることが明らかになった。ヘリコバクターは貪食に抵抗することが知られるにもかかわらず、効率良くパイエル板内の樹状細胞に取り込まれたことは意外であった。ヘリコバクターは嫌気性条件下ではラセン型から球形に形態を変化するが球形型は容易に樹状細胞によって貪食されることが培養系で明らかになった。さらに小腸結窄モデルを用いて精査したところ、腸管内に播種したラセン型ヘリコバクターは時間経過とともに球形化し、ラセン型の菌体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形化していることが示された。これらのことから、ヘリコバクターは微好気性の胃においてはラセン型を保つが、腸管へ移行する際にラセン型から球形型へ変化し、パイエル板経由で樹状細胞に取り込まれ宿主

図1. EPEC 感染戦略に関する新しいモデルと新規治療法
新規治療法の部分を赤で囲った。

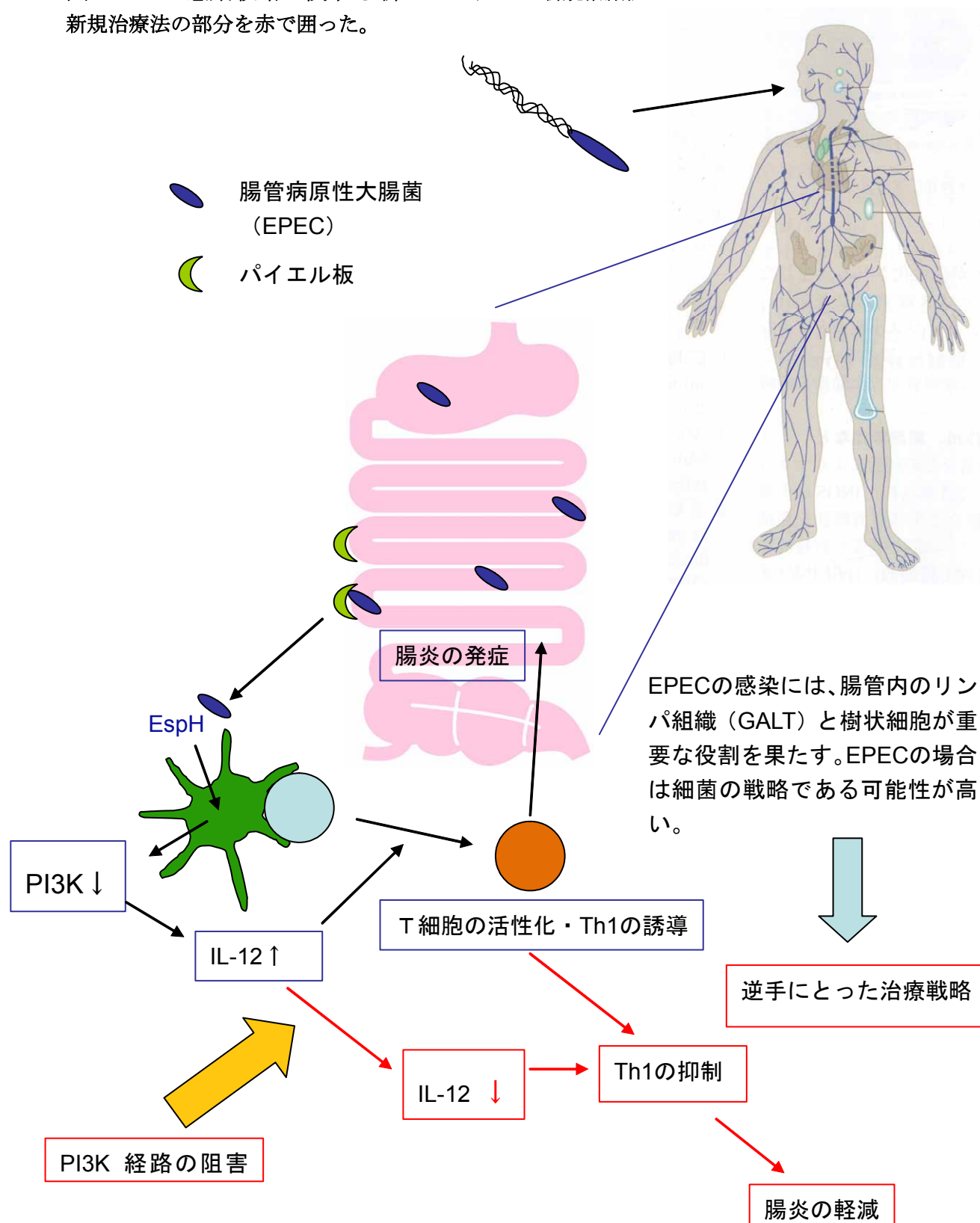
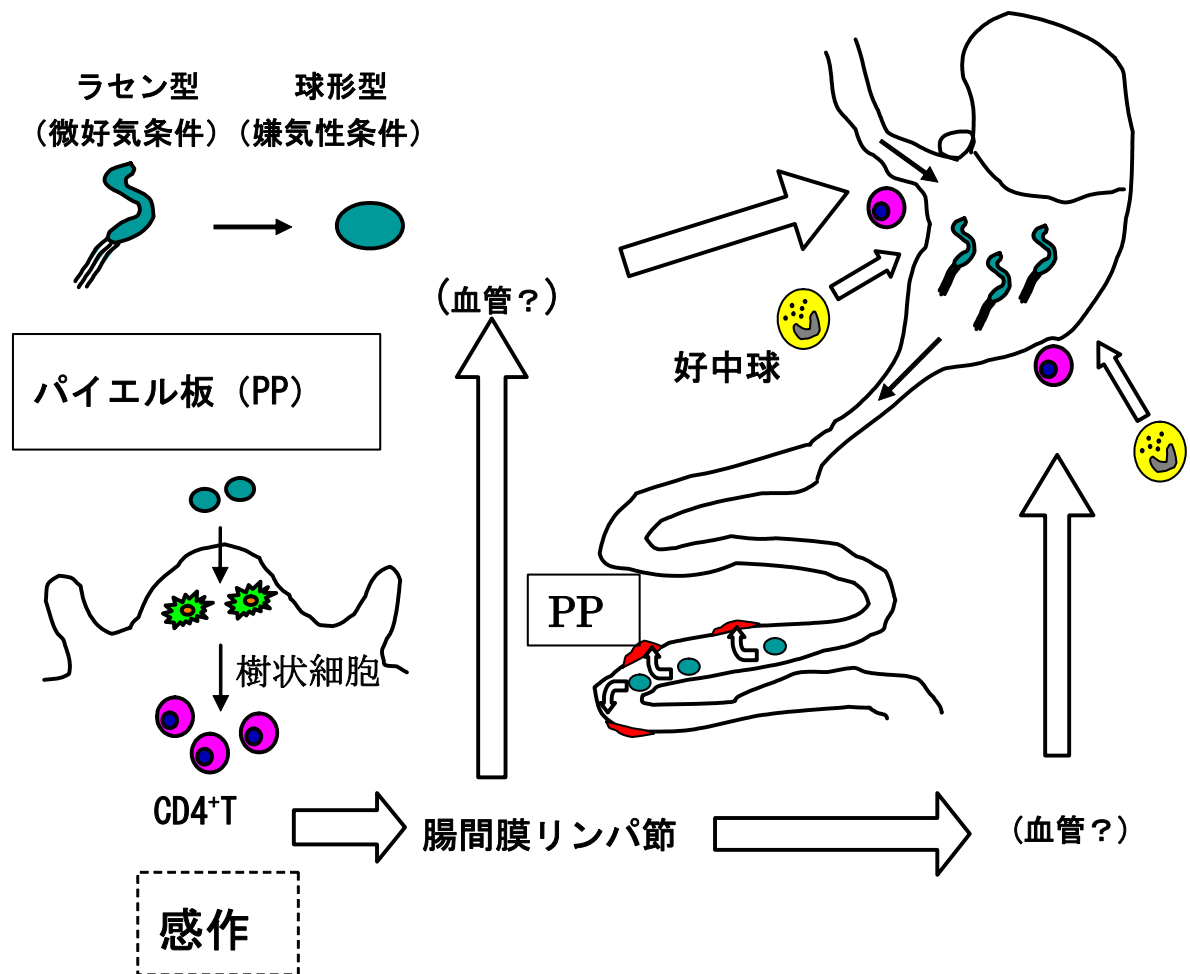


図2. 宿主によるヘリコバクターの検知機構に関する新しいモデル



微好気性の胃から嫌気性条件下の腸管へ移動したヘリコバクターはラセン型から球形型へ変化し、パイエル板を介して取り込まれパイエル板内の樹状細胞によって貪食される。パイエル板内、あるいは腸間膜リンパ節においてヘリコバクター特異的な CD4 陽性T細胞が活性化され、血行性に胃上皮へ浸潤する。CD4 陽性T細胞によって生産されるケモカインによってさらに好中球が浸潤し胃炎を発症する。

3. 研究実施体制

(1) 小安グループ

①研究者名

小安 重夫(慶應義塾大学 教授)

②研究項目

- ・ 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 *H. pylori* 感染病態の解析
- ・ 遺伝子改変動物を用いた *C. rodentium* 感染病態の解析
- ・ 樹状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

(2) 笹川グループ

①研究者名

笹川 千尋(東京大学 教授)

②研究項目

- ・ *H. pylori* の遺伝子改変および病原性の解析
- ・ *C. rodentium* 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

(3) 矢原グループ

①研究者名

矢原 一郎((株)医学生物学研究所 伊那研究所長・慶應義塾大学 訪問教授)

②研究項目

- ・樹状細胞によるクロスプレゼンテーションの分子機構の解明
- ・GroEL、HSP70、HSP90 などのストレスタンパク質の調整
- ・ストレスタンパク質と樹状細胞の相互作用の解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Yu, Y., Nagai, S., Wu, H., Neish, A. S., Koyasu, S. and Gewirtz, A. T. (2006) TLR5-mediated PI3K activation negatively regulates flagellin-induced pro-inflammatory gene expression. **J. Immunol.** 176:6194-6201.
- Sakai, K., Suzuki, H., Oda, H., Akaike, T., Azuma, Y., Murakami, T., Sugi, K., Ito, T., Ichinose, H., Koyasu, S. and Shirai, M. (2006) Phosphoinositide 3-kinase in nitric oxides synthesis in macrophage: critical dimerization of inducible nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.** 281:17736-17742.
- Ohteki T., Tada, H., Ishida, K., Sato, T., Maki, C., Yamada, T., Hamuro, J. and Koyasu, S. (2006) Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses *in vivo*. **J. Exp. Med.** 203:2329-2338.
- Shiroki, F., Matsuda, S., Doi, T., Fujiwara, M., Mochizuki, Y., Kadowaki, T., Suzuki, H. and Koyasu S. (2007) The p85 α regulatory subunit of class IA phosphoinositide 3-kinase regulates β -selection in thymocyte development. **J. Immunol.** 178:1349-1356.
- Obayashi, K., Doi, T. and Koyasu, S. (2007) Dendritic cells suppress IgE production in B cells. **Int. Immunol.** 19:217-226.

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:2件(CREST 研究期間累積件数:5件)