

「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。特に宿主細胞として樹状細胞に注目し、また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：

樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞がインターロイキン12 (IL-12) やγ型インターフェロン (IFN $\gamma$ ) の生産を通じて感染防御に機能することを報告してきた。本年はin vivoにおける樹状細胞とマクロファージの役割分担をさらに検討するために、樹状細胞を欠損するマウスを作製してリステリア感染における機能を検討した。樹状細胞マーカーであるCD11のプロモーターの下流にジフテリア毒素の受容体を組み込んだトランスジェニックマウス (Jung et al., (2002) *Immunity*, 17:211-220) にジフテリア毒素を投与することによって末梢から樹状細胞を除去することが出来る。このマウスにリステリアを感染させるとIL-12の生産とそれに続く血中のIFN $\gamma$ の生産はほとんど見られず、マウスはリステリアに対する抵抗性を失った。この事実は自然免疫における上記のサイトカイン生産細胞としての樹状細胞の重要性を改めて示すものである。

### 2) 樹状細胞からのIL-12発現のPI3Kによる調節機構の解析：

微生物に出会った樹状細胞はTLRの刺激を介してIL-12を生産し、T細胞反応をTh1方向へ誘導する。我々はこのIL-12発現をPI3Kが負に制御することを明らかにしてきた。さらに

そのシグナル伝達系を検討した。その結果、mTORの阻害剤であるラパマイシンがPI3Kの阻害剤と同様にマウス骨髄由来の樹状細胞からのIL-12の生産を増強することを見いだした。ヒトの末梢血単球由来の樹状細胞においても同様であった。これらの結果は、PI3Kの下流で機能するmTORがIL-12発現のネガティブフィードバック機構に関与することを示す。ラパマイシンを用いることによって樹状細胞からのIL-12生産を増強し、それによって人為的にTh1反応を亢進させる可能性が考えられる。

### 3) 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析：

微生物感染に対し、細胞傷害性T細胞の誘導は重要である。細胞傷害性T細胞はCD8陽性のT細胞から分化するが、そのためには微生物抗原のMHCクラスI経路への抗原提示が重要である。樹状細胞は細胞外から取り込んだ抗原をMHCクラスII経路のみならずMHCクラスI経路へも提示するというクロスプレゼンテーションの能力を持つことが特徴である。この分子機構を明らかにすることを目指した。モデル抗原として卵白アルブミンを用いて樹状細胞内の挙動と分解過程を精査した結果、取り込んだ抗原が小胞体を経由し、小胞体品質管理機構（endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD)）と呼ばれる分子機構を用いてMHCクラスI経路へ誘導されることが明らかになった（図1）。

### 4) B細胞におけるPI3Kの機能解析：

これまでのPI3Kのノックアウトマウスの表現系の解析結果から、B細胞抗原受容体下流のシグナル伝達系において、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を覆し、Btkの活性化がPI3K活性とは独立に誘導されること、BtkとPI3Kは共に転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化に必要であることを示してきた。本年度はNF- $\kappa$ Bの活性化にBtkとPI3Kがそれぞれどのようにかかわるかを検討した。その結果、Btkの欠損はI $\kappa$ Bキナーゼの活性化によるI $\kappa$ Bの分解に障害が見られたのに対し、PI3Kの欠損によってNF- $\kappa$ Bの構成因子であるc-Relの発現が著減することが示された。これらの結果から、BtkがI $\kappa$ Bキナーゼの活性化を、PI3Kがc-Relの発現を介してNF- $\kappa$ B経路を活性化すること、すなわちBtkとPI3Kが異なる経路でNF- $\kappa$ Bの活性化に寄与すると結論した（図2）。

図1 樹状細胞のクロスプレゼンテーションに関する新しいモデル

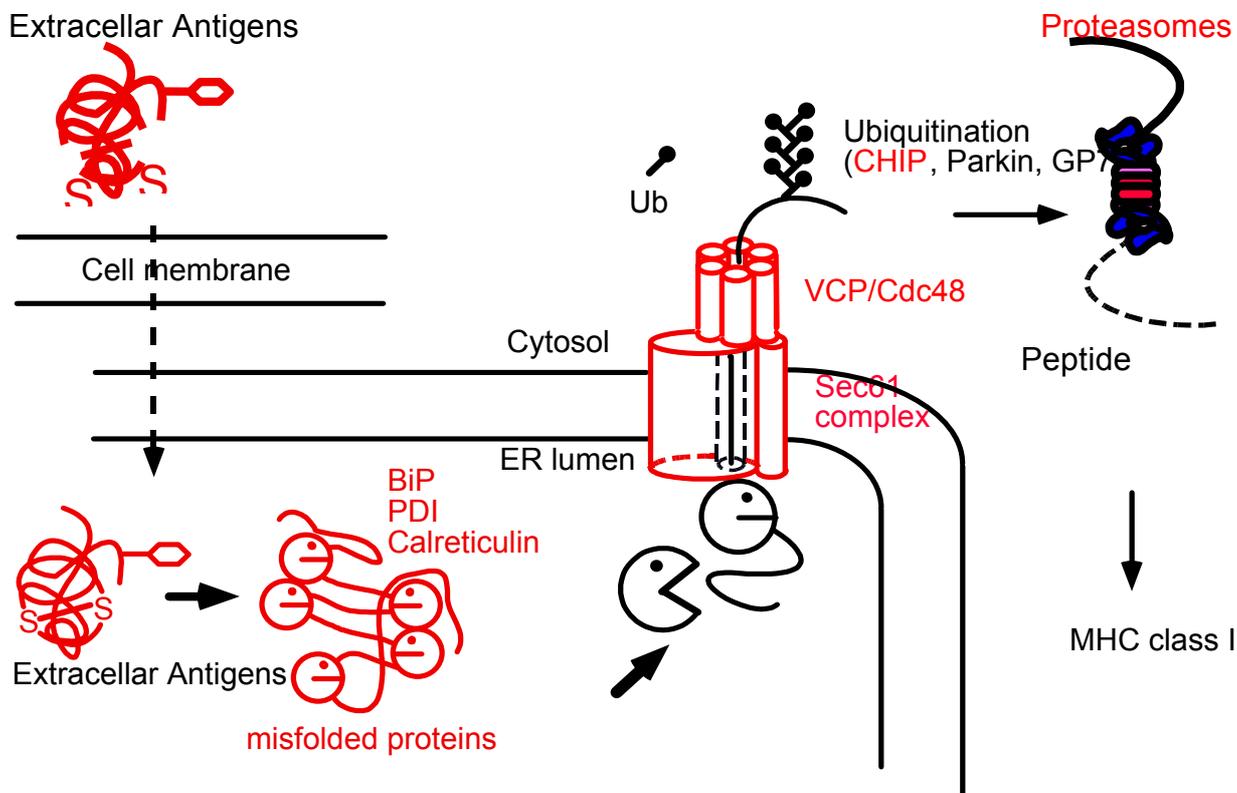
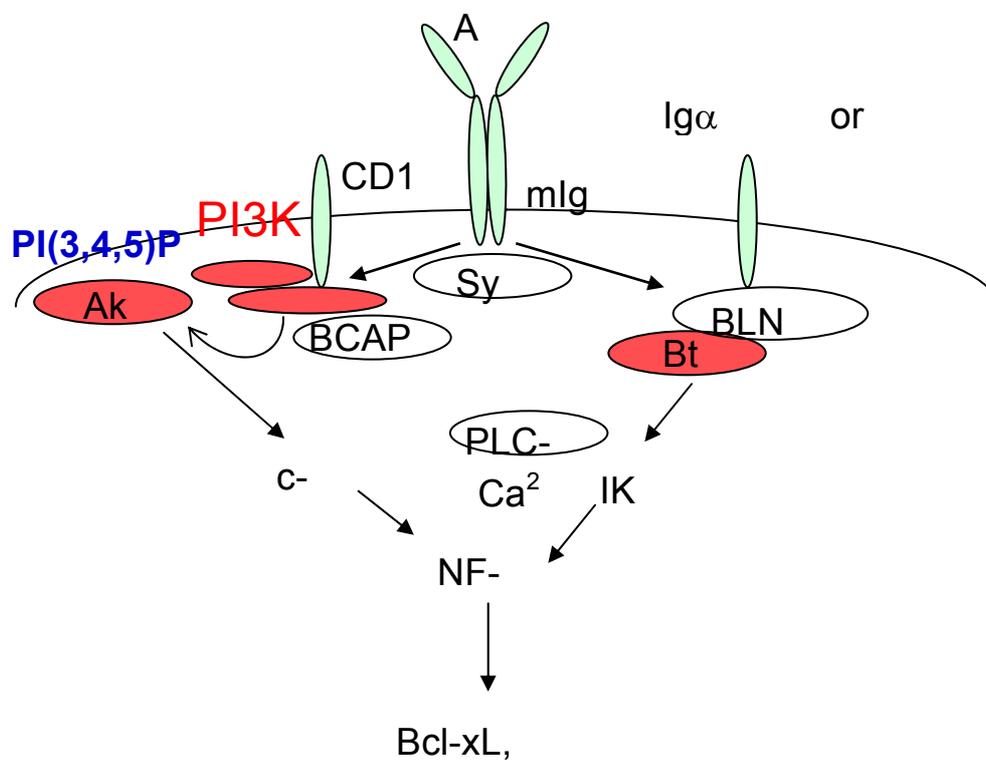


図2 B細胞におけるNF-κBの活性化に関する新しいモデル



### 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（原著論文）発表

- Matsuda, S., Miwa, Y., Hirata, Y., Minowa, A., Tanaka, J., Nishida, E. and Koyasu, S. (2004) Negative feedback loop in T cell activation through MAPK-catalyzed threonine phosphorylation of LAT. **EMBO J.** 23: 2577–2585.
- Aoki-Ota, M., Tsunoda, K., Ota, T., Iwasaki, T., Koyasu, S., Amagai, M. and Nishikawa, T. (2004) A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. **Br. J. Dermatol.** 151:346–354.
- Ota, T., Aoki-Ota, M., Tsunoda, K., Shimoda, K., Nishikawa, T., Amagai, M. and Koyasu, S. (2004) Auto-reactive B cells against peripheral antigen, desmoglein 3, escape from tolerance mechanism. **Int. Immunol.** 16:1487–1495.
- Esashi, E., Ito, H., Ishihara, K., Hirano, T., Koyasu, S., and Miyajima, A. (2004) Development of CD4<sup>+</sup> macrophages from intrathymic T cell progenitors is induced by thymic epithelial cells. **J. Immunol.** 173:4360–4367.
- Imai, J., Hasegawa, H., Maruya, M., Koyasu, S., and Yahara, I. (2005) Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells.

**Int. Immunol.** 17:45-53.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：2件）