

「免疫難病・感染症などの先進医療技術」

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た。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フォイノシタイド 3 キナーゼ (PI3K) 経路に注目した。腸管病原性大腸菌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。今後この経路を標的とした治療法の開発を試みる。

2. 研究実施内容

宿主が感染体に対して特異的な免疫反応を起動するためには、樹状細胞が感染体を貪食し、感染体由来の抗原を提示することが重要である。同時に Toll-like receptor (TLR) を介したシグナルに代表される自然免疫系の活性化も重要である。TLR を介した刺激により、樹状細胞は成熟して強い抗原提示能を持つと同時にインターロイキン 12 (IL-12) をはじめとする炎症性サイトカインを発現・分泌する。活性化された CD4 陽性 T 細胞は細胞性免疫反応を司る 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1)、あるいは液性免疫反応を司る 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) へ分化するが、IL-12 は Th1 の分化を誘導するために重要なサイトカインである。我々はこれまでに、脂質リン酸化酵素の一つであるフォスフォイノシタイド 3 キナーゼ (PI3K) が樹状細胞からの IL-12 の発現を負に制御することを明らかにしてきた。

EPEC は宿主側の Th2 反応による中和抗体の生産によって制御されるが、Th1 反応が優位に起こる場合には定着増殖して炎症や下痢などの症状が現れる。これは EPEC とほとんど同じ病原因子を持ち、マウス版 EPEC といえる *C. rodentium* を用いた感染実験を行うことで示すことができた。*C. rodentium* を Th2 反応が優位に誘導される BALB/c マウスに感染した場合には菌は速やかに排除され、炎症も誘導されないが、Th1 反応が優位に誘導される C57BL/6 あるいは B10.D2 マウスにおいては菌の増殖や定着とともに強い炎症と下痢が誘導される。EPEC や *C. rodentium* は III 型分泌装置 (type III secretion system: TTSS) を介して宿主細胞内に様々なエフェクター分子を導入し、宿主細胞の性質に変化を与えることが知られる。興味深いことに、EPEC は上皮細胞やマクロファージなどの宿主細胞と共培養した場合、活性化された PI3K が速やかに不活化されることが報告されている。これらの事実から、我々は「EPEC が樹状細胞の PI3K 活性を抑制することで IL-12

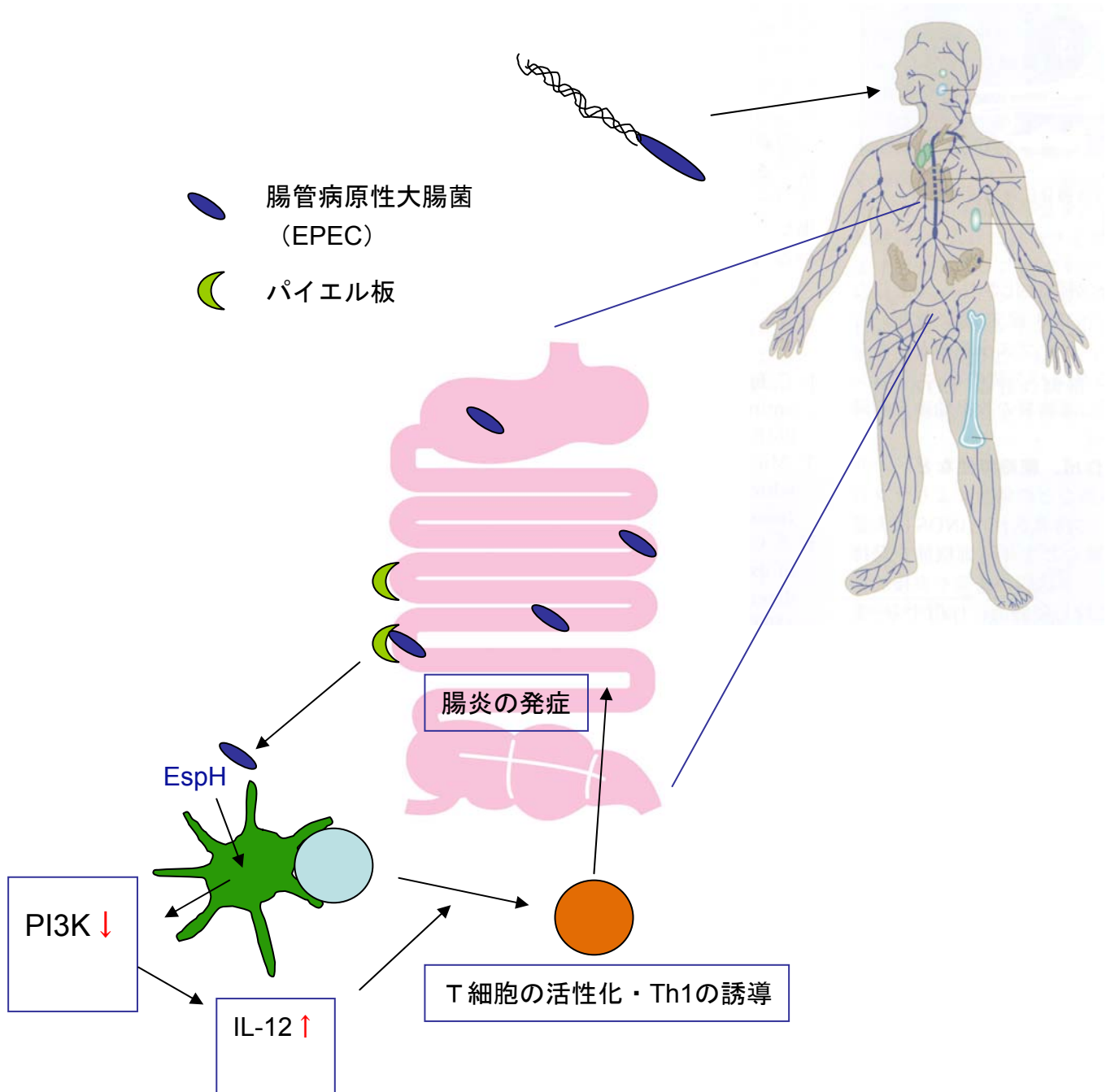
の発現を亢進し、自らに有利な Th1 反応を誘導する戦略をとる」という仮説を立て、これを実証するために一連の実験を行った。

樹状細胞と EPEC を共培養する系を用いて PI3K の活性化を下流の Akt のリン酸化を指標として検討したところ、樹状細胞においても一旦活性化された PI3K は速やかに不活化されることが明らかになった。この際に III 型分泌装置の変異によってエフェクターを宿主細胞に注入できない変異体を用いた場合には、非病原性大腸菌を用いた場合と同様に PI3K の長時間にわたる活性化が観察された。この事実は EPEC から注入されるエフェクターの中に PI3K 経路を抑制する因子があることを示唆する。そこで、EPEC の様々な変異体を検討し、espH 遺伝子の変異体を用いた場合に樹状細胞の PI3K-Akt 経路の不活化が起こらないことが明らかになった。さらに IL-12 の発現を検討したところ、espH 変異体との共培養で樹状細胞からの IL-12 の発現が低下することも示された。

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、*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。

以上の結果は、「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(次ページの図参照)。現在、espH 変異体の性質をさらに精査するとともに、EspH の性質を詳細に検討中である。EspH を用いることによって PI3K 経路に干渉することで Th1/Th2 反応の人為的な制御への道が開ける可能性があり、さらに研究を進めている。

図 EPEC 感染戦略に関する新しいモデル



3. 研究実施体制

小安グループ

- ①研究分担グループ長：小安 重夫（慶応義塾大学、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

- ①研究分担グループ長：笹川 千尋（東京大学医科学研究所、教授）
- ②研究項目：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

- ①研究分担グループ長：矢原 一郎（(株)医学生物学研究所 慶應リサーチパーク、所長／訪問教授）
- ②研究項目：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

- Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K. and Ichijo, H. (2005) ROS-dependent activation of TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. **Nat. Immunol.** 6:571-578.
- Yajima, T., Yoshihara, K., Nakazato, K., Kumabe, S., Koyasu, S., Sad, S., Shen, H., Kuwano, H. and Yoshikai, Y. (2006) IL-15 Regulates CD8+ T Cell Contraction during Primary Infection. **J. Immunol.** 176:507-515.
- 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.** 印刷中.

（2）特許出願

H17 年度出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：3 件）