

日本財団補助金による


1999年度日中医学協力事業報告書

—中国人研究者・医療技術者招聘助成—

財団法人 日 中 医 学 協 会
理 事 長 中 島 章 殿

2000年3月29日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招へい責任者 浅野喜博 
所属機関 愛媛大学医学部 職名 教授
所在地 〒791-0295 愛媛県温泉郡京浜町 電話 089-960-5272
招へい研究者氏名 劉鳳芝
所属機関 中国医科大学基礎医学院疫学教室 職名 講師
研究テーマ 感染症における自然疫源と獲得疫源の関わりに関する研究

2. 日本滞在日程

1999年1月12日 来日。(愛媛大学医学部外国人客員研究員)
1999年4月1日 愛媛大学大学院医学研究科博士課程入学。
現在に至る。

3. 研究報告

別紙書式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい(枚数自由・ワープロ使用)

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当たっては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

感染症における自然免疫系と獲得免疫系の関わりに関する研究

来日研究者氏名：劉 鳳芝

中国での所属・役職：中国医科大学基礎医学院免疫学教室・講師

招聘者氏名・所属・役職：浅野喜博・愛媛大学医学部・教授

要旨： 病原体感染におけるマクロファージ細胞を主とするinnate immunityの機能解析を行い、病原体の感染に際して早期に機能するinnate immunityの細胞群、特にマクロファージ系の細胞が、抗原提示機能を介して獲得免疫系を活性化するのみならず、その反応の方向をも規定している可能性を示した。このとき、獲得免疫系のT細胞の抗原特異性とは全く別の抗原性を持つ病原体の感染であっても、抗原特異的なT細胞の分化をコントロールしていること、すなわち、一種類の病原体の感染により免疫系全体がシフトすることが示された。したがって、マクロファージ系細胞の機能制御は、病原体感染における感染病態制御のために重要であると考えられる。

KEY WORDS：自然免疫系、獲得免疫系、病原体感染、抗原提示機能、T細胞の分化

研 究 報 告

研究目的：細菌・原虫感染の第一次防御線としてのマクロファージやNK細胞が、それ以後に続く第二次防御線としてのT細胞・B細胞を中心とする免疫系をコントロールしている。感染病原体の種類によりマクロファージ系細胞が異なる機序で異なる質の活性化を受ける可能性が考えられる。本研究では、生体防御における指令センターと云う視点からマクロファージ・NK細胞系のネットワークに焦点を当てて解析する。生体防御の指令センターをどの方向に向けるかを規定する刺激が何かを明らかにし、この刺激を人為的にコントロールすることにより、感染症の制御法の開発を目指す。

研究方法：1) 感染防御に作用する遺伝子の発現が障害されている遺伝子ターゲットマウスで、細菌感染と原虫感染で活性化される応答遺伝子を調べる。併せてマクロファージ・

NK細胞のネットワークでコントロールされているT細胞系の機能解析を行う。

2) 感染に伴うT細胞の機能的サブセットの分化を、病原体とは特異性の異なるT細胞レセプターを導入したトランスジェニックマウスを用いて解析する。これにより、病原体感染に伴い免疫系全体がどのような影響を受けるかを調べる。

3) 骨髄細胞をヘルパーウイルスフリー組み替え型レトロウイルスで形質転換し、マクロファージ系細胞株を樹立する。これを用いて、種々の病原体の感染実験を行い、ターゲットとなる感染初期遺伝子を分離・同定する。この遺伝子についてその発現調節機能や生体内における機能、特に、どの様にして生体の感染防御系をコントロールしているかを明らかにする。さらに、マウスにこの遺伝子を導入、あるいは欠損させ、感染病態に対する影響を調べる。

これら一連の解析により、感染防御における初期応答遺伝子の機能を明らかにすると共に、細菌・原虫感染における第一次防御線としてのマクロファージ系細胞・NK細胞ネットワークが、どの様な機序で、T細胞・B細胞を中心とする第二次防御線のコントロールセンターとして機能しているかを明らかにするとともに、その制御法を開発する。

研究結果：1) IRF-1遺伝子欠損マウスではタイプ1 T細胞反応に異常がある。病原体の感染防御にはマクロファージそのものの活性化は重要であるが、さらに、マクロファージを活性化するタイプ1 T細胞が感染抵抗性を賦与することを考えあわせると、IRF-1遺伝子欠損マウスではタイプ1 T細胞型の免疫応答が障害されている可能性も考えられる。

IRF-1は転写因子として、上述したように免疫応答に関与している重要な複数の遺伝子の転写を調節している。そこで、T細胞サブセット分化に関わる遺伝子に関して検討したところ、以下のようにタイプ1 T細胞への分化のキー分子であるIL-12遺伝子の発現をもコントロールしていることが明らかになった。

ア) IL-12遺伝子の発現障害によるタイプ1 T細胞サブセットへの分化障害。

リステリア菌、百日咳菌、リーシュマニア原虫感染におけるIRF-1遺伝子欠損マウスとその野生型マウスのT細胞サイトカイン応答を比較した。野生型マウスでは強いIFN γ 産生が認められ、タイプ1 T細胞反応が起きている。これに対して、IRF-1遺伝子欠損マウスでは、IFN γ 産生が低く、IL-4産生が高い。したがって、このマウスでは、本来起きるはずのタイプ1 T細胞の誘導が起きず、むしろ、T細胞反応はタイプ2 T細胞サブセットの誘導へと偏りを示していることが分かる。これらの結果は、菌の増殖カーブお

よび足蹠の腫脹から推測された様に、IRF-1遺伝子欠損マウスでは感染に伴い、本来感染に抵抗するためにマクロファージの機能を活性化するのに必要なタイプ1T細胞反応が起きず、T細胞サブセットがタイプ2T細胞サブセットに偏っていることを示している。

それではなぜIRF-1遺伝子欠損マウスでこのようなT細胞サブセットの偏りが生じるのかである。マクロファージからのIL-12産生は、LPSとIFN γ とにより誘導される。そこで、IRF-1欠損マウスでのIL-12遺伝子発現を調べると、全く検出できなかった。TNF α 遺伝子の発現が野生型と同程度に認められることから、LPSによるマクロファージの活性化は正常に起こっていると考えられる。この点は、IL-12遺伝子プロモーター部分を用いたルシフェラーゼ法およびゲルシフト法により、IL-12 p40遺伝子プロモーター部分にIRF-1結合部位があることが示され、したがって、IL-12遺伝子発現の差は転写レベルでの差であり、IRF-1分子がIL-12 p40遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。

イ) マラリア原虫感染。

ネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) 感染で調べてみると、IL-12の遺伝子の発現が障害されているはずのIRF-1遺伝子欠損マウスでも、IFN γ 産生T細胞が誘導されることが明らかになった。*P. berghei*感染を見ると、IRF-1遺伝子欠損マウスでも野生型とほぼ等しい程度にIFN γ 産生T細胞が誘導されている。マラリア原虫感染マクロファージを刺激したときのIL-12遺伝子の発現を調べると、非感染マウスに比べて、遺伝子発現の転写レベルでの抑制が認められる。この機序は現在解析中でまだ不明であるが、麻疹ウイルス感染時に認められる転写レベルでのIL-12遺伝子発現抑制に似た機序であろうと考えている。これらのことは、タイプ1/タイプ2T細胞サブセット分化過程にIL-12の関与しない経路が存在することを示唆している。

さらに、マラリア原虫やいくつかの病原体に対する反応では、IRF-1遺伝子欠損マウスでIL-4産生細胞の誘導が等しく認められる。このことは、このIL-12非依存性の経路は、タイプ1/タイプ2T細胞サブセットへの従来から知られている誘導経路とは独立して機能していることを示唆している。この点に関しては今後さらに解析を進める予定である。

2) T細胞サブセットの分化はマクロファージ系細胞のレベルで抗原非特異的にコントロールされている。

ア) マクロファージ系細胞の添加による機能の補償。

IRF-1遺伝子ノックアウトマウスと野生型マウスのT細胞サブセットを、非感染の状態（ナイーブ）で調べると、2つの系統でIFN γ 産生およびIL-4産生の程度に違いは認められなかった。すなわち、T細胞サブセットの偏りは認められないこと、換言すれば、ナイーブな状態ではTh0タイプ（pTh）までの分化はIRF-1遺伝子欠損マウスでも正常に起こっていると考えられる。したがって、T細胞サブセットの偏りの原因はナイーブT細胞が外部からの刺激によりpThから分化する過程にあり、しかも、T細胞そのものには差が認められないことから、T細胞と抗原提示細胞間の問題である可能性が考えられる。

ここまで見てきたIRF-1遺伝子欠損マウスで認められる機能的T細胞サブセットへの分化障害がIL-12の誘導が起きないためだけによるものであれば、IL-12を外因性に投与することによりT細胞サブセットの偏りを是正することが可能になると考えられる。そこで、病原体を投与するときにリコンビナントIL-12を共投与してIFN γ の産生誘導が野生型で起きる条件で、遺伝子欠損マウスにIL-12を共投与してみたところ、T細胞サブセットの偏りを正すことが出来なかった。しかし、野生型マウスから得たマクロファージを共投与すると、この偏りが是正された。したがって、遺伝子欠損マウスのT細胞そのものは正常に機能的分化を起こし得る状態にあるが、これを誘導するシステムが異常であると考えられる。この異常の原因は、単にIL-12遺伝子の誘導が起きないためよりは、タイプ1T細胞誘導に作用するIL-12を含めた未知のシステムがマクロファージ系の細胞に内在するためと考えられる。

Innate immunityに関わるマクロファージ系細胞以外の細胞群はどのように関与してくるかをであるが、IRF-1遺伝子欠損マウスでは、NK細胞の分化障害が認められている。もしNK細胞がキーとなる細胞であるとすれば、上記のマラリア感染でタイプ1T細胞が誘導され、しかもタイプ2T細胞の分化が認められることの説明ができない。さらに、NK1.1+T細胞のレセプターで特異的に使われる遺伝子を欠損しているためにNKT細胞が存在しないマウス（千葉大学大学院、谷口克教授より供与）を用いても、病原体感染によりタイプ1T細胞の誘導が認められる。したがって、innate immunityの中で病原体感染時のT細胞サブセット分化に重要な役割を演じるのは、マクロファージ系細胞である可能性が強く示唆される。

イ) 一種類の病原体の感染により免疫系全体が、抗原特異性は問わず、シフトする。

T細胞の活性化にはT細胞レセプターに特異的な抗原の存在が必要であり厳密に抗原特異的な反応である。一方、innate immunityの細胞群の活性化にはこのような抗原特異性

が見られない。この性質を利用して、病原体感染により誘導されるT細胞サブセットの偏りが、どのレベルで決定されるかを解析することができる。そこで先ず、OVA特異的CD4 T細胞クローンのT細胞レセプタートランスジェニックマウスにリステリア菌を感染させ、このTCRトランスジェニックマウスT細胞を、非感染のマウスから調整したマクロファージ系細胞（抗原提示細胞）と特異的抗原（OVA）ペプチドにより*in vitro*で培養し、OVA特異的T細胞サブセットのシフトを調べた。この*in vitro*の培養は、pTh→Th1/Th2の抗原特異的なステップを解析することになる。

非感染マウスのT細胞は、この*in vitro*の培養により、タイプ2T細胞が優位に誘導されたが、感染マウスのT細胞からは、タイプ1T細胞が優位に誘導された。また、この変化は、感染マウスの抗原提示細胞を用いて非感染マウスT細胞を刺激した場合にも認められることから、抗原提示細胞のレベルでコントロールされていると考えられる。抗原提示細胞がタイプ1/タイプ2T細胞の増殖反応を誘導する活性には、感染マウスと非感染マウスとの間に差が認められない。さらに、感染マウス・非感染マウスで認められるタイプ1T前駆細胞およびタイプ2T前駆細胞の頻度を調べたところ、非感染マウスではタイプ2T前駆細胞の頻度が高く、感染によりこの頻度が下がり、逆にタイプ1T前駆細胞の頻度が上昇することが明らかになった。したがって、病原体感染により誘導されるT細胞サブセットのシフトは、innate immunityの細胞おそらくはマクロファージ系細胞により、抗原非依存性にコントロールされていると考えられる。ここで重要なことは、獲得免疫系のT細胞の抗原特異性（OVA）とは全く別の抗原性を持つ病原体の感染であっても、OVA抗原特異的なT細胞の分化をコントロールしていることである。このことは、一種類の病原体の感染により免疫系全体が、抗原特異性は問わず、シフトすることを意味している。

考察：IL-12はタイプ1T細胞分化には必須の因子と考えられている。ところが、必ずしもIL-12が存在しなくてもタイプ1T細胞が誘導されることが明らかになってきた。この点は、ここに述べた我々の解析の他にも、幾つかのグループの解析結果でも示唆されている。また、ここに示した結果は、タイプ1T細胞の誘導経路に、IL-12の存在を必要としない、従来のタイプ1/タイプ2T細胞サブセット誘導経路と独立に機能する経路が存在することを示唆している。さらに、TCRトランスジェニックマウスを用いた感染実験からは、T細胞サブセットのシフトをコントロールしているのはマクロファージ系細胞である可能性が強く示唆された。病原体の感染に際して早期に機能するinnate

immunityの細胞群、特にマクロファージ系の細胞が、抗原提示機能を介して獲得免疫系を活性化するのみならず、その反応の方向をも規定している可能性を考えさせる。どのような分子がこのような機能を果たしているかを明らかにすることが次の目標である。

株化マクロファージを樹立して行う解析は、現在いくつかの株化マクロファージが得られつつある。細胞の由来の解析を行った後、研究方法の3で述べた解析を順次進める予定である。また、感染・非感染マクロファージ間で発現に差のある遺伝子の解析は、RDA法とシグナル配列トラップ法を組み合わせを行っているが、まで遺伝子の同定には至っていない。

参考文献：

1. Lamphier M and Taniguchi T : The transcription factors IRF-1 and IRF-2. *Immunologist* 2, 167-171, 1994.
2. Ogasawara K, Hida S, Azimi N, et al : Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 391, 700-703, 1998.
3. Feng, C., et al. An alternative pathway for type 1 T cell differentiation. *Int. Immunol.* 11, 1185-1194, 1999.
4. Taki, S., et al. Multistage regulation of Th1-type immune responses by the transcription factor IRF-1. *Immunity* 6, 673-679, 1997.
5. Kamijo R, Harada H, Matsuyama T et al. : Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263, 1612-1615, 1994.
6. Reiner SL and Locksley RM : The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13, 151-177, 1995.
7. Lohoff M, Ferrick D, Mittrucker HW, et al : Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo. *Immunity* 6, 681-689, 1997.
8. Karp, C. L., et al. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* 273, 228-231, 1996.
9. Sutterwala, F. S., Noel, G. J., Clynes, R., & Mosser, D. M. Selective suppression of Interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J. Exp. Med.* 185, 1977-1985, 1997.

10. Fehr, T., et al. Crucial role of interferon consensus sequence binding protein, but neither of interferon regulatory factor 1 nor of nitric oxide synthesis for protection against murine listeriosis. *J. Exp. Med.* 185, 921–931, 1997.
11. Ohteki T, Yoshida H, Matsuyama T, et al : The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1⁺T cell receptor- α / β ⁺ (NK1.1⁺T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells. *J Exp Med* 187, 967–972, 1998.
12. Murphy, K. M., Heimberger, A. B., & Loh, D. Y. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes *in vivo*. *Science* 250, 1720–1723, 1990.