

## 樹状細胞の病原菌反応機構の解明とその応用

●菊地 利明

東北大学病院

### 〈研究の目的と進め方〉

これまでわれわれは、樹状細胞が感染免疫応答に重要な抗原提示細胞であることに着目して研究を行ってきた。この研究過程で、樹状細胞に元来発現している分子でもその機能は十分ではなく、それを外因性の強発現で補うことにより、樹状細胞の免疫応答能は増強され得るという着想に至った。また、樹状細胞は種々の病原菌に対し貪食作用を示すことや、取り込んだ病原菌に応じて免疫応答を惹起することが報告されている。そこで当該研究提案では、SAGE (serial analysis of gene expression) 法を用いることにより、病原菌に応じて樹状細胞がとる反応を、細胞内遺伝子発現量の変化としてホールゲノムで解析し、感染免疫応答のために、外来性強発現で補うべき樹状細胞の新規発現分子のスクリーニングを行う。そしてその結果を元に、遺伝子改変樹状細胞による新規感染症ワクチンの開発を行う。その成果は、樹状細胞本来の免疫応答能を強化させたスーパー樹状細胞の創製という、難治性感染症対策に対する新たなパラダイムの構築につながるだけでなく、感染免疫応答時に樹状細胞内で働く遺伝子ネットワークの解明という、知的資産の形成にも寄与するものと考ええる。

### 〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 病原菌としてレジオネラ菌を取り上げ、病原菌を取り込んだ樹状細胞の形質変化を、樹状細胞から産生分泌されるサイトカインと、樹状細胞の表面形質の変化において調べる。測定するサイトカインは、IL-6・IL-10・IL-12・TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) 等で、市販のELISAキットにより定量化する。また表面形質の変化は、樹状細胞の成熟度マーカーを中心として、MHC class II・CD40・CD80・CD86等の発現をフローサイトメトリーで測定する。以上の実験を様々な条件で行い、病原菌が樹状細胞に取り込まれるのに最適な病原菌と樹状細胞の比、病原菌と樹状細胞の培養時間、および樹状細胞の形質変化が最もダイナミックとなるタイムポイントを決定する。
- 2) 1) で決定した条件で、病原菌を取り込んだ樹状細胞の遺伝子発現変化を、SAGE法を用いて解析する。

### 〈研究期間の成果〉

1) レジオネラ菌を不活化させ、これを樹状細胞に取り込ませることによって、樹状細胞のMHC class II、CD40、CD54、CD80、CD86の表面形質は発現が増加し、IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ のサイトカイン分泌量も増加した。しかし、このような樹状細胞の活性化は、レジオネラ菌の生菌を取り込んだ樹状細胞では認められず、レジオネラ菌の生菌により、樹状細胞の成熟化は逆に阻害された。また、不活化レジオネラ菌をパルスした樹状細胞でマウスを免疫すると、コントロールのマウスに比し、有意にレジオネラ菌の気道感染に対し耐性を示すようになった。一方、レジオネラ菌の生菌をパルスした樹状細胞で免疫したマウスは、レジオネラ菌の気道感染に対し、弱い耐

性しか示さなかった。以上の結果から、レジオネラ菌の死菌と生菌を取り込んだ樹状細胞は、それぞれ異なる免疫応答を惹起することが、*in vitro*と*in vivo*において明らかとなった。

2) 不活化レジオネラ菌を取り込ませた樹状細胞 (iDC) とナイーブな樹状細胞 (nDC) から、それぞれmRNAを抽出し、SAGEライブラリーを構築した。nDCライブラリーからは14011タグのシークエンスを、iDCライブラリーからは15275タグのシークエンスを、それぞれ決定し比較した。その結果nDCに比し、iDCで2倍以上の発現上昇が認められた遺伝子を664個、iDCで2分の1以下の発現低下が認められた遺伝子を819個、nDCに比しiDCで2分の1以上2倍以下と、nDCとiDCで発現が不変の遺伝子を1332個それぞれ同定した。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

樹状細胞は、さまざまな病原菌を取り込むことによって、成熟化することが報告されている。しかし、*Y. enterocolitica* や *T. cruzi* のように、樹状細胞の成熟化を逆に阻害する病原微生物も一部には報告されており、病原菌が宿主免疫応答を逃れる一つの機構と考えられている。「研究期間の成果」1) の結果から、レジオネラ菌もこのような病原菌の一つであると考えられた。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

「研究開始時の研究計画」1) を実施し、レジオネラ菌の生菌と死菌では、これらを取り込んだ樹状細胞が、異なる免疫応答を引き起こすという予想外の結果が得られた。そのため、その後のSAGE法による解析においても、レジオネラ菌の生菌と死菌で、樹状細胞の遺伝子発現を比較する必要が生じた。しかし、時間的な制約から、死菌を取り込ませた樹状細胞とナイーブな樹状細胞間の比較のみを行った。

### 〈今後の課題〉

レジオネラ菌の生菌を取り込んだ樹状細胞からもSAGEライブラリーを構築し、死菌を取り込ませた樹状細胞やナイーブな樹状細胞との比較を行う必要がある。

### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文／プロシーディング (査読付きのものに限る)  
0404031306  
Kikuchi, T., Kobayashi, T., Gomi, K., Suzuki, T., Tokue, Y., Watanabe, A., and Nukiwa, T., Dendritic cells pulsed with live and dead *Legionella pneumophila* elicit distinct immune responses. *J. Immunol.*, 172, 1727-1734 (2004).
- 2) データベース／ソフトウェア 特記事項なし
- 3) 特許など 特記事項なし
- 4) その他顕著なもの 特記事項なし