

琉球大学学術リポジトリ

結核菌の肺感染局所における免疫システムの解明と 新たなワクチン開発への応用

メタデータ	言語: 出版者: 松崎吾朗 公開日: 2007-03-01 キーワード (Ja): 肺結核, T細胞, T細胞抗原レセプター, トランスジェニックマウス, 防御免疫 キーワード (En): 作成者: 松崎, 吾朗, 新川, 武, 梅村, 正幸, Matsuzaki, Goro, Arakawa, Takeshi, Umemura, Masayuki, 松崎, 吾朗 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/100

研究成果報告書

結核菌の肺感染局所における免疫システムの解明
と新たなワクチン開発への応用

1 6 5 9 0 3 6 5

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C))研究成果報告書

平成18年 5月

研究代表者 松 崎 吾 朗

琉球大学・遺伝子実験センター・教授

〈はしがき〉

結核は、人類の生命に対して最大の脅威となっている感染症の一つであり、早急な対策が必要とされている。しかし、成人の肺結核を効率よく予防するワクチンの開発は難航している。これは、結核菌が感染した肺での免疫応答の制御機構がいまだに解明されていないことが一因であると考えられた。これが解明できれば、肺で有効な防御免疫を誘導するワクチンをデザインすることが可能になるものと期待されたため、本研究は、結核菌の肺感染局所における免疫システムの解明を目的として計画された。

研究組織

研究代表者：松崎吾朗（琉球大学遺伝子実験センター・教授）

研究分担者：新川 武（琉球大学遺伝子実験センター・助教授）

研究分担者：梅村正幸（琉球大学遺伝子実験センター・助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2,000,000	0	2,000,000
平成17年度	1,600,000	0	1,600,000
総計	3,600,000	0	3,600,000

研究発表

（1）学会誌等

Inagaki-Ohara, K. et al. Mucosal T cells bearing $\gamma\delta$ T-cell receptor play a protective role in intestinal inflammation. *J. Immunol*, 173, 5156-5164, 2004.

Umemura, M. et al. Involvement of IL-17 in Fas ligand-induced inflammation *Int. Immunol.*, 16, 1099-1018, 2004.

Tagawa, T. et al. V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells producing CC chemokines may bridge a gap between neutrophils and macrophages in innate immunity during *Escherichia coli* infection in mice. *J. Immunol.*, 173, 5156-5164, 2004.

Tsuji, N. et al. Recombinant *Ascaris* 16-kDa protein induces protection against *Ascaris suum* larval migration following intranasal vaccination in pigs *J. Infect. Dis.*, 190, 1812-1820, 2004.

Inagaki-Ohara, K. et al. Intraepithelial lymphocytes express junctional molecules in murine small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 331, 977-983, 2005.

Kidoya, H. et al. Fas ligand induces cell-autonomous IL-23 production in dendritic cells, a mechanism for Fas ligand-induced IL-17 production. *J. Immunol.*, 175, 8024-8031, 2005.

(2) 口頭発表

梅村正幸, 矢作綾野, Dilara Mst. Begum, 浜田聡, 渡部久実, 須田貴司, 松崎吾朗 *Mycobacterium bovis* BCG 感染における IL-17 の誘導機構の検討. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 (札幌) 2004/12

梅村正幸、矢作綾野、浜田聡、Dilara Begum、松崎吾朗. マイコバクテリアに対する感染防御における IL-17 の重要性. 第 78 回日本細菌学会総会 (東京) 2005 年 4 月 4-6 日

矢作綾野、梅村正幸、Dilara Begum、浜田聡、田村敏生、高津聖志、松崎吾朗. 結核肺感染局所における T 細胞免疫応答の制御機構の解析. 第 78 回日本細菌学会総会 (東京) 2005 年 4 月 4-6 日

Umemura, M., Yahagi, A., Hamada, S., Begum, D., Ohshiro, K., Arakawa, T., Matsuzaki, G. Role of interleukin-17 in induction of an antigen-specific T cell response to mycobacterial infection. 第 35 回日本免疫学会総会 (横浜)

2005年12月13-15日

梅村正幸、矢作綾野、浜田聡、Dilara Mst. Begum、渡部久実、松崎吾朗. Mycobacteria 感染における IL-17 の生体防御機構の解明. 第16回日本生体防御学会(東京) 2005年8月5日

矢作綾野、梅村正幸、小濱秀泰、Begum, D. M., 浜田聡、大城清哲、田村敏生、高津聖志、松崎吾朗. 肺における結核菌抗原特異的 Th1 型免疫応答の解析. 第4回感染症若手研究者沖縄フォーラム(沖縄) 2006年1月13-15日

矢作綾野、梅村正幸、小濱秀泰、Dilara Mst Begum、浜田聡、大城清哲、田村敏生、高津聖志、松崎吾朗. 肺における結核菌抗原特異的 T1 h1 型免疫応答制御: TCR トランスジェニックマウスを用いた解析. 第79回日本細菌学会総会(金沢) 2006年3月29日

梅村正幸、矢作綾野、浜田聡、Dilara Begum、松崎吾朗. Mycobacterium bovis BCG 感染に対する獲得免疫応答および肉芽種形成に及ぼす IL-17 の影響. 第79回日本細菌学会総会(金沢) 2006年3月29日

(3) 出版物 なし

研究成果

<緒言>

結核は結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* を原因菌とする慢性の感染症であり、世界中で最も重大な生命に対する脅威の一つとして位置づけられる。その予防として、弱毒株である *M. bovis* Bacille de Calmette et Guérin (BCG) の皮下接種が行なわれており、日本では BCG 東京株が 1942 年から集団接種されている。しかし、感染予防効果、特に肺結核に対する予防効果については、厳密な疫学的証拠があるのかどうか明確で無いまま長年大きな問題もなく使用されてきた¹⁾。一般的に BCG は粟粒結核などの播種性の結核菌感染症の予防には有効と考えられている²⁾。しかし、BCG 接種の結核予防に関しての疫学調査では、その防御率は 80~90% と幅広く、また、インドにおける大規模な調査では肺結核に対する感染予防効果が認められなかったため、その有効性は疑問視されている^{3,4)}。従って、肺結核を予防するためには、確実に成人の肺結核を予防しうる次世代ワクチンの開発が必須である。

結核菌は気道から吸入されると、単球由来の肺胞マクロファージにとりこまれ、食胞内で生存・増殖する。一方、宿主は結核菌抗原特異的 Th1 型免疫応答により、結核菌感染細胞の周囲に肉芽腫を形成して結核菌を封じ込めるとともに、食細胞系を活性化して殺菌作用を増強し、菌の排除を促進する。このときに Th1 型 T 細胞が産生する IFN- γ は、マクロファージの殺菌作用増強における最も重要なサイトカインである^{5,6)}。しかし、結核菌が感染した肺で Th1 型免疫応答の誘導を制御するメカニズムについては、不明な点が多い。通常の組織では、病原体が侵入すると、直ちに樹状細胞が抗原を取り込み、近傍の所属リンパ節に移動して T 細

胞に抗原を提示することで免疫応答が開始される。しかし、肺ではリンパ節に依存しないで免疫応答が誘導される例も報告されており、この場合の免疫応答の場合は肺に形成される誘導型細気管支関連リンパ組織 (inducible bronchus-associated lymphoid tissue、iBALT)であった⁷⁾。また、肺の樹状細胞が長期に抗原を維持して肺での T 細胞活性化に関与する可能性が報告されている⁸⁾。しかし、このような肺特異的な免疫応答が、肺結核に対する防御免疫誘導においても認められるか解明されていない。

今回我々は、結核菌感染に対する肺での感染防御免疫について解明するために、主要な結核菌抗原の 1 つである Ag85B を特異的に認識する CD4⁺ T 細胞クローンの T 細胞レセプター(TCR)遺伝子を発現するトランスジェニック(P25-TCR Tg)マウスを用いて、結核菌肺感染の際の結核菌抗原特異的 T 細胞の追跡システムを構築し、Th1 型免疫応答の動態を解析した。

<材料および方法>

1. 細菌と感染

結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株および *M. bovis* BCG 東京株を本研究に用いた。結核菌は、ミドルブルック 7H9 液体培地で培養し、培養2週間後に集菌し、0.05% Tween80 を含む PBS に懸濁したうえで、使用するまで-80℃で保存した。BCG は BCG ワクチン(日本ビーシージー、東京)を購入し、使用した。菌は、それぞれ PBS で必要濃度に希釈した。10² CFU または 10⁴ CFU の結核菌、あるいは 5x10⁶ CFU の BCG を 100 μl の PBS に懸濁し、マウスに経気道的に接種することにより肺

感染させた。結核菌死菌は H37Ra 株のホルマリン固定死菌(BD Bioscience、Franklin Lakes、NJ)を用い、その 50 μg を結核菌抗原 PPD(日本ビーシージー)、50 μg とともに経気道接種した。また、BCG を皮内接種する場合は、50 μl の PBS に懸濁して、足蹠に皮下注射した。

2. マウス

本研究に用いた P25-TCR トランスジェニック(P25-TCR Tg)マウスは、東京大学医科学研究所・高津聖志教授より供与していただいた。P25-TCR Tg マウスは、MHC クラス II I-A^b 拘束性、結核菌抗原 Ag85B エピトープ(ペプチド 25(P25))特異的 T 細胞クローン BP1 よりクローニングした T 細胞レセプター(TCR) α 鎖および β 鎖 cDNA を H-2K^b promoter の下流にクローニングし、C57BL/6 マウスの受精卵に microinjection することによって作成した⁹⁾。P25-TCR Tg マウスと白血球マーカー Ly5 のアレルが異なる C57BL/6 Ly5.1 コンジェニックマウスは九州大学生体防御医学研究所の吉開泰信教授より供与していただいた。今回の研究では、8-12 週齢のマウスを使用した。

Tg T 細胞移入マウスは、以下の方法で作成した¹⁰⁾：P25-TCR Tg マウスからナイロンウール法で分離した T 細胞を C57BL/6 Ly5.1 コンジェニックマウスに静脈注射により養子移入した。翌日、結核菌(1×10^2 CFU)を経気道感染させた。感染後、経時的に肺、肺所属リンパ節、脾臓の細胞を分離し、CD4⁺ Tg T 細胞の活性化マーカー CD69 発現をフローサイトメトリーにて解析した。さらに、Ag85B を含む結核抗原 PPD 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の存在下で *in vitro* 刺激し、20 時間後の Ag85B 特異的 CD4⁺ Tg T 細胞の IFN- γ 産生を細胞内サイトカイン染色法にて検出した。

正常 T 細胞移入 P25-TCR Tg マウスは以下の方法で作成した：無処置 C57BL/6 Ly5.1 コンジェニックマウスの脾細胞を P25-TCR Tg マウスへ

養子移入した。翌日、結核菌(1×10^4 CFU)、BCG(5×10^6 CFU)、または結核死菌(50 μ g)+PPD(50 μ g)を経気道的に接種した。接種後、経時的に肺、肺所属リンパ節、脾臓からの細胞を採取し、上記の方法で解析した。

3. 細胞培養およびフローサイトメトリー(FCM)

リンパ節細胞および脾細胞は、リンパ節および脾臓をスライドグラスで押しつぶすことにより作成した。肺浸潤細胞は、肺を collagenase (Invitrogen、Carlsbad、CA)、hyaluronidase (Sigma-Aldrich、St. Louis、Mo) および DNase (Sigma-Aldrich) で 37°C、1 時間消化して細胞懸濁液とし、さらに Percoll (Amersham Biosciences、Piscataway、NJ) の密度勾配遠心 (67.5% および 45%) によりリンパ球を分離することにより調整した。新鮮な細胞は Fc-blocker (抗 CD16/32 抗体) で前処理した後、以下の抗体で染色した：biotin 標識抗 P25 TCR idotype 抗体(KN7、東京大学医科学研究所の高津聖志教授より供与)、allophycocyanin 標識抗 CD4 抗体(BD Bioscience)、FITC 標識抗 CD69 抗体(BD Bioscience)、allophycocyanin 標識抗 TCR β 抗体(BD Bioscience)。染色後、1%パラホルムアルデヒドで固定し、FACSCalibur フローサイトメーター(BD Bioscience)にて FCM 解析した。また、調製した細胞を 10%牛胎仔血清添加 RPMI1640 培地 (Invitrogen) に 5×10^6 個/ml に再懸濁し、in vitro で 20 時間、PPD の存在下あるいは非存在下で培養した。培養の最後 6 時間に GolgiPlug(BD Bioscience) を添加した。この培養細胞を、biotin 標識抗 Ly5.2 抗体(BD Bioscience) 又は biotin 標識抗 P25 TCR idotype 抗体、allophycocyanin 標識抗 CD4 抗体で染色後、Cytofix/Cytoperm 液(BD Bioscience) で固定、Perm/wash 液(BD Bioscience) で permialization し、さらに、FITC 標識抗 IFN- γ 抗体で細胞内染色し FCM 解析した。

<結果>

1. P25-TCR Tg マウスの T 細胞の表現型

まず、本研究で用いる P25-TCR Tg マウスの T 細胞の表現型を確認するため、無処置 P25-TCR Tg マウスの脾臓を FCM で解析した。P25-TCR Tg T 細胞特異的抗イデオタイプ抗体である KN7 で染色を行なったところ、KN7⁺ 細胞はリンパ球の 27% であり、そのうち TCRβ⁺ 細胞は 99% 以上、CD4⁺ 細胞分布は 78% であった(図 1)。また、CD4⁺ T 細胞の 87% 以上が KN7 を発現していた。

2. Tg T 細胞移入マウスの結核菌感染における Ag85B 特異的 CD4⁺ T 細胞の動態

結核菌抗原特異的 CD4⁺ T 細胞の活性化と機能獲得を経時的に追跡するため、P25-TCR Tg マウスから調整した T 細胞を C57BL/6 Ly5.1 コンジェニックマウスに移入した Tg T 細胞移入マウスを作成した(図 2-a)。このマウスに結核菌を肺感染させると、各臓器から少ないながら Tg T 細胞が検出された(図 2-b)。Tg T 細胞数は、経時的に減少する傾向を示した(図 2-c)が、Tg T 細胞の活性化マーカー CD69 発現の割合は増加を示し、肺浸潤細胞で感染 28 日に、所属リンパ節細胞では 14 日目にピークを示した(図 3-a、b)。しかし、脾臓では、Tg T 細胞の CD69 発現に関する明確な動きは認められなかった。一方、Tg T 細胞の Th1 型機能獲得の指標として検討した抗原特異的 IFN-γ 産生は、肺浸潤細胞で 14 日目から検出、脾細胞で 28 日目に検出された(図 4-a、b)。以上の結果から、結核菌肺感染後の肺では、通常の組織とは異なり、結核菌抗原特異的免疫応答の誘導と Th1 型 T 細胞の分化に 2 週間以上の時間が必要であることが示唆された。しかし、このシステムでは、Tg T 細胞数が少なく、かつ Tg T 細胞中の IFN-γ 産生細胞の割合が低いこと(図-3a、4a)、肺所

属リンパ節の細胞数が特に少ないこと（図 4-b）から、安定した検出と解析が困難であった。これは、肺では Tg T 細胞が抗原認識しても速やかに反応できないために、感染後初期のクローン増殖が十分に起こらず、経時的に新たに分化してくる宿主側の T 細胞に希釈されてしまうために起こる現象ではないかと推定された。そこで、改めて肺における T 細胞活性化のカイネティックスを検討するシステムを検討した。

3. 正常 T 細胞移入 P25-TCR Tg マウスのリンパ節における Ag85B 特異的免疫応答

上述したように、Tg T 細胞移入マウスでは Tg T 細胞数が少ないため、詳細な解析が困難であった。そこで、肺における免疫応答が弱くても Tg T 細胞の活性化を検出できるシステムを検討した。P25-TCR Tg マウスに直接結核菌を感染させれば、解析に十分な数の Tg T 細胞が肺より得られると考えられた。しかし、それだけでは、Ag85B 以外の抗原に反応する通常 T 細胞レポーターが欠失することになるため、正常の免疫応答とは異なる結果となる可能性が考えられた。そこで、P25-TCR Tg マウスに C57BL/6 Ly5.1 マウスの脾細胞を移入することにより P25-TCR Tg マウスに正常の T 細胞レポーターを追加し、Ag85B 以外の抗原に対しても免疫応答が可能なマウス（正常 T 細胞移入 P25-TCR Tg マウス、図 5-a）を作成した。

まず、このマウスの肺外での Ag85B に対する反応性を確認するために、足蹠に Ag85B を発現する BCG、または結核菌分泌抗原 PPD+リコンビナント Ag85B を Complete Freund Adjuvant (CFA) に混じたもの (CFA+PPD+Ag85B) を皮下接種した後に、経時的に鼠径・膝窩リンパ節を FCM 解析した。図 5 で示すように、このマウスの通常の末梢リンパ節では、Tg T 細胞の CD69 発現および IFN- γ 発現細胞を安定して検出す

るのに十分な TgT 細胞が分布していた (図 5-b)。皮下免疫後の CD4⁺ Tg T 細胞の CD69 発現の割合及び絶対数は BCG で 1 日目、CFA+PPD+Ag85B で 3 日目という非常に早期にピークを示し、その後減少した(図 6-a)。また、CD4⁺ Tg T 細胞の IFN- γ 産生細胞の割合及び絶対数も、in vitro での PPD 刺激または Ag85B 刺激何れの場合でも皮下接種後 1-3 日目にピークを示した(図 6-b)。この結果から、この Tg T 細胞システムでは、肺に関連しない免疫組織では非常に早期から結核抗原特異的 CD4⁺ T 細胞の Th1 への誘導が認められることを示唆している。なお、CD4⁺ Tg T 細胞中の IFN- γ 産生細胞の率は CFA+PPD+Ag85B の 1 日目で 7%程度であったため、この値がこの検出系での IFN- γ 誘導の最高値であろうと推定された(図 6-b)。

4. 正常 T 細胞移入 P25-TCR Tg マウスの結核菌肺感染における Ag85B 特異的免疫応答

引き続き、正常 T 細胞移入 P25-TCR Tg マウスの肺における結核菌抗原特異的免疫応答の解析を行なった。正常 T 細胞移入 P25-TCR Tg マウスに結核菌を経気道的に感染させ、各臓器の CD4⁺ Tg T 細胞の活性化マーカー CD69 発現および IFN- γ の発現を調べた(図 7-a)。このシステムでは、肺及び肺所属リンパ節においても CD69 及び IFN- γ 発現を FCM で検討するのに十分な数の CD4⁺ Tg T 細胞を得ることができた (図 7-b)。

まず、この結核菌感染のシステムで CD69 の発現のカイネティクスを検討したが、肺浸潤細胞、肺所属リンパ節細胞ではその割合 (図 8-a 上段)、絶対数 (図 8-b 上段) とともに、感染 14 日から上昇が認められ、28 日ではより高値となった。IFN- γ 発現細胞については、肺浸潤細胞で 28 日目、肺所属リンパ節細胞で 14 日目、と遅い時期にその割合 (図 9-a 上段) と絶対数 (図 9-b 上段) が増加した。一方、脾臓では、CD69 の

発現は 28 日目と遅れたものの (図 8-a、b)、IFN- γ 発現は感染 7 日目で増加が認められた (図 9-a、b)。以上の結果から、結核菌肺感染による結核菌抗原特異的 CD4⁺T 細胞の活性化と Th1 型 T 細胞への分化は、肺および所属リンパ節では遅延することが明らかとなった。

5. 低病原性抗酸菌、又は結核菌死菌の接種による肺での Ag85B 特異的免疫応答

結核菌肺感染における結核菌抗原特異的 Th1 型 T 細胞出現の遅延が、肺における T 細胞免疫応答の制御機構の特性を反映したものなのか、あるいは結核菌の病原因子に起因する現象なのか明確にするために、結核菌よりも病原性の弱い BCG、あるいは感染性を有しない結核菌死菌を用いて、肺浸潤細胞と肺所属リンパ節細胞を同様な方法で解析した。なお、本研究で用いている Ag85B は分泌蛋白であるため、結核菌死菌ではその含有量が低いことが推定されたため、Ag85B の量を補う目的で PPD をともに接種した。

BCG を経気道感染させた際の CD4⁺Tg T 細胞の IFN- γ 産生誘導は、肺浸潤細胞では 28 日目に、肺所属リンパ節細胞では 14 日から検出された (図 9-a、b 中段)。一方、CD69 の発現は、肺浸潤細胞、肺所属リンパ節細胞ともに感染 3 日の早期から検出された (図 8-a、b 中段)。一方、結核菌死菌を接種した際には、肺浸潤細胞と肺所属リンパ節細胞の IFN- γ 産生 CD4⁺Tg T 細胞が 14 日目に増加する (図 9-a、b 下段) のに対して、CD69 発現は感染 3 日目でピークとなった (図 8-a、b 下段)。これらの結果から、1)BCG 肺感染および結核菌死菌接種でも肺及び肺所属リンパ節の結核菌抗原特異的 Th1 型 CD4⁺T 細胞の誘導が遅れたことから、肺における Th1 誘導の遅延は肺の免疫応答に特有な現象である、2)一方、T 細胞活性化マーカーである CD69 の発現は結核菌感染では遅

延したものの BCG 感染および結核菌死菌接種では皮下接種と同様に早期から認められたことから、T 細胞活性化の強い抑制は結核菌の病原因子による現象である、以上の 2 点が示唆された。

< 考察 >

肺結核に対する感染防御免疫においては、IFN- γ を産生する Th1 型免疫応答が重要であることが知られている^{11,12)}。そこで、今回の研究では、肺における結核菌抗原特異的 T 細胞の Th1 機能獲得を追跡できるシステムを構築した。ここで用いたのは、結核菌の主要抗原の 1 つである Ag85B に対する Th1 型免疫応答である。Ag85B に対する免疫応答を PPD 陽性無症候者で検討すると、in vitro において強い Th1 型免疫反応の誘導が認められている¹³⁻¹⁵⁾。また、刈米らは C57BL/6 マウスにおいて Ag85B の 240-254 アミノ酸で構成される 15 ペプチド(Peptide-25)が IFN- γ と IL-2 を産生する Ag85B 特異的 TCR V β 11⁺T 細胞の主要エピトープであることを見出した¹⁶⁻¹⁸⁾。我々は、この Peptide-25 を認識する CD4⁺ TCR V β 11⁺ T 細胞の TCR を発現する P25-TCR Tg マウスを用いて、結核菌抗原特異的 CD4⁺T 細胞免疫応答の動態を追跡するシステムを確立し、活性化マーカー CD69 および IFN- γ の発現を解析した。

まずはじめに、P25 TgT 細胞を移入したマウスの肺に結核菌を感染させて、TgT 細胞の活性化を検討した。その結果、時間経過とともに肺、肺所属リンパ節、脾臓のいずれにおいても TgT 細胞数の減少が見られた。これは、移入した細胞のうち、抗原提示を受けなかった細胞が、漸次、細胞死により排除されていったためである可能性が考えられた。一方、肺での IFN- γ 産生細胞数は増加傾向が見られたが、このシステムでは、検出可能な細胞数が非常に少ないため、今回の FCM による方法では安

定した解析が困難であった。後述するように、肺感染の局所では、細胞の活性化と Th1 機能の分化が遅延するため、感染初期の細胞増殖が充分におこらず、このような結果になったものと推定している。この細胞の増殖については、今後検討が必要である。

次に、T 細胞増殖が不十分であっても解析が可能なシステムを構築するため、P25-TCR Tg マウスに正常レパトリーの T 細胞を追加する正常細胞移入 P25-TCR Tg マウスでの免疫応答を検討した。このマウスへの結核菌肺感染により、詳細な解析に十分な Tg T 細胞が肺および肺所属リンパ節に検出されたため、このシステムを中心として肺における結核抗原特異的 CD4⁺T 細胞の反応の検討を行なった。対照群として、正常 T 細胞移入 P25-TCR Tg マウスへの BCG または CFA+PPD+Ag85B 皮下接種後の T 細胞応答を経時的に検討した。その結果、皮下接種では、IFN- γ の産生が所属リンパ節で 1 日目から増加が見られた。一般的に、末梢リンパ組織における獲得免疫の成立には、免疫開始後 6 日程度の時間が必要といわれているが、この Tg マウスシステムでは非常に早期から Th1 型機能の獲得が認められることになる。通常の免疫応答では、抗原特異的 T 細胞の頻度が非常に少ないことから、免疫応答が検出できるようになるまでには約 1 週間のクローン増殖の期間が必要なことが知られている。しかし、この Tg マウスでは、感染しない状態においても、90% 近くの CD4⁺T 細胞が Ag85B 特異的 TCR を発現することから、クローン増殖の時間を必要とせずに機能が獲得されたために、このような結果になったものと推定される。一方、免疫 1-3 日目以降の活性化 CD69⁺ Tg T 細胞および IFN- γ 産生 Tg T 細胞の顕著な増加は認められなかった。T 細胞の活性化後にアポトーシスによる細胞死が誘導されることが報告されており¹⁹⁾、それにより T 細胞免疫応答の自己制御が行なわれてい

ると考えられている。今回の P25-TCR Tg マウスの皮下免疫でも、同様な現象が生じていると考えられる。

一方、肺での免疫応答は、皮下免疫に比べて 2 週間以上遅延することが判明した。正常 T 細胞移入 P25-TCR Tg マウスに結核菌を肺感染させると、CD4⁺ Tg T 細胞の Th1 機能の獲得が、肺所属リンパ節で 14 日目、肺で 28 日目まで認められなかった。この遅延の原因が、結核菌の強い病原性によるものである可能性もあったため、結核菌より病原性の低い BCG の肺感染でも検討したが、やはり遅延した Th1 誘導が認められ、さらに、結核菌死菌に Ag85 を含む PPD を混じて肺に接種しても同様であった。従って、結核菌肺感染で認められた Tg T 細胞の Th1 機能獲得遅延は、結核菌の病原因子や細胞内寄生による抗原の局在の特殊性によるものではなく、肺における免疫応答の制御機構の特殊性により起こるものと考えられた。この制御機構を解明することが大きな課題である。今後、この制御機構における抑制性サイトカイン(IL-10、TGF-βなど)、抑制性 T 細胞の関与を解明するため、それぞれに対する抗体を接種したマウスでの Th1 機能獲得を検討していく予定である。

本研究では、Th1 機能獲得を IFN-γ産生を指標に検討するのみでなく、CD69 発現増加を指標に Tg T 細胞活性化の検討を試みた。その結果、肺においては Th1 型免疫応答の獲得と CD69 発現に乖離が認められることが明らかとなった。結核菌肺感染では、Th1 機能獲得と同様に、CD69 増加に 2 週間以上の時間を必要とした。しかし、BCG 肺感染、および結核菌死菌の肺接種では、皮下免疫の場合と同様に感染 3 日から著しい CD69 発現増加が認められた。これまでに、CD69 は T 細胞が抗原を認識して活性化した際に初期から発現される活性化マーカーと考えられ

てきたが、最近、CD69の発現が抗原認識と関係なくIFNにより誘導されることが報告されており²⁰⁾、この現象も各刺激によるIFN産生の違いを反映している可能性が考えられる。あるいは、Th1誘導のカイネティックスには各刺激間で違いがないものの、実際のT細胞の活性化が病原性により大きく異なる可能性も考えられる。この点は、肺での免疫応答を知るうえで、重要なポイントと考えられるため、今後、別の指標として細胞増殖に伴うBrdUの取り込みを指標として、あらためて肺におけるTg T細胞活性化のカイネティックスを検討していく予定である。

<要約>

肺結核に対する感染防御免疫がT細胞に依存することは良く知られている。しかし、結核菌が感染した肺においてT細胞がどのように活性化し機能を獲得していくのか解明されていない。近年、肺を含む粘膜面に粘膜固有な免疫制御機構があることが明らかになってきており、結核菌に対する肺の免疫応答も、肺固有な反応パターンを示すことが推定された。この点を検討するため、結核菌肺感染マウスモデルを用いて、肺における結核菌抗原特異的T細胞の動態を解析した。結核菌抗原特異的T細胞として、主要な結核菌抗原の一つであるAg85Bに特異的なCD4⁺T細胞クローンのT細胞レセプター(TCR)遺伝子を発現するトランスジェニック(P25-TCR Tg)マウスを用いた。まず、P25-TCR Tgマウスから精製したT細胞をC57BL/6 Ly5.1コンジェニックマウスに養子移入し(P25-TCR TgT細胞移入マウス)、さらに結核菌を経気道的に感染させた。感染後、経時的に肺浸潤細胞および肺所属リンパ節細胞を調製し、CD4⁺Tg T細胞の数と活性化マーカー発現を検討するとともに、Ag85Bでin vitro刺激後のIFN- γ 産生を検討した。その結果、肺および肺所属リンパ節において活性化マーカーCD69を発現するAg85B特異的CD4⁺Tg T細胞が増加するのに感染後4週間を要した。し

かし、IFN- γ 産生細胞については、Ag85B特異的CD4⁺Tg T細胞の絶対数とIFN- γ 産生細胞の割合がともに低いため、詳細な解析は困難であった。そこで、次にC57BL/6 Ly5.1コンジェニックマウスの脾細胞をP25-TCR Tgマウスに移入することにより、約80%のCD4⁺T細胞がAg85B特異的TCRを発現するマウス(正常T細胞移入P25-TCR Tgマウス)を作成した。このマウスの足蹠に、Ag85Bを発現する*Mycobacterium bovis* BCGを皮内接種すると、接種後1日目の非常に早期から鼠径・膝窩リンパ節にAg85B特異的IFN- γ 産生CD4⁺Tg T細胞が強く誘導された。これに対して、結核菌またはBCGを経気道感染させた場合、肺ではAg85B特異的IFN- γ 産生CD4⁺Tg T細胞の誘導に約4週間、肺所属リンパ節でも約2週間を要した。結核菌死菌の経気道接種でも、肺にAg85B特異的IFN- γ 産生T細胞が誘導されるのに約2週間を要した。この結果から、結核菌に対する肺のT細胞免疫応答は2~4週間程度の遅延の後に成立することが明らかとなった。以上の結果から、結核菌に対する抗原特異的Th1型免疫応答誘導が肺では抑制され、結果としてTh1型免疫反応が遅延する可能性が示唆された。この遅延のメカニズムを解明することにより、今後、効率よく肺にTh1型防御免疫応答を誘導するワクチンのデザインが可能になるものと期待される。

<謝辞>

本研究を行なうにあたり、貴重な P25-TCR Tg マウスおよび抗イデオタイプ抗体を供与していただき、また貴重なコメントを下さいました東京大学医科学研究所感染・免疫部門免疫調節分野の高津聖志教授、田村敏生先生、刈米アイ先生に深謝申し上げます。

<参考文献>

1. 光山正雄編. 2001.結核.医薬ジャーナル社.
2. Roche, P.W., J.A. Triccas, and N. Winter. 1995. BCG vaccination against tuberculosis:Past disappointments and future hopes. *Trends Microbiol.* 3:397-401.
3. Bloom, B.R., and PEM. Fine. 1994. The BCG experience:implications for future vaccines against tuberculosis. in Tuberculosis:Pathogenesis, Protection and Control. (ed. by BR Bloom). *ASM press.* 531-557.
4. Editorial:1980. BCG:bad news from India. *Lancet.* 315:73-74.
5. Kobayashi, K., and T. Yoshida. 1996. The immunopathogenesis of granulomatous inflammation induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods.* 9:204-214
6. Romani, L., P. Puccetti, and F. Bistoni. 1997. Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:611-636
7. Corbett, M., and J.P. Kraehenbuhl. 2004. Lung immunity:necessity is the mother of induction. *Nat. Med.* 9:927-934
8. Julia, V., E.M.Hessel, L. Malherbe, N. Glaichenhaus, A. O'Garra, and R.L. Coffman. 2002. A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity.* 16:271-283.
9. Tamura, T., H. Ariga, T. Kinashi, S. Uehara, T. Kikuchi, M. Nakada, T. Tokunaga, X.Wen, A. Kariyone, T. Saito, T. Kitamura, G. Maxwell, S. Takaki, and K. Takatsu. 2004. The role of antigenic peptide in CD4⁺ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int Immunol.* 16:1691-1699.
10. MoSorley, S.J., S. Asch, M. Costalonga, R.L. Reinhardt, and M.K. Jenkins.

2002. Tracking *salmonella*-specific CD4 T cells in vivo reveals a local mucosal response to a disseminated infection. *Immunity*. 16:365-377
11. North, R.J., and Y.J. Jung. 2004. Immunity to tuberculosis. *Annu.Rev.Immunol.* 22:599-623
 12. Flynn, J.L., and J. Chan. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu.Rev.Immunol.* 19:93-129
 13. Silver, R.F., R.S. Wallis, and J.J. Ellner. 1995. Mapping of T cell epitopes of the 30-kDa alpha antigen of *Mycobacterium bovis* strain bacillus Calmette–Guerin in purified protein derivative (PPD)-positive individuals. *J.Immunol.* 154:4665-4674.
 14. Kamath, A.T., C.G. Feng, M. Macdonald, H. Briscoe, and W.J. Britton. 1999. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 67:1702-1707.
 15. Mustafa, A.S., F.A. Shaban, A.T. Abal, R. Al-Attiyah, H.G. Wiker, K.E. Lundin, F. Oftung, and K. Huygen. 2000. Identification and HLA restriction of naturally derived Th1-cell epitopes from the secreted *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B recognized by antigen-specific human CD4⁺ T-cell lines. *Infect. Immun.* 68:3933-3940.
 16. Yanagisawa, S., M. Koike, A. Kariyone, S. Nagai, and K. Takatsu. 1997. Mapping of V β 11⁺ helper T cell epitopes on mycobacterial antigen in mouse primed with *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. Immunol.* 9:227-237.
 17. Kariyone, A., K. Higuchi, S. Yamamoto, A. Nagasaka-Kametaka, M. Harada, A. Takahashi, N. Harada, K. Ogasawara, and K. Takatsu. 1999. Identification of amino acid residues of the T-cell epitope of *Mycobacterium tuberculosis* a antigen critical for V β 11⁺ Th1 cells. *Infect. Immun.* 67:4312-4319.

18. Kariyone, A., T. Tamura, H. Kano, Y. Iwakura, K. Takeda, S. Akira, and K. Takatsu. 2003. Immunogenicity of Peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN- γ . *Int. Immunol.* 15:1183-1194.
19. Shyr-te, J.D., J. Panka, H. Cui, R. Ettinger, M. Ei-khatib., D.H. Sherr., B.Z. Stainger., and, A. Marshak-Rothstein. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature.* 373:444-448.
20. Feng, H. Z. Dong, D. Palliser, P. Zhu, S. Cai, A. Schlesinger, L. Maliszewski, and J. Lieberman. 2005. *Listeria*-infected myeloid dendritic cells produce IFN- β , priming T cell activation *J.Immunol.* 175:421-432.

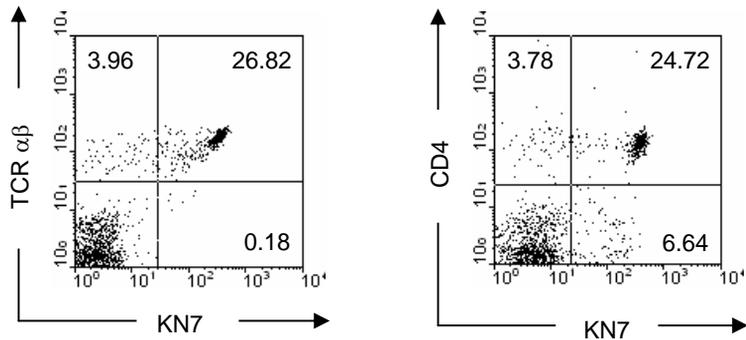


図1 P25-TCR T_gマウスのT細胞の表現型

無処置P25-TCR T_gマウスから採取した脾臓細胞を抗P25 TCR イディオタイプ抗体KN7、抗TCRαβ抗体および抗CD4抗体にて染色し、FCMで解析した。ここでは代表的な個体のデータを示した。

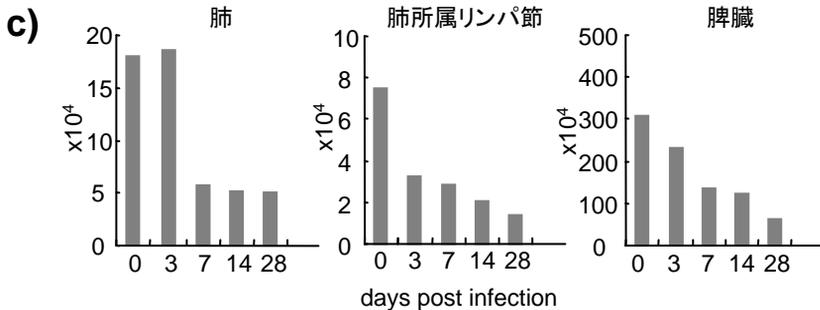
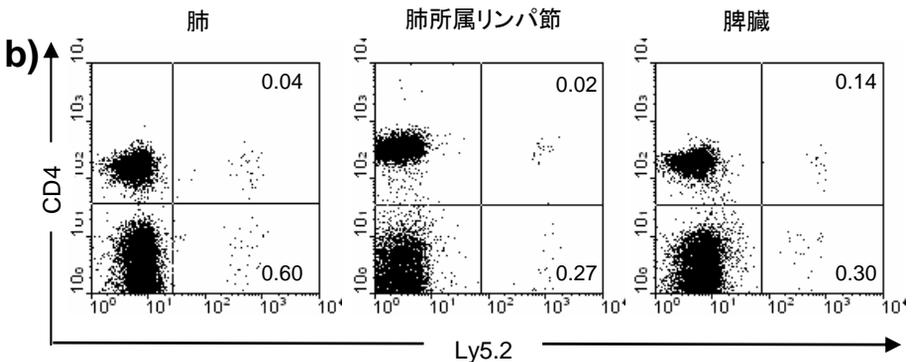
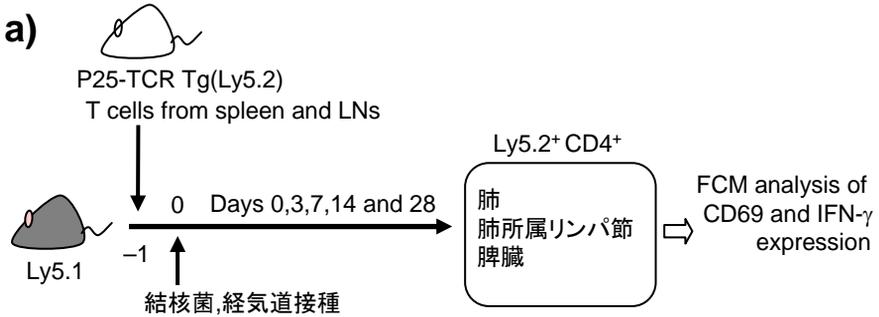


図2 T_g T細胞移入マウスの作成方法と移入細胞の検出

a) T_gT細胞移入マウスの作成と解析の流れ図: P25-TCR T_gマウスから調整したT細胞をC57BL/6 Ly5.1コンジェニックマウスに養子移入した翌日に結核菌を経気道感染させ、経時的に肺浸潤細胞、肺所属リンパ節細胞および脾細胞を調整した。FCMにより、これらの細胞に含まれるT_g T細胞をCD4⁺Ly5.2⁺T細胞として検出し、これらのT_g T細胞の活性化マーカーCD69発現を検討した。IFN- γ 産生については、20時間抗原刺激培養後に細胞内サイトカイン染色FCMにて解析した。

b) 結核菌感染28日後の各臓器におけるCD4⁺Ly5.2⁺ T_g T細胞をFCMにより検出した。ここでは代表的なFCMドットプロットを示した。

c) 結核菌感染後の各臓器におけるT_gT細胞数の経時変化をヒストグラムで示した。

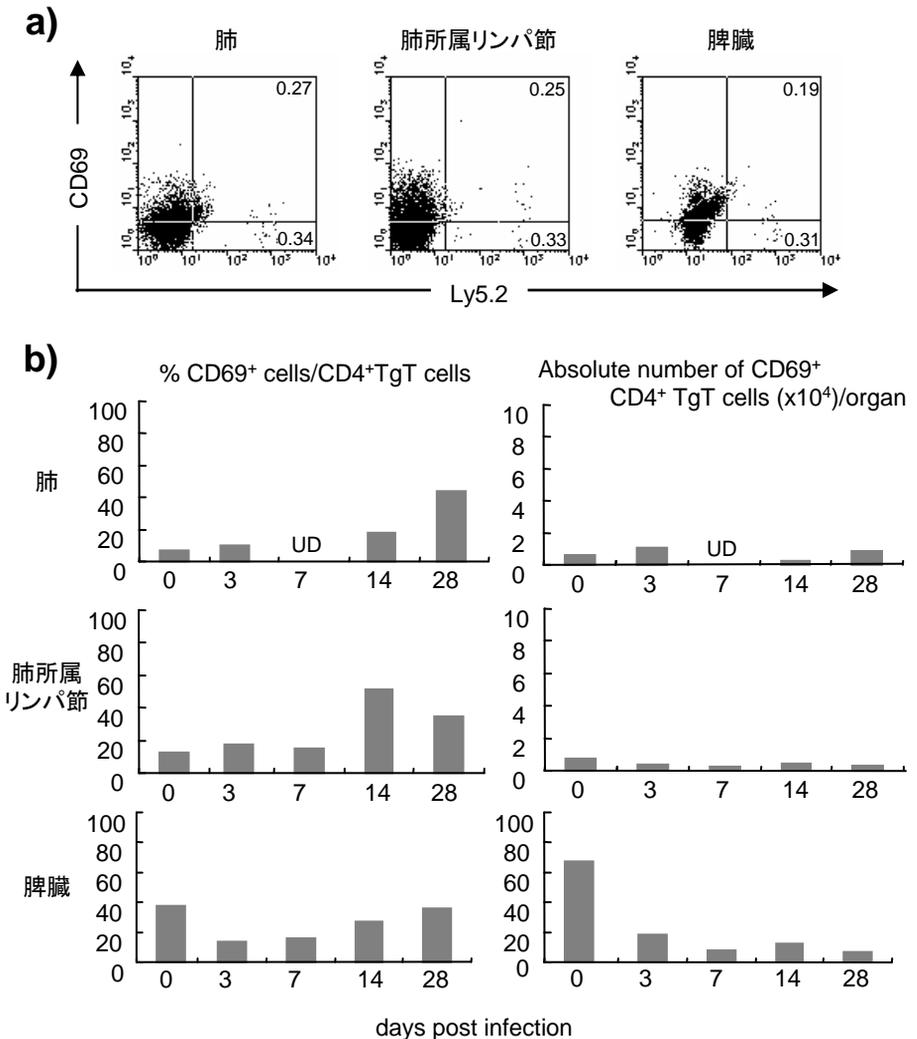


図3 結核菌肺感染したTg T細胞移入マウスにおける移入TgT細胞の活性化マーカーCD69発現

a) 結核菌感染後28日目の肺浸潤細胞、肺所属リンパ節細胞および脾細胞における活性化マーカーCD69の発現をFCMで解析した。ここでは代表的なFCMドットプロットを示した。

b) Tg T細胞移入マウスの結核菌感染後に認められた肺、肺所属リンパ節および脾臓におけるCD4⁺ Tg T細胞の活性化マーカーCD69発現細胞の割合(左図)とその細胞数(x10⁴細胞)(右図)の経時的变化をヒストグラムで示した。

UD, under detection level.

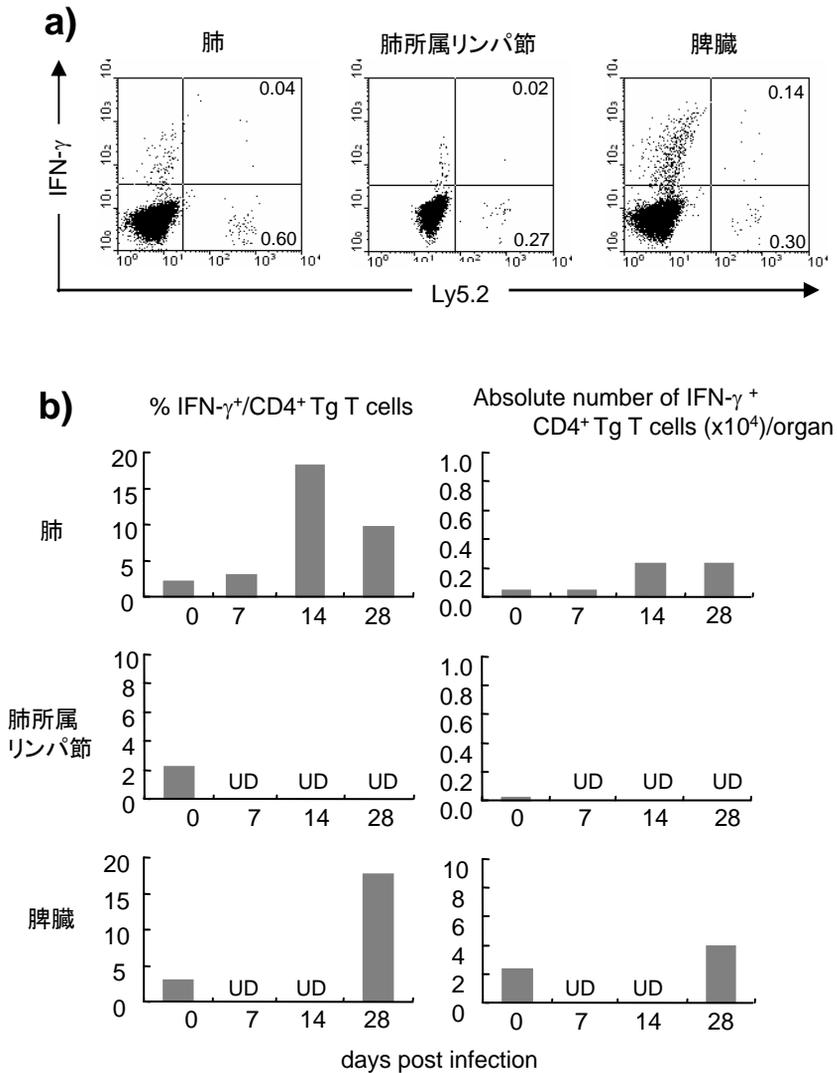


図4 結核菌肺感染したTg T細胞移入マウスにおける移入TgT細胞のIFN- γ 発現

a) 結核菌感染後28日目の肺浸潤細胞、肺所属リンパ節細胞および脾細胞におけるIFN- γ の発現のFCMで解析した。代表的FCMドットプロットを示した。

b) Tg T細胞移入マウスの結核菌感染後に認められた肺、肺所属リンパ節および脾臓におけるCD4⁺ Tg T細胞のIFN- γ 発現細胞の割合(左図)とその細胞数($\times 10^4$ 細胞)(右図)の経時変化をヒストグラムで示した。

UD, under detection level.

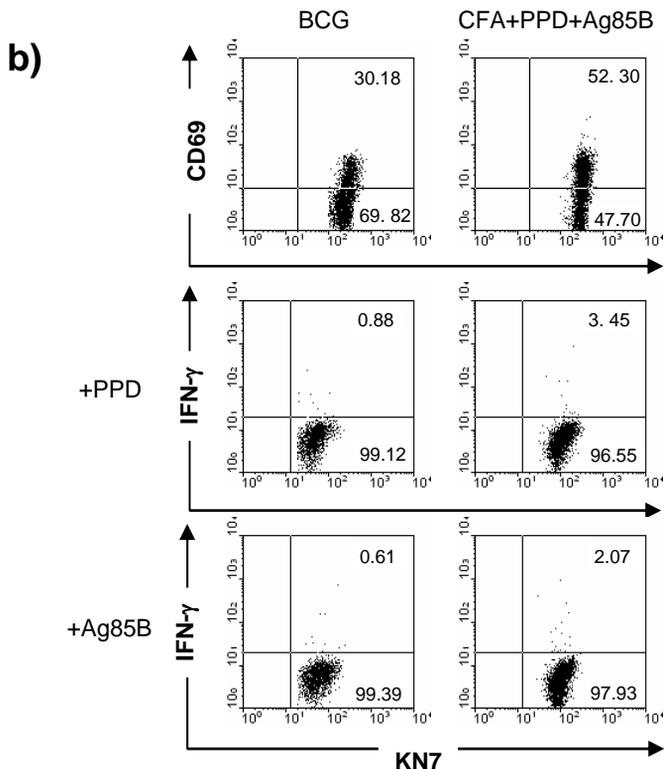
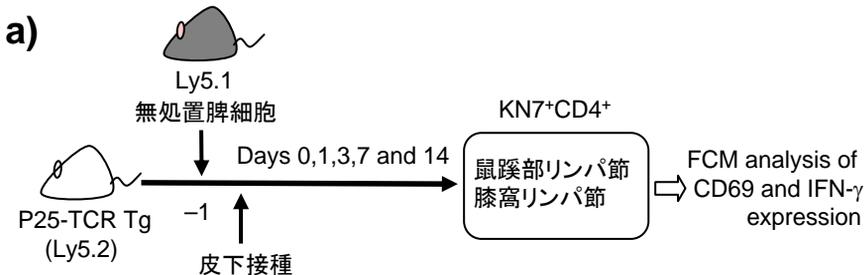


図5 正常T細胞移入P25-TCR Tgマウスの作成方法と皮下接種後のTg T細胞活性化の検討

a) 正常T細胞移入P25-TCR Tgマウスの作成と解析の流れ図: 無処置Ly5.1コンジェニックマウス由来の正常脾細胞をP25-TCR Tgマウスに移入し、翌日に皮下にBCGまたはPPDとAg85Bを混じたCFAを接種した。その後、経時的に所属リンパ節である鼠蹊部リンパ節と膝窩リンパ節を採取し、CD4⁺KN7⁺Tg細胞について活性化マーカーCD69発現を検討した。IFN- γ 発現については、TgT細胞の認識する抗原Ag85Bまたはそれを含むPPDで20時間*in vitro*抗原刺激し、細胞内サイトカイン染色FCMで解析した。

b) 皮下免疫3日後の所属リンパ節のCD69発現およびPPDまたはAg85Bで*in vitro*刺激した後のIFN- γ 発現をFCMで検討した。ここでは代表的なFCMドットプロットを示した。

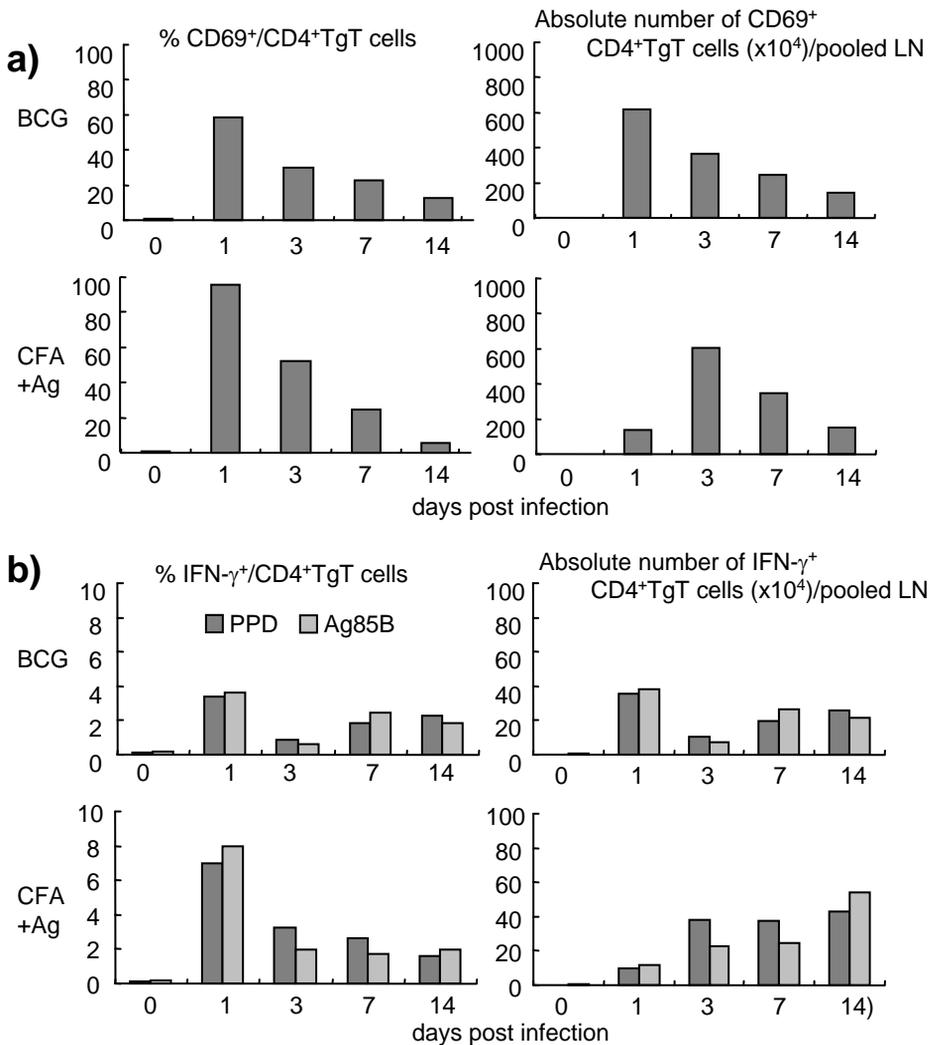


図6 正常T細胞移入P25-TCR T_gマウスにBCG又は結核抗原を皮下接種した後のCD4⁺T_g T細胞の活性化マーカーCD69発現およびIFN-γ産生のカイネティクス

a) 正常T細胞移入P25-TCR T_gマウスの足蹠にBCG(上段)またはCFA+PPD+Ag85B (CFA+Ag、下段)を皮下接種した後、鼠径・膝窩リンパ節のCD4⁺T_gT細胞の活性化マーカーCD69発現細胞の割合(左図)とその細胞数(x10⁴細胞)(右図)の経時的変化をFCMIにて解析した。

b) 正常T細胞移入P25-TCR T_gマウスの足蹠にBCG(上段)またはCFA+PPD+Ag85B (CFA+Ag、下段)を皮下接種した後、鼠径・膝窩リンパ節のCD4⁺T_gT細胞のIFN-γ産生細胞の割合(左図)とその細胞数(x10⁴細胞)(右図)の経時的変化をFCMIにて解析した。

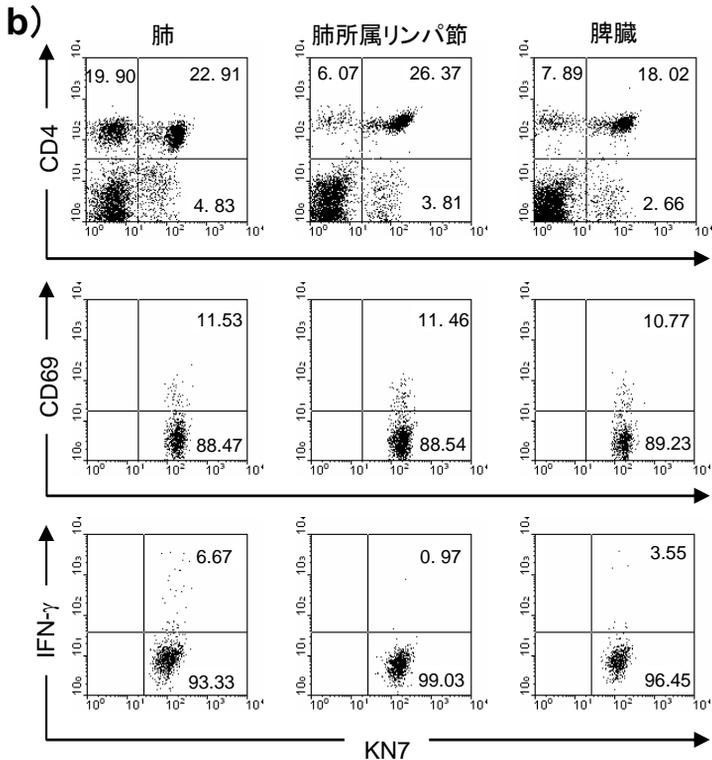
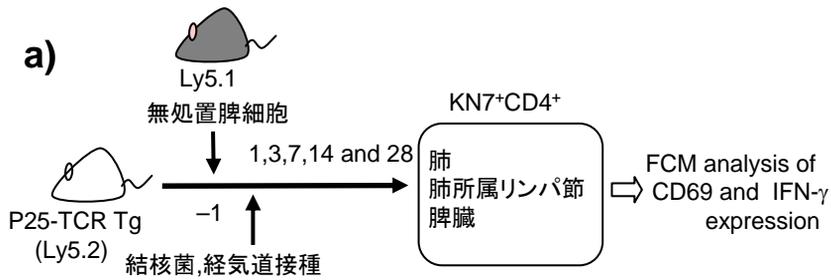


図7 正常T細胞移入P25-TCR Tgマウスの結核菌肺感染における免疫応答の解析

a) 正常T細胞移入P25-TCR Tgマウスに結核菌を経気道感染させ、その後経時的に肺浸潤細胞、肺所属リンパ節細胞および脾細胞を調整し、CD4⁺TgT細胞について活性化マーカーCD69発現およびIFN- γ 発現をFCMで解析した。

b) 正常T細胞移入P25-TCR Tgマウスに結核菌を肺感染させた28日目に、各臓器のCD4⁺KN7⁺TgT細胞を検出し(上段)、このCD4⁺TgT細胞の活性化マーカーCD69発現(中段)ならびにIFN- γ 発現(下段)をFCM解析した。ここでは代表的なFCMドットプロットを示した。

a)

% CD69⁺ cells/CD4⁺TgT cells

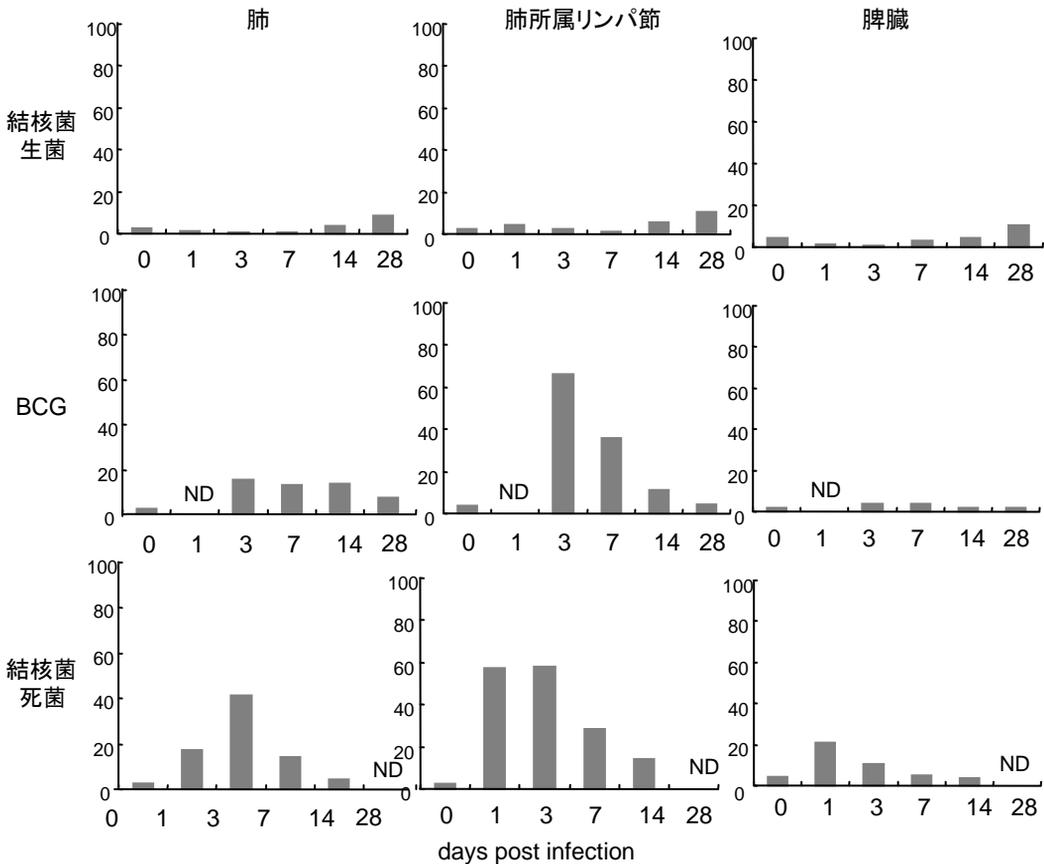
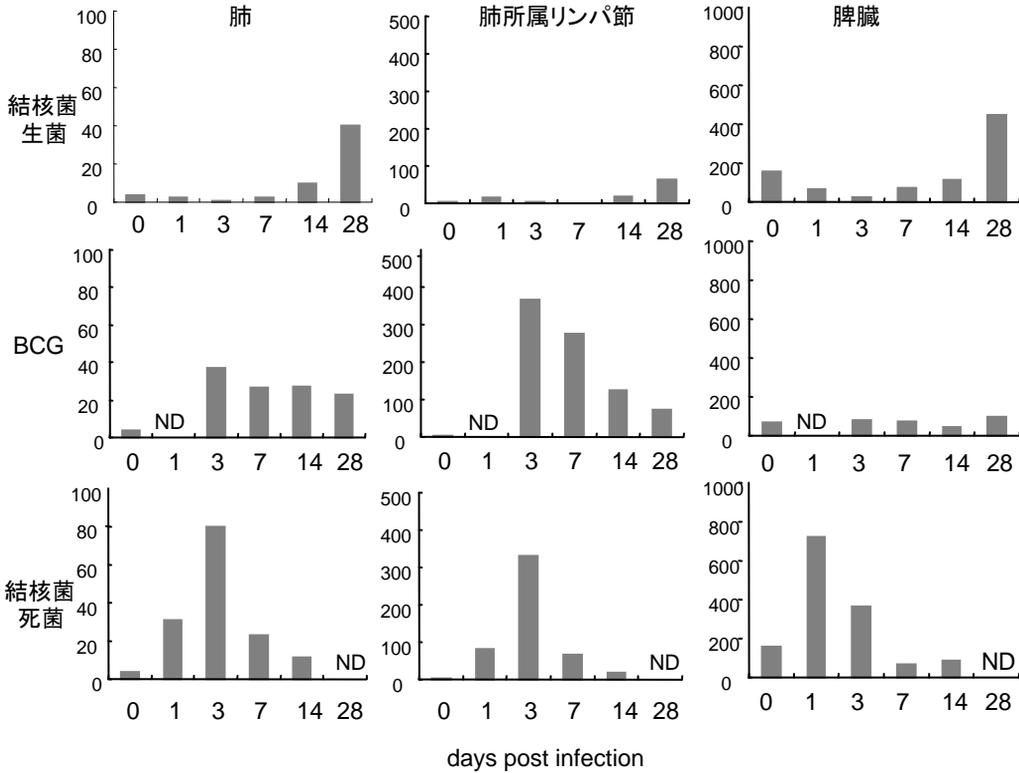


図8 正常T細胞移入P25-TCR Tgマウスの肺におけるTgT細胞活性化

a) 正常T細胞移入P25-TCR Tgマウスに結核菌生菌(上段)、BCG(中段)または結核菌死菌+PPD(下段)を経気道的に接種した後に、肺、肺所属リンパ節、および脾臓のCD4⁺TgT細胞の活性化マーカーCD69発現をFCMで検討し、その割合の経時的変化をヒストグラムで示した。

ND, not determined.

b)Absolute number of CD69⁺CD4⁺TgT cells (x10⁴)/organ**図8 正常T細胞移入P25-TCR T_gマウスの肺におけるT_gT細胞活性化**

b) 正常T細胞移入P25-TCR T_gマウスに結核菌生菌(上段)、BCG(中段)または結核菌死菌+PPD(下段)を経気道的に接種した後に、肺、肺所属リンパ節および脾臓のCD4⁺T_gT細胞の活性化マーカーCD69発現をFCMで検討し、その臓器当りの絶対数の経時的変化をヒストグラムで示した。ND, not determined.

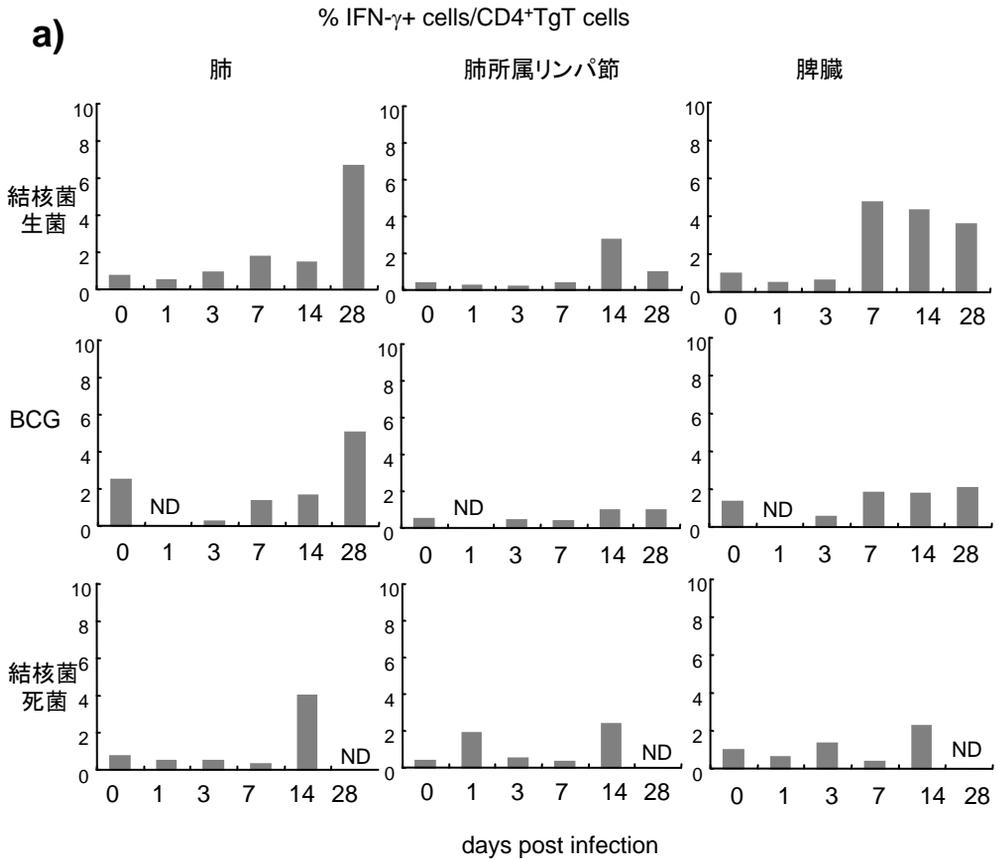


図9 正常T細胞移入P25-TCR T_gマウスの肺におけるT_gT細胞のIFN- γ 発現

a) 正常T細胞移入P25-TCR T_gマウスに結核菌生菌(上段)、BCG(中段)または結核菌死菌+PPD(下段)を経気道的に接種した後に、肺、肺所属リンパ節および脾臓のCD4⁺T_gT細胞のIFN- γ 発現をFCMで検討し、その割合の経時的変化をヒストグラムで示した。

ND, not determined.

b)

Absolute number of IFN- γ ⁺CD4⁺TgT cells (x10⁴)/organ

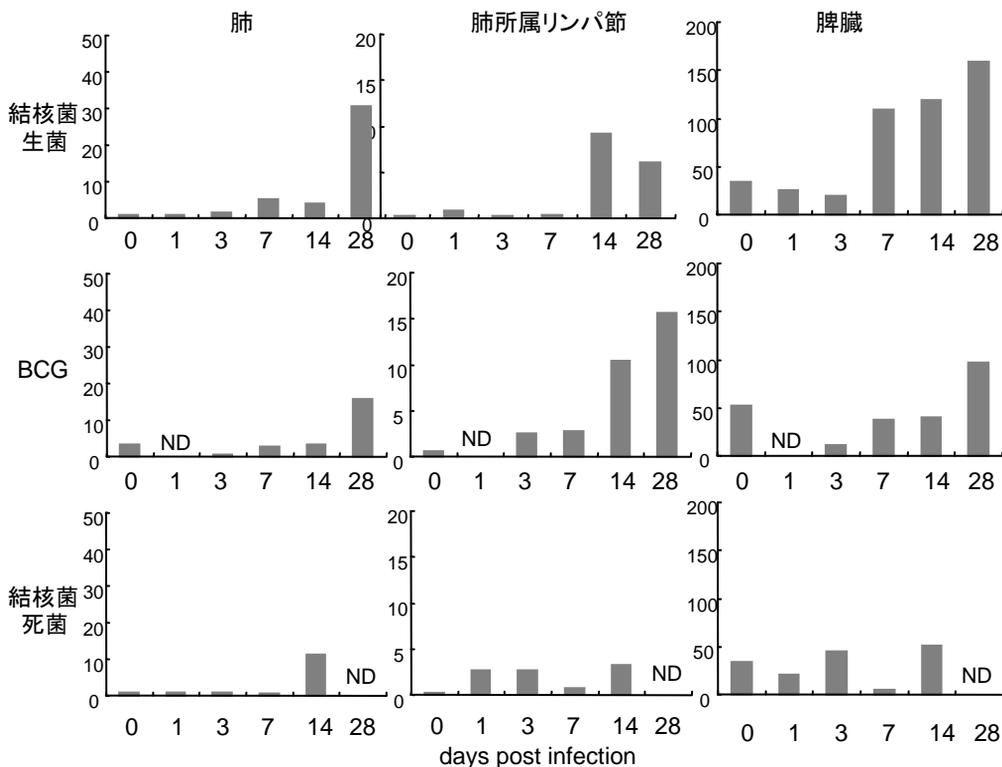


図9 正常T細胞移入P25-TCR T_gマウスの肺におけるT_gT細胞のIFN- γ 産生

b) 正常T細胞移入P25-TCR T_gマウスに結核菌生菌(上段)、BCG(中段)または結核菌死菌+PPD(下段)を経気道的に接種した後に、肺、肺所属リンパ節および脾臓のCD4⁺T_gT細胞のIFN- γ 発現をFCMで検討し、その臓器当りの絶対数の経時変化をヒストグラムで示した。

ND, not determined.