らい菌感染マクロファージにおける細胞内寄生と排除に関わる分子機構

谷川和也*¹⁾、鈴木幸一¹⁾、川島 晃¹⁾、三島眞代¹⁾、Huhehasi Wu¹⁾、
赤間 剛¹⁾、武下文彦²⁾、石井則久¹⁾

1) 国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部

2) 横浜市立大学医学部分子生体防御学

〔受付・掲載決定：2007 年 11 月 1 日〕

キーワード：ファゴソーム、マクロファージ、CORO1A、*Mycobacterium leprae* (*M. leprae*)、
toll-like receptor2 (TLR2)

Mycobacterium leprae (*M. leprae*) 感染において、宿主のマクロファージのファゴソームの膜上には Toll 様受容体 (TLR2) および CORO1A (TACO, Coronin 1, p57) が発現していることが示されたが、両因子間の関係については未だ不明点が多い。我々は *M. leprae* 感染後の細胞内生存における両因子間の機能的相互作用について検討を行い、両因子が互いに拮抗し合っていることを見いだした。

背 景

通常、我々の免疫システムは「自己」と「非自己」を区別し、病原体などの「非自己」を排除する生体防御機構が備わっている。そのような十分な免疫反応を惹起するには自然免疫の働きが必須であり、現在では病原体に対するセンサーとして Toll 様受容体 (TLR)、Nod 蛋白、RIG-I などの重要なメカニズムが明らかとされている。免疫担当細胞として重要な役割を担うマクロファージは、「非自己」である病原体を感知し排除するメカニズムを有しており、その中核を担うのが TLR である。TLR の

主な役割は、病原体にのみ高度に保存される特徴的な構造 Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識することであるが、マクロファージに発現する TLR2 は細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン (PGN) を認識する受容体であり、自然免疫系を活性化することで菌を排除する役割を担っている。

ハンセン病は leproma cell を蓄積することで形成される組織球性病巣を主体とし、末梢神経傷害および皮膚症状をきたす抗酸菌感染症である。ハンセン病の起原菌である *M. leprae* は、マクロファージを宿主とする細胞内寄生菌であり、貪食された際に形成されるファゴソーム内で生存を維持できることが知られている (Fig 1)。In vitro の研究で *Mycobacterium bovis* Bacilli Calmette-Guerin (*M. bovis* BCG) を用いライソゾームとファゴソームの融合を阻害する TACO (CORO1A) という蛋白の存在が明らかとされた¹⁾。また、最近で

* Corresponding author:
国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部
〒189-0002 東京都東村山市青葉町 4-2-1
TEL : 042-391-8211 FAX : 042-394-9092
E-mail : tanigawa@nih.go.jp

は Coronin 1 が Ca^{2+} シグナル伝達系の酵素カルシニューリンを活性化し、ファゴソームの maturation を阻害することで抗酸菌は生存を維持できるという報告もなされている^{2,3)}。

Figure 1. L 型ハンセン病における *M. leprae* 感染に対する免疫反応

細菌感染に対してはマクロファージによって貪食された結果形成されるファゴソームにおいてライソソームと融合されることによって排除されるが、*M. leprae* が感染すると細胞膜の内側に発現する CORO1A がファゴソーム形成時にファゴソームの膜上に移動することによりライソソームとの融合を受けず、細胞内で生存を維持できる。

目 的

我々のこれまでの研究により *M. leprae* を貪食したファゴソームの膜上に CORO1A の発現が誘導されることを見いだしている⁴⁾。そこで今回、*M. leprae* 感染において、菌を排除する役割を担う TLR2 と菌の生存の維持に働く CORO1A という相反する両因子の機能的相互作用について明らかにすべく研究を行った。

具体的には以下の3点について検討を行った。

1. L 型ハンセン病皮膚組織における TLR2 と CORO1A の局在を免疫組織学的に検討した。
2. CORO1A が TLR 下流のシグナルに与える影響について HEK293 細胞を用い、種々のベクターをトランスフェクションしルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイで評価した。
3. TLR2 のシグナル

が CORO1A の発現に与える影響についてヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞を用いて RT-PCR で評価した。

結 果

それぞれの検討の結果、以下のようなことが明らかとなった。

1. L 型ハンセン病皮膚組織における TLR2 と CORO1A の局在

L 型ハンセン病皮膚組織について CORO1A および TLR2 の発現を確認するために免疫染色と抗酸菌染色の2重染色を行ったところ、*M. leprae* を含んだファゴソームの膜が染色されたことから TLR2 (Fig. 2A)、CORO1A (Fig. 2B) とともにファゴソームの膜上に局在することが明らかとなった。また、*M. leprae* を含まないファゴソームの膜には染まらなかったことから両因子共に感染時に局在が変化するものと考えられた。

2. CORO1A が TLR 下流のシグナルに与える影響

上記1の実験結果より CORO1A および TLR2 はらい菌を含むファゴソームの膜上に局在することが明らかとなったので、この両因子間の機能的相互作用についてさらに検討を行った。CORO1A が TLR2 シグナルに与える影響について検討を行うために HEK293 細胞に NF- κ B 依存性レポーター遺伝子および種々の TLR 発現ベクターを transfection し、そのリガンドで刺激した場合と細胞を TNF- α で刺激した場合のそれぞれの場合に誘導されるルシフェラーゼ活性に対して CORO1A が影響を及ぼすかどうかについて検討を行った。

TLR2 を発現させ、そのリガンドである PGN で刺激することにより誘導された NF- κ B によるルシフェラーゼ活性は CORO1A の用量依存的に抑制された。また、TLR とは独立した TNF- α によって誘導された NF- κ B 依存性ルシフェラーゼ活性も CORO1A の用量依存的に抑制された。しかし、コントロールとして用いた pGL3 control プラスミドによるルシフェラーゼ活性は CORO1A の影響を全く受けなかったことからルシフェラーゼの発現自体には影響がないことが分かった。

さらに、CORO1Aの影響がTLR2に特異的なか、またNF- κ Bの発現に特異的なのかを確認するために、NF- κ BだけでなくType1 IFNの発現を誘導するTLR3および4をHEK293細胞に発現させ、それぞれのリガンドである二本鎖RNA (dsRNA) 及びリポポリサッカライド (LPS) で刺激する系においても検討を行った結果、リガンド刺激することでNF- κ B依存性プロモーター及びIFN- β プロモーター活性が誘導されたが、CORO1Aの用量依存的に抑制された。

Figure 2. *M. leprae* を含んだファゴソームの膜上に局在するTLR2とCORO1A

L型ハンセン病皮膚組織を抗酸菌染色と免疫染色の2重染色を行った。(A)は抗酸菌染色後にTLR2の免疫染色を行ったもので、抗酸菌染色によって染色された白抜きで示す *M. leprae* を含んだファゴソームの膜が黒矢印で示すようにTLR2の抗体で染まった。また、(B)も同様に抗酸菌染色後にCORO1Aの免疫染色を行ったもので、白抜きで示す *M. leprae* を含んだファゴソームの膜が黒矢印で示すようにCORO1Aの抗体で染まった。このことから、両因子共に *M. leprae* を含んだファゴソームの膜上に局在することが確認された。

以上の結果から、CORO1AはTLR及びTNF- α によって誘導されるNF- κ Bを抑制し、またTLR3、4によるIFN- β プロモーター活性も抑制することが明らかとなった。このことより、CORO1Aは種々の自然免疫シグナルに対して抑制的に働くことで *M. leprae* が生存しやすい環境を作り出しているものと考えられた。

3. TLR2のシグナルがCORO1Aの発現に与える影響

これまでの結果より、CORO1AはTLR及びTNF- α を介して誘導されるNF- κ BおよびIFN- β の発現を抑制していることが明らかとなったので、逆にTLRシグナルがCORO1Aの発現に与える影響について検討を行った。また、TLR2のシグナルでも実際に *M. leprae* を感染させた場合とPGNで刺激した場合でCORO1Aの発現に違いがあるかどうか検討を行った。すなわち、ホルボールエステル (PMA) 処理することで活性化させたTHP-1細胞にPGNおよび *M. leprae* で刺激後RT-PCRによりCORO1AのmRNAの発現を比較検討した。その結果、PMA未処理のTHP-1細胞においてはそれぞれの刺激による影響は見られなかった。一方でPMA処理後PGNによる刺激によってCORO1AのmRNAの発現が12時間をピークに強く抑制された。しかし、*M. leprae* による刺激においてはCORO1AのmRNAの発現に変動は見られなかった。このことから、活性化マクロファージにおいてPGNによるTLR2を介した刺激ではCORO1Aの発現は抑制されるが、*M. leprae* が感染した場合マクロファージに貪食されることでCORO1Aの存在を必要とし維持することで、結果 *M. leprae* が細胞内で生存しやすい環境を作っているのではないかと考えられた。

まとめ

これらのことより、TLR2とCORO1Aは機能的に拮抗していることが明らかとなり、両因子のバランスが抗酸菌感染症の予後に影響を与えるものと考えられた。また、PGNによってCORO1Aの発現は減少されたことから、菌の生存に不利に働くと考えられるが、*M. leprae* はCORO1Aの発現に影響を与えなかったことから、*M. leprae* にはファ

ゴソーム内で菌の生存を可能にするような未知の因子の存在が考えられた (Fig 3)。

Figure 3. *M. leprae* は CORO1A の発現を抑制する PGN によるシグナルを阻害する
THP-1 細胞において、PGN による刺激により CORO1A の発現は抑制されたが、*M. leprae* では CORO1A の発現に変動が見られなかったことから、*M. leprae* は感染した際に誘導される免疫反応に対して抑制的に働くことにより生存を維持でき、その結果増殖すると考えられた。

謝 辞

第 80 回日本ハンセン病学会総会において学会長奨励賞を頂き深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J: A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97:435-447, 1999.
- 2) Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, Miyazaki T, Albrecht I, Massner J, Pieters J: Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell* 130:37-50, 2007.
- 3) Trimble WS, Grinstein S: TB or not TB: calcium regulation in mycobacterial survival. *Cell* 130:12-14, 2007.
- 4) Suzuki K, Takeshita F, Nakata N, Ishii N, Makino M: Localization of CORO1A in the Macrophages Containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochem Cytochem* 39:107-112, 2006.

Molecular mechanisms for intracellular parasitisation and exclusion in macrophage infected with *Mycobacterium leprae*

Kazunari TANIGAWA * ¹⁾, Koichi SUZUKI¹⁾, Akira KAWASHIMA¹⁾,
Masayo MISHIMA¹⁾, Huhehasi Wu¹⁾, Takeshi AKAMA¹⁾,
Fumihiko TAKESHITA²⁾, Norihisa ISHII¹⁾

1) Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo

2) Department of Molecular Biodefense Research, Yokohama City University School of Medicine

[Received / Accepted: 1 Nov. 2007]

Key words : CORO1A, macrophage, *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), phagosome, toll-like receptor 2 (TLR2),

It was previously demonstrated that TLR2 and CORO1A(TACO, Coronin 1, p57) localize phagosome membrane of macrophage. However, the functional relationship between TLR2 and CORO1A was not known. We show here that there is a functional counteraction between TLR2 and CORO1A.

*Corresponding author :

Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases,
4-2-1 Aoba-cho, Higashimurayama, Tokyo, 189-0002, Japan.

TEL : 042-391-8211 FAX : 042-394-9092

E-mail : tanigawa@nih.go.jp