

腸管マクロファージの PIR-B を介する腸内環境整備機構の解明

中山 勝文

東北大学加齢医学研究所生体防御学分野 助教

緒言

様々な細菌感染に対する初期の生体防御機構として、マクロファージを中心とした自然免疫系細胞が作動し、炎症反応の惹起および細菌の除去を担う。マクロファージは、各々の細菌種を識別し、各々に応じて異なる応答をすると考えられるが、そのメカニズムとして、マクロファージに発現する多様な Pattern recognition receptors (PRRs) が各々の細菌を識別し異なるシグナルを伝達すると考えられる。PRRs は“トランス(遠距離)型”と“シス(近距離)型”の二つに大別される¹⁾。トランス型レセプターとして Toll-like receptors (TLRs) がよく知られている。TLRs は LPS、Lipoteichoic acid (LTA) や鞭毛といった細菌種間で比較的良く保存された菌体成分を高感度で認識し、主に NF- κ B 経路を介して炎症性メディエーターの産生を誘導するため、生体内において細菌そのものから“遠距離”においてもその感染を感知するセンサーとしての役割を担っていると考えられる²⁾。しかしながら、TLRs は細菌そのものに直接結合することは出来ない。一方、シス型レセプターとして、FcR や Dectin-1 が挙げられる。FcR は Ig オプソニン化病原体に、Dectin-1 は酵母由来成分の β -グルカンに、それぞれ直接結合して活性化される。これらは、TLRs に比べ感度は低く、可溶性の病原体由来成分では活性化されないが、病原体に“近距離”において、直接結合することによって排除することができる。マクロファージはこれらのトランス型とシス型のレセプターを機能的に相互作用させることによって効率よく病原体を排除すると考えられる。

最近、我々は、マウス骨髄由来マクロファージ cDNA ライブラリーを用いた発現クローニング法により、代表的なグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* に対する新規シス型レセプターとして Paired Ig-like receptor B (PIR-B) を同定した³⁾。PIR-B はその細胞内領域に Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory

motif (ITIM) を持つ抑制性免疫レセプターとして既に報告されている⁴⁾。我々は、PIR-B は *S. aureus* と結合することによって ITIM を介して TLR の炎症シグナルを抑制することを報告した³⁾。

本研究では、PIR-B が他の細菌種に結合するか否か検討した結果、大腸菌およびヒトなどの胃に生息するピロリ菌に結合することを見出した。ピロリ菌の感染は慢性胃炎、十二指腸潰瘍のみならず胃癌の発生につながる事が知られている。そこで、マクロファージのピロリ菌および大腸菌に対する免疫応答に PIR-B がどのように関与するか検討した。さらに PIR-B の腸管膜リンパ節等における発現パターンについても解析した。

結果

1. PIR-B の種々の細菌への結合能

抑制性ペア型レセプターの PIR-B はその細胞外領域の Ig 様ドメイン 2 内のループ構造を介して黄色ブドウ球菌に結合し、その細胞内領域に存在する ITIM を介して TLR シグナルを抑制する。同様に PIR-B は他の種々の細菌へも結合するか否かについて解析した。枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、および大腸菌 (*Escherichia coli*) を熱処理後に蛍光標識し、NIH3T3 細胞あるいは PIR-B/NIH3T3 細胞と 1:10 (NIH3T3 細胞:細菌) の割合で 37°C 30 分間培養し、各細胞への細菌の結合性をフローサイトメトリーにより測定した。その結果、PIR-B/NIH3T3 細胞は黄色ブドウ球菌の他にピロリ菌および大腸菌に効率良く結合することが判明した(図 1)。一方、PIR-B に対応する活性化型レセプターのひとつである PIR-A2h は、アミノ酸レベルで PIR-B と 90% 以上の高い相同性の細胞外領域を有しているのにも関わらず、黄色ブドウ球菌への結合に重要な Ig 様ドメイン 2 内のループ構造が PIR-B と異なるため、その

細菌への結合能が極めて低いことが判明している³⁾。そこで、PIR-Bのピロリ菌および大腸菌の結合も同じドメインを介するか否かについて、PIR-A2h/NIH3T3細胞を用いて検討した。その結果、ピロリ菌および大腸菌共のPIR-A2hへの有意な結合は認められなかった。これらの結果より、PIR-Bはその細胞外領域のIg様ドメイン2内のループ構造を介してピロリ菌および大腸菌に結合することを示唆する。

2. ピロリ菌に対するマクロファージの炎症応答におけるPIR-Bの抑制作用

次に我々は、*Pirb* 遺伝子の欠損がピロリ菌および大腸菌に対する免疫応答にどのように影響を及ぼすかにつ

いて、*Pirb* 欠損マウス由来マクロファージを用いて検討した。ピロリ菌、大腸菌、および緑膿菌を熱処理した後、野生型および *Pirb* 欠損マウス骨髄由来マクロファージに5:1あるいは10:1(細菌:マクロファージ)の割合で刺激し、12時間後の培養上清中のIL-6サイトカイン量をELISAにより測定した。その結果、野生型マクロファージに比べて *Pirb* 欠損マクロファージではピロリ菌に対しておよそ2倍のIL-6産生の亢進が認められた(図2)。一方で、大腸菌および緑膿菌に対するIL-6産生については野生型および *Pirb* 欠損マクロファージ間において有意差は認められなかった。以上の結果は、PIR-Bはピロリ菌に結合して炎症反応を抑制することを示唆する。

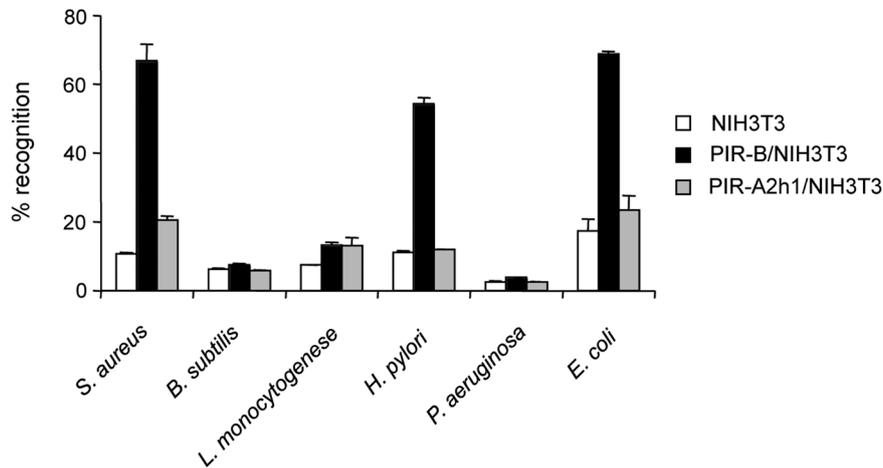


図1 PIR-Bの各種細菌への結合性

NIH3T3、PIR-B/NIH3T3 および PIR-A2h1/NIH3T3 細胞を蛍光標識した各種細菌と1:10(NIH3T3細胞:細菌)の割合で37°C 30分間培養し、各細胞への細菌の結合をFACSにより解析した。

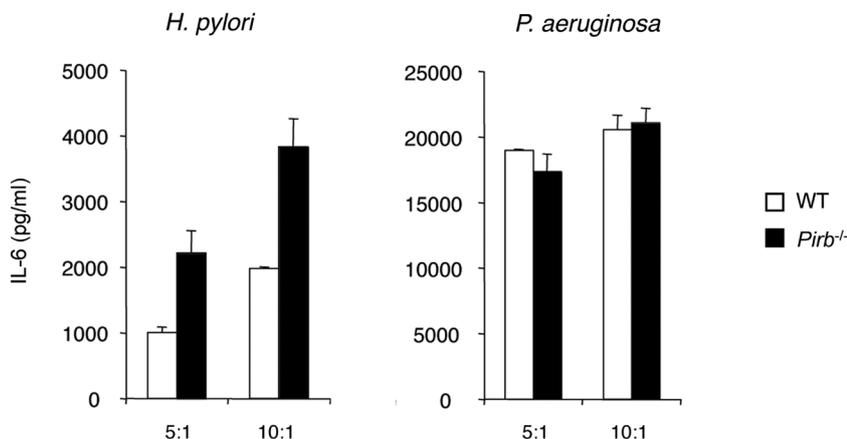


図2 PIR-B欠損マクロファージはピロリ菌に対する炎症応答が高い野生型およびPIR-B欠損マウス骨髄由来マクロファージを熱処理したピロリ菌あるいは緑膿菌

5:1および10:1(細菌:マクロファージ)の割合で刺激し、12時間後の培養上清中のIL-6量をELISAにより測定した。

3. 腸管マクロファージおよび樹状細胞上の PIR-B の発現

我々は、腸管マクロファージおよび樹状細胞上の PIR-B の発現について検討した。腸管膜リンパ節 (mesenteric lymph node: MLN) および脾臓をコラゲナーゼ処理し、CD11b、CD11c あるいは PIR に対するモノクローナル抗体で染色した。その結果、腸管膜リンパ節および脾臓のいずれにおいても PIR-B は CD11b⁺ CD11c⁻ マクロファージ、CD11b⁺ CD11c⁺ 樹状細胞、および CD11b⁻ CD11c⁺ 樹状細胞の全てのサブセットに高発現していることが判明した。このことから、PIR-B は腸管免疫において何らかの役割を担っていることが期待できる。

考 察

本研究により、PIR-B はピロリ菌に結合し、炎症応答に抑制的に作用することが判明した。ピロリ菌は全世界人口の約 2/3 が感染しており、慢性胃炎、十二指腸潰瘍のみならず胃癌の発生につながることが知られている^{5,6)}。PIR-B による炎症抑制作用がピロリ菌にとって有利に働くのか、あるいは宿主の生体防御に有利に作用するのかが不明であり、今後の検討が必要である。また本研究により PIR-B は腸管マクロファージおよび樹状細胞表面上に発現することも判明した。このことから、PIR-B は腸管免疫における重要な役割を持つことが期待

される。腸管免疫システムは腸管マクロファージを主体とする自然免疫系細胞によって構成される。通常、末梢血や脾臓に存在するマクロファージ様細胞には、Toll-like receptor (TLR) および NOD ファミリー分子といった様々な菌体成分認識レセプターが発現しており、これらレセプターが活性化されると、主に NF- κ B の活性化を介して炎症性サイトカインが誘導される。腸管マクロファージも他のマクロファージサブセットと同様に細菌認識レセプターが発現しており、実際に腸内細菌由来成分に応答することが最近分かってきた⁷⁾。しかしながら、生理的条件下においてなぜ腸管マクロファージは腸内細菌に反応して炎症を引き起こさないのか、という点については不明な点が残されている。今後、PIR-B のその抑制機構への関与について検討する予定である。

要 約

我々が黄色ブドウ球菌に結合するマクロファージ受容体として同定した PIR-B は、ピロリ菌や大腸菌といった消化管に生息する細菌にも結合することが判明した。さらに PIR-B はマクロファージのピロリ菌に対する炎症反応を抑制すること、PIR-B の発現は腸管マクロファージに高発現していることが判明したため、今後、PIR-B の腸管免疫における生理的役割について解析を進める予定である。

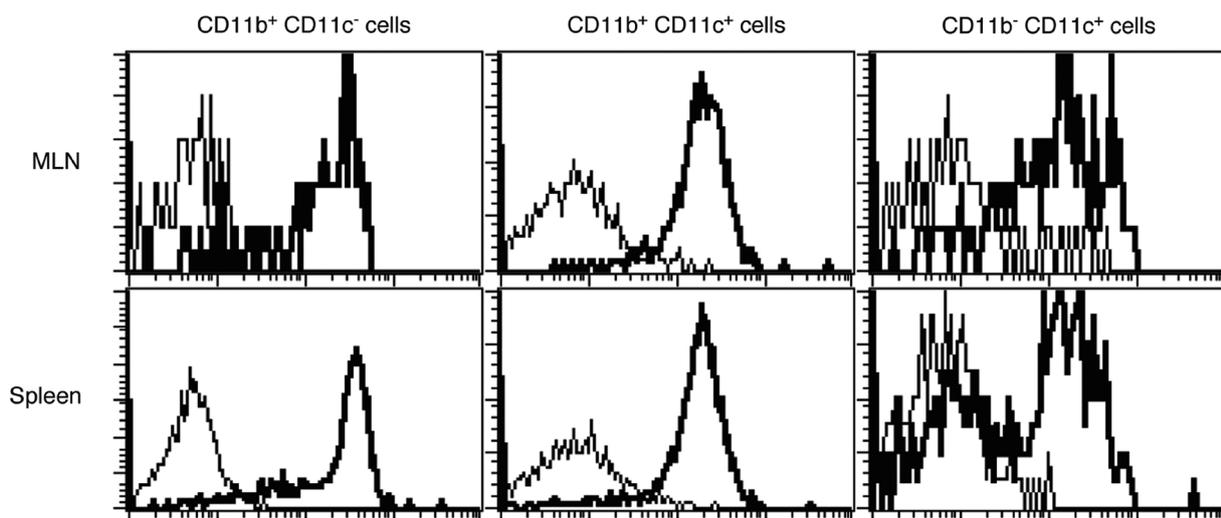


図3 腸管膜リンパ節および脾臓のマクロファージおよび樹状細胞上における PIR-B の発現
コラゲナーゼ処理した脾臓および腸管膜リンパ節 (MLN) 中の CD11b⁺ CD11c⁻ (マクロファージ)、CD11b⁺ CD11c⁺ 樹状細胞、CD11b⁻ CD11c⁺ 樹状細胞上の PIR-B の発現を FACS により解析した。細線および太線はそれぞれコントロール IgG1 抗体および抗 PIR 抗体 6C1 抗体による染色を示す。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団より研究助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Underhill DM and Ozinsky A: *Annu. Rev. Immunol.* , 2002, **20**, 825-852
- 2) Underhill DM and Gantner B: *Microbes and Infection.* , 2004, **6**, 1368-1373
- 3) Nakayama M, et al. : *J. Immunol.* , 2007, **178**, 4250-4209
- 4) Takai T: *Adv. Immunol.* , 2005, **88**, 161-192
- 5) Wilson KT and Crabtree JE. : *Gastroenterology*, 2007, **133**, 288-308
- 6) Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. (<http://www.cdc.gov/ulcer/keytocure.htm>) 2006, September 28
- 7) Strober W: *Immunity* 2009, **31**, 377-388