

9. IL-4 は高 L-アルギニン濃度で培養した IFN- γ 活性化マクロファージの結核菌殺菌能を促進する

松村 和典¹⁾, 切替 富美子^{1,2)}, 切替 照雄^{1,2)}

¹⁾ 国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部

²⁾ 順天堂大学大学院医学研究科微生物学

はじめに

結核は、世界人口の 1/3 が感染していると推計され、年間約 1,000 万人が新規に罹患し、約 140 万人が亡くなる、今なお重要な感染症である¹⁾。近年では、薬剤耐性結核菌の出現や、HIV 感染者の主要な死亡原因が結核であることが問題となっており、新規薬剤やワクチンの開発が急務である。結核菌に対する宿主の感染防御機構を調べることは、それらの開発に重要である。これまでわれわれは、宿主の持つ抗酸化酵素 Peroxiredoxin1 が抗結核に寄与することを示してきた²⁾。本稿では、結核に対する宿主の免疫応答や、抗結核に重要な役割を担うマクロファージの遺伝子発現制御について紹介し、今回われわれが見出した、高 L-arginine (L-Arg) 濃度で培養したマクロファージにおいて、Interleukin (IL)-4 が Nitric oxide (NO) 産生を促進し、結果的に、結核菌殺菌能も向上させた結果を説明する。さらに、この変化をもたらす分子機構について考察し、最後に、このような宿主の感染防御機構を解明することが、結核に対する新規治療法の開発に寄与している例を紹介する。

1. 結核に対する宿主の免疫応答

結核菌に対する宿主の防御応答において軸となるのは、Type 1 helper T (Th1) 細胞応答である³⁾。結核菌は、結核発病者の咳やくしゃみなどを通じて空気感染する菌であり、非感染者が吸い込んだ結核菌は、肺マクロファージ、好中球、単球、さらには樹状細胞などの貪食細胞に捕捉される。結核菌を捕捉した貪食細胞は、炎症性サイトカインを産生し、かつ、抗原提示することで、CD4 陽性 T 細胞を Th1 細胞に分化させる。Th1 細胞が産生するサイトカイン Interferon (IFN)- γ は、マクロファージを活性化し、抗結核能を発揮させる。なかでも Nitric oxide synthase 2 (NOS2) の発現促進は、結核菌殺菌能を有する NO の産生を増大させる。

一方、CD4 陽性 T 細胞が分化する細胞として、寄生虫感染やアレルギー反応において主要な免疫応答を担うのが Th2 細胞である。Th2 細胞が産生するサイトカ

イン IL-4 や IL-13 は、マクロファージに Arginase (ARG) 1 の発現を誘導させる⁴⁾。ARG1 は、NOS2 が NO 産生に用いる基質 L-Arg を競合的に消費する酵素であるため、結果的に NO 産生を抑制する可能性がある。この作用から、IL-4/13 は抗結核応答を阻害すると推測され、実際、結核患者の血清に含まれる IL-4 レベルは健康人より高い⁵⁾。しかし、IL-4 や IL-4 受容体のノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して、結核菌に対する抵抗性が向上していると明確に示す結果は得られていない³⁾。ただし、ARG1 のコンディショナルノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して、結核菌抵抗性が高いと報告されている⁶⁾。これまでのところ IL-4/13 が宿主の抗結核応答を阻害するかどうか不明である。

2. マクロファージの NOS2 発現誘導機構

マクロファージの NOS2 発現誘導は、細菌などを貪食することから始まる⁷⁾。細菌のもつ代表的なリガンド Lipopolysaccharide (LPS) とマクロファージの表面にある受容体 Toll like-receptor 4 (TLR4) が結合することで、シグナル伝達が始まり、最終的に転写因子 NF- κ B が活性化、核内へ移行し、Nos2 遺伝子のプロモーター領域に結合する。一方、転写因子 Interferon response factor (IRF) 3 がリン酸化し、核内移行して IFN- α/β が産生される。分泌された IFN- α/β は、受容体と結合し、Janus kinase (JAK) を活性化する。活性化した JAK は、転写因子 Signal transducers and activators of transcription (STAT) 1 を活性化、その結果 STAT1 \cdot STAT2 \cdot IRF9 の 3 つの転写因子で構成される複合体 (IFN-stimulated gene factor : ISGF3) が形成され、ISGF3 が核内に移行し、Nos2 遺伝子のプロモーター領域にある IFN-stimulated response element (ISRE) 配列に結合し、前述の NF- κ B と協調して NOS2 発現を増大させる。

Th1 細胞が産生する IFN- γ は、STAT1 を活性化するため、NOS2 発現誘導を、さらに促進する⁴⁾。結核菌が感染したマクロファージでも、この経路により NOS2 を発現するが、結核菌が感染しただけでは NO は、ほと

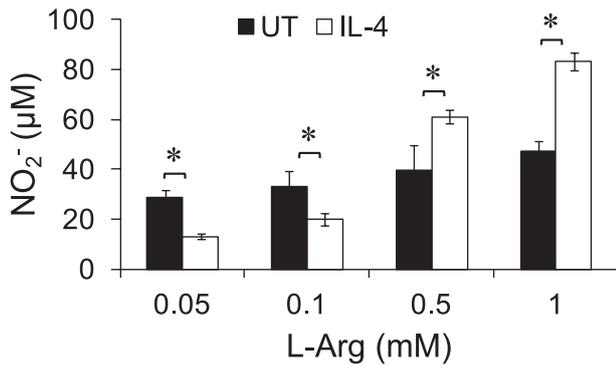


図1 LPS刺激マクロファージのNO産生に与えるIL-4の影響

C57BL/6 マウスから調整した骨髄由来マクロファージを、培地中のL-Arg濃度を0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mMに調整して培養し、10 ng/mL IL-4を添加して24時間後、100 ng/mL LPSで刺激した。LPS刺激して48時間後、培地上清に含まれるNO濃度をGriess法で測定した。
* : p < 0.05

んど産生されない。IFN- γ による活性化を経て、結核菌を殺菌するのに十分な量のNOを産生するようになる⁸⁾。一方、Th2細胞が産生するIL-4/13は、このNOS2発現誘導を抑制すると考えられてきた⁹⁾。しかし、IL-4/13によるNOS2発現誘導抑制機構は明らかになっていない。

3. IL-4によるNO産生制御にL-Arg濃度が与える影響

われわれは、IL-4によるNO産生抑制が、培地中のL-Arg濃度に依存することを見出した。0, 0.1, 0.5および1.0 mMのL-Arg濃度をもつ培地で培養した骨髄由来マクロファージをLPSで刺激し、培養上清に含まれるNOを測定したところ、L-Arg濃度が生理濃度に近い0.1 mM以下では、IL-4はNO産生を抑制し、0.5 mM以上ではNO産生を促進した(図1)。NO産生の違いは、NOS2とARG1の発現バランスによるものと考えられた。LPS刺激のみの細胞では、NOS2が発現するのに対し、ARG1は、ほとんど発現していない(図2)。一方、IL-4添加後LPS刺激した細胞では、NOS2とARG1両方が発現している。L-Arg濃度が0.1 mM以下の場合、ARG1がL-Argを消費するためNO産生は低下するが、0.5 mM以上だと、L-Argが十分に存在するため、ARG1による競合的消費の影響は低下する。さらに、IL-4添加後LPS刺激した細胞の方が、LPS刺激のみの細胞より、NOS2発現が増加しており、そのため、IL-4添加後LPS刺激した細胞によるNO産生が、LPS刺激のみの細胞と同程度ではなく、有意に多く産生する、という結果が得られたものと推察された。こ

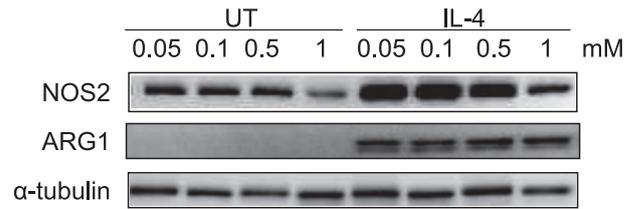


図2 LPS刺激マクロファージのNOS2/ARG1発現に与えるIL-4の影響

図1と同様の条件で行い、LPS刺激して24時間後に細胞破砕液を調整した。ウェスタンブロットにより、NOS2およびARG1を検出した。

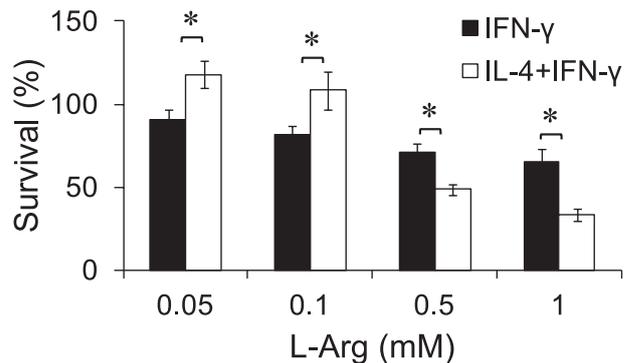


図3 IFN- γ 活性化マクロファージの結核菌殺菌能に与えるIL-4の影響

骨髄由来マクロファージをIFN- γ およびIL-4/IFN- γ で刺激し、結核菌Erdman株を1細胞あたり5つの菌の割合で感染させた。感染4時間後と72時間後に細胞を破碎し、平板培地にプレーティング、3~4週間後に生菌数を測定した。感染4時間後の生菌数を基準に、感染3日後の生存率を算出した。* : p < 0.05

のIL-4によるNOS2発現増加は、L-Arg濃度依存性はみられず、常にLPS刺激によるNOS2発現を促進していた。一方、ARG1発現は、LPS刺激やL-Arg濃度によらず一定であった。

このIL-4依存的NO産生増加が、結核菌殺菌能を促進させているか確認するため、IFN- γ 活性化マクロファージに結核菌を感染させ3日後に生存率を算出した(図3)。L-Arg濃度が0.1 mM以下の場合、IL-4は結核菌殺菌能を阻害し、0.5 mM以上の場合、IL-4は結核菌殺菌能を促進した。これより、NO産生能と結核菌殺菌能に相関がみられ、IL-4は、細胞周囲の環境によっては、結核菌殺菌能を促進することが示唆された。

4. IL-4によるNOS2発現促進機構

IL-4がマクロファージ表面のIL-4受容体と結合すると、JAK-STAT経路が活性化し、転写因子STAT6がリン酸化して核内に移行し、ARG1を初めとするIL-4/STAT6経路特異的遺伝子が発現する⁴⁾。そこで、

STAT6 が、この IL-4 依存的 NOS2 発現促進に関与しているかどうか確認するため、STAT6 をノックダウンあるいは阻害剤処理により、STAT6 の機能を失わせると、IL-4 依存的 NOS2 発現促進は減少した（未発表）。前述のとおり、LPS でマクロファージを刺激すると、IFN- α/β 依存的に ISGF3 が形成され、NOS2 発現が増強するが、この IL-4 依存的 NOS2 発現促進も、ISGF3 とかわりがあるのではないかと考え、STAT6 を免疫沈降したところ、ISGF3 を構成する転写因子の一つ IRF9 と結合していた（未発表）。IRF9 は、*Nos2* 遺伝子のプロモーター領域の ISRE 配列に結合する転写因子である。よって、IL-4 添加して LPS で刺激したマクロファージ内では、少なくとも STAT6 と IRF9 が ISGF3 様複合体を形成して、ISRE 配列に結合し、NOS2 発現を促進する機構が考えられた。

5. 腹腔マクロファージにおける IL-4 による NOS2 発現抑制機構

IL-4 による NOS2 発現促進は、骨髄由来マクロファージだけでなく、肺胞、常在性腹腔マクロファージでもみられた（未発表）。一方、チオグリコレート滲出性腹腔マクロファージでは、IL-4 は NOS2 発現を抑制し、これまでの報告⁹⁾と一致した。チオグリコレートをマウスの腹腔に注射すると、腹膜炎が起きる。腹膜炎を起こしたマウスの腹腔には、生理活性物質 Prostaglandin (PG) が滲出する。なかでも 15d-PGJ₂ は、NOS2 発現を抑制する作用を有する¹⁰⁾。チオグリコレート滲出腹腔マクロファージは、15d-PGJ₂ へ暴露した結果、IL-4 が NOS2 発現を抑制する可能性が考えられる。

6. 感染防御の知見を新規治療法開発に生かす試み

ヒト *NOS2A* 遺伝子の多型は、結核感受性と相関がある¹¹⁾。結核の病状進行に伴い形成される肉芽腫で NOS2 が発現し、結核患者の肺や末梢血から単離したマクロファージは、結核菌を殺菌可能な量の NO を産生する¹²⁾。ヒトの結核において、IL-4/13 および ARG1 の結核抵抗性への関連は明らかになっていないが、肉芽腫では ARG1 も発現しており、NO 産生を阻害している可能性が示唆されている¹³⁾。仮に IL-4/13 によって ARG1 が発現していたとしても、結核患者の血中 L-Arg 濃度を上昇させれば、NO 産生が増大し、結核菌をより殺菌できる可能性がある。実際、L-Arg を多く含むピーナッツや精製 L-Arg のサプリメントを結核患者に投与して、病状が改善したという報告がある^{14,15)}。抗結核薬ほどの効果は無いが、薬剤耐性結核菌の出現頻度を減らすため、宿主の防御応答を増強する、このような補助療法の探索が期待される。

おわりに

マクロファージや好中球をはじめとする貪食細胞は、多くの病原体に対して生体防御の最前線で活躍する免疫細胞である。これまで IL-4 はマクロファージの NO 産生を抑制すると考えられてきたが、この表現型は、培地中の L-Arg 濃度に応じて変わりうるものであった。また、IL-4 は NOS2 発現を抑制すると考えられてきた。これは、ある型のマクロファージでみられるが、他のマクロファージでは、むしろ促進していた。それらの分子機構を明らかにすることが今後の課題である。

文 献

- 1) World Health Organization : Global tuberculosis report 2016. 2016
- 2) Matsumura K, Iwai H, Kato-Miyazawa M, et al. : Peroxiredoxin 1 Contributes to Host Defenses against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 197 : 3233-3244, 2016
- 3) Flynn JL, Chan J : Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19 : 93-129, 2001
- 4) Martinez FO, Gordon S : The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : time for reassessment. *PLoS One* 9 : e100000, 2014
- 5) van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW : Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 15 : 294-309, 2002
- 6) El Kasmi KC, Qualls JE, Pesce JT, et al. : Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol* 9 : 1399-1406, 2008
- 7) Bogdan C : Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity : an update. *Trends Immunol* 36 : 161-178, 2015
- 8) Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, et al. : Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis* : signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med* 194 : 1123-1140, 2001
- 9) Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, et al. : Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol* 55 : 227-233, 1994
- 10) Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ : Cyclopentanone prostaglandins suppress activation of microglia : down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 4668-4673, 1999
- 11) Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS : Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun* 80 :

3343-3359, 2012

- 12) MacMicking JD : Cell-autonomous effector mechanisms against mycobacterium tuberculosis. Cold Spring Harb Perspect Med 4 : doi : 10.1101/cshperspect.a018507, 2014
- 13) Mattila JT, Ojo OO, Kepka-Lenhart D, et al. : Microenvironments in tuberculous granulomas are delineated by distinct populations of macrophage subsets and expression of nitric oxide synthase and arginase isoforms. J Immunol 191 : 773-784, 2013
- 14) Schön T, Elias D, Moges F, et al. : Arginine as an adjuvant to chemotherapy improves clinical outcome in active tuberculosis. Eur Respir J 21 : 483-488, 2003
- 15) Farazi A, Shafaat O, Sofian M, et al. : Arginine adjunctive therapy in active tuberculosis. Tuberc Res Treat 2015 : 205016, 2015