

結核菌感染マクロファージの一酸化窒素産生制御

松村 和典¹⁾, 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⁾順天堂大学医学部微生物学講座

Regulation of nitric oxide production in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages

Kazunori Matsumura¹⁾, Teruo Kirikae^{1,2)}

¹⁾Department of Infectious Diseases, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine

²⁾Department of Microbiology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

Peroxiredoxin 1 (PRDX1) is an antioxidant that detoxifies hydrogen peroxide and peroxynitrite. Compared with wild-type (WT) mice, Prdx1-deficient (*Prdx1*^{-/-}) mice showed increased susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Infection with Mtb led to significantly shorter mean postinfection (p. i.) survival in *Prdx1*^{-/-} (80.8 ± 10.0 days) than in WT mice (143.4 ± 17.5 days). The numbers of viable Mtb in the lungs at 9 weeks p. i. were 10-fold higher in *Prdx1*^{-/-} than in WT lungs. Histological examinations showed auramine-rhodamine-stained Mtb was present predominantly in the alveolar sacs of *Prdx1*^{-/-} lungs, but few lesions were observed in WT lungs. IFN- γ -activated *Prdx1*^{-/-} bone marrow-derived macrophages (BMDMs) did not kill Mtb effectively. Nitric oxide (NO) production levels were lower, and arginase activity and arginase 1 (Arg1) expression levels were higher in IFN- γ -activated *Prdx1*^{-/-} than WT BMDMs after Mtb infection. An arginase inhibitor, N^ω-hydroxy-nor-arginine, restored antimicrobial activity and NO production in IFN- γ -activated *Prdx1*^{-/-} BMDMs after Mtb infection. At 9 wk p. i., Arg1 mRNA levels were significantly higher in the lungs of *Prdx1*^{-/-} than WT mice. These results suggest that PRDX1 contributes to host defenses against Mtb. PRDX1 positively regulates NO production by suppressing *Arg1* expression in macrophages infected with Mtb.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 30~34, 2018

Key words : 結核菌, マクロファージ, NO, ペルオキシレドキシシン, アルギナーゼ

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、高アルギニン(L-arginine:L-arg)濃度で培養したマクロファージにおいて、インターロイキン(Interleukin:IL)-4 が一酸化窒素(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ことを報告した²⁾。本稿では、結核菌に対する宿主

の自然免疫において重要なマクロファージの活性酸素・窒素産生機構に触れ、活性酸素の代謝制御が変化することで抗結核能に影響が出ることを紹介する。さらに、今回、われわれが見出した、宿主タンパク質 PRDX1 の結核菌感染マクロファージ NO 産生への寄与について述べる。

1. 結核菌感染マクロファージによる活性酸素・窒素産生

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、肺胞マクロファージ、好中球、単球、あるいは樹状細胞などの貪食細胞に捕捉される。結核菌を捕捉したマクロファージは、炎症性サイトカインを産生し、かつ、

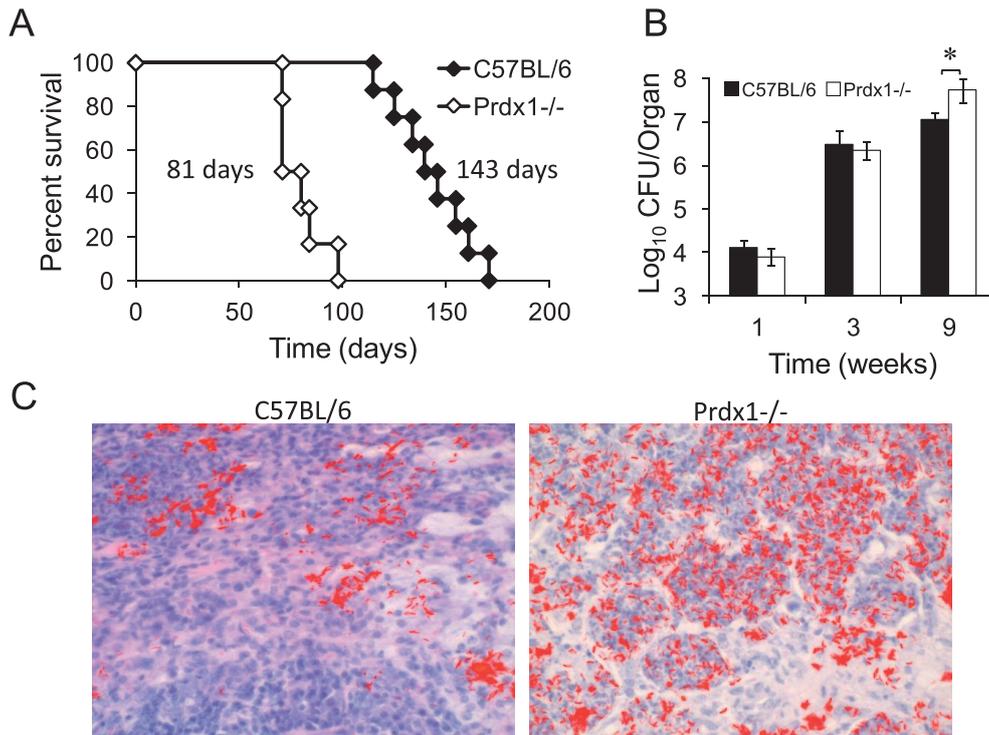


図 1 *Prdx1*^{-/-}マウスの結核感受性

- A : 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マウスの生死観察 C57BL/6 マウス (◆) および *Prdx1*^{-/-}マウス (◇) 各 10 匹に、結核菌 Erdman 株を 2×10^6 個、尾静脈より感染させ生死観察を実施した。平均生存日数を図中に示した。P<0.05。
- B : 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マウスの肺中生菌数推移 C57BL/6 マウス (■) および *Prdx1*^{-/-}マウス (□) 各 6 匹に A と同様の条件で結核菌を感染させた。感染 1・3・9 週後に肺を採材し、破碎液を、平板培地に播いた。3~4 週間後、コロニーを計測し、生菌数を推定した。* : P<0.05。
- C : 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マウスの肺切片染色像 各マウスに A と同様の条件で結核菌を感染させ、感染 9 週後に肺を採材し、ホルマリン固定後切片を 2 枚ずつ作製し、1 枚を H & E 染色し、もう 1 枚をオーラミン・ローダミン染色した。各染色切片を撮影し、画像を合成した。

抗原提示することで、CD4 陽性 T 細胞を 1 型ヘルパー T (Type 1 helper T : Th1) 細胞に分化させる³⁾。Th1 細胞が産生するインターフェロン (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。活性化マクロファージは、NADPH オキシダーゼおよび NO 合成酵素 NO synthase (NOS) 2 により、活性酸素や活性窒素を産生する⁴⁾。活性酸素には、スーパーオキシド、過酸化水素、一重項酸素、ヒドロキシラジカルなどが含まれる。一方、活性窒素には、NO およびその派生物であるペルオキシナイトライトなどが含まれる。活性酸素は、マクロファージなど貪食細胞が産生する主要な殺菌分子として知られているが、NADPH オキシダーゼ構成遺伝子を欠損したマウスは、野生型 Wild-type (WT) マウスと比較して、結核感受性に差を認めない報告がある⁵⁾こと、また、結核菌が、活性酸素を消去する抗酸化酵素を産生している⁶⁾ことから、活性酸素の抗結核への寄与は不明である。一方、NOS2 遺伝子

ノックアウト (*Nos2*^{-/-}) マウスは、WT マウスと比較して、生存日数が著しく減少するなど結核感受性が高く⁷⁾、*Nos2*^{-/-}マクロファージも、WT マクロファージと比較して、結核菌殺菌能低下が報告されており⁸⁾、抗結核への寄与が明らかとなっている。

2. 活性窒素の代謝と結核感受性への影響

NOS2 遺伝子変異だけでなく、活性窒素の代謝変化も、抗結核に影響を与えることが知られている。NOS2 は、アルギニン NO とシトルリンに分解するが、アルギナーゼ Arginase (ARG) も同じアルギニンを基質として、尿素とオルニチンに分解する。アルギナーゼには、主に細胞質に局在する ARG1 とミトコンドリアに局在する ARG2 の二種類がある。そのうち ARG1 は、活性化マクロファージの NO 産生を低下させることが報告されている⁹⁾。また、マクロファージ特異的に ARG1 を欠損したマウスに結核菌を感染させると、WT

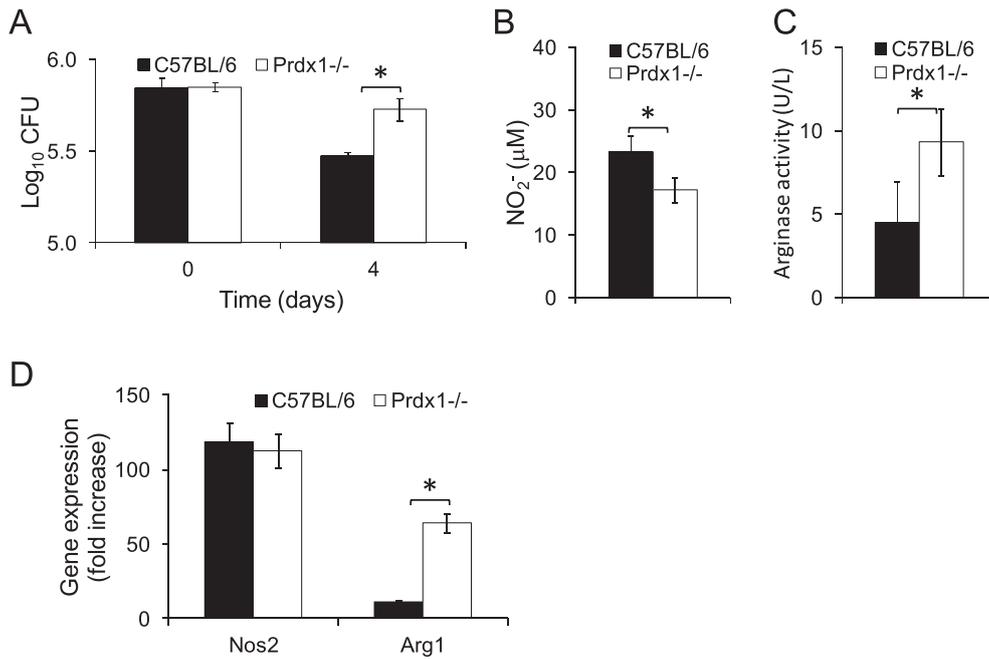


図 2 *Prdx1*^{-/-}マクロファージの一酸化窒素産生能と結核菌殺菌能

- A: *Prdx1*^{-/-}マクロファージ内の結核菌生菌数推移 C57BL/6 (■) および *Prdx1*^{-/-} (□) マウスから骨髓由来マクロファージを調整し, 10 pg/mL IFN- γ で活性化, 結核菌 Erdman 株を細胞 1 個に対して菌が 5 個入るように感染させた。感染 4 日後, 細胞破砕液を平板培地に播いた。3~4 週間後, コロニー数を測定し, 生菌数を推定した。
- B: 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マクロファージの NO 産生 図 2 (A) の結核菌感染 4 日後の培養上清を回収し, 含まれる NO 濃度を Griess 法で測定した。
- C: 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マクロファージのアルギナーゼ活性 図 2 (A) の結核菌感染 4 日後の細胞破砕液を用いてアルギナーゼ活性を測定した。
- D: 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マクロファージの遺伝子発現 図 2 (A) の結核菌感染 4 日後の細胞から全 RNA を回収し, *Nos2* と *Arg1* について, 定量 PCR を実施した。内部コントロールとして GAPDH を用い, 相対的発現量を示した。(A~D) * : $P < 0.05$ 。

マウスと比較して, 活性化マクロファージの NO 産生が増加し, 肺の生菌数は低下した¹⁰⁾。

3. PRDX1 の結核菌感染マクロファージ NO 産生への寄与

ペルオキシレドキシシン (Peroxioredoxin: PRDX) は, チオレドキシシンを電子供与体として利用し, 過酸化水素の消去を行う抗酸化酵素であり, バクテリアから動物, 植物に至るほとんどの生物で見出されているタンパク質である¹¹⁾。大きさは 25 kDa で, 細胞内では多量体を形成するが, 二量体の時は抗酸化酵素として機能し, 十量体の時は分子シャペロンとして機能すると考えられている¹²⁾。

PRDX1 は, 主に細胞質に局在する PRDX で, ほとんどの組織で発現が認められ, 活性酸素の代謝に影響を与える酵素である¹²⁾。ヘリコバクター・ピロリによる酸化損傷, 鉄ニトリロ三酢酸投与による腎臓障害, プレオ

マイシン投与による肺炎などに対して, PRDX1 の抗酸化機能による防御効果を示唆する結果が報告されている¹²⁾。

抗酸化酵素やシャペロンとしての機能だけではない, 異なる機能も持つことが知られている。すなわち, オゾン照射による肺の急性炎症を増加させること¹²⁾や, 虚血再灌流障害を起こすような脳卒中の場合, ネクローシス細胞から放出された PRDX1 が炎症を惹起することで脳障害を悪化させること¹²⁾, さらに, 組換え PRDX1 が Toll-like receptor (TLR) 4 と結合し, 炎症を正に制御することも報告されている¹²⁾。

われわれは, PRDX1 が, ARG1 発現を抑制することで NO 産生を正に制御し, 抗結核に貢献していることを見出した¹³⁾。われわれは当初, PRDX1 が抗酸化酵素であることから, 細胞から PRDX1 を失うことによって, 結核菌感染による活性酸素産生が増大し, 抗結核能が増強することを想定していた。ところが, PRDX1

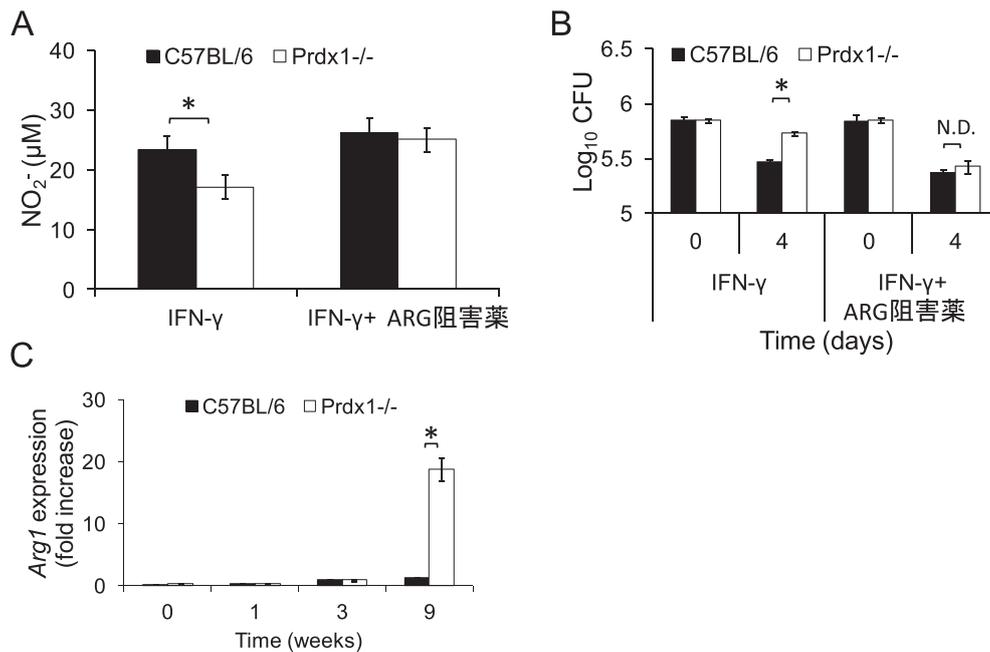


図 3 結核菌感染マクロファージおよびマウス内での PRDX1 による Arg1 発現抑制

- A : 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マクロファージの NO 産生に対するアルギナーゼ (ARG) 阻害薬の影響 C57BL/6 (■) および *Prdx1*^{-/-} (□) マウスの骨髄由来マクロファージに, 図 2 (A) と同様の条件で結核菌を感染させ, 同時に ARG 阻害薬を添加し, 感染 4 日後, 図 2 (B) と同様の方法で培養上清中に含まれる NO 濃度を測定した。
- B : 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マクロファージの結核菌殺菌能に対する ARG 阻害薬の影響 各マクロファージに, 図 2 (A) と同様の条件で結核菌を感染させ, 同時に ARG 阻害薬を添加し, 図 2 (A) と同様の方法で生菌数を測定した。
- C : 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マウスの肺中遺伝子発現の推移 各マウスに図 1 (A) と同様の条件で, 結核菌に感染させ, 感染 0・1・3・9 週後に肺を採材し, 全 RNA を抽出, Arg1 の発現を定量 PCR で測定した。内部コントロールとして GAPDH を用い, 相対的発現量を示した。(A~C) * : P<0.05。

ノックアウト (*Prdx1*^{-/-}) マウスに結核菌を感染させたところ, WT マウスと比較して, 結核抵抗性が低下した (図 1)。そこで *Prdx1*^{-/-}マウスから骨髄由来マクロファージ Bone marrow-derived macrophage (BMDM) を調整し, IFN- γ で活性化し, 結核菌を感染させたところ, WT マウスから調整した BMDM と比較して, ARG1 の発現が誘導され, NO 産生が低下し, 結核菌の生菌数が増加した (図 2)。また, ARG 阻害薬により, IFN- γ 活性化 *Prdx1*^{-/-} BMDM の NO 産生が回復し, 結核菌の生菌数も低下した (図 3)。さらに, 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マウスの肺で ARG1 発現が誘導されていたことを見出した (図 3)。以上の結果から, PRDX1 は, 結核菌が感染した IFN- γ 活性化マクロファージにおいて, ARG1 の発現を抑制することで, NO 産生を正に制御し, 結核殺菌能を向上させていることが示唆された。

おわりに

抗酸化酵素 PRDX1 が NO 産生を抑制する ARG1 の発現を阻害することで, 抗結核に寄与していることが

明らかとなった。PRDX1 はどのようにして ARG1 の発現を抑制しているのだろうか。活性酸素消去剤を IFN- γ 活性化 *Prdx1*^{-/-} BMDM の培養液に添加して, 結核菌を感染させても, NO 産生量や抗結核能には, とくに変化がみられず, PRDX1 の抗酸化酵素機能との関連は見出せなかった¹³⁾。したがって, 抗酸化酵素以外の PRDX1 の機能が関与しているものと思われる。また, IL-4 やレチノイン酸は, ARG1 を発現誘導させるが, IFN- γ 活性化 *Prdx1*^{-/-} BMDM に結核菌を感染させても, IL-4 やレチノイン酸によって発現誘導される ARG1 以外の遺伝子発現はみられなかった¹³⁾。そのため, IL-4 やレチノイン酸が直接かかわる可能性は低いものと思われる。さらに, *Prdx1*^{-/-} BMDM をそれぞれ IFN- γ で活性化する, あるいは, 結核菌を感染させるだけでは ARG1 は誘導されない¹³⁾。よって, BMDM を IFN- γ で活性化し, かつ, 結核菌を感染させたときのみ, 未知の因子により ARG1 発現が誘導されることになり, PRDX1 は未知の機能により ARG1 発現誘導を阻害すると考えられる。これら未知の ARG1 発現誘導

因子, および, PRDX1 の未知の機能を同定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) 松村和典, 切替富美子, 切替照雄 : 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. “エンドトキシン・自然免疫研究 20” 日本エンドトキシン・自然免疫研究会編. 2017, pp46-49
- 3) Flynn JL, Chan J : Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19 : 93-129, 2001
- 4) Ehrt S, Schnappinger D : Mycobacterial survival strategies in the phagosome : defence against host stresses. *Cell Microbiol* 11 : 1170-1178, 2009
- 5) Jung YJ, LaCourse R, Ryan L, et al. : Virulent but not avirulent *Mycobacterium tuberculosis* can evade the growth inhibitory action of a T helper 1-dependent, nitric oxide synthase 2-independent defense in mice. *J Exp Med* 196 : 991-998, 2002
- 6) Voskuil MI, Bartek IL, Visconti K, et al. : The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species. *Front Microbiol* 2 : 105, 2011
- 7) MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, et al. : Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 5243-5248, 1997
- 8) Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, et al. : Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon- γ and *Mycobacterium tuberculosis* : signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med* 194 : 1123-1140, 2001
- 9) Rutschman R, Lang R, Hesse M, et al. : Cutting Edge : Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol* 166 : 2173-2177, 2001
- 10) 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
- 11) Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, et al. : Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28 : 32-40, 2003
- 12) Ishii T, Warabi E, Yanagawa T : Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. *J Clin Biochem Nutr* 50 : 91-105, 2012
- 13) Matsumura K, Iwai H, Kato-Miyazawa M, et al. : Peroxiredoxin 1 contributes to host defenses against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 197 : 3233-3244, 2016