

クラミジア抗原刺激によるマクロファージの

免疫賦活作用および泡沫化機序の解析

指導教官 小池 和彦 教授

東京大学大学院医学研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 北沢 貴利

動脈硬化の機序を解明し、治療的介入を行うことは医学上の重要な課題の一つである。動脈硬化の発症、進行に対する研究において動脈硬化を炎症としてとらえる概念が定着し、炎症を惹起する成因の一つとして、病原体の感染とそれに対する宿主の免疫応答が位置付けられている。現在までに動脈硬化との関連性を指摘されている病原体は多岐にわたり、中でも肺炎クラミジア感染症は、動脈硬化の危険因子となる感染症として最も多くの疫学的研究が集積されている。

肺炎クラミジアは、呼吸器感染症の起原菌である一方で、不顕性感染の割合も高い病原体である。肺炎クラミジアと動脈硬化症との関連性の指摘は 1988 年の血清疫学的報告に始まり、以後多くの関連性を示唆する報告が得られている。また動脈硬化病変からクラミジア検出も試みられ、高率な分離培養の成功は病変部位での感染を示唆している。動物モデルによる感染実験も報告され、肺炎クラミジアの呼吸器感染により、早期に同菌が大動脈に出現し、アテローム硬化が進展する。

動脈硬化を担当する細胞の反応として *in vitro* の系での解析も進められ、マクロファージ・単球に感染すると泡沫細胞化し、その誘導因子はリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) であるとされている。泡沫化は、炎症性サイトカイン刺激でも亢進するという報告もあり、外的ストレスに対する細胞応答ととらえられる。

外的ストレスに対し活性化するシグナル伝達系の一つに mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系がある。MAPK には Extracellular-regulated protein kinase (ERK p42/44)、c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)、p38 mitogen-activated protein kinase (p38) をシグナル因子とする主要な 3 系統が存在し、泡沫化でも MAPK の関与が指摘されている。しかし、肺炎クラミジア感染がこのシグナル伝達系を介してマクロファージ泡沫化を誘導させているかについての具体的検討は未だされていない。そこで本研究ではクラミジア抗原刺激によるマクロファージ賦活機序およびマクロファージ泡沫化機序に関して特に MAPK に焦点をあて解析を行った。

まずクラミジア抗原に対する宿主の受容体認識機構について解析した。病原体の外来抗原特異的な構造を、宿主細胞が生来的に発現する膜受容体により認識し、サイトカインやケモカインといった免疫賦活化因子を誘導することは、感染免疫の初期応答として重要である。この受容体群として Toll 様受容体 (Toll-like Receptor; TLR) が知られ、細菌成分の認識には腸内細菌 LPS は TLR4 を介して、またペプチドグリカンなどは TLR2 を介して行われている。TLR を介して活性化されるシグナル因子には NF- κ B や MAPK があり、炎症性サイトカイン産生に寄与している。本研究では HEK293 細胞に TLR2、もしくは TLR4 と MD2 を強制発現させ、クラミジア抗原刺激による NF- κ B ルシフェラーゼアッセイを行った。TLR2 発現細胞で NF- κ B 活性化を認め、一方で TLR4 と MD2 発現細胞では活性化は軽度であり、クラミジア抗原の認識に関して主に TLR2 を介して細胞内シグナル伝達系を活性化させていることが明らかとなった。

次にクラミジア抗原刺激による MAPK 活性化の解析を行った。マクロファージ由来の

RAW264.7 細胞にクラミジア抗原を処理すると 15-30 分をピークとする 3 系統の MAPK のリン酸化が認められ、濃度依存性の亢進傾向を示した。

クラミジア抗原刺激による炎症性サイトカイン産生として TNF- α 、IL-1 β の産生を ELISA 法により測定した。クラミジア抗原により TNF- α 、IL-1 β ともに用量依存的に産生が亢進した。サイトカイン産生における MAPK 関与について MAPK 阻害薬による検討を行い、IL-1 β 産生は p38 インヒビター、JNK インヒビターにより減少し、p38、JNK は IL-1 β 産生に促進的に作用することが示唆された。一方 TNF- α の産生は、ERK インヒビター、p38 インヒビターで減少し、ERK、p38 で促進的に作用することが明らかとなった。

泡沫化の機序の解析には、泡沫化細胞を oil-red-O 染色し、明視野顕微鏡下で算定、もしくはイソプロパノールによる溶出による吸光度測定を行った。クラミジア抗原により用量依存性の促進作用を認めた。また添加する LDL 濃度でも用量依存的に亢進した。

泡沫化における MAPK 系の関与を検討するために、クラミジア抗原刺激時に各 MAPK 阻害薬を処理した上で LDL 添加を行った。ERK インヒビター処理では泡沫化が亢進し、p38 インヒビターおよび JNK インヒビター処理では泡沫化が抑制されていたことから、クラミジア抗原による泡沫化の過程において ERK は抑制的に、p38、JNK は促進的に作用していると考えられた。

クラミジア抗原刺激による IL-1 β 産生および泡沫化に対する MAPK の関与において、p38、JNK がともに促進的に作用することから、産生された IL-1 β が泡沫化を誘導している可能性も考えられた。そこでクラミジアで刺激した後、産生放出された IL-1 β がマクロファージに結合するのを阻害することで、IL-1 β のマクロファージ泡沫化に及ぼす影響を検討した。まず抗 IL-1 受容体抗体により IL-1 β が受容体に結合阻害され、シグナル活性化が影響されるかを NF- κ B ルシフェラーゼアッセイにて検討した。コントロールの抗 rat IgG₁ 抗体を前処理し、IL-1 β で刺激すると NF- κ B の活性化が見られたが、抗 IL-1 受容体抗体を前処理では IL-1 β で刺激による NF- κ B 活性は抗体の濃度依

的に阻害された。次に抗 IL-1 受容体抗体、抗 rat IgG₁ 抗体にて前処理し、クラミジア抗原もしくは IL-1 β を刺激後、LDL を添加し泡沫化を定量した。IL-1 β 単独刺激、また抗 rat IgG₁ 抗体、抗 IL-1 受容体抗体による泡沫化促進はみられなかった。抗 rat IgG₁ 抗体で前処理した後、クラミジア抗原で刺激すると泡沫化が促進したが、抗 IL-1 受容体抗体で前処理し、クラミジア抗原刺激すると泡沫化が減少していた。よってクラミジア抗原刺激による泡沫化の機序の一部として、放出した IL-1 β による促進効果も含まれることが示唆された。

泡沫化の要因として LDL 受容体発現の亢進による LDL 取り込みの上昇の可能性を考え、LDL 受容体の発現量を検討した。MAPK 阻害薬存在下または非存在下で処理し、その後クラミジア抗原で刺激後、抽出したタンパクに対し、ウェスタンブロッティングにて発現量の比較を行った。クラミジア抗原の刺激により LDL 受容体の発現の亢進が見られ、MAPK 阻害薬の前処理では ERK インヒビター、JNK インヒビターでコントロールと比べ発現量に変化がなかったが、p38 インヒビターで発現量はコントロールより減少した。以上の結果より LDL 受容体の発現はクラミジア抗原刺激により亢進し、p38 により促進的に作用することが示唆された。

以上本研究により、クラミジア抗原刺激はマクロファージにおいて MAPK3 系統を活性化させ、中でも p38 および JNK は IL-1 β 産生、泡沫化に促進作用をもたらすことが明らかとなった。また泡沫化の機序の一部にクラミジア刺激により産生、放出された IL-1 β が関与している可能性が示唆された。LDL 取り込みに関与する LDL 受容体は p38 がその発現亢進に関与し、泡沫化促進の一因である可能性が推測された。肺炎クラミジアに対する動脈硬化治療の介入として、抗菌薬投与による動脈硬化巣の評価、心血管イベントに対する臨床試験が行われているが、その効果については意見が分かれている。今後、肺炎クラミジア特有の動脈硬化発症における MAPK の関与など分子生物学的機構の解明がすすみ、宿主の免疫応答の制御を標的とした創薬につながることを期待される。