

Role of NKT Cells during *Chlamydia Trachomatis* Mouse Pneumonitis Lung Infection in Mice

Toshinori HAMADA¹⁾²⁾, Kazunari ISHII¹⁾, Ryota ITOH¹⁾,
Yoshiki OHNISHI¹⁾, Bin CHOU¹⁾, Toshinori SOEJIMA¹⁾,
Akinori IWASAKI²⁾, Kenji HIROMATSU¹⁾

¹⁾ Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Fukuoka University

²⁾ Department of Surgery, Division of Thoracic Surgery, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Abstract: *Chlamydia trachomatis* is an obligate intracellular pathogen that causes a variety of diseases, including trachoma, pelvic inflammatory diseases, infertility and pneumonia. Although Th-1 type cytokines have been demonstrated to be crucial in the host defense against *C. trachomatis* infection, the role of innate immune system, especially in mucosal immunity such as lung and genital tract, remains largely obscure. We investigated the role of invariant NKT (iNKT) cells in *C. trachomatis* lung infection. Ja18-/- gene knock out (KO) mice, which lack iNKT cells, and C57BL/6J wild type mice were infected intratracheally with *C. muridarum*. Compared to iNKT KO mice, wild type mice revealed significantly severe body weight loss, increased chlamydial in vivo growth and severe lung pathological changes. Systemic Chlamydia dissemination was also prominent in wild type mice. FACS analyses of lung infiltrating cells revealed that CD11b⁺Ly6G⁺ neutrophils and CD11b⁺Ly6C⁺ inflammatory macrophages greatly increased in wild type mice than in iNKT KO mice after infection. We found that increased mRNA MIP-2 and TNF α in lung tissues of WT mice but not in NKT-/- mice, suggesting a critical role of NKT cells in recruitment of neutrophils in the lung. Significantly higher levels of IL-4 and IL-13 were also found in lung homogenates of wild type mice with concomitant induction of Arginase-1 gene expression which is known to express in alternatively activated macrophages. Together, these results contribute to the understanding of how iNKT cells exacerbate *C. trachomatis* lung infection.

Key words : Natural killer T cells, CD1d, *Chlamydia trachomatis*, lung mucosal immunity, macrophages

クラミジア・トラコマチス肺粘膜感染マウスモデルにおける NKT 細胞の役割

濱田 利徳¹⁾²⁾, 石井 一成¹⁾, 伊藤 竜太¹⁾,
大西 克樹¹⁾, 仇 斌¹⁾, 副島 利紀¹⁾,
岩崎 昭憲²⁾, 廣松 賢治¹⁾

¹⁾ 福岡大学医学部微生物・免疫学教室

²⁾ 福岡大学医学部呼吸器・乳腺内分泌・小児外科学教室

要旨: 偏性細胞内寄生性細菌であるクラミジアは性感染症、トラコーマ、肺炎の主要な原因菌であり、最近では動脈硬化との関連も疑われている。これらのクラミジアは子宮頸部等の生殖器や肺などの粘膜を感染の場とする。従って、クラミジアに対する有効な免疫制御法の開発には、クラミジアの宿主免疫系からのエスケープ機構の解明に加えて、自然免疫系、獲得免疫系を含めた粘膜免疫系の場の特徴を理解することが肝

要である。NKT (natural killer T) 細胞は自然免疫系, 獲得免疫系の橋渡しをする T 細胞群で, CD1d 分子により抗原提示, 活性化され, 様々の感染免疫や, 自己免疫などの免疫制御に関係している。本研究で我々は, 細胞内寄生性細菌クラミジア・トラコマチの経気管肺感染モデルを確立し, 肺粘膜部位における NKT 細胞のクラミジア感染防御機構における役割を明らかにした。肺感染モデルでは, 野生型マウスにおいて感染後の著しい体重減少が見られ, NKT 細胞欠損マウスでは体重減少は軽度であった。また, 感染肺の経時的 IFU アッセイでも, 野生型マウスにおいて NKT 欠損マウスより感染性クラミジア (EB 基本小体) を多く認めた。また, 野生型マウスでは, NKT 欠損マウスに比べて顕著な好中球・炎症性マクロファージの肺への浸潤を認めた。肺組織におけるサイトカインおよびケモカインの real time RT-PCR による検討で, 野生型マウスにおいて iNKT 欠損マウスよりも高度の MIP-2, TNF α , CCL2 の発現増加を認め, このことが上記炎症性細胞の顕著な肺内への集合のメカニズムと考えられた。感染肺からの好中球内には感染性クラミジア基本小体の存在が IFU 法により確認され, クラミジアが好中球を増殖の場としていることが明らかとなった。クラミジア感染肺内の炎症性マクロファージの検討では, iNKT 細胞欠損マウスではマクロファージ上の MHC クラス II 分子が強発現しており Th1 系のサイトカイン (IFN γ) による活性化マクロファージが強く誘導されていることが示唆された。一方, 野生型マウスの肺組織の ELISA では, Th2 系サイトカインである IL-4 および IL-13 の産生が iNKT 細胞欠損マウスと比べて有意に増加していた。さらに, 野生型マウスでは, これらの IL-4 や IL-13 により誘導される代替活性化マクロファージ (alternatively activated macrophage : aaM ϕ) のマーカータンパク質である Arginase-1 の著しい mRNA レベルでの発現増加を real time RT-PCR で認めた。以上の結果より, 野生型マウスでは, クラミジア肺感染後 iNKT 細胞が MIP2, CCL2 等のケモカインや Th2 サイトカインである IL-4, IL-13 産生することにより, 顕著な好中球浸潤によるクラミジアの増殖や, Th2 免疫応答の誘導に基づく aaM ϕ の増加を惹起することによりクラミジア感染抵抗性が減弱している可能性が強く示唆された。

キーワード : NKT 細胞, CD1d 分子, クラミジア・トラコマチス, 肺粘膜免疫, マクロファージ

対象と方法

はじめに

クラミジアは偏性細胞内寄生性病原体であり, 眼病変であるトラコーマ, 骨盤内炎症性疾患 (PID) による不妊, また呼吸器感染症としての肺炎等の多様な病変を引き起こし, 市中肺炎の 10% 程度を占めるとされる^{1,3)}。またクラミジアは動脈硬化性疾患, アルツハイマー病などにも関与する可能性が指摘されている^{4,5)}。クラミジアの排除においては Th1 タイプサイトカインが宿主防御として, 特に肺や生殖器では粘膜免疫における自然免疫の役割が重要であることが証明されているが⁶⁾, いまだ不明な点も多い。iNKT 細胞は V α 14 抗原受容体を発現し, CD1d 分子により提示されている糖脂質を特異的に認識するリンパ球であり, 感染早期より IL-4 や IFN- γ などのサイトカインを放出し多核白血球, マクロファージ, 樹状細胞などの自然免疫系の細胞や, $\alpha\beta$ T 細胞などの獲得免疫系細胞の分化・誘導に関与している。また iNKT 細胞は産生する Th1/Th2 サイトカインのバランスが抗原の種類によって異なることが報告されている^{7,8)}。今回, マウスでのクラミジア肺炎モデルを確立し, クラミジアに対する肺粘膜免疫応答における iNKT 細胞の役割を検討した。

1. マウス

7-10 週齢 C57BL/6J 野生型雌マウス (WT) は日本 SLC 株式会社 (静岡県浜松市) より購入した。iNKT 欠損マウスである J α 281 欠損雌マウス (iNKT KO) は福岡大学アニマルセンターにて繁殖および飼育を行い, 7~10 週齢のマウスを使用した。すべての実験は福岡大学動物実験指針に則り, 福岡大学動物実験委員会によって承認された動物実験計画 (承認番号 : 0609133, 0808288) に基づき実施した。

2. クラミジア経気道感染

C.trachomatis Mouse Pneumonitis 株 (*C.muridarum* strain NiggII, ATCC No.VR-123) を, ヒト喉頭癌由来 HEp-2 細胞 (ATCC No.CCL-23) にて 48 時間培養しクラミジア基本小体 (EB) を精製し SPG 緩衝液に懸濁分注し -80°C で保存した。本研究においては同一 *C.muridarum* EB 分注物を使用した。マウスをネンプタール (大日本住友製薬, 大阪, 日本) を用いて深麻酔を施した後, 喉部皮膚を切開して気管を露出させ, 26 ゲージ針を装着したマイクロシリンジ (ハミルトン社, Nevada, USA) を用いてクラミジア *C.muridarum* EB 1.5×10^3 クラミジア封入体数

(Inclusion-Forming Unit [IFU]) を含んだ SPG 緩衝液をマウスあたり 15 μ l 経気管的に接種することでクラミジア肺炎を誘導した。

3. クラミジア感染価の測定 (IFU アッセイ)

クラミジア感染後、マウス肺および肝臓をそれぞれ無菌的に摘出し、10 倍量 (w/v) の SPG 緩衝液に懸濁し、ステンレスメッシュおよび 10 ml シリンジを用いて組織を破碎後、400 g, 4℃にて 10 分間遠心し、上清をガラスビーズ入りの試験管にて -80℃で凍結保存した。クラミジア感染価の測定に際し、凍結させた組織上清液を氷上にて融解させ、ボルテックスミキサーを用いて十分に破碎・懸濁した後、段階的に希釈した懸濁液をそれぞれ 0.25 ml を 13 mm カバーガラス上で単層培養した HEp-2 細胞上に重層し、900 g, 室温条件下において 1 時間遠心を行い吸着感染させた。その後 5% ウシ胎児血清, 100 mg/l ストレプトマイシン, 1 mg/l シクロヘキシミドをそれぞれ含む DMEM 培地にて 24 時間培養を行った。カバーガラスを取り出し氷冷メタノールで固定後、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識抗クラミジア由来リポポリサッカライド (LPS) 抗体 (AC-I: PROGEN Biothchnik, Heidelberg, Germany) を用いて染色を行った。カバーガラス中の全てのクラミジア封入体数を蛍光顕微鏡 Axioskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて測定した後、それぞれのサンプルに対する希釈倍数より希釈前のクラミジア感染価を推定した。

4. 病理組織学的解析

C.muridarum 感染 5 日後および 14 日後の野生型および iNKT 欠損マウスの両群マウスより全肺組織を摘出した。摘出した肺組織は 10%ホルマリン固定を行い、パラフィン包埋後のサンプルより 4 μ m 厚の薄層切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

5. リアルタイム定量的逆転写 PCR

C.muridarum 感染および非感染マウスの肺組織を摘出し、TRIzol[®] 試薬 (Invotrogen, CA, USA) を用いて totalRNA を抽出した。1 μ g totalRNA を鋳型とし、SuperScript[®] III First Strand Synthesis System (Invotrogen) を用いて cDNA の合成を行った。遺伝子発現の定量には 96 穴プレート上で Power SYBR[®] green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) 試薬によりアプライドバイオシステム 7500 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を使用した。使用したプライマーを以下に記す。マウス Arginase-1 センス 5' -ATC AAC ACT CCC CTG ACA AC-3' ; アンチセンス 5' -TGA AGG TCT CTT CCA TCA CC-3' , マウス Chemokine (C-C motif) Ligand2 (CCL2) センス 5' -CTA

CTC ATT CAC CAG CAA GA-3' ; アンチセンス 5' -GAT TTA CGG GTC AAC TTC AC-3' , マウス Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2), センス:5' -ACC CTG CCA AGG GTT GAC TTC-3' ; アンチセンス 5' -GGC ACA TCA GGT ACG ATC CAG-3' , マウス IL-10 センス:5' -CAA AGG ACC AGC TGG ACA AC-3' ; アンチセンス 5' -CAC TCT TCA CCT GCT CCA CT-3' , マウス TNF α センス:5' -CTA TGG CCC AGA CCC TCA CA-3' ; アンチセンス 5' -TGT GGG TGA GGA GCA CGT AG-3' , マウス Glyceraldehyde tri-phosphate dehydrogenase (GAPDH), センス 5' -GGC ACA TCA GGT ACG ATC CAG-3' ; アンチセンス 5' -ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' . PCR のプログラムは、50℃にて 2 分, 95℃にて 10 分の処理の後、(95℃にて 15 秒, 55℃にて 15 秒および 72℃にて 30 秒) のサイクルを計 40 回行った。GAPDH の mRNA 量を対照として Arginase-1, TNF α , MIP-2, CCL2 および IL-10 の mRNA 量をそれぞれ校正した後、野生型マウスの非感染サンプルにおける各 mRNA の発現量を 1.0 として、それぞれのサンプルと比較して相対的定量を行った。全ての PCR 操作は 2 サンプルずつ用いて行った。

6. サイトカイン ELISA

マウス肺組織を摘出して細断後、10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.6% NP-40, 5 mM フッ化フェニルメチルスルホニルおよび 1 mg/ml プロテアーゼ阻害剤 (ナカライテスク, 京都府) を含む溶解液で組織を溶解した。14,000 g にて 15 分間遠心後、上清を採取し測定時まで -80℃条件下で保存した。IL-4, IL-13 および IFN- γ に対する ELISA アッセイは、DuoSet[®] ELISA システム (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて製品プロトコールに従って操作を行った。

7. フローサイトメトリー

マウス肺組織を細断後、2.5 mg/ml コラゲナーゼタイプ XI (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を含む PBS 溶液中にて 37℃条件下で 30 分間保温し、100 μ m 孔のステンレス網を通す事でホモジネートした。混入した赤血球細胞は ACK 溶液 (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ and 0.1 mM EDTA) を用いて 37℃, 5 分処理することにより除外した。単離したリンパ球細胞に対し、以下に示す適切な表面マーカー抗体を用いて 4℃にて 30 分間の染色を行った。FITC 標識モノクローナル抗体: 抗 CD4 抗体 (eBioscience, San Diego, CA), 抗 CD11b 抗体 (eBioscience), 抗 B220/45R 抗体 (BD PharMingen, San Diego, CA) および抗 Ly6C 抗体 (BD PharMingen) フィコエリスリン (PE) 標識抗体: 抗 CD8 抗体 (BD

PharMingen), 抗 CD19 抗体 (eBioscience), 抗 Gr-1 抗体 (BD PharMingen), 抗 MHC class II 抗体 (eBioscience), 抗 Ly6G 抗体 (BD PharMingen) および ; アロフィコシアニン (APC) 標識抗体: 抗ベータ型 T 細胞受容体 (TCR β) 抗体 (eBioscience), 抗 CD11c 抗体 (eBioscience), 抗 CD45 抗体 (eBioscience) および 抗 F4/80 抗体 (AbD serotec, Oxford, UK). 染色した細胞は FACSCanto™ II フローサイトメーターおよび FACSDiva™ ソフトウェア (ともに BD Biosciences, San Jose, CA) を用いてデータを解析した。

8. 好中球内クラミジアの定量化

フローサイトメトリーと同様の手順でマウス摘出肺よりリンパ球細胞を単離後, PE 抱合抗 Ly6G 抗体を使用し 4℃, 30 分間の染色し洗浄後, クラミジア LPS 細胞内染色を製品プロトコールに従って操作を行った. Cytofix/Cytoperm™ 溶液 (BD PharMingen) 250 μ l にて細胞

を固定, PBS にて 10 倍希釈した 10 \times Perm/Wash™ 溶液 (BD PharMingen) で 2 度洗浄した. 再度 Perm/Wash™ 溶液 50 μ l に懸濁し, FITC 標識抗クラミジア LPS 抗体を用いて 4℃, 30 分間染色後, 2 度洗浄を行なった. 染色した細胞は FACSCanto™ II フローサイトメーターおよび FACSDiva™ ソフトウェアを用いてデータを解析した。

9. 好中球内クラミジア感染性 EB の測定

マウス摘出肺よりリンパ球細胞を単離後, MACS Separator (Miltenyi Biotec GmbH) を使用し Ly6G 陽性細胞を単離した. フローサイトメーターにて Ly6G 細胞の単離を確認後, SPG 緩衝液 1ml に懸濁し, ガラスビーズ入りの試験管にて -80℃ で凍結保存した. 以後, クラミジア感染価の測定と同様の手順でクラミジア感染性 EB を測定した。

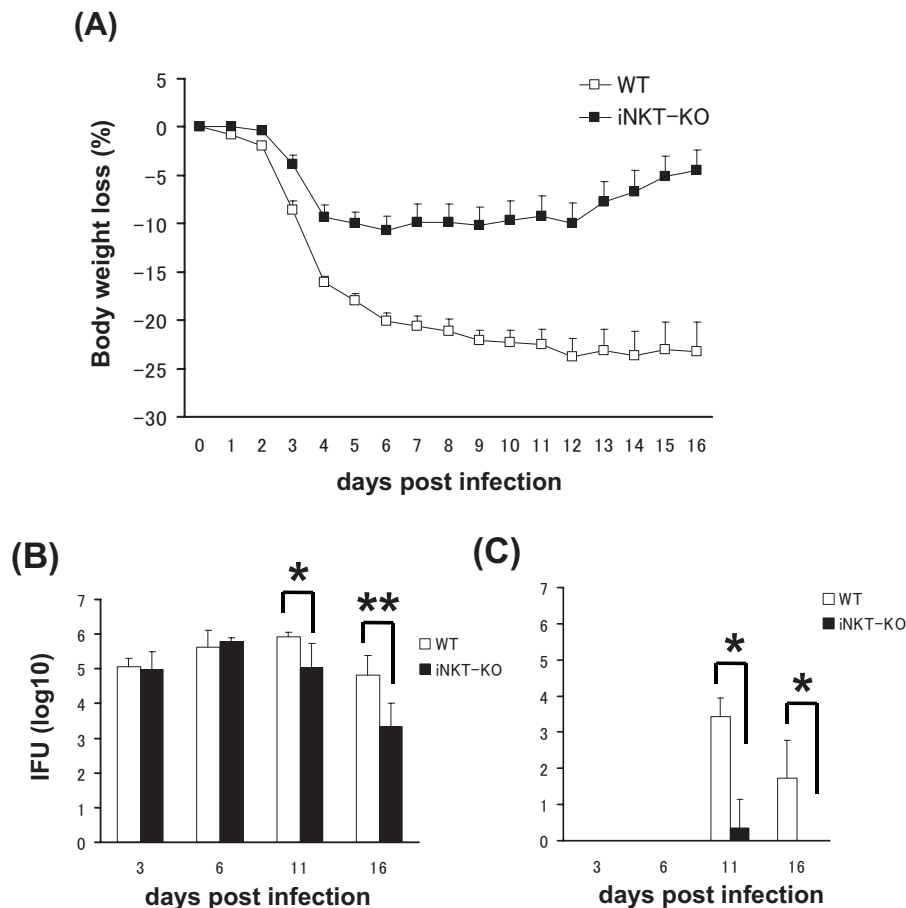


Fig 1. Serious body weight loss (A) and higher chlamydial growth in lung (B) and liver (C) following chlamydial infection in WT mice than in iNKT KO mice. Mice were intratracheally infected with *C.muridarum* (1,500 IFU) and were measured daily for body weight changes. Each point represents the mean \pm S.E.M of at least 15 mice. Mice were sacrificed on day 3, 6, 11 and 16, respectively, after infection. The lung and liver were analyzed for in vivo chlamydial growth as described Materials and Methods. p< 0.05; **p<0.01, comparison between WT and iNKT KO mice. ND; not detected.

10. 統計学的解析

それぞれのデータは平均値±標準偏差を算出し、統計学的な有意差を検証するために Student *t* 検定を行った。p<0.05 において、有意差を認めると判定した。

結 果

1. 野生型マウスと iNKT 欠損マウスにおける *C.muridarum* 経気管感染の経時的変化

マウス *C.muridarum* の経気管感染後、野生型マウス群では、iNKT 欠損マウスに比べて高度の体重減少を示した (Fig.1A)。マウス肺内および肝臓における *C.muridarum* 感染価 (IFU) は、感染後 11 日目および 16 日目の iNKT 欠損マウスは野生型マウスに対し、肺組織および肝臓組織のいずれにおいても統計学的に有意に低いクラミジア感染価を示した (Fig.1B および C)。 *C.muridarum* 感染後 5 日目および 14 日目の肺組織の HE 染色による病理組織学的解析では、顕著な炎症細胞の浸潤を野生型マウスで認めた (Fig.2)。これらの結果より、 *C.muridarum* の肺感染

モデルにおいて iNKT 細胞は感染増悪に働いている可能性が強く示唆された。

2. *C.muridarum* 経気管感染後の肺内浸潤細胞の解析

肺組織における病理組織学的解析より、iNKT 欠損マウスでは野生型と比較して炎症細胞の浸潤が抑制されていることが示唆された。このことから、 *C.muridarum* 感染後の肺組織内における免疫担当細胞の動態を検証するため、フローサイトメトリーを用いて経時的解析を行った。 Fig.3A において、全白血球中に占める各細胞集団の割合を示す。 *C.muridarum* 感染後 7 日目において、野生型および iNKT 欠損マウスの両群ともに CD11b⁺ Gr-1⁺ を指標とする好中球集団 (PMN)、CD11b⁺ Gr-1⁻ マクロファージ集団 (Mφ) および CD11c⁺ 樹状細胞集団 (DC) の全白血球集団に対する割合の増加が認められた (Fig.3A, PMN, Mφ および DC)。これらの細胞集団は感染後 11 日目および 16 日目では割合の減少に転じることが明らかとなった。これに対して、CD19⁺B 細胞は感染後 7 日目において大きくその割合が減少し、11 日目および 16 日目に増加に転じ

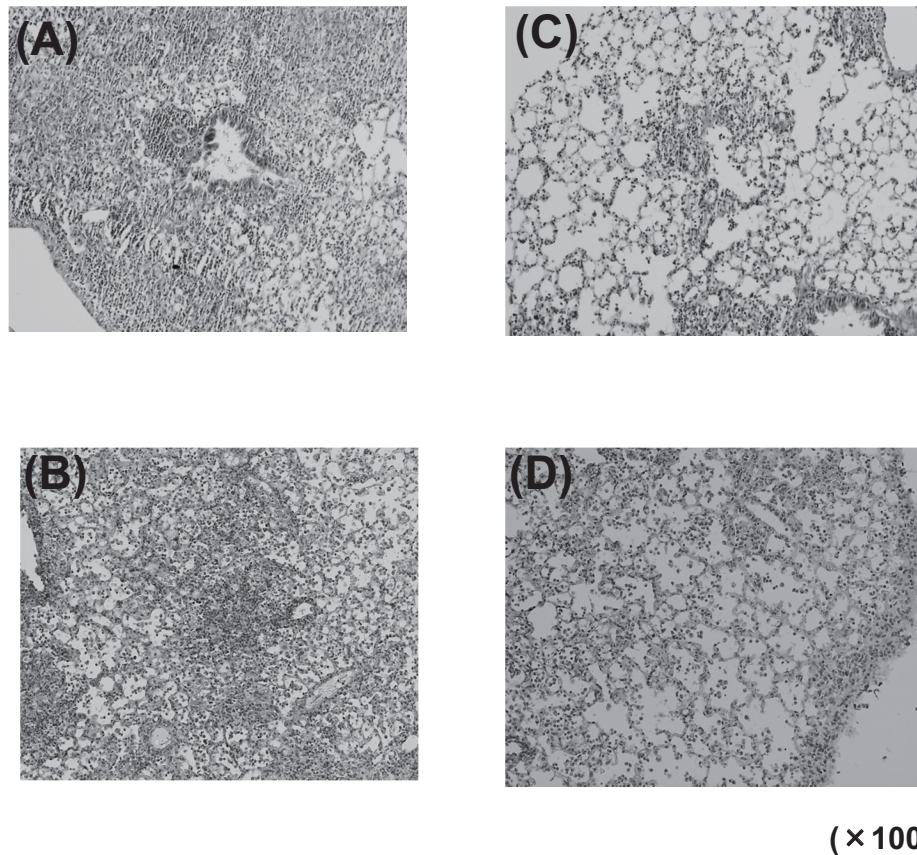


Fig 2. iNKT KO mice exhibited lesser inflammatory response than WT mice. The lung from infected mice at day 5 and 14 post infection were analyzed under light microscopy for histological changes and cellular infiltration by H.E. staining (A-D) as described Materials and Methods. Magnification, ×100. Lung histology of WT mice (A and B) and iNKT KO mice (C and D). A and C : post infection day 5, B and D : post infection day 14.

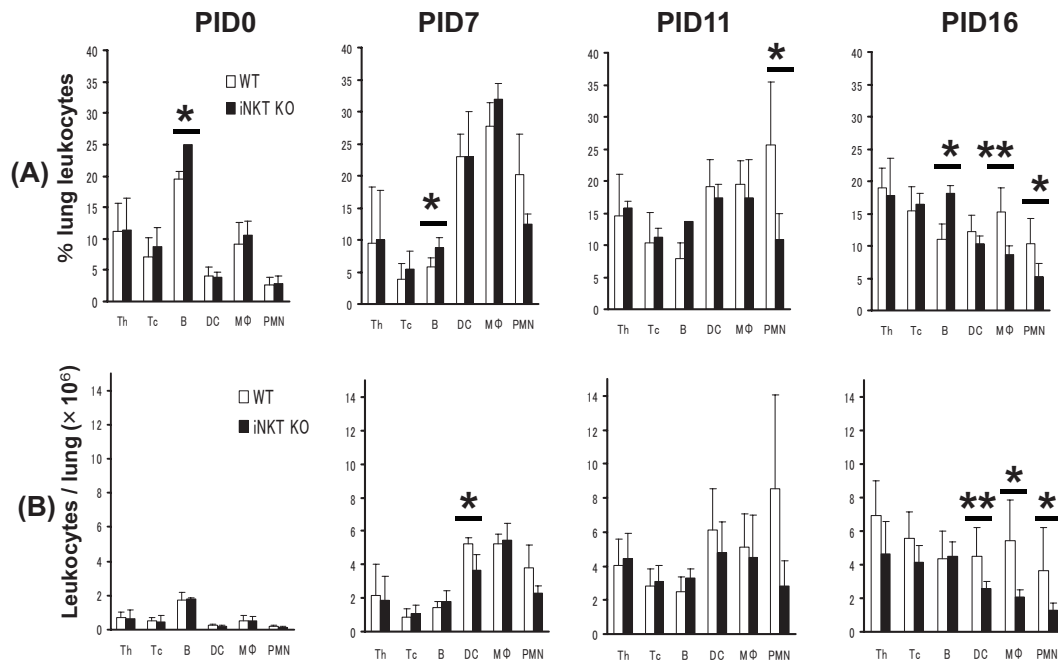


Fig 3. An elevated number of neutrophils, macrophages, dendritic cells in lung tissues of WT mice after infection with *C.muridarum* intratracheally. Kinetics of lung cells was analyzed by flow cytometer at day 0, 7, 11 and 16 postinfection. (A) Relative distribution of leukocytes in WT and iNKT KO mice, (B) The absolute number of lung leukocytes in WT and iNKT KO mice. The data are presented as mean \pm S.D, at least four mice per group were analyzed individually in each time point. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparison between WT and iNKT KO mice. Th; $CD4^+$ cells, Tc; $CD8^+$ cells, B; B cells, DC; dendritic cells, M ϕ ; macrophages and PMN; polymononuclear cells..

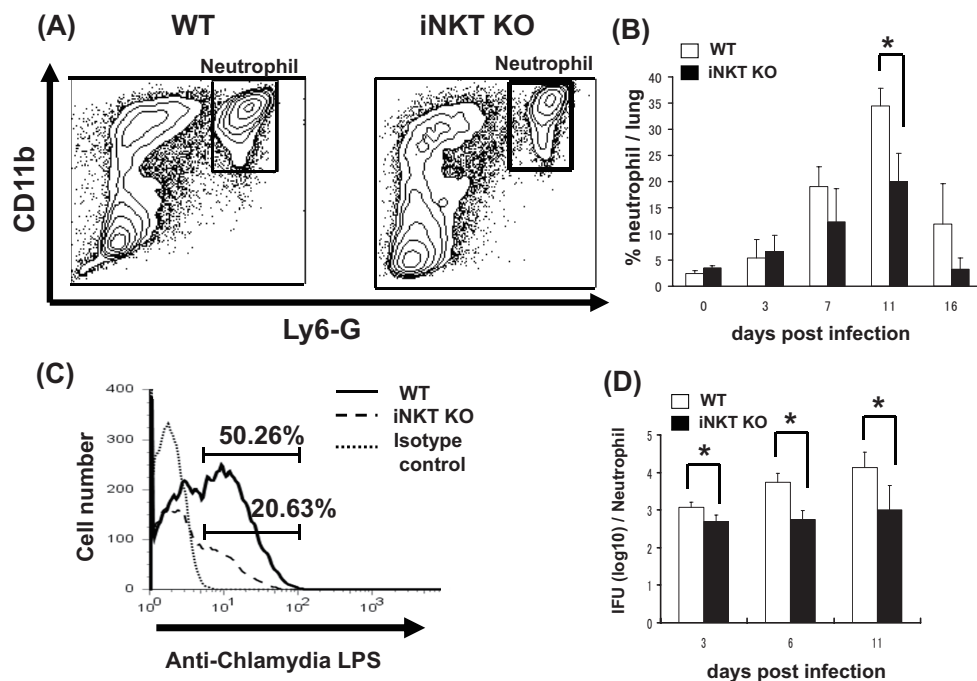


Fig 4. Neutrophil recruitment in the lung was significantly reduced in iNKT KO mice than WT mice following chlamydial infection (A and B). Higher chlamydial positive neutrophils were detected in WT mice than iNKT KO mice by intracellular flow cytometry (C). Infectious EBs in neutrophils obtained from wild type mice and iNKT KO mice after chlamydial lung infection (D). Lung cells were analyzed by flow cytometer at day 0, 3, 7, 11 and 16 post infection. The data are presented as mean \pm S.D, at least four mice per group were analyzed individually in each time point. * $p < 0.05$ comparison between WT and iNKT KO mice.

ることが明らかとなった (Fig.3A:B). $CD4^+$ ヘルパー T 細胞 (Th) および $CD8^+$ 細胞障害性 T 細胞 (Tc) は感染後、日数経過と共にその割合は増加する事が明らかとなった (Fig.3A: Th および Tc). 野生型および iNKT 欠損マウス間の比較において、PMN は感染後 7, 11 および 16 日目において、 $M\phi$ は感染後 16 日目において野生型マウスと比較して iNKT 欠損マウスで有意な減少を認めた (Fig.3A: PMN および $M\phi$). これに対して、DC は両群間における有意差は認められなかった (Fig.3A: DC). 一方、各細胞集団の絶対数を比較すると、B 細胞を除く全ての細胞集団は感染後より増加しており、その一方で B 細胞は感染後 7 日目までは絶対数の変化は見られず、その後増加に転じることが示された。この増加パターンの相違が 7 日目における B 細胞の割合の減少 (Fig.3A) に繋がると思われる。野生型および iNKT 欠損マウス間を比較すると、PMN および $M\phi$ は感染後 16 日目において、DC は感染後 7 および 16 日目において、野生型マウスと比較して iNKT 欠損マウスでは有意な減少を認めた (Fig.3B: PMN, $M\phi$ および DC). これらの結果より、*C.muridarum* 感染後日数を経るにつれて、肺組織における白血球集団の増加が誘導されるが、iNKT 欠損マウスにおいては野生型マウスに比べ自然免疫系を担う PMN, $M\phi$ および DC の増加が有意に抑制されることが示唆された。

3. クラミジアの好中球内での増殖

さらに炎症細胞である PMN, $M\phi$ を詳細に解析する目的でフローサイトメトリーを行った。近年、前述の Gr-1⁺ 細胞集団はさらに Ly6G, Ly6C の 2 種類の表面マーカーを用いて好中球 ($Ly6C^{int}Ly6G^{hi}$) および $M\phi$ ($Ly6C^{hi}Ly6G^+$) に分別できることが報告されている⁹⁾。さらに、 $M\phi$ 細胞は炎症性 $M\phi$ ($F4/80^+Ly6C^+$) および常在 $M\phi$ ($F4/80^+Ly6C^-$) に分類できることが報告されている¹⁰⁾。よって本研究においても Ly6G, Ly6C 抗体を用いてリンパ球集団を染色し、好中球、炎症性マクロファージおよび常在マクロファージの挙動に着目してフローサイトメトリーによる解析を行った。その結果、好中球 ($CD11b^+Ly6G^+$) 集団は感染後 11 日目において野生型マウス (34.5%) に対して iNKT 欠損マウスでは約 20% 程度と、有意な割合の減少を認めた (Fig.4A, B). 野生型マウスにおいて肺内への著しい好中球の流入に関わらず、クラミジアのクリアランスが遅延しているため、好中球のクラミジア殺菌能を検証した。好中球である Ly6G 陽性細胞内のクラミジア LPS 染色において、iNKT 欠損マウスではクラミジアが存在する好中球は約 20% であるのに対し、野生型マウスでは約 2.5 倍の 50% 程度と iNKT 欠損マウスは好中球内に存在するクラミジアがより軽微であることが明らかとなった (Fig.4C). さらに、これらの好中球内のクラミジアは感染性を示す EB であることが IFU 法により明らかとなった。 (Fig.4D).

以上のことより、クラミジアが肺にリクルートしてくる好中球を増殖の場としていることが強く示唆された。

4. *C.muridarum* 経気管感染における肺内炎症性マクロファージの活性化

クラミジア経気管感染後に肺内へ誘導される炎症性 $M\phi$ は野生型マウスにおいてより高度の浸潤を示した (Fig.5A, B). これらのマクロファージが細胞内殺菌能の昂進している活性化マクロファージであるかを検討するために、マクロファージの細胞表面における MHC クラス II の発現を検討したところ、野生型マウスでは、iNKT 欠損マウスと比べて、その MHC クラス II 強発現細胞の割合が有意に低下しており (Fig.5C,D), iNKT 細胞存在下では、肺内へリクルートされる炎症性マクロファージの活性化が減弱していることが強く示唆された。

5. *C.muridarum* 経気管感染後の肺内サイトカイン・ケモカインの発現の検討

好中球の浸潤に関しては、その走化性因子である $TNF\alpha$, MIP-2 の関連が報告されている¹³⁾。またマクロファージの浸潤には遊走因子である CCL2 の関連が報告されている。したがって我々は、*C.muridarum* 感染後の肺組織における $TNF\alpha$, MIP-2 および CCL2 の発現量をリアルタイム RT-PCR 法により定量し、野生型および iNKT 欠損マウス間の比較を行った。その結果、野生型マウスに対して iNKT 欠損マウスでは肺組織より検出される $TNF\alpha$, MIP-2 および CCL2 mRNA の発現量が著しく減少していることが明らかとなった (Fig.6). この結果より、野生型マウスにおける *C.muridarum* 感染後の肺組織に見られた好中球および炎症性マクロファージの顕著な増加および浸潤は、走化性因子である MIP-2, CCL2 などの顕著な増加に伴うものであることが示唆された。

感染等の刺激により誘導される免疫応答では、産生されるサイトカインにより、Th1 型あるいは Th2 型の獲得性免疫が誘導されることが知られている。そのため、我々は *C.muridarum* 感染マウスの肺組織内において、Th1 型あるいは Th2 型の免疫応答のどちらが優位に誘導されているかを、各種サイトカイン産生量を定量する事で検証した。*C.muridarum* 感染後 3, 6, 11 および 16 日目の肺組織抽出物に含まれる IFN- γ , IL-4 および IL-13 を ELISA 法により測定し、野生型マウスおよび iNKT 欠損マウス間にて比較を行った。その結果、IFN- γ , IL-4 および IL-13 のいずれにおいても、両群ともに感染 11 日目で顕著な各サイトカイン産生量の上昇が見られ、16 日目では再び減少に転じる事が明らかとなった。IFN- γ については、iNKT 欠損マウス、野生型マウス間による産生量の差異は認めなかった。これに対し、IL-4 および IL-13 についてはともに感染後 11 日目において iNKT 欠損マウス肺組織内での産生量

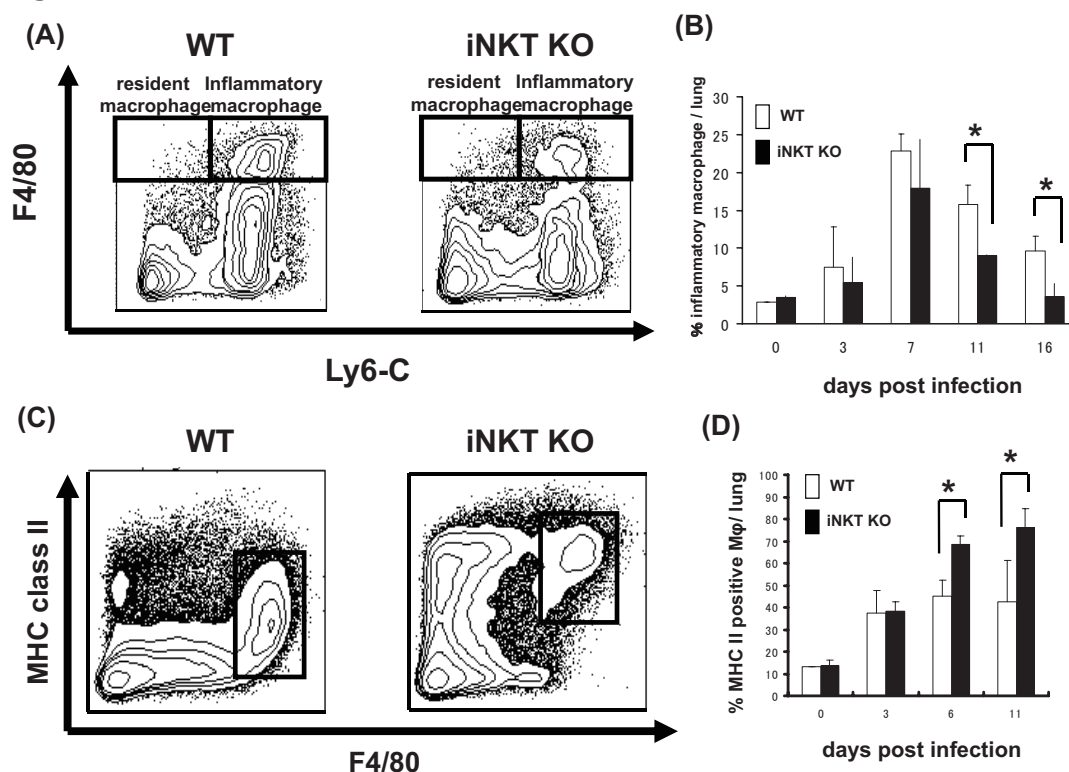


Fig 5. Inflammatory macrophage recruitment in the lung was significantly reduced in iNKT KO mice than in WT mice after chlamydial infection (A and B). MHC class II expressions on macrophage were significantly increased in iNKT KO mice compared to WT mice (C and D). Lung cells were analyzed by flow cytometer at day 0, 3, 7, 11 and 16 post infection. The data are presented as mean \pm S.D, at least four mice per group were analyzed individually in each time point. * $p < 0.05$ comparison between WT and iNKT KO mice.

が有意に減少していた (Fig.7). これらの結果から, クラミジア肺感染における感染局所では iNKT 細胞の存在により, Th2 型免疫応答への誘導が促進されている可能性が示唆された.

6. *C.muridarum* 経気管感染野生型マウスにおける Arginase-1 の発現の検討

近年, Mφでは病原体あるいは IL-4, IL-10 および IL-13 存在下など特定のサイトカイン環境により病原体の排除に関与しない代替活性化 Mφ (Alternatively-activated Mφ, AAMφ) が誘導されることが報告された^{10,14)}. 本研究においても *C.muridarum* 感染後の野生型マウス肺組織において IL-13 産生量が iNKT 欠損マウスに比べ有意に多い (Fig 7). また IL-10 mRNA の発現量が野生型マウスで有意に増加していた (Fig.8). したがって野生型マウスにおける肺組織中の Mφは AAMφへの誘導が促進されている可能性が考えられた. よって, *C.muridarum* 感染マウスにおける肺組織中の AAMφの存在を, AAMφのマーカータンパク質である Arginase-1 を指標として検証した.*C.muridarum* 感染後の肺組織より total RNA を抽出し,

リアルタイム RT-PCR 法により Arginase-1 の mRNA の発現量を定量し, 野生型および iNKT 欠損マウス両群について比較した. その結果, 野生型マウスにおいては感染後 7 および 11 日後に Arginase-1 の著しい発現増加が認められた. これに対し, iNKT 欠損マウスでは野生型マウスに比べ Arginase-1 の発現量は顕著に低いことが明らかとなった (Fig.8).

考 察

本研究において我々は, マウスに対するクラミジア肺炎モデルを確立し, クラミジア感染に関連した肺粘膜免疫応答における iNKT 細胞の役割を検討した. その結果, *C.muridarum* 肺感染モデルにおいて, iNKT 欠損マウスが対照野生型マウスと比較してより強い防御免疫が誘導されることを見出した. この結論はクラミジア感染時における iNKT 欠損マウスの軽微な体重減少, 感染局所におけるクラミジア感染価の低下および軽度な病理組織学的変化によって導かれるものである (Fig.1, 2).

C.muridarum 肺感染モデルにおける PMN と肺組織

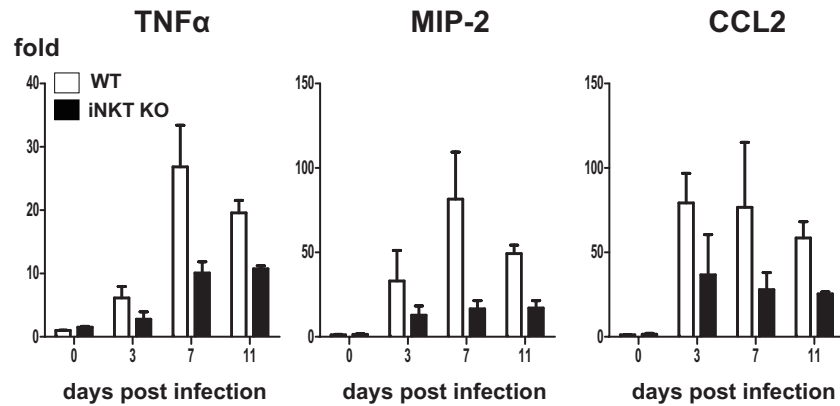


Fig 6. Expression levels of TNF α , MIP-2 and CCL2 mRNA in the lung following chlamydial infection. Lung tissue was collected on 0, 3, 7 and 11 days post infection. Real time RT-PCR analysis of TNF α , MIP-2 and CCL2 mRNA was performed as described Material and Method. At least three mice per group in each time point. The data are presented as mean \pm SEM. The relative quantification of target mRNA level was measured as the levels of change (n-fold) compared to level in control (GAPDH). * $p < 0.05$, comparison between WT and iNKT KO mice. All experiments were performed in duplicate.

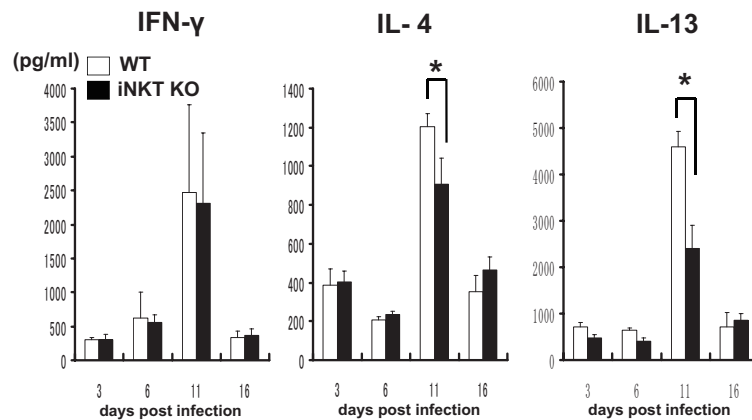


Fig 7. Higher Th2 cytokine, IL-4 and IL-13, production in the lung in WT mice compared to iNKT KO mice after chlamydial infection (A). The production of IFN γ , IL-4 and IL-13 by lung cells was analyzed by ELISA. Cytokine production from lung tissue homogenate was measured at day 3, 6, 11 and 16 post infection. The data are presented as mean \pm S.D, at least four mice per group were analyzed individually in each time point. * $p < 0.05$, comparison between WT and iNKT KO mice.

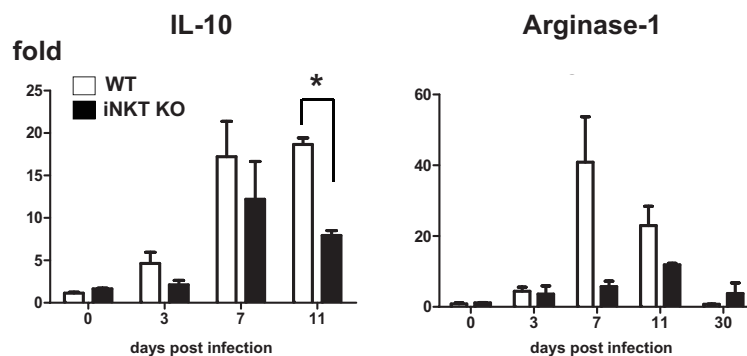


Fig 8. Expression levels of Arginase-1 and IL-10 mRNA in the lung of WT mice after chlamydial infection were higher than iNKT KO mice. Lung tissue was collected on 0, 3, 7, 11 and 30 days post infection. Real time RT-PCR analysis of IL-10 and Arginase-1 mRNA was performed as described Material and Method. At least three mice per group in each time point. The data are presented as mean \pm SEM. The relative quantification of target mRNA level was measured as the levels of change (n-fold) compared to level in control (GAPDH).

内における好中球遊走因子 MIP-2 の発現量の解析より、iNKT 欠損マウスにおける有意な好中球の減少と MIP-2 の発現量との間に明確な関連性が示された (Fig.3, 4A, 4B および 6)。Diao らは、Concanavalin A 誘導マウス肝炎モデルにおいて、肝組織内に存在する NKT 細胞が MIP-2 を産生することを報告しており¹⁵⁾、また Faunce らは、MIP-2 が NKT 細胞誘導のケモアトラクタントの可能性であることを報告している¹⁶⁾。本研究においてもクラミジア感染後の肺組織内において、NKT 細胞が MIP-2 産生源として機能しうる可能性が容易に推測された。しかしながら、*C.muridarum* 肺感染において肺組織内に存在するリンパ球集団のうち iNKT 細胞の占める割合は、最大で約 2% 程度であり (data not shown)、他のリンパ球集団により MIP-2 の産生も十分に考えうる。Rodriguez らは、*C.pneumoniae* 感染において、MyD88 依存的な MIP-2 の産生経路および好中球の遊走を報告しており¹⁷⁾、本研究においても同様に iNKT 非依存的な MIP-2 産生経路の存在が考えられ、今後の解析の課題である。いずれにおいても、本研究において野生型および iNKT 欠損マウスが示した MIP-2 産生量の差は、iNKT の存在に起因するものであり、iNKT が感染初期過程において重要な役割を担う事が示唆される。

C.muridarum 肺感染モデルにおける PMN と Mφ の経時変化を解析し、野生型マウスと比較して iNKT 欠損マウスではそれぞれの炎症細胞の遊走が抑制されていることが示唆された (Fig.3-5)。これは病理組織学的解析においても同様の結果が得られている (Fig.2)。Bai らは *C.muridarum* 肺感染マウスモデルにおいて、好中球がクラミジア感染制御の効能に乏しいことを報告しており¹⁸⁾、Roriguez らは、*C.pneumoniae* 経鼻肺感染モデルにおいて、*C.pneumoniae* が多核白血球に感染し、上皮細胞内での *C.pneumoniae* の複製を増強することを報告し¹⁷⁾、また von Zandbergen らは、多核白血球に貪食された *C.pneumoniae* は殺傷されずに多核白血球内で増殖することで、多核白血球の生存期間が延長することを報告している¹⁹⁾。本研究のクラミジア肺感染モデルにおいても、肺組織に浸潤する好中球内にクラミジアが感染および増殖しクラミジア排除の遅延を幫助していることが明らかとなった。

C.muridarum 肺感染におけるサイトカインの解析結果は、宿主のクラミジア感染感受性と iNKT 細胞の関連性について重要な示唆を与える。iNKT 細胞は感染早期より Th1 型サイトカインである IFN- γ あるいは Th2 型サイトカインである IL-4 等の各種サイトカインを大量に放出することにより CD4 ヘルパー T 細胞の Th1 もしくは Th2 細胞への分化に影響すると考えられている。Joyee らは、野生型マウスと iNKT 欠損マウスでの *C.pneumoniae* 経鼻肺感染症モデルにおいて、iNKT 細胞が Th1 型サイトカインである IFN- γ を産生し、結果的にクラミジア排除を

促進していることを報告した²⁰⁾。しかし、本研究における ELISA のデータより、*C.muridarum* 感染後 11 日目における野生型マウスの肺組織内では、iNKT 欠損マウスと比較して有意に多い IL-4 および IL-13 サイトカインの産生が示され (Fig.7)、*C.muridarum* 肺感染局所において、iNKT 細胞の存在により Th2 型の免疫応答が優位に誘導されている可能性が示唆された。このことは、同じ肺粘膜感染モデルにおいても、使用する菌の種類 (*C.muridarum* および *C.pneumoniae*) の違いにより、iNKT 細胞の免疫応答が異なる可能性を示唆する。一方、今回の研究と同じ *C.muridarum* を用いた生殖器粘膜クラミジア感染マウスモデルの検討では、iNKT 細胞はクラミジア感染後 IFN- γ を産生し Th1 免疫応答誘導を誘導することによりクラミジア排除に防御的に働くことを我々は見出している (大西ら、論文準備中)。これらのことより、肺、生殖器粘膜という異なった粘膜免疫応答の場の違いにより、同じ病原体 (*C.muridarum*) による感染症でも iNKT 細胞の果たす役割が異なることが強く示唆される。今後 iNKT 細胞の機能の違いがどのようなメカニズムで惹起されるのか、に関する検討が必要であろう。

Mφ は曝露されるサイトカインおよび病原体により、通常の活性化 Mφ および代替活性化 Mφ (AAMφ) という、異なる機能を持つ 2 種類の Mφ に分化する^{10,14)}。本研究においても野生型マウスは Mφ の誘導は増加しているが、活性化を示す MHC クラス II の発現は有意に低下していた (Fig.5D)。通常の活性化 Mφ が一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (iNOS) の発現を伴って病原体の排除を行うのに対し、AAMφ は NO 合成を阻害する Arginase-1 の発現が増強し、抗炎症作用に働くことが報告されている。Kim らは、iNKT 細胞が産生する IL-13 が、肺組織内の Mφ に作用して Mφ 自体の IL-13 および IL-13 受容体の発現を増加させ、ポジティブフィードバックによる IL-13 産生および Arginase-1 の発現を増加させ、最終的に AAMφ へ誘導させると報告している²¹⁾。本研究において、野生型マウスにおける IL-13 産生量の増加と Arginase-1 の発現増加が認められ (Fig.7, 8)、Mφ の代替活性化の誘導が示唆された。しかし、肺組織中のリンパ球集団における iNKT の存在比はごく僅かであり、また iNKT 欠損マウスにおいても IL-13 の産生は認められる事から (Fig.7)、他のリンパ球集団による IL-13 の産生が強く示唆される。野生型および iNKT 欠損マウスにおける IL-13 および Arginase-1 の産生量との比較から、iNKT の産生する IL-13 がクラミジア感染後の初期過程における AAMφ 誘導の引き金となり、以降の他リンパ球集団における IL-13 の産生に繋がる可能性が考えられる。

文 献

- 1) Brunham R. C., Zhang D. J., Yang X., and McClarty G. M.: The potential for vaccine development against chlamydial infection and disease. *J Infect Dis* 181 Suppl 3: S538-43, 2000.
- 2) Kuo C. C., Jackson L. A., Campbell L. A., and Grayston J. T.: *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 8: 451-61, 1995.
- 3) Schachter J.: Chlamydial infections (third of three parts). *N Engl J Med* 298: 540-9, 1978.
- 4) Balin B. J., Gerard H. C., Arking E. J., Appelt D. M., Branigan P. J., Abrams J. T., Whittum-Hudson J. A., and Hudson A. P.: Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol* 187: 23-42, 1998.
- 5) Johnston S. C., Messina L. M., Browner W. S., Lawton M. T., Morris C., and Dean D.: C-reactive protein levels and viable *Chlamydia pneumoniae* in carotid artery atherosclerosis. *Stroke* 32: 2748-52, 2001.
- 6) Yang X., HayGlass K. T., and Brunham R. C.: Genetically determined differences in IL-10 and IFN-gamma responses correlate with clearance of *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis infection. *J Immunol* 156: 4338-44, 1996.
- 7) Minami K., Yanagawa Y., Iwabuchi K., Shinohara N., Harabayashi T., Nonomura K., and Onoe K.: Negative feedback regulation of T helper type 1 (Th1)/ Th2 cytokine balance via dendritic cell and natural killer T cell interactions. *Blood* 106: 1685-93, 2005.
- 8) Tupin E., Kinjo Y., and Kronenberg M.: The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 5: 405-17, 2007.
- 9) Daley J. M., Thomay A. A., Connolly M. D., Reichner J. S., and Albina J. E.: Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 83: 64-70, 2008.
- 10) Gordon S. and Taylor P. R.: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-64, 2005.
- 11) Iwasaki A.: Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 25: 381-418, 2007.
- 12) Pulendran B., Tang H., and Denning T. L.: Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 20: 61-7, 2008.
- 13) Matzer S. P., Baumann T., Lukacs N. W., Rollinghoff M., and Beuscher H. U.: Constitutive expression of macrophage-inflammatory protein 2 (MIP-2) mRNA in bone marrow gives rise to peripheral neutrophils with preformed MIP-2 protein. *J Immunol* 167: 4635-43, 2001.
- 14) Kreider T., Anthony R. M., Urban J. F., Jr., and Gause W. C.: Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol* 19: 448-53, 2007.
- 15) Diao H., Kon S., Iwabuchi K., Kimura C., Morimoto J., Ito D., Segawa T., Maeda M., Hamuro J., Nakayama T., Taniguchi M., Yagita H., Van Kaer L., Onoe K., Denhardt D., Rittling S., and Uede T.: Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 21: 539-50, 2004.
- 16) Faunce D. E., Sonoda K. H., and Stein-Streilein J.: MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. *J Immunol* 166: 313-21, 2001.
- 17) Rodriguez N., Fend F., Jennen L., Schiemann M., Wantia N., Prazeres da Costa C. U., Durr S., Heinzmann U., Wagner H., and Miethke T.: Polymorphonuclear neutrophils improve replication of *Chlamydia pneumoniae* in vivo upon MyD88-dependent attraction. *J Immunol* 174: 4836-44, 2005.
- 18) Bai H., Yang J., Qiu H., Wang S., Fan Y., Han X., Xie S., and Yang X.: Intranasal inoculation of *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis agent induces significant neutrophil infiltration which is not efficient in controlling the infection in mice. *Immunology* 114: 246-54, 2005.
- 19) van Zandbergen G., Gieffers J., Kothe H., Rupp J., Bollinger A., Aga E., Klinger M., Brade H., Dalhoff K., Maass M., Solbach W., and Laskay T.: *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J Immunol* 172: 1768-76, 2004.
- 20) Joyee A. G., Qiu H., Wang S., Fan Y., Bilenki L., and Yang X.: Distinct NKT cell subsets are induced by different *Chlamydia* species leading to differential adaptive immunity and host resistance to the infections. *J Immunol* 178: 1048-58, 2007.
- 21) Kim E. Y., Battaile J. T., Patel A. C., You Y., Agapov E., Grayson M. H., Benoit L. A., Byers D. E., Alevy Y., Tucker J., Swanson S., Tidwell R., Tyner J. W., Morton J. D., Castro M., Polineni D., Patterson G. A., Schwendener R. A., Allard J. D., Peltz G., and Holtzman M. J.: Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nat Med* 14: 633-40, 2008.
- 22) Kaiko G. E., Phipps S., Hickey D. K., Lam C. E., Hansbro P. M., Foster P. S., and Beagley K. W.: *Chlamydia muridarum* infection subverts dendritic cell function to promote Th2 immunity and airways hyperreactivity. *J Immunol* 180: 2225-32, 2008.
- 23) Wiethe C., Debus A., Mohrs M., Steinkasserer A., Lutz M., and Gessner A.: Dendritic cell differentiation state and their interaction with NKT cells determine Th1/Th2 differentiation in the murine model of *Leishmania major* infection. *J Immunol* 180: 4371-81, 2008.

(平成 24. 1. 6 受付 平成 24. 3. 8 受理)

