

# Study on the Mechanism and Role of Phagocytic Elimination of Microbes and Microbe-Infected Cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/17591">http://hdl.handle.net/2297/17591</a>

【総説】

微生物および微生物感染細胞の貪食除去反応の機構と意義に関する研究

Study on the Mechanism and Role of Phagocytic Elimination of Microbes and Microbe-Infected Cells

金沢大学大学院医学系研究科 生体防御応答学分野

白 土 明 子

はじめに

生体内へ微生物が侵入すると、これらを異物と感知して排除する免疫が働く。このしくみは液性応答と細胞性応答とに大別され、それぞれに、遺伝子再編成の必要性を基準に自然免疫と獲得免疫とが存在する。<sup>1)</sup> 日常生活で免疫と呼ばれる場合には、一般に獲得免疫を意味することが多い。すなわち、獲得免疫では、異物の情報が免疫細胞に伝わり、二度目以降の感知時に強く排除するしくみが構築される。微生物が最初に感知された時には、これらは食細胞と呼ばれる一群の細胞に丸ごと取り込まれて処理を受ける。そして、分解された微生物成分が食細胞表面に移動し、これが他の免疫細胞を刺激して、いわゆる免疫記憶を産む。また、食細胞は、微生物だけを貪食の標的とするのではなく、微生物に感染した宿主細胞も変性自己細胞として認識し貪食処理する。食細胞は、取り込んだ標的細胞を吟味して適切な方法で破壊分解して無害化するとともに、炎症や組織の働きを調節する生理活性物質を産生する。<sup>2)</sup> これらの知見は、貪食反応を起点とした生体恒常性維持機構が存在することを意味する。この論文では、細胞性自然免疫応答としての微生物及び微生物感染細胞の貪食反応の機構と意義について、筆者らの研究成果を中心に解説する。

宿主食細胞による微生物の貪食と処理

哺乳類の食細胞では、マクロファージと好中球がその代表である。これらは、主に血流に乗って体内を循環する。これに対して、臓器に局在する食細胞も存在し、脳のミクログリアや肝臓のクッパー細胞が挙げられる。微生物貪食の最前線を担当するのは好中球であり、微生物感染細胞は主にマクロファージにより貪食される。貪食反応の第一段階は食細胞表面の受容体による標的細胞の認識であり、これが食細胞内の情報伝達を起し、細胞骨格の変化を伴う標的の取り込みを導く。(Figure 1) 貪食受容体は直接又は間接的に標的細胞表面の構造(リガンド)を認識する。間接的な認識は、受容体とリガンドとの両方に結合する橋渡し分子を介して行われ、橋渡し分子の代表例が抗体である。筆者らは、血清成分のマンノース結合レクチンが、大腸菌表面のリポ多糖とマクロファージ表面受容体を橋渡しして貪食を促すことを見いだした。<sup>3)</sup>

食細胞に取り込まれた標的は、貪食胞(ファゴソーム)と呼ばれる膜小胞中に捉えられ、多くの場合はこれにリソソームが融合してファゴリソームとなる。(Figure 2) 貪食胞内では、活性酵素などのラジカルによる標的細胞の破壊が行われる。さらに、ファゴリソーム中では、リソソーム由来の様々な分解

酵素により、標的成分が分解される。また、樹状細胞やマクロファージなど抗原提示能の高い食細胞では、分解された標的細胞の成分が主要組織適合性抗原複合体に結合して細胞表層に移動し、Tリンパ球に対する抗原提示が行われる場合がある。さらに、標的細胞の取り込みが食細胞中の遺伝子発現を誘導して、炎症を拡大あるいは抑制するサイトカインが産生されることもある。

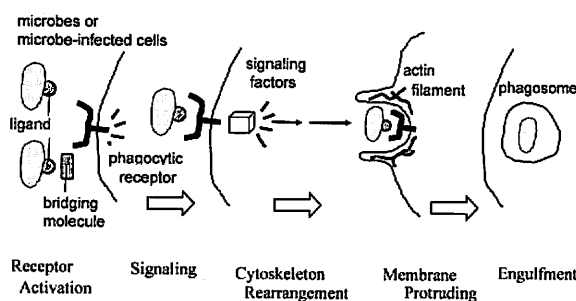


Fig.1. Mechanism of Phagocytosis of Microbes and Microbe-Infected Cells  
Step for the induction of phagocytosis are illustrated.

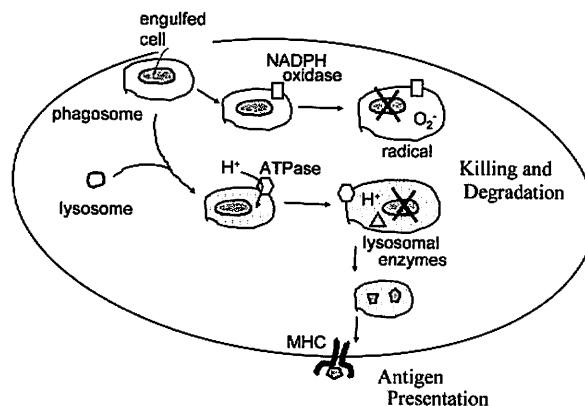


Fig. 2. Fate of Engulfed Target Cells  
Engulfed cells are contained in phagosomes where killing by readicals is done. Phagosomes are fused with lysosomes, giving rise to phagolysosomes, and engulfed and killed cells are digested by lysosomal enzymes. In antigen-presenting phagocytes, digested components of engulfed cells are bound by major histocompatibility complex (MHC) and exposed at cell surface to stimulate T lymphocytes.

### 微生物の食食殺菌からの回避

微生物は、認識の回避、食食胞からの脱出、リソソームへの輸送抑制、リソソーム内攻撃の回避などのしくみを発揮して、宿主食細胞による抹殺と消化を逃れる。(Figure 2)ある種の細菌は、細胞壁構造を変化させて食細胞に認識されなくする。また、食食されても食食胞から脱出して細胞質で生存を続ける微生物の存在も知られている。食食胞とリソソームとの融合を阻害して消化を逃れる微生物もいる。さらに、ファゴリソソーム内部の水素イオン濃度の上昇を阻害してリソソーム酵素が働けなくする微生物も知られている。

### インフルエンザウイルス感染細胞食食のしくみと病態生理学的意義

ウイルスは宿主細胞の遺伝子発現装置を使わないと増殖できない細胞内寄生体であり、ウイルスが侵入した細胞は、ウイルス遺伝子の複製と発現を優先させるように変化する。Takizawaらは、インフルエンザウイルス感染により宿主細胞がアポトーシスと呼ばれる生理学的細胞死を起こすことを初めて見だし、ウイルス感染細胞が自ら死んでウイルス増殖を抑えるという考えを提唱した。<sup>4)</sup>しかし、その後の解析により、インフルエンザウイルスは宿主細胞の装置がアポトーシスで機能しなくなる前に増殖を完了させることが判明し、この考え方が当てはまらない例のあることがわかってきた。これより筆者らは、ウイルス感染細胞のアポトーシスの意義が、食細胞による食食誘導にあると仮定して解析を進めた。その結果、インフルエンザウイルス感染細胞では、アポトーシスに伴って細胞膜リン脂質のホスファチジルセリンが細胞表層に出現し、これがリガンドとなってマクロファージによる食食が誘導されることがわかった。<sup>5)</sup>また、感染細胞の細胞膜にはウイルス由来の糖鎖修飾酵素が存在しており、マクロファージがウイルス感染細胞と接触すると、マクロファージ表面の糖鎖構造が変化してウイルス感染細胞の食食が亢進することがわかった。<sup>6)</sup>これらのことから、インフルエンザウイルス感染細胞は、アポトーシス細胞に共通する食食リガンドと、ウイルス感染に限定して生じる表面構造変化との両者により、マクロファージに効率よく食食される機構を持つことが示された。そこで、ウイルスを経鼻注入した感染モデルマウスを用いてこの反応を個体レベルで解析したところ、肺組織でウイルス感染細胞がマクロファージや好中球に食食されていた。<sup>7)</sup>マウスに食食阻害剤を与えた状態でインフルエンザウイルスを感染させると、肺組織では、アポトーシス細胞が多数検出されるようになり、ウイルス量が増え、そして、マウスが早く死ぬことが判明した。培養細胞を用いたモデル系でも、食食に依存してウイルス増殖が完全に抑制することが示された。以上より、インフルエンザウイルス感染細胞の食食の意義は、ウイルスを感染細胞もろとも破壊することによる生体防御反応であるといえる。

### 炎症時に産生される生理活性脂質による食食反応の調節

微生物の侵入した組織では、食細胞を初めとする免疫細胞や上皮細胞がこれらを検知し、炎症調節因子が産生される。そのような因子として、各種の生理活性エタノールアミンとその関連物質がある。これらの物質は生体膜脂質を材料として炎症組織で産生増大することから、筆者らは、炎症組織に集積するマクロファージ食食作用もこれらの調節を受けると予想して実験を行った。エンドカンナビノイドのひとつである2-アラキドノイルグリセロール (2-arachidonoylglycerol, 2-AG) は、カンナ

ビノイド受容体介して炎症調節や神経伝達調節を行う。2-AGは炎症性マクロファージによる真菌の取り込みを促進するとわかり、これは、2-AGがカンナビノイド受容体に作用して、食食受容体dectin-1の機能亢進を導くためであると判明した。<sup>8)</sup>また、*N*-パルミトイルホスファチジルエタノールアミン (*N*-palmitoylphosphatidylethanolamine, NPPE) は、生理活性エタノールアミンのひとつ*N*-パルミトイルエタノールアミンの前駆体であり、これについても食食への作用を調べたところ、NPPEは低分子量G蛋白質のRac1及びGdc42の活性化を抑制してマクロファージの食食能を低下させた。<sup>9)</sup>マクロファージは細胞膜を標的に向かってせり出し、仮足と呼ばれる突起を形成して標的を包み込む。(Figure 1)これは、一群の低分子量G蛋白質の作用で細胞骨格アクチン繊維が再編成されて生じる。NPPEはこれらの低分子量G蛋白質の活性化を阻害するため、NPPEによる食食抑制効果は標的の種類に依らず発揮された。NPPEの産生にはG蛋白質共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR)が働き、上述したカンナビノイド受容体もGPCRに属する。これらのことから、食細胞による微生物の食食は、感染組織の炎症及び微生物排除をGPCRを介して調節する反応だとする解釈が可能である。

### 免疫特権組織での細菌食食

免疫細胞による生体防御が活発に行われない、いわゆる免疫特権組織に眼や精巣がある。これらの組織では、免疫細胞は物理的又は機能的に抑制されている。精巣精細管は精子形成細胞の精子への分化の場であり、精細管壁内側に存在するセルトリ細胞と呼ばれる上皮系細胞が、哺育細胞として精子形成細胞の生存や分化を支持する。セルトリ細胞は密着結合を形成し、これが血液精巣関門として働くことにより微生物や免疫細胞などの管内への侵入を阻んでいる。精巣細胞による微生物感染時の免疫応答を調べたところ、セルトリ細胞は黄色ブドウ球菌や大腸菌を食食するとともに、抗菌ペプチドの一種であるディフェンシンを生産するとわかった。また、生きたマウスの精細管内へ大腸菌を顕微注入した感染モデルマウスでは、精細管外の精巣間質に好中球やリンパ球の集積が観察された。精細管内に尿道炎などの理由で微生物が侵入すると、これをセルトリ細胞が食食して抗菌物質を産生するとともに、免疫細胞を集積させる物質が精細管から放出されて微生物除去のための反応が起きると推察される。

### 細菌による宿主免疫経路の乗っ取り：宿主免疫応答を利用した黄色ブドウ球菌の殺菌回避

黄色ブドウ球菌は、ヒトへの日和見感染症を起こすグラム陽性細菌であり、宿主への感染時応答の理解は、薬剤耐性菌の出現による院内感染症制圧の面からも重要な課題である。哺乳類マクロファージは、黄色ブドウ球菌を食食し、活性酸素を使って細菌をする。一方で、マクロファージには液性自然免疫誘導性のtoll様受容体 (TLR) ファミリーが発現しており、筆者らは、これらについて、TLR4によるウイルス感染組織での炎症調節<sup>10)</sup>やマクロファージに食食された標的の分解抑制<sup>11)</sup>を報告している。さらに、黄色ブドウ球菌が、TLR2を介して活性酸素産生を抑制して、マクロファージ内で生き延びていることを見いだした。<sup>12)</sup>そこで次に、黄色ブドウ球菌の変異株ライブラリーを利用して、TLR2経路の乗っ取りに必要な菌側因子の探索を行った。TLR2のリガンド候補としては、現在のところ、細胞壁成分のリポプロテインが有力である。<sup>13)</sup>変異株の解析では、リ

ポロタンを持たない菌は活性酸素生産の抑制効果を示さなかった(未発表)。さらに、別の細胞壁成分であるD-アラニン化タイコ酸は、リポタンによるTLR2を介した活性酸素生産抑制に必要であることがわかった(未発表)。これらのことより、液性免疫では菌を排除する反応を誘導するTLR2が、細胞性免疫の食食反応では同じリポタンをリガンドとしながら、菌の生存を助けるように働くことが明らかになった。

#### ショウジョウバエを利用した感染免疫反応解析の試み

モデル生物のうち、獲得免疫を持たず、専門的食細胞を使って免疫応答を行う動物にショウジョウバエがある。ショウジョウバエは遺伝学が利用でき、また、一世代の時間が短く飼育が容易であり、しかも、免疫の基本機構が哺乳類と共通することから、微生物感染時の自然免疫反応の解析に有用な実験材料といえる。<sup>13)</sup> 筆者らはこれまでに、ショウジョウバエ食細胞によるアポトーシス細胞の食食排除機構が、線虫や哺乳類のそれと共通することを報告してきた。<sup>14,15)</sup> 現在は、これらの知見に基づき、微生物感染免疫の解析を行っている。すなわち、敗血症のモデルとしてショウジョウバエの腹から微生物を注入して、また、腸管免疫モデルとして微生物を餌に混ぜて経口摂取させて、微生物の食食を *in vivo* で解析している。また、ショウジョウバエ体液より食細胞を取りだし、*in vitro* で細胞食食を調べている。このような実験系を利用して、黄色ブドウ球菌変異株ライブラリーを調べ、食細胞による食食に必要な細菌遺伝子群が同定され、さらに、食食リガンドとなる細菌細胞壁成分やこれらを認識する食細胞上の受容体候補が得られている(未発表)。ショウジョウバエの細菌食食受容体候補分子の多くは、哺乳類にカウンターパートが存在することから、得られた知見はヒトの感染症の理解につながると期待される。

#### む す び

ヒトを初めとする高等生物の免疫研究は、歴史的に獲得免疫の機構を中心に進められてきた。そのためか、免疫学の教科書を開いても自然免疫の解説にはわずかの紙面しか与えられておらず、かつては、自然免疫は生物の進化過程で衰退した原始的で未発達なものと理解される向きがあった。しかし、自然免疫はよく体系立てられ精巧な調節を受ける反応であり、高等生物での役割も大きいことがわかってきた。今では、自然免疫と獲得免疫とは独立に進化したとする考えが提唱されている。また、獲得免疫の基準とされてきた遺伝子再編成の必要性に関しても、別のしくみによる免疫分子の多様性創出が自然免疫だけを持つ生物に見いだされている。さらに、ショウジョウバエでも免疫学的記憶が観察されるとする報告もある。‘immunity’は、もともと外交官特権に代表される審査免除の意味合いを持つ言葉である。「免疫」すなわち‘疫を免れる’と講義で板書するにつけ、自己免疫疾患などの‘免疫が原因の病気’の存在に矛盾を感じた小学生時代の記憶がよみがえる。自然免疫が獲得免疫かという分類の定義や理解に揺らぎや例外が増えている今の時代、細胞性応答と液性応答を中心として免疫機構の理解に再編成がなされるかもしれない。細胞食食反応をキーワードとした生体恒常性維持機構の体系立ては、そこに一役買うはずである。

#### 謝 辞

本研究は、金沢大学大学院医学系研究科・生体防御応答学分野の

中西義信教授のもとで実施されました。ご指導を賜りました中西教授に深謝いたします。本研究進行に必要な実験材料、技術、情報を提供頂いた国内外の研究者の皆様へ深謝いたします。大学院生として筆者と共に細菌への免疫応答プロジェクトを立ち上げ研究をおし進めた、渡邊椰子博士、橋本優実修士(博士課程在籍中)、一木万奈美修士、清水郁修士を初め、現旧職員そして卒業修了生を含めた室員諸氏に感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) Janeway, Jr CA. How the immune system works to protect the host from infection: A personal view. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7461-7468 (2001)
- 2) Nakanishi, Y. Humoral and cellular responses in innate immunity. *Yakugaku Zasshi* 126, 1207-1212 (2006)
- 3) Shiratsuchi, A., Watanabe, I., Ju, J.-S., Lee, B.-L., and Nakanishi, Y., Bridging effect of recombinant human mannose-binding lectin in macrophage phagocytosis of *Escherichia coli*. *Immunology* 124, 575-583 (2008)
- 4) Shiratsuchi, A, and Nakanishi Y. Elimination of influenza virus-infected cells by phagocytes. *Yakugaku Zasshi* 126, 1245-1251 (2006)
- 5) Shiratsuchi, A., Kaido, M., Takizawa, T., and Nakanishi, Y. Phosphatidylserine-mediated phagocytosis of influenza A virus-infected cells by mouse peritoneal macrophages. *J. Virol.* 74, 9240-9244 (2000)
- 6) Watanabe, Y., Shiratsuchi, A., Shimizu, K., Takizawa, T., and Nakanishi, Y. Role of phosphatidylserine exposure and sugar chain desialylation at the surface of influenza virus-infected cells in efficient phagocytosis by macrophages. *J. Biol. Chem.* 277, 18222-18228 (2002)
- 7) Hashimoto, Y., Moki, T., Takizawa, T., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. *J. Immunol.* 178, 2448-2457 (2007)
- 8) Shiratsuchi, A., Watanabe, I., Yoshida, H., and Nakanishi, Y. Involvement of cannabinoid receptor CB2 in dectin-1-mediated macrophage phagocytosis. *Immunol. Cell Biol.* 86, 179-184 (2008)
- 9) Shiratsuchi, A., Ichiki, M., Okamoto, Y., Ueda, N., Sugimoto, N., Takuwa, Y., and Nakanishi, Y. Inhibitory effect of N-palmitoylphosphatidylethanolamine on macrophage phagocytosis through inhibition of Rac1 and Cdc42. *J. Biochem.* 145, 43-50 (2009)
- 10) Shiratsuchi, A., Watanabe, I., Takeuchi, O., Akira, S., and Nakanishi, Y. Inhibitory effect of Toll like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J. Immunol.* 172, 2039-2047 (2004)
- 11) Watanabe, I., Ichiki, M., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. TLR2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages: a novel bacterial strategy against host innate immunity. *J. Immunol.* 178, 4917-4925 (2007)
- 12) Kurokawa, K., Lee, H., Rho, K.-B., Asanuma, M., Kim, Y. S., Nakayama, H., Shiratsuchi, A., Choi, Y., Takeuchi, O., Kang, H. J., Dohmae, N., Nakanishi, Y., Akira, S., Sekimizu, K., and Lee, B.-L. The triacylated ATP binding cluster transporter substrate-binding lipoprotein of *Staphylococcus aureus* functions as a native ligand for the toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 284, 8406-8411

(2009)

- 13) Nakanishi, Y., and Shiratsuchi, A. Mechanisms and roles of phagocytosis in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*. (review), *Invertebrate Survival Journal* 3, 89-96 (2006)
- 14) Manaka, J., Kuraishi, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P., and Nakanishi, Y. Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J. Biol. Chem.* 279, 48466-48476 (2004)
- 15) Kuraishi, T., Manaka, J., Kono, M., Ishii, H., Yamamoto, N., Koizumi, K., Shiratsuchi, A., Lee, B.-L., Higashida, H., and Nakanishi, Y. Identification of calreticulin as a marker for phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 313, 500-510 (2007)