

原 著

## 細菌内毒素による TNK 細胞の活性化と ガンマインターフェロン産生誘導

小笠原 康 悦

東北大学歯学部口腔細菌学講座

(指導: 熊谷勝男名誉教授)

(主任: 高田春比古教授)

(平成 8 年 11 月 7 日受付, 平成 8 年 12 月 2 日受理)

### Activation of TNK cells and induction of interferon- $\gamma$ by bacterial endotoxin

Kouetsu Ogasawara

*Department of Microbiology and Immunology, Tohoku University School of Dentistry*

*(Director: Emeritus Prof. Katsuo Kumagai)*

*(Chief: Prof. Haruhiko Takada)*

**Abstract:** Endotoxic lipopolysaccharides (LPS) of gram-negative bacteria modulate immune responses in animals by inducing various cytokines. Natural killer (NK) cells and TNK cells which carry surface markers of both T and NK cells are also activated by LPS and show enhanced cytotoxic activity against tumor cells. To study novel aspects of the immunomodulating activities of LPS, C57BL/6 mice were given LPS from *Escherichia coli* intraperitoneally, and systemic cytokine production and responses of NK, T, and TNK cells in the liver were examined. It was demonstrated that the activation of NK and TNK cells depended on interleukin-12 (IL-12) induced by LPS. The IL-12 receptor is highly expressed on TNK cells as compared with NK and T cells; therefore TNK cells may respond to IL-12 to a higher degree than NK and T cells. Furthermore, C57BL/6 mice given IL-12 intraperitoneally showed activated NK and TNK cells in the liver and a high serum level of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). The results suggested that IFN- $\gamma$  was produced mainly by TNK cells activated by IL-12, and that the TNK cells produced IFN- $\gamma$  in an autocrine manner. LPS from periodontal disease-associated oral black-pigmented bacteria also induced serum IFN- $\gamma$  production in mice. These findings suggest that activation of the cytokine network by the production of IL-12 also occurs in periodontal tissues.

**Key words:** LPS, TNK cells, IL-12, IFN- $\gamma$ , cytotoxicity

---

#### 略 語

FITC: Fluorescein isothiocyanate

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

IFN- $\gamma$ : Interferon-gamma

IL-1: Interleukin-1

IL-12: Interleukin-12

LPS: Lipopolysaccharide

MAF: Macrophage activating factor

NO: Nitric oxide

PE: Phycoerythrin

RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction

SCID: Severe combined immunodeficiency

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$

## 緒 言

歯周病の発症には、*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* 等のグラム陰性嫌気性桿菌が深く関わるとされている<sup>1,2)</sup>。これら細菌の表層には、内毒素性リポ多糖 (LPS) が存在している。LPS はほとんどあらゆる細胞種に作用して、極めて多彩な活性を発揮する<sup>3)</sup>。歯科領域でも有力な歯周病のビルレンス因子と考えられて活発な研究が展開されてきた<sup>4,5)</sup>。しかし当初は、LPS の歯周組織構成細胞に対する直接的傷害作用の研究が中心であった<sup>4)</sup>。その後、LPS は各種細胞を刺激して様々な活性因子の産生を促し、それら誘導された因子が、内毒素活性を含めた LPS の多彩な作用をもたらすとの考えが、一般的となった<sup>3,6,7)</sup>。このような背景のもとに、歯周病関連細菌 LPS のサイトカイン誘導活性が検討されるようになった<sup>4,5)</sup>。他方、主要な炎症性サイトカインであり、破骨細胞による骨吸収を促す因子として知られるインターロイキン (IL)-1 や腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) については、歯周病患者を対象として、歯肉浸出液中でのサイトカインレベルと病態との関わり、さらには歯周組織中でのサイトカイン産生細胞の動態等が詳細に検討されている<sup>8,9)</sup>。Takada ら<sup>10)</sup> は、歯周病関連細菌の菌体成分が、本来生体防御に当たるべきサイトカインネットワークを攪乱して、過剰のサイトカイン産生を誘導して、歯周組織破壊を引き起こしているのではないかと作業仮説に基づいて研究を展開している。その結果、歯肉繊維芽細胞による IL-1, IL-6, IL-8 等の炎症性サイトカインの産生が *P. gingivalis* や *P. intermedia* の LPS によって誘導されること、またインターフェロン (IFN) 類、特に IFN- $\gamma$  が繊維芽細胞の LPS 応答を調節していることを明らかにしている<sup>11,12)</sup>。歯周病患者の歯周組織には高レベルの IFN- $\gamma$  mRNA の発現が認められたとの報告はあるが<sup>13)</sup>、歯科領域での IFN- $\gamma$  の研究は必ずしも進んでいない。

LPS がマウスの IFN- $\gamma$  産生を促すことはよく知られているが、その機序については充分解明されていない。ちなみに IFN- $\gamma$  の主要産生細胞は T およびナチュラルキラー (NK) 細胞とされており、IL-12 がその産生を促すと考えられている。杉浦<sup>14)</sup> は、*P. gingivalis* や *Escherichia coli* の菌体成分を投与するグラム陰性菌感染実験モデルで、マウス肝リンパ球の解析を行っている。その結果、NK 細胞と T 細胞の両方の表面マーカーをもった TNK 細胞 (NK1.1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>) と

呼ばれる細胞が活性化されると強い細胞傷害活性をもつようになること、活性化された細胞集団は、これまでに報告のない NK1.1<sup>high</sup> CD3<sup>+</sup> のマーカーを発現していること、さらに、このリンパ球群誘導における主要な細菌成分が LPS であるとの知見を報告している。

そこで、本研究では、まず歯周病関連細菌由来標品を含む種々の LPS のサイトカイン産生作用、特に IFN- $\gamma$  産生誘導作用を検討した。次いで、IL-12 と TNK 細胞に主眼をおいて、LPS による IFN- $\gamma$  産生の機序を明かにしようとした。

## 材料と方法

### 1 実験動物

6-8 週齢の雄性 C57BL/6 マウスを船橋農場より購入し、東北大学医学部付属動物実験施設にて、specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育して供試した。

### 2 LPS, 抗体, サイトカイン

大部分の実験では *E. coli* O26:B6 より熱フェノール・水抽出した Difco 社 (Detroit, Mich.) 製 LPS を供試した。一部の実験では *P. gingivalis* 381 ならびに *P. intermedia* ATCC 25611 より熱フェノール・水抽出した LPS<sup>15)</sup> を供試した。リコンビナントマウスインターロイキン-12 (mIL-12) は、Genetics Institute (Cambridge, Mass.) 研究員の小林路子博士より分与を受けた。抗マウス TNF- $\alpha$  抗体、抗マウス IL-1 $\alpha$  抗体および抗マウス IL-1 $\beta$  抗体は Genzyme 社 (Cambridge, Mass.) より購入した。抗マウス IL-12 モノクローナル抗体は中和活性のある C17.8 と中和活性を欠く C15.1 を Wistar Institute (Philadelphia, Pa.) の G. Trinchieri 博士より恵受を受けて実験に供した。抗 NK1.1 抗体は PK136 hybridoma (ATCC HB-191) を購入し精製して実験に供した。抗アシアロ GM1 抗体は和光純薬 (Tokyo) より購入した。

### 3 サイトカインの定量

サイトカインの定量には ELISA kit (Genzyme Cambridge, Mass.) を用いた。C57BL/6 マウスに LPS (2.5  $\mu$ g) を腹腔内投与し、経時的に血清を採取して、血清に含まれるサイトカインを ELISA 法によって定量した。なお、各サイトカインは、予備実験でピークを示した時点で測定した。すなわち、IL-1 $\alpha$  は LPS 投与 2 時間後、TNF- $\alpha$  は 1 時間後、IFN- $\gamma$  は 24 時間後に

測定した。また、IFN- $\gamma$  産生細胞を得るため、抗 NK1.1 抗体 (5  $\mu$ g), あるいは抗アシアロ GM1 抗体 (20  $\mu$ g) をあらかじめ C57BL/6 マウス腹腔内に投与し、2 日後に IL-12 を投与し、その 24 時間後に血清中の IFN- $\gamma$  を測定する実験も行った。

#### 4 細胞調製

エーテル麻酔下でマウスの腋窩動静脈を切断して脱血死させた後、臓器を摘出した。摘出肝をハサミで細切後、200 ゲージのステンレスメッシュですりつぶし 10% FCS を含む RPMI 1640 培地 (日水製薬株式会社, 東京) 中で 1,800 rpm, 10 分, 4°C の条件で 2 度洗浄した。次いで同培地で 30% に調整した Percoll 液 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) に細胞を再浮遊させ 2,300 rpm, 15 分, 室温で遠心して、肝実質と分離したものに、Lysing buffer (0.75% 塩化アンモニウム, 0.21% トリス液, pH 7.65) を加え、赤血球を除去して用いた。

#### 5 免疫蛍光染色

細胞表面抗原の同定は抗マウス CD3 および抗マウス NK1.1 (Pharmingen Co., San Diego, Calif.) モノクローナル抗体を用いた二重染色により行った。モノクローナル抗体は Fluorescein isothiocyanate (FITC) または Phycoerythrin (PE) 標識したものをを用いた。蛍光染色細胞は FACSscan (Becton Dickinson & Co. Ltd, Mountain View, Calif.) を用いて解析した。

#### 6 細胞傷害試験

NK 感受性のマウスリンパ球系細胞株 YAC-1 細胞  $2 \times 10^6$  個を  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  液 (1 mCi/ml) 0.2 ml に浮遊させ、37°C で 1 時間炭酸ガス培養器にてインキュベートした。その後、10% FCS 加 RPMI 1640 培地で 2 回洗浄して標的細胞とした。一方、LPS やサイトカインで刺激したマウス肝臓の単核球の細胞を 3 段階に希釈してマイクロプレートの各 well に 0.1 ml ずつ分注した。各 well にラベルした標的細胞液を 0.1 ml ずつ加え、4 時間の  $^{51}\text{Cr}$  遊離法にて傷害活性を測定した。

#### 7 IL-12 受容体の検出

IL-12 受容体の検出には、reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いた。プライマーの DNA はレセプターの膜貫通領域を含み

他の遺伝子と相同性が低い部分を決定して合成した。プライマーの配列は、センス 5' GAA GAT ATC CCA GTA CCT GTA CAA CTG 3', アンチセンス 5' GCT CTC GAG GCG TTA CCC CCA AAG 3' であり、増幅されるべき PCR 産物は、981 塩基対である。また、対照として  $\beta$ -actin の RT-PCR もあわせて行った。RNA は分離したマウスリンパ球をチオシアン酸グアニジン溶液に溶解、塩化セシウムに重層して 44,000 rpm, 16 時間, 25°C にて遠心しトータル RNA を抽出した。この RNA から oligo (dT) 15 プライマー (Promega, Madison, Mich.), Rous associated virus 2 逆転写酵素により cDNA を合成し、これを鋳型とする PCR を行った。PCR の条件は、94°C 30 秒にて DNA 変性し、アニーリング 68°C 1 分、伸長 72°C 1 分で 25 サイクルとした。

### 結 果

#### 1 LPS により産生誘導されるサイトカインの検出

表 1 に示すように LPS (2.5  $\mu$ g) の投与により IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , ならびに IFN- $\gamma$  のいずれもの産生が認められた。さらに、歯周疾患の原因菌と考えられている *P. gingivalis* や *P. intermedia* の LPS (25  $\mu$ g) で IFN- $\gamma$  について検討したところ、著明な産生が認められた。一方無処理マウス (none control) の血清中に

表 1 LPS 投与により産生されるサイトカイン

LPS extracted from	Production of cytokines (pg/ml)		
	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
Expt 1			
None control	<1	<1	<1
<i>E. coli</i>	61.0 $\pm$ 6.30	1,667 $\pm$ 266	6,370 $\pm$ 382
Expt 2			
None control	NT	NT	<1
<i>P. gingivalis</i>	NT	NT	11,000 $\pm$ 369
<i>P. intermedia</i>	NT	NT	6,780 $\pm$ 382

実験 1 では、C57BL/6 マウスに *E. coli* LPS (2.5  $\mu$ g) を腹腔内投与し、血清を採取して血清に含まれるサイトカインを ELISA 法により定量した。IL-1 は LPS 投与 2 時間後、TNF- $\gamma$  は 24 時間後に採取した血清を供試して測定した。実験 2 では、*P. gingivalis* と *P. intermedia* の LPS (25  $\mu$ g) を C57BL/6 マウスに腹腔内投与し、24 時間後に血清を採取、血清に含まれる IFN- $\gamma$  を ELISA 法により定量した。NT, 測定せず。

はこれらサイトカインは全く検出されなかった。

## 2 抗マウス IL-12 抗体処理による細胞傷害活性の減少

LPS による細胞傷害活性の誘導とサイトカインとの関連を調べる目的で、種々の抗マウスサイトカイン抗体を投与し、細胞傷害活性に対する影響を検討した。抗体は血清中でのそれぞれのサイトカイン量を中和するのに十分な量を投与し、標的細胞には、NK 細胞感受性細胞である YAC-1、NK 細胞抵抗性細胞である P815 を供試した。表 2 に示されるように、抗マウス IFN- $\gamma$  抗体処理、抗マウス IL-12 抗体処理により細胞傷害活性の著しい減少がみられた。しかし、抗マウス IL-1 $\alpha$ / $\beta$  抗体処理、抗マウス TNF- $\alpha$  抗体処理、抗マウス IL-1 $\alpha$ / $\beta$  抗体と抗マウス TNF- $\alpha$  抗体併用処理を施した群ではほとんど細胞傷害活性の減少は認められなかった。また抗マウス IL-12 抗体処理群においては、YAC-1 および P815 のいずれの標的細胞においても、ほぼ完全に細胞傷害活性が抑制できたのに対し、抗マウス IFN- $\gamma$  抗体処理群においては、YAC-1 を標的細胞にした場合に部分的抑制を示すにとどまった。このことから、LPS により誘導される NK および TNK 細胞の活性化は明らかに IL-12 により誘導されているものであり、IL-12 によって産生が促されと考えられる IFN- $\gamma$  が細胞傷害活性に強く影響を及ぼして

いることが示唆された。

## 3 IL-12 受容体の検出による IL-12 に対する高反応性細胞群の同定

IL-12 に反応すると考えられる NK 細胞ならびに、TNK 細胞について IL-12 受容体の一部であるベータ鎖の発現を検討した。NK 細胞、TNK 細胞をそれぞれ 99% 以上の純度で回収し、mRNA を抽出して、PCR を行った。図 1 に示されるように、NK 細胞ならびに、TNK 細胞のいずれにも IL-12 受容体ベータ鎖の発現が認められた。特に、TNK 細胞には、著しい発現が認められた。

## 4 IL-12 により誘導される IFN- $\gamma$ 産生細胞群の同定

次に、どの細胞群が IFN- $\gamma$  産生に関与しているかを検討した。このために抗アシアロ GM1 抗体、あるいは抗 NK1.1 抗体をマウスにそれぞれ投与し、NK 細胞のみ、あるいは NK 細胞と TNK 細胞の両者を除去するという実験を行った。この実験系では、それらの細胞が少なくとも 5 日間は完全に除去された状態であることを確認した(図 2)。処理マウスに IL-12 を投与し、血清中の IFN- $\gamma$  量を測定したところ、図 3 に示されるように、NK 細胞のみを除去した場合、産生される IFN- $\gamma$  量が、わずかに減少したにとどまり、NK 細胞

表 2 抗マウスサイトカイン抗体の細胞傷害活性に対する影響

Treatment	(%) cytotoxicity to					
	P815 cell, E : T ratio			YAC-1 cells, E : T ratio		
	50 : 1	25 : 1	12.5 : 1	50 : 1	25 : 1	12.5 : 1
None	4.1 $\pm$ 2.0	1.9 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2	6.2 $\pm$ 0.8	3.9 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 0.9
LPS	23.8 $\pm$ 0.8	18.5 $\pm$ 1.5	12.4 $\pm$ 1.2	38.9 $\pm$ 2.2	35.6 $\pm$ 1.2	30.4 $\pm$ 2.1
LPS+anti-IL-1 $\alpha$ , $\beta$	18.3 $\pm$ 2.3	15.7 $\pm$ 0.9	10.2 $\pm$ 1.8	31.1 $\pm$ 2.8	29.7 $\pm$ 0.5	29.2 $\pm$ 2.1
LPS+anti-TNF- $\alpha$	21.0 $\pm$ 0.8	18.4 $\pm$ 1.2	9.8 $\pm$ 0.7	37.7 $\pm$ 5.2	33.2 $\pm$ 2.4	30.2 $\pm$ 1.8
LPS+anti-IL-1 $\alpha$ , $\beta$ +anti-TNF- $\alpha$	20.8 $\pm$ 1.2	14.9 $\pm$ 2.2	9.5 $\pm$ 0.9	34.7 $\pm$ 1.4	30.3 $\pm$ 1.2	27.8 $\pm$ 4.4
LPS+anti-IL-12 (C17.8)	4.2 $\pm$ 1.2	2.8 $\pm$ 1.1	1.8 $\pm$ 0.7	14.2 $\pm$ 2.3	12.1 $\pm$ 2.1	10.7 $\pm$ 1.0
LPS+anti-IFN- $\gamma$	6.9 $\pm$ 0.8	5.7 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 1.1	22.2 $\pm$ 0.8	19.7 $\pm$ 1.4	18.4 $\pm$ 2.1
LPS+anti-IL-12 (C15.1)	23.1 $\pm$ 1.5	19.9 $\pm$ 1.8	16.5 $\pm$ 2.3	40.8 $\pm$ 0.5	34.2 $\pm$ 1.6	30.5 $\pm$ 1.7

マウスに LPS と種々のモノクローナル抗体を腹腔内投与し、24 時間後肝臓の単核球を分離し、4 時間の  $^{51}\text{Cr}$  遊離法にて細胞傷害活性を測定した。標的細胞には、NK 細胞感受性の YAC-1 と NK 細胞抵抗性の P815 を用いた。

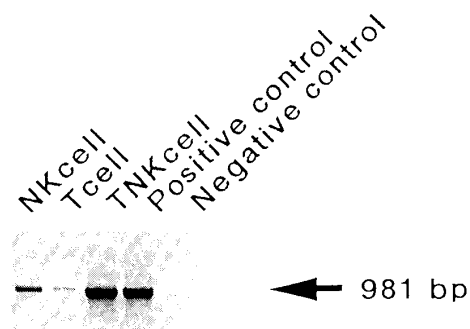
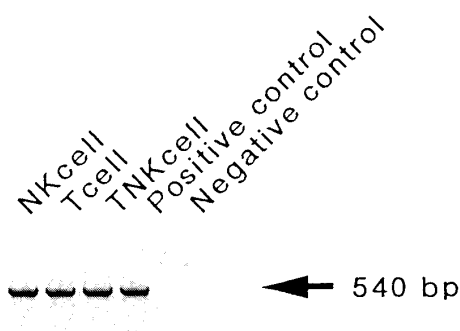
IL-12 receptor  $\beta$  chain $\beta$  actin

図1 IL-12 受容体の検出

肝臓の単核球を T, NK, および TNK 細胞に分離し、それぞれの細胞より全 RNA を抽出し、RT-PCR 法により IL-12 受容体遺伝子の発現を検出した。対照として  $\beta$ -actin の RT-PCR もあわせて行った。なお、PCR の条件は、94°C 30 秒にて DNA 変性し、アニーリング 68°C 1 分、伸長 72°C 1 分で 25 サイクルとした。

と TNK 細胞の両者を除去した場合には IFN- $\gamma$  は、検出できなかった。

## 考 察

LPS が IFN- $\gamma$  産生誘導作用を示すことは知られていたが、これは NK 細胞によるものであると考えられてきた<sup>16)</sup>。今回の実験で、LPS が免疫担当細胞に作用して IL-12 を産生誘導し、その IL-12 によって主として TNK 細胞から多量の IFN- $\gamma$  が産生されることを明らかにすることができた。

TNK 細胞は最近注目を集めている細胞集団であ

り、NK 細胞と共に、腫瘍の転移抑制、骨髄幹細胞の増殖制御、Hybrid resistance と呼ばれる骨髄移植拒絶のエフェクター細胞として知られている<sup>17)</sup>。さらに最近、Yoshimoto らは<sup>18)</sup> TNK 細胞の一部と考えられる NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 細胞が T 細胞レセプター (TCR) からの刺激で IL-4 を産生することから、ヘルパー T 細胞の Th2 タイプへの分化促進、液性免疫系への移行において TNK 細胞は、重要な役割を果たしているとの知見を示している。しかし、本研究の TNK 細胞が IL-12 に反応し IFN- $\gamma$  を産生するという事実は、ヘルパー T 細胞の Th1 タイプへの分化を促進し、細胞性免疫系への移行への関与を示唆し、彼らの説とは逆の応答を示すことが考えられる。一般に免疫反応において相対する作用を示すと考えられている IL-4 と IFN- $\gamma$  が同一の細胞から産生されるという結果は予想外の知見と言える。しかし総合して考えると、TNK 細胞には、それぞれ亜集団が存在する可能性もある。あるいは、TNK 細胞は T 細胞と NK 細胞両方の特徴を合わせ持つ細胞であり TCR からの刺激と IL-12 による刺激に応じて異なった応答を示すという可能性も考えられる。

TNK 細胞の亜集団と係わる知見として、橋元ら<sup>19)</sup> は TNK 細胞には NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 細胞と NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>dim</sup> 細胞の 2 つの亜集団が存在することも明らかにしている。すなわち Yoshimoto らの言う NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 細胞は、IL-4 産生細胞であるが、それ以外の細胞集団である NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>dim</sup> の細胞集団が IFN- $\gamma$  産生に深く関わっているのではないだろうか。実際、in vivo で CD4<sup>+</sup> 細胞を除去したマウスの TNK 細胞から IFN- $\gamma$  が産生されているという結果も得られている<sup>20)</sup>。

最近 IL-12 の情報伝達系のしくみが、明らかになりつつある。IL-12 は、他のサイトカインや TCR とは異なった情報伝達経路をたどり、IL-12 受容体からのシグナルが STAT3 と STAT4 (Signal transducers and activators of transcription) を介して核に伝わり、種々の生物反応を引き起こすという<sup>21-24)</sup>。今回 IL-12 レセプターの検出により、TNK 細胞が IL-12 レセプターを高レベルに発現していることが明らかとなった。一般的にサイトカイン受容体の発現量と反応性の間に相関が認められる。したがって、TNK 細胞は他のどの細胞群と比較しても、IL-12 に対して最も高い反応性を示す可能性がある。このことは TNK 細胞が、TCR からの刺激とは異なった応答を示しうる可能性

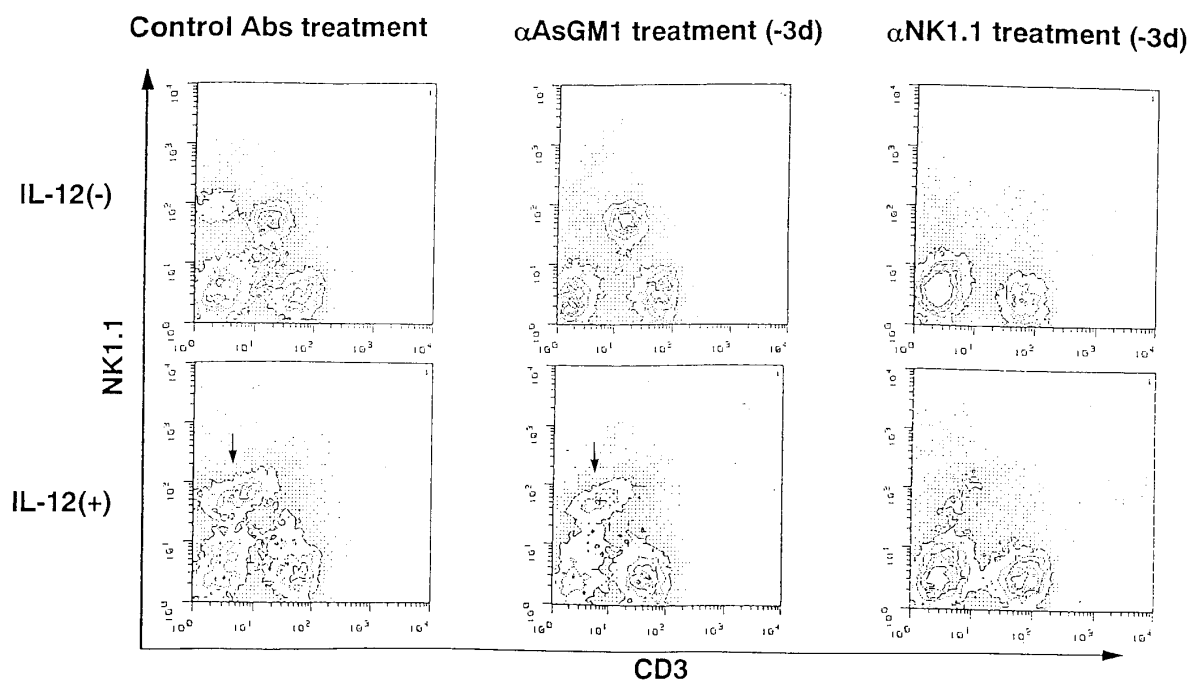


図2 抗アシアロ GM1 および抗 NK1.1 抗体投与による NK および TNK 細胞の除去  
 抗アシアロ GM1 あるいは抗 NK1.1 抗体投与後 3 日目の CD3 (FITC) と NK1.1 (PE) の二重染色のパターンを示した。抗アシアロ GM1 抗体 (20  $\mu$ g) 腹腔内投与により、全身の NK 細胞のみが選択的に除去され、抗 NK1.1 抗体 (5  $\mu$ g) 腹腔内投与により、NK, TNK 細胞の両方が除去される。下段の 3 つのパネルはそれぞれの抗体処理後 IL-12 を投与した場合のパターン、(↓) は活性化 TNK 細胞を示す。

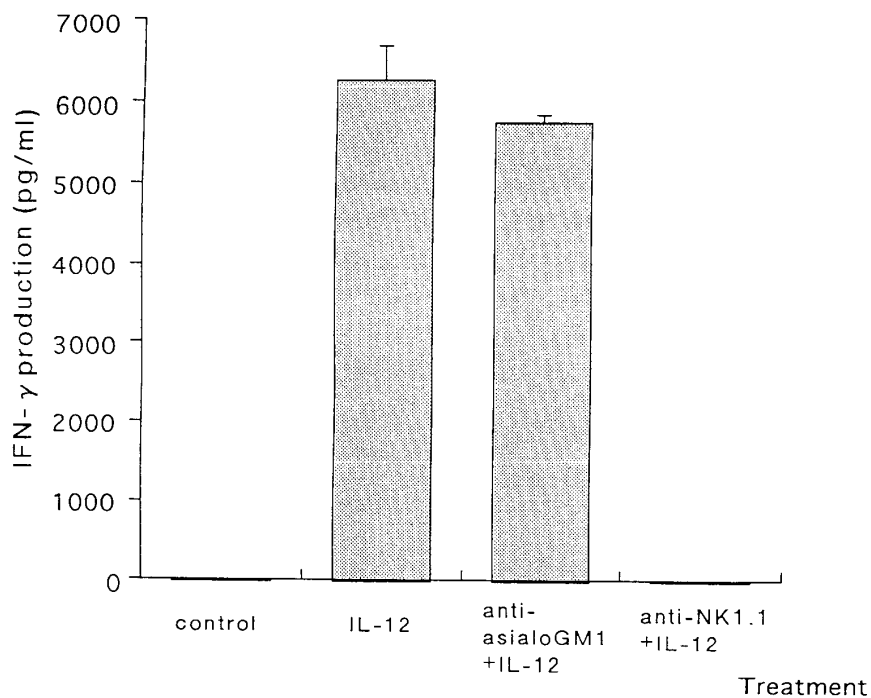


図3 IL-12 刺激による IFN- $\gamma$  産生細胞の同定  
 抗アシアロ GM1 抗体により NK 細胞を除去したマウスと、抗 NK1.1 抗体により NK ならびに TNK 細胞の両方を除去したマウスに IL-12 (0.5  $\mu$ g) をそれぞれ腹腔内投与し、24 時間後の血清中の IFN- $\gamma$  量を ELISA 法により測定した。

があることを示唆している。

一般的に IL-12 による免疫応答の大部分は IFN- $\gamma$  の生物活性によるものと考えられている<sup>24-26)</sup>。しかし今回の結果から、IL-12 による直接的生物反応も存在することも明らかとなった。1 つは細胞傷害活性の増強であり、もう 1 つは TNK 細胞の活性化である。すなわち表 2 で、NK 細胞感受性の標的細胞 YAC-1 に対して、抗マウス IL-12 抗体の投与では細胞傷害活性の完全抑制がみられているのに対し、抗マウス IFN- $\gamma$  抗体の投与では部分的な抑制しかみられなかったことと、IL-12 投与による CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>high</sup> の細胞集団の出現が、抗マウス IFN- $\gamma$  抗体によって阻害されないこと (小笠原ら、未発表) が上述の知見を支持している。だが、IL-12 による直接的活性化があるとはいえ、細胞傷害活性においては、誘導された IFN- $\gamma$  が最も強い影響を及ぼしており、活性化された TNK 細胞は自己の産生する IFN- $\gamma$  によってオートクライン的に活性増強されている可能性がある。

LPS による IL-12 産生に関しては、LPS が B 細胞に作用して IL-12 が誘導されるとの報告がある<sup>27)</sup>。今回 LPS 投与による細胞傷害活性において抗マウス IL-12 抗体処理によって完全抑制が認められた (表 2) ことから、LPS により明らかに IL-12 が産生誘導されていることが確認された。しかし LPS のレセプターである CD14 は、マクロファージに多く発現していること、LPS 投与により肝臓 Kupffer 細胞から IL-12 のメッセンジャー RNA が検出できること<sup>28)</sup>、T 細胞と B 細胞がともに欠如している SCID マウスでも正常マウスと同程度の IL-12 産生が認められること<sup>29)</sup> 等からこの IL-12 の産生細胞は、B 細胞以外の細胞、主にマクロファージであると考えられる。

歯周組織は、外来抗原の侵入しやすい組織であり、感染防御の初期応答に重要と考えられているマクロファージ、NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞が数多く存在することが知られている<sup>30)</sup>。本論文の主題である TNK の存在は、歯周組織では未だ確認されていないが、これらの細胞が、口腔内感染症において、その発症や防御に重要な働きをしていると考えられる。ちなみに、*P. gingivalis* や *P. intermedia* 等の黒色色素産生細菌 (BPB) の LPS は、*E. coli* 等の腸内細菌科の LPS とは、化学構造ならびに生物活性を異にしており、一般的には、腸内細菌科 LPS に比較して生物活性は弱いと言われている<sup>4,5)</sup>。本研究でも、*P. gingivalis* や *P. intermedia* の LPS は、*E. coli* LPS と同程度の IFN- $\gamma$  誘

導作用を発揮するのに、10 倍の濃度を要した (表 1)。ともあれ BPB LPS を含めて、LPS により炎症性サイトカインのみならず IL-12 と IFN- $\gamma$  が産生誘導されるということは、LPS の多彩な生物活性を理解する上で重要であると考えられる。マクロファージは 100 近くの因子を産生し、サイトカインネットワークの起点として炎症反応から免疫応答への架け橋を担う多様な細胞集団であり、LPS によりマクロファージ活性化因子 (MAF) が誘導されることが知られている<sup>31)</sup>。現在、MAF の主体は IFN- $\gamma$  であると考えられている。今回の結果からマクロファージの活性化に TNK 細胞が強く関与していることが示唆された。活性化マクロファージは活性酸素と NO を産生し、これらは、感染防御の主要なエフェクター分子となる。しかし一方で LPS により誘導された MAF はマクロファージのみならず破骨細胞にも作用し活性化を促して骨破壊を促進したり、活性化マクロファージの産生する活性酸素の恒常的発現は正常組織の破壊をも引き起こす。このように歯周疾患において MAF はその病態の改善と増悪の両側面で主要な因子として作用すると考えられる<sup>31,32)</sup>。

今回の結果から、IL-12 は TNK 細胞に作用して IFN- $\gamma$  産生を誘導し、IFN- $\gamma$  はマクロファージに働き LPS と共同して IL-12 産生を促すため、サーキットを形成し、一旦マクロファージが活性化されると局所で IL-12 と IFN- $\gamma$  が多量に産生される可能性がある。実際 LPS と IL-12 の投与によって IFN- $\gamma$  をメディエーターとしたシュワルツマン反応と思われる肝細胞傷害が認められ、場合によっては致死的であった<sup>33)</sup>。このように多量のサイトカインは種々の細胞に働いて、活性酸素や NO の恒常的発現、血管透過性の上昇、白血球の遊走促進等により組織破壊や腫脹などの炎症の増悪に作用すると考えられる。

すなわち、歯周組織においても、TNK の存在が実証されれば、LPS による TNK 細胞からの過剰の IFN- $\gamma$  産生がサイトカインネットワークを攪乱し炎症の増悪に強く関係する可能性がある。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際し、多大なるご教示、ご指導を頂いた熊谷勝男本学名誉教授、ならびに実際の研究にあたり直接ご指導頂いた竹田和由博士 (現順天堂大学医学部)、さらに本論文執筆にあたりご指導頂いた本学口

腔細菌学講座の高田春比古教授に心から拝謝いたします。また本論文のご校閲を賜りました口腔生化学講座の山田正教授ならびに、予防歯科学講座の坂本征三郎教授に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究の完成を全面的にご支援頂くとともに、熊谷先生退官後、終始懇切な研究指導を賜っ

た東京大学医学部免疫学教室谷口維紹教授に深厚なる感謝の意を表します。

なお、本研究は文部省科学研究費補助金(特別研究員奨励費)を受けて実施したことを記して、謝意を表します。

**内容要旨：** グラム陰性菌の内毒素性リポ多糖 (LPS) は、種々のサイトカイン産生を誘導し免疫応答を調節することが知られている。またナチュラルキラー(NK)細胞や、T細胞とNK細胞の両方の性質を具備したTNK細胞をLPSで刺激すると、強い細胞傷害活性を示すようになる。本研究では、LPSの免疫応答調節作用の新たな側面を明らかにする目的で、C57BL/6マウスに *Escherichia coli* のLPSを腹腔内投与し、肝臓で活性化されたNK細胞とTNK細胞の動態と、サイトカインとの関わりを検討した。本実験によって、LPSによる肝臓のNK細胞とTNK細胞の活性化は、主としてLPSによって誘導されたインターロイキン12(IL-12)を介する機序によって起こっていることが明らかになった。また、TNK細胞はIL-12反応性細胞の中でも、IL-12受容体の発現が顕著に高く、NK細胞よりも高いIL-12反応性を示すことが示唆された。さらにIL-12をC57BL/6マウスに腹腔内投与するとNK細胞やTNK細胞の細胞傷害活性の増強と、血清中に高レベルのIFN- $\gamma$ が検出されたが、IFN- $\gamma$ の産生細胞は、IL-12により活性化されたTNK細胞が主であることが示された。また、活性化したTNK細胞は、IFN- $\gamma$ を介するオートクライン的な機構によって、IFN- $\gamma$ を産生し続けることが示唆された。歯周病発症に深く関わりとされる黒色色素産生菌のLPSにも同様の活性が認められることを考えあわせると、これらの知見は歯周局所でも、IL-12産生誘導に伴うサイトカインネットワークの活性化がもたらされる可能性があることを示している。

## 文 献

- 1) Shah, H.N., Mayrand, D. and Genco, R.J. (edit.): Biology of the species *Porphyromonas gingivalis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993.
- 2) Zambon, J.J., Grossi, S., Dunford, R., Haraszthy, V.I., Preus, H. and Genco, R.J.: Epidemiology of subgingival bacterial pathogens in periodontal disease. Genco, R., Hamada, S., Lehner, T., McGhee, J. and Mergenhagen, S. (edit.): Molecular pathogenesis of periodontal disease. American Society for Microbiology, Washinton, D.C, 1994, pp. 3-12.
- 3) Morrison, D.C. and Ryan, J.L. (edit.): Bacterial endotoxic lipopolysaccharides. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992.
- 4) Hamada, S., Takada, H., Ogawa, T., Fujiwara, T. and Mihara, J.: Lipopolysaccharides of oral anaerobes associated with chronic inflammation: chemical and immunomodulating properties. Intern. Rev. Immunol. 6: 247-261, 1990.
- 5) Wilson, M.: Biological activities of lipopolysaccharide and endotoxin. Shah, H.N., Mayrand, D. and Genco, R.J. (edit.): Biology of the species *Porphyromonas gingivalis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993. pp. 171-197
- 6) Raetz, C.R.H., Ulevitch, R.J., Wright, S.D., Sibley, C.H., Ding, A. and Nathan, C.F.: Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. FASEB J. 5: 2652-2660, 1991.
- 7) Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zähringer, U., Seydel, U., Padova, F.D., Schreiber, M. and Brade, H.: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J. 8: 217-225, 1994.
- 8) Rossomando, E.F., Kennedy, J.E. and Hadjimi-chael, J.: Tumor necrosis factor alfa in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. Archs Oral Biol. 35: 431-434, 1990.



- 9) Charon, J.A., Luger, T.A., Mergenhagen, S.E. and Oppenheim, J.J.: Increased thymocyte-activating factor in human gingival fluid during gingival inflammation. *Infect. Immun.* **38**: 1190-1195, 1982.
- 10) Takada, T., Mihara, J., Morisaki, I. and Hamada, S.: Production of cytokines by human gingival fibroblasts. Hamada, S., Holt, S.C. and McGhee, J.R. (edit.): *Periodontal disease: pathogens and host immune responses*. Quintessence Pub., Tokyo, 1991, pp. 265-276.
- 11) Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. and Hamada, S.: Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **59**: 295-301, 1991.
- 12) Tamura, M., Tokuda, M., Nagaoka, S. and Takada, H.: Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivaris* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect. Immun.* **60**: 4932-4937, 1992.
- 13) Shimabukuro, Y., Murakami, S. and Okada, H.: Antigen-presenting-cell function of interferon  $\gamma$ -treated human gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res.* **31**: 217-228, 1996.
- 14) 杉浦慶太郎: *Bacteroides gingivalis* による新しい NK 活性の誘導. 東北歯誌 **13**: 37-50, 1994.
- 15) Takada, H., Hirai, H., Fujiwara, T., Koga, T., Ogawa, T. and Hamada, S.: *Bacteroides* lipopolysaccharides (LPS) induce anaphylactoid and lethal reactions in LPS-responsive and -nonresponsive mice primed with muramyl dipeptide. *J. Infect. Dis.* **134**: 428-434, 1990.
- 16) Heremans, H., Dillen, C., Van Damme, J. and Billiau, A.: Essential role for natural killer cells in the lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like reaction in mice. *Eur. J. Immunol.* **24**: 1155-1160, 1994.
- 17) Hashimoto, W., Takeda, K., Anzai, R., Ogasawara, K., Sakihara, H., Sugiura, K., Seki, S. and Kumagai, K.: Cytotoxic NK1.1Ag $^+$   $\alpha\beta$  T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. *J. Immunol.* **154**: 4333-4340, 1995.
- 18) Yoshimoto, T. and Paul, W.E.: CD4 $^{pos}$  NK1.1 $^{pos}$  T cells promptly produced IL-4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J. Exp. Med.* **179**: 1285-1295, 1994.
- 19) 橋元 亘, 小林照忠, 佐藤正幸, 小笠原康悦, 関 修司, 熊谷勝男, 竹田和由: IL-12 による CD4 $^-$  NK1 $^+$  T 細胞の活性化. 日本免疫学会集会記録 **26**: 151, 1996.
- 20) 橋元 亘, 佐藤正幸, 高橋基能, 小笠原康悦, 熊谷勝男, 竹田和由, 関 修司: IL-12 による肝 TNK 細胞活性化の in vivo 抗体投与による解析. 日本免疫学会学術集会記録 **25**: 138, 1995.
- 21) Desai, B.B., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Mongini, P.K.A., Chizzonite, R. and Gately, M.K.: IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J. Immunol.* **148**: 3125-3132, 1992.
- 22) Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E., Jr. and Murphy, K.M.: Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat) 3 and Stat 4. *J. Exp. Med.* **181**: 1755-1762, 1995.
- 23) Thierfelder, W.E., Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawer, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vingnali, D.A.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C. and Ihle, J.N.: Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* **382**: 171-174, 1996.
- 24) Kaplan, M.K., Sun, Y.L., Hoey, T. and Grusby, M.J.: Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat 4-deficient mice. *Nature* **382**: 174-177, 1996.
- 25) Wolf, S.F., Temple, P.A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R.M., Kelleher, K., Herrmann, S.H., Clark, S.C., Azzoni, L., Chan, S.H., Trinchieri, G. and Perussia, B.: Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* **146**: 3074-3081, 1991.

- 26) Magram, J., Connaughton, S.E., Warrier, R.R., Carvajal, D.M., Wu, C., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D.A. and Gately, M.K.: IL-12-deficient mice are defective in IFN- $\gamma$  production and Type 1 cytokine responses. *Immunity* **4**: 471-481, 1996.
- 27) D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S.H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E., Chizzonite, R., Wolf, S.F. and Trinchieri, G.: Production of natural killer cell stimulatory factor (Interleukin-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* **176**: 1398-1408, 1992.
- 28) Takahashi, M., Ogasawara, K., Takeda, K., Hashimoto, W., Sakihara, H., Kumagai, K., Anzai, R., Satoh, M. and Seki, S.: LPS induces NK1.1<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells with potent cytotoxicity in the liver of mice via production of IL-12 from Kupffer cells. *J. Immunol.* **156**: 2436-2442, 1996.
- 29) 小笠原康悦, 竹田和由, 高橋基能, 橋元 亘, 佐藤正幸, 熊谷勝男, 関 修司: SCID mice における mIL-12 の抗転移作用とそのエフェクター細胞の解析. *日本免疫学会学術集会記録* **25**: 155, 1995.
- 30) Wynne, S.E., Walsh, L.J., Seymour, G.J. and Powell, R.N.: In situ demonstration of natural killer (NK) cells in human gingival tissue. *J. Periodontol.* **57**: 699-702, 1986.
- 31) Shreiber, R.D. and Celad, A.: Molecular characterization of interferon- $\gamma$  as a macrophage activating factor. *Lymphokines* **11**: 87-118, 1985.
- 32) Hausmann, E., Raisz, L.G. and Miller, W.A.: Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science* **168**: 862-864, 1970.
- 33) 竹田和由, 橋元 亘, 佐藤正幸, 高橋基能, 小笠原康悦, 熊谷勝男, 関 修司: IL-12 による転移抑制効果をもつ TNK 細胞の誘導とその肝細胞障害性. *日本免疫学会学術集会記録* **25**: 322, 1995.