

原 著

抗酸菌感染マクロファージにおける ICAM-1 発現の
制御メカニズムに関する研究 (第1報)

Win Win Maw · 富岡 治明 · 佐藤 勝昌

高根医大微生物・免疫学

斎藤 肇

国立多摩研究所

受付 平成8年2月29日

受理 平成8年7月18日

THE EXPRESSION OF ICAM-1 ON MACROPHAGES STIMULATED WITH
MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX AND ITS CONTROL BY SOME
REGULATORY CYTOKINES

Win Win Maw, Haruaki TOMIOKA*, Katsumasa SATO
and Hajime SAITO

(Received 29 February 1996/Accepted 18 July 1996)

The interaction of LFA-1 on T lymphocytes with ICAM-1 on antigen presenting cells (APCs) is critical in determining conjugate formation between the APCs and T cells as well as activation of T cells. Recently, it was found that stimulation of THP-1 cells, a human monocyte/M ϕ cell line, with *Mycobacterium tuberculosis* or its lipoarabinomannan, elicited the increase in the ICAM-1 expression. In addition, in cases of lepromatous leprosy patients with a serious defect in the *M. leprae* antigen-specific cellular immunity, keratinocytes in the leprosy lesions were lacking in the ICAM-1 expression. Therefore, ICAM-1 seems to participate in the host response to mycobacterial infections. Here, we studied the mode of the expression of ICAM-1 molecules on murine peritoneal M ϕ s in response to stimulation with *M. avium* complex (MAC). In addition, the regulatory effect of some cytokines including TNF- α , IL-10, and transforming growth factor- β (TGF- β) on the ICAM-1 expression was studied.

Monolayer cultures of peptone-starch induced murine peritoneal M ϕ s were cultured in RPMI-1640 medium in the presence of MAC with or without test agents. At intervals, the M ϕ s were stained with anti-ICAM-1 antibody (Ab) and then treated with alkaline phosphatase (Ap)-conjugated anti-Ig Ab. After color development with NBT-BCIP substrate, percentage of the blue-stained (ICAM-1 positive) M ϕ s was determined microscopically.

* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo 693, Japan.

The concentrations of TNF- α , IL-10, and TGF- β in the M ϕ culture fluid was measured by ELISA using capture Ab, biotin-labelled capping Ab, and Ap-conjugated streptavidin.

When M ϕ s infected with MAC organisms were cultured in RPMI medium containing 10% fetal bovine serum or in serum-free GPI medium, a significant increase in their ICAM-1 expression was observed, reaching the peak at days 1 to 3, thereafter rapidly decreased and returned to the normal level by day 14. Further addition of TNF- α caused no significant change in the mode of the MAC-induced expression of ICAM-1. A transient increase in the IL-10 production of MAC-infected M ϕ s was observed during the first 3-days cultivation, as in the case of TNF- α . On the other hand, TGF- β production of the M ϕ population was initiated from day 3, and thereafter increased gradually until day 14. ICAM-1 expression of the MAC-infected M ϕ s was not influenced by the addition of IL-10, while anti-IL-10 Ab retarded the decline of ICAM-1 expression at day 7. On the other hand, the addition of TGF- β attenuated the MAC infection-induced increase in the ICAM-1 expression significantly. In addition, anti-TGF- β Ab significantly delayed the reduction of the ICAM-1 expression of MAC-infected M ϕ s during days 3 to 7. These results indicate that, in the MAC-infected M ϕ s, TGF- β rather than IL-10 play important roles as a mediators for the late-phase down-regulation of ICAM-1 expression which had been transiently elevated by the action of TNF- α in the early phase of the M ϕ cultivation.

Key words : ICAM-1, Macrophage, Cytokine, *Mycobacterium avium* complex

キーワード : ICAM-1, マクロファージ, サイトカイン, *Mycobacterium avium* complex

はじめに

マクロファージをはじめとする抗原提示細胞 (APC) に表現されている細胞間接着分子である intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) は, APC から T 細胞への抗原シグナル伝達に重要な役割を演じている¹⁾²⁾。最近, T 型らい患者での遅延型過敏症反応である reversal reaction や光田反応部位の皮膚の keratinocyte では ICAM-1 の発現が増強しているが, L 型らい患者の皮膚病変部の keratinocyte では interferon- γ (IFN- γ) で刺激した場合でも, そうした ICAM-1 の発現がみられないことなどが報告されている³⁾⁴⁾。

また, 結核菌やその菌体成分であるリポアラビノマンナンで刺激したマクロファージ株化細胞では少なくとも培養3日目までは ICAM-1 発現が高まるが, LFA-1 や VCAM-1 ではそのような現象がみられないことが報告されており⁵⁾, 抗酸菌症での宿主感染抵抗性発現における ICAM-1 のかかわりが注目されている。

今回は, 培養マウス腹腔マクロファージに *Mycobacterium avium* complex (MAC) を感染させた場合の ICAM-1 発現の様相について検討するとともに, ICAM-1 発現の制御, 特にその down-regulation にか

かわるサイトカインを知る目的で, MAC 刺激マクロファージや脾細胞などによる tumor necrosis factor- α (TNF- α) や IFN- γ などの proinflammatory cytokine および IL-10 や transforming growth factor- β (TGF- β) などの macrophage deactivating cytokine 産生の動態についても若干の検討を行った。

材料と方法

1) 供試菌 : MAC N-260株 (血清型16) の 7H9 培地培養菌を供試した。なお, 本菌は DNA プロブテストで *M. intracellulare* と同定されている。

2) 試薬 : Recombinant TNF- α , IL-10, TGF- β 並びに抗 TNF, IL-10, TGF- β , ICAM-1 モノクローナル抗体は Genzyme 社 (米国) あるいは R & D 社 (米国) より購入した。

3) マクロファージの ICAM-1 発現の測定 : BALB/c マウスから採取した peptone-starch 誘導腹腔浸出細胞より径35mm のプラスチック培養平底ウェル (Corning) あるいは実験によっては径14mm のプラスチックシート (和光純薬) 上に単層培養マクロファージを調製し, MAC (1×10^6 /ml) あるいは TNF- α (500 units/ml) を含む10%牛胎児血清 (Bio Whittaker, 米国) 加 RPMI-1640培地中 (日水製薬), 実験によっては血

清非添加の GPI 培地 (日水製薬) で培養し, 1, 3, 7 および 14 日に単層培養マクロファージを抗 ICAM-1 モノクローナル抗体, アルカリフォスファターゼ標識抗 Ig 抗体および NBT (nitroblue tetrazolium)-BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoly 1-phosphate) 基質を用いた酵素抗体法によって染色し, 鏡検下で青染した ICAM-1 陽性細胞数を計測した。

4) マクロファージのサイトカイン産性能の測定: 上述の腹腔マクロファージの MAC 菌体添加あるいは非添加の培養系での培養上清について, 捕捉抗体として抗 TNF, 抗 TGF- β および抗 IL-10 モノクローナル抗体, キャッピング抗体としてビオチン標識抗 TNF- α , 抗 TGF- β および抗 IL-10 抗体, アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン並びに ABTS substrate (p-nitrophenyl phosphate) (Sigma) を用いての ELISA 法で各々目的とするサイトカイン濃度を測定した⁶⁾。

結果

1) MAC 刺激マクロファージにおける ICAM-1 発現

Fig. 1 は MAC 感染による刺激を受けたマクロファージの ICAM-1 発現をみたものである。培養開始時点のマクロファージには ICAM-1 の発現は認められなかったが, MAC を添加した 10% 牛胎児血清加 RPMI 培地中で培養すると, 培養 3 日目に ICAM-1 発現の最も著しい亢進がみられ, その後速やかに低下し培養 14 日後に

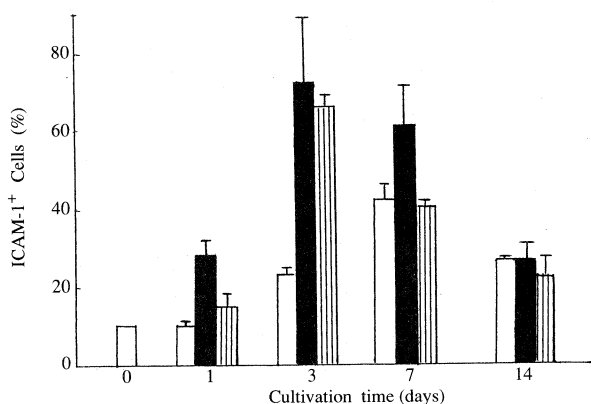


Fig. 1 ICAM-1 expression of MAC(10^6 CFU/ml)-infected macrophages in the presence (hatched bar) or absence (shaded bar) of TNF- α at 500 units/ml. Open bars mean the ICAM-1 expression of uninfected macrophages. Each bar indicates the mean \pm SEM (n=3). There was no significant difference between the values of hatched bars (+TNF- α) and those of corresponding shaded bars (-TNF- α).

はほぼ正常レベルに復することが分かった。また, この系に TNF- α を添加しても, MAC 刺激を受けたマクロファージの ICAM-1 発現が特に助長される傾向はみられなかった。

われわれは別の実験で, 非感染マクロファージの ICAM-1 発現は TNF- α の添加によりさらに増強されるという Pamirez⁵⁾ や Springer⁷⁾ の報告と軌を一にする成績を得ており (成績省略), このことはマクロファージの ICAM-1 発現には, TNF- α が重要な役割を演ずることを示唆するものであるが, Fig. 1 の成績からすると, MAC 刺激マクロファージでの ICAM-1 発現の場合では TNF- α の増強作用は余り顕著なものではないように思われる。

また, 培養 3 日目以降の phase でみられる ICAM-1 発現の低下は TNF- α の添加によっても克服できないことより, この ICAM-1 発現の down-regulation とい

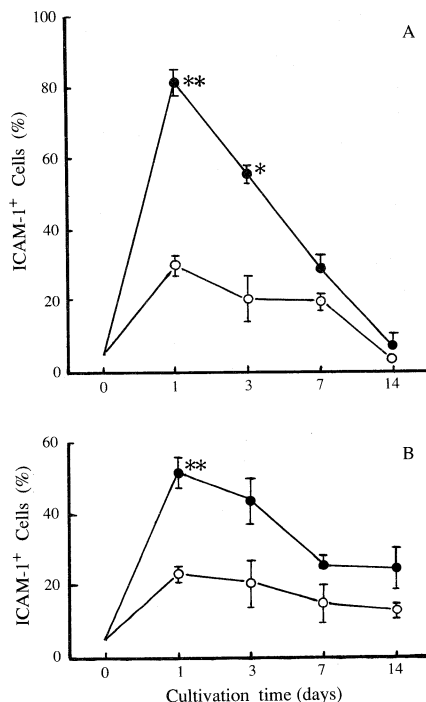


Fig. 2 ICAM-1 expression of MAC-infected macrophages cultured in serum-free GPI medium (A) or in RPMI-medium containing 10% fetal bovine serum (B). ○, Uninfected macrophages; ●, MAC (2×10^7 CFU/ml)-infected macrophages. Each symbol indicates the mean \pm SEM (n=3). The values of the closed circles (+MAC) with asterisk(s) are significantly higher than those of corresponding open circles (-MAC); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (Student's *t*-test).

Table 1 Production of IL-10 and TNF by Macrophages Stimulated with MAC^{a)}

Incubation time (Days)	Cytokine production (ng/ml) (Mean±SE)			
	IL-10 (n=3)		TNF (n=3)	
	MAC infection		MAC infection	
	-	+	-	+
1	0.16±0.06	1.93±0.03	0.93±0.50	0.27±0.17
3	<0.05	2.95±0.10	<0.10	0.66±0.24
7	<0.05	1.35±0.13	<0.10	0.14±0.04
10	<0.05	0.22±0.09	0.17±0.06	<0.10
14	<0.05	0.17±0.08	0.33±0.23	0.15±0.05

a) Macrophage monolayers prepared by seeding 1×10^6 /ml of 5% peptone-5% starch-induced peritoneal exudate cells were cultured in the presence or absence of MAC organisms (1×10^7 CFU/ml). Culture supernatants were collected at different time points and assayed for IL-10 and TNF.

Table 2 Production of IL-10 and TGF- β by Macrophages Stimulated with MAC^{a)}

Incubation time (Days)	Cytokine production (ng/ml) (Mean±SE)			
	IL-10 (n=3)		TGF- β (n=1)	
	MAC infection		MAC infection	
	-	+	-	+
1	0.14±0.04	3.16±0.85	<0.02	<0.02
3	0.17±0.03	3.42±0.28	0.30	1.17
7	0.15±0.05	0.39±0.47	ND	2.08
14	<0.10	0.22±0.10	0.89	4.56

*) Macrophage monolayers prepared by seeding 5×10^5 /ml of 5% peptone-5% starch-induced peritoneal cells onto plastic sheets (14 mm diameter) were cultured in 10% FBS-RPMI 1640 medium with or without addition of MAC organisms (1×10^7 CFU/ml). At intervals, culture supernatants were collected and assayed for cytokines.

う現象は、マクロファージによる TNF- α の産生の低下によるものではなく、何らかの active な抑制因子の産生に起因したものであろうと考えられた。

また、Fig. 2 は10%牛胎児血清加 RPMI 培地と血清非添加 GPI 培地中で、MAC 感染マクロファージを培養した場合の ICAM-1 発現の様相を比較したものであるが、いずれの場合でも同様な推移をたどることが分かった。このことは MAC 感染マクロファージにおける ICAM-1 発現の培養初期で一過性の亢進は、培地に添加した血清成分の作用に基づくものではなく、MAC 菌体そのものあるいはその成分による刺激に起因したものであることを示しているものと思われる。

以上、今回の検討により、MAC 刺激マクロファージでの ICAM-1 発現レベルの上昇は培養 1~3 日目にピークを示す一過性のものであることが明らかになったが (Figs. 1, 2), 特にそれ以降の phase でみられる ICAM-1 発現の down-regulation が、どのようなメカニズムによって起こるのかは興味深い問題である。そこで、この現象にかかわる抑制性サイトカインを探る目

的で以下の検討を行った。

2) MAC 刺激マクロファージの IL-10, TGF- β および TNF- α 産生ならびにその動態

Table 1 は MAC 感染あるいは非感染 (対照) 腹腔マクロファージの TNF- α および IL-10 産生をみたものであるが、MAC 刺激を受けたマクロファージでは培養 3 日目に TNF- α と IL-10 産生の有意な亢進が認められた。また、Table 2 に示すように、MAC 貪食マクロファージからの TGF- β 産生は、IL-10 の場合とは異なり、培養 7 日目以降になって初めて有意なレベルに達することが分かった。なお、詳細は省くが、別途行った実験では MAC 刺激を受けた脾マクロファージにおいて培養 2~3 日目に IL-10 産生の著しい増強が認められたが、この場合、培養 3 日目の IL-10 産生量と比較すると、正常マウスマクロファージのそれの 2.4 倍と高値であった。他方、TGF- β については培養 3 日目に低レベルの産生が認められたに過ぎなかった。

3) ICAM-1 発現の down-regulation における IL-10 および TGF- β の関わり

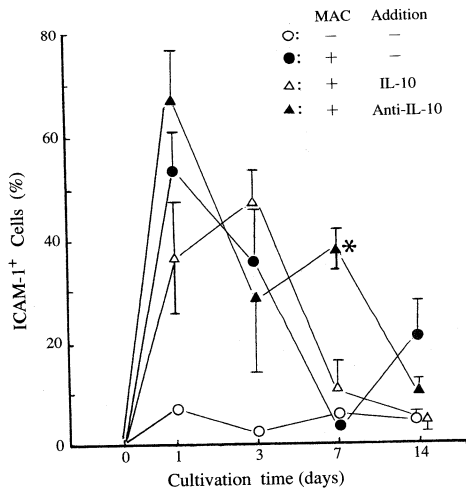


Fig. 3 Effects of the addition of IL-10 (10 ng/ml) or anti-IL-10 antibody (5 μg/ml) upon ICAM-1 expression on MAC-infected macrophages. ○, Without MAC-infection; ●, MAC (1 × 10⁷ CFU/ml)-infection alone; △, MAC-infection + IL-10; ▲, MAC-infection + anti-IL-10 antibody. Each symbol indicates the mean ± SEM (n=3). The value of the closed triangle with asterisk was significantly larger than that of the corresponding closed circle (*p* < 0.005; *t*-test).

殺菌能をはじめとするマクロファージの種々の細胞活性は、マクロファージ自らが産生する IL-10 ならびに TGF-β などのマクロファージ不活化サイトカインにより negative control を受けることが知られているので^{8)~12)}、以下に、MAC 刺激マクロファージでの ICAM-1 発現に対する IL-10 および TGF-β ならびに抗 IL-10 および抗 TGF-β 抗体の及ぼす影響について検討した。

Fig. 3 に示すように、IL-10 の添加により培養 1 日目での ICAM-1 発現には若干の抑制がみられ、培養 3 日目では逆にやや増強される傾向が認められた。他方、抗 IL-10 抗体の添加によっては培養 1 日目では ICAM-1 発現の軽度の増強がみられるのみならず、対照 (抗体非添加) マクロファージでは ICAM-1 発現が著しく低下してしまう培養 7 日目になっても、高レベルの ICAM-1 発現が認められた (*p* < 0.005)。

次に、TGF-β ならびに抗 TGF-β 抗体の及ぼす影響についてみたところ (Fig. 4)、MAC 感染マクロファージの培養 1~3 日目での ICAM-1 発現は TGF-β 添加により約 50% の阻害を受けた (*p* < 0.025)。また抗 TGF-

β 抗体の添加により、培養 3~7 日目の対照 (抗体非添加) マクロファージでみられる ICAM-1 発現の down-regulation の程度が有意に軽減されることが分かった (*p* < 0.005)。

考 察

今回の検討により、MAC 感染マクロファージでは培養 1~3 日目に ICAM-1 発現レベルの一過性の上昇がみられたが、以後の phase では ICAM-1 発現の急激な低下がみられ、培養 14 日目までには非刺激マクロファージのレベルにまで復することが明らかになった。抗酸菌貪食マクロファージからの抗原提示に引き続く Th1 細胞の expansion と活性化、それに続くマクロファージの活性化などによる抗酸菌抗原に特異的な細胞性免疫の増強のカスケードは、主に Th2 細胞からの IL-4 ならびに Th2 細胞とマクロファージからの IL-10 さらには TGF-β などのサイトカインにより negative control を受けていることが知られている^{8)~12)}、Table 1 と 2 に示した腹腔マクロファージの諸種サイトカイン産生の様相からすると、MAC 菌体で刺激を受けたマクロファージでは活性化に伴う ICAM-1 発現の亢進とほぼ時を同

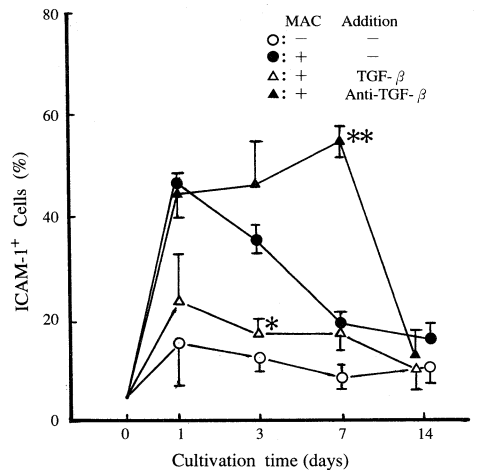


Fig. 4 Effects of the addition of TGF-β (10 ng/ml) or anti-TGF-β antibody (30 μg/ml) upon ICAM-1 expression on MAC-infected macrophages. ○, Without MAC-infection; ●, MAC (2 × 10⁷ CFU/ml) - infection alone; △, MAC-infection + TGF-β; ▲, MAC-infection + anti-TGF-β antibody. Each symbol indicates the mean ± SEM (n=3). The values of the open and closed triangles with asterisks were significantly different from those of corresponding closed circles; *, *p* < 0.025; **, *p* < 0.005 (*t*-test).

じくして免疫抑制性サイトカインの一つである IL-10 が産生され、さらにそれ以降の phase では TGF- β の産生が増強されていくという特異的なパターンがみられる。このことよりすると、これらマクロファージ不活化サイトカインのいずれかまたはその両者がマクロファージに autocrine あるいは paracrine に働き、その ICAM-1 発現を down-regulate している可能性が高いもののように思われる。

まず、IL-10 の関わりについては、マクロファージからの産生パターンからすると (Table 1)、培養 3 日目以降での ICAM-1 発現の down-regulation の成立に何らかの役割を演じている可能性は否定できないものの、Fig. 3 に示すように、IL-10 や抗 IL-10 抗体添加の影響は明確なものとは言い難く、IL-10 の寄与はあくまでも部分的なものに過ぎないものようである。他方、TGF- β の関わりについては、Table 2 に示すように MAC 感染マクロファージからの TGF- β 産生は培養 3 日目以降になって初めて増強してくるが、これは ICAM-1 発現の down-regulation の phase とよく一致している。

他方、Fig. 4 に示した成績では、TGF- β の添加による MAC 感染マクロファージにおける ICAM-1 発現の有意な阻害が、さらに抗 TGF- β 抗体を添加した場合には、培養中期以降にみられる ICAM-1 発現の down-regulation が有意に軽減される傾向が認められており、これらの成績を勘案すると、TGF- β が MAC 感染マクロファージにおける ICAM-1 発現の down-regulation の成立・進展に重要な役割を演じているものと思われる。

以上、MAC 感染を受けたマクロファージでは、TNF- α などの活性化サイトカインの産生にやや遅れてマクロファージ不活化サイトカイン、特に TGF- β が産生され、これらが TNF- α や IL-1 などの活性化サイトカインの働きで増強された ICAM-1 の発現を逆に down-regulate していく可能性が考えられる。言葉を換えると、MAC 感染マクロファージでの活性化サイトカインと抑制性サイトカインの sequential な産生という現象が、培養 1~3 日目をピークとする一過性の ICAM-1 発現という今回の成績の根底にあるものと思われる。現在、nitric oxide あるいは prostaglandin などの果たす役割についても検討中であるが、これらの成績については別の機会に報告したい。

ま と め

MAC 菌体で刺激されたマウス腹腔培養マクロファージでは、培養 1~3 日目に ICAM-1 発現の一過性の増強が認められたが、TNF- α の添加によっても同様な増

強がみられた。また MAC 刺激マクロファージでは培養 1~3 日目に TNF および IL-10 産生能の増強が、また培養 7 日目以降には TGF- β 産生能の増強が認められた。MAC 刺激マクロファージの培養系に IL-10 を添加した場合には ICAM-1 発現の若干の抑制が、また抗 IL-10 抗体を添加した場合には 3 日目以降での ICAM-1 発現の低下が若干遅延する傾向が認められた。

他方、TGF- β の添加により MAC 感染マクロファージにおける ICAM-1 発現の有意な阻害が、さらに抗 TGF- β 抗体の添加した場合には培養中期以降にみられる ICAM-1 発現の down-regulation が有意に軽減される傾向が認められており、これら以上の成績より、MAC 刺激マクロファージの培養 1~3 日での ICAM-1 発現の増強には TNF- α が、また 3 日目以降での ICAM-1 発現の低下にはマクロファージ不活化サイトカイン、特に TGF- β が何らかの形で関与している可能性が示唆された。

謝 辞

サイトカインの測定に携わった中田隆博、梶谷浩子両氏に謝意を表します。

文 献

- 1) Sptaunton DE, Marlin SD, Stratowa C, et al.: Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 1988; 52: 925-933.
- 2) Van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan, KJ, et al.: The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory, signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J. Immunol.* 1990; 144: 4579-4586.
- 3) Sullivan L, Sano S, Pirmez C, et al.: Expression of adhesion molecules in leprosy lesions. *Infect. Immun.* 1991; 59: 4154-4160.
- 4) Moncada B, Torres-Alvarez MB, Gonzalez-Amaro R, et al.: Lack of expression of intercellular adhesion molecule ICAM-1 in lepromatous leprosy patients. *Int J Lepr.* 1993; 61: 581-585.
- 5) Pamirez GML, Rom WN, Ciotoli C, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* alters expression of adhesion molecules on monocytic cells. *Infect Immun.* 1994; 62: 2515-2520.
- 6) Tossi Z, Young T-G, Averill, LE, et al.: Induction of transforming growth factor β 1

- by purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995; 63: 224-228.
- 7) Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-434.
- 8) Howard M, O'Garra A: Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today.* 1992; 13: 198-200.
- 9) Trinchieri G: Interleukin-12 and its role in the generation of T_H-1 cells. *Immunol Today.* 1993; 14: 335-338.
- 10) Wahl SM: Transforming growth factor beta ($TGF-\beta$) in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol.* 1992; 12: 61-73.
- 11) 富岡治明: 抗酸菌感染症が難治性である理由を探る. *日本細菌学雑誌.* 1995; 50: 687-701.
- 12) 佐藤勝昌, 富岡治明, Win win Maw, 斎藤肇: 実験的 *Mycobacterium avium* complex 感染マウスの化学療法経過中にみられる菌の再増殖のメカニズムに関する研究 (第1報). *結核.* 1995; 70: 673-678.