

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15271

研究課題名(和文) 真菌感染防御に必須な新規IL-17A産生性細胞の発見と解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism of IL-17 production in anti-fungal immunity

研究代表者

西城 忍 (SAIJO, Shinobu)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：60396877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：病原真菌*Candida albicans* (*C. albicans*)は、ヒトの皮膚や粘膜に常在する日和見感染の原因菌で、通常は病原性を示さないものの、高齢者、がん患者、免疫不全患者にとって時には生命を脅かす感染症を引き起こす。私たちは糖鎖認識性の分子群であるC型レクチンファミリーが*C. albicans*の認識と排除に重要な役割を果たすことをこれまでに示してきた。本研究では、C型レクチンによる真菌認識後、分泌されるサイトカインの制御機構の解析を行い、新しい機構を見出したので報告する。

研究成果の概要(英文)：Fungi are ubiquitous in environments and host immune systems are constantly engaged with these eukaryotic pathogens. We have reported that C-type lectin receptors (CLRs) that expressed in myeloid cells play a central role in host defenses against fungal infections by coordinating immune systems. Cytokine production is one of the most characteristic and crucial responses in anti-fungal immunity led by ligand ligation of CLRs. However, in vivo mechanisms of this process has not been fully explained. In this study, we describe the molecular mechanisms of cytokine production in anti-fungal activities by the host immune systems.

研究分野：細菌学(含真菌学)

キーワード：感染免疫 サイトカイン 真菌感染

1. 研究開始当初の背景

病原真菌カンジダ菌(*Candida albicans*, 以下 *C. albicans*) は、日和見感染の原因菌として、高齢者、がん患者、免疫不全患者にとって時には命を脅かす感染症を引き起こす。研究代表者らは、これまでに *C. albicans* に対する宿主の感染防御機構として、抗原提示細胞に発現している膜タンパク質の C 型レクチンファミリー分子が病原体を感知し、炎症性サイトカインの分泌を強力に誘導すること、そのサイトカインによって T 細胞を IL-17A 産生性の Th17 細胞に分化誘導すること、IL-17A は菌体の排除に必須であることなどを報告した (Saijo et al., *Nat. Immunol.*, 2007, Saijo et al., *Immunity*, 2010)。しかし、*in vivo* で *C. albicans* の感知から IL-17A 産生に至る機構は全く解明されておらず、実際どの臓器で IL-17A 産生が誘導されるのか、その結果、どのような免疫反応が誘導されるのか、などといった分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

IL-17A を分泌する細胞は、免疫担当細胞の中でも限られた細胞群に限局されているが、それらの細胞でも恒常的には分泌されず、なんらかの刺激が必要である。そこで本研究では、*C. albicans* によって誘導され、感染防御に必須な IL-17A 産生細胞を同定し、その感染防御における役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *C. albicans* の培養

C. albicans SC5314 株をポテトデキストロール (PDA) 培地に播種し、30℃ で 2 日間培養した。独立したコロニーを回収し、リン酸緩衝生理食塩水に懸濁、2 回洗浄後、血球計算版を用いて計数した。

(2) *C. albicans* 皮膚感染モデル

Day-2 (感染 2 日前) マウス背部をバリカンで剃毛後、除毛剤により被毛を完全に取り除いた。

Day0 (感染日) 1cm² の滅菌ガーゼに 1×10⁸ cells/ml に調整した *C. albicans* 懸濁液 100μl を滴下し (1×10⁷ cells/ml/mouse)、剃毛した背部に貼付した。貼付したガーゼの上から滅菌フィルムを貼付し、密封状態にした。

Day7 (感染 7 日後) 密封を解除し、感染部位の皮膚を採取、その 1/2 を病理組織検査、1/4 を遺伝子発現解析、残りの 1/4 をコロニー形成能 (CFU) アッセイおよびタンパク質定量に用いた。

感染局所での免疫担当細胞の解析の際には、Day4 で密封を解除しディスペーゼ、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼを用いて単細胞に分離した。

(3) 実験動物

野生型 C57BL/6J マウス (WT マウス) は日本クレアより購入した。IL-17A 欠損 (KO)、IL-17F KO、IL-17A/F 二重欠損 (DKO) マウスは、C58BL/6J 背景のものを使用した。

4. 研究成果

(1) *C. albicans* 皮膚感染モデルの確立

マウス背部の被毛を取り除き、10⁷CFU の *C. albicans* 懸濁液を含ませたガーゼを貼付、滅菌フィルムで密封し、Day7 で密封を解除し、感染部位の観察、病理像の解析、CFU アッセイなどの解析を行った。その結果、WT マウスでは完全に真菌を排除している一方で、IL-17A/F DKO マウスでは、WT マウスの約 1,000 倍に *C. albicans* が増殖していることがわかった。そこで、IL-17A あるいは IL-17F のどちらが菌体の排除に重要であるか確認する目的で、IL-17A 単独あるいは IL-17F 単独 KO マウスを用いて同様の実験を行った。その結果、IL-17A KO マウス、IL-17F KO マウスのどちらでも WT マウスと同様に菌体を排除できることがわかった。

次に、感染に伴い分泌される免疫応答反応を解析する目的で、Day2 で感染部位を回収し、CFU アッセイと病理像の解析、サイトカイン・ケモカイン量の測定を行った。その結果、Day2 では WT マウス、IL-17A/F DKO 同程度に *C. albicans* が増殖していること、WT マウスでは IL-17A、IL-17F の産生が Day0 と比較して顕著に亢進していることなどが明らかとなった。この結果から、皮膚における *C. albicans* の排除には、IL-17A あるいは IL-17F のどちらかが分泌されれば充分であることが示された。

(2) *C. albicans* 感染時の IL-17A 産生細胞の同定

次に、*C. albicans* 感染時の IL-17A 産生細胞を同定する目的で、IL-17A の発現に伴い緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を発現するレポーターマウス (IL-17 EGFP マウス) を用いて同様に皮膚に *C. albicans* を感染させた。Day4 で感染局所の皮膚を回収し、ディスペーゼ、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼを用いて単細胞に分離、フローサイトメトリーを用いて、EGFP 発現細胞の解析を行った。その結果、*C. albicans* に伴って IL-17A を発現する細胞は、CD45 陽性の血球細胞で、ヘルパー T 細胞のマーカーである CD4 を発現していない細胞であることがわかった。

(3) *C. albicans* 皮膚感染時の自然免疫受容体の同定

C. albicans 皮膚感染時に IL-17A を産生する細胞は、これまでに知られていない細胞である可能性が示された。そこで、IL-17A 産生に至るメカニズムを解析する目的で、これまでに *C. albicans* を認識することが示されていた受容体の KO マウスを用いて、感染実験を行った。しかし、Dectin-1、Dectin-2、TLR2、TLR4 いずれの受容体の KO マウスでも WT マウスと同等に菌体を排除できることが示され、皮膚で *C. albicans* を認識する受容体の同定にはいたらなかった。

(4) 全身性 *C. albicans* 感染に対する防御機構の解析

皮膚に常在する *C. albicans* は、皮膚で感染症を引き起こすだけではなく、傷口などから体内に侵入することで、全身性の感染症を引き起こす。そこで、IL-17A および IL-17F が全身性 *C. albicans* 感染の防御にも関与しているかどうかの検討を行った。その結果、IL-17A KO マウスでは、WT マウスと比較し、生存率が有意に低下していることが明らかとなった。しかし、IL-17F KO マウスでは、WT マウスと同等の生存率を示すことがわかった。この結果から、全身性 *C. albicans* 感染に対する防御には、皮膚感染とは異なる機構が存在することが示された。

(5) 真菌リガンドによる常在菌の制御機構

Dectin-1 のリガンド糖鎖である グルカンは、食品中にも多量に存在する。そこで、その グルカンを宿主の免疫恒常性維持に及ぼす影響を明らかにする目的で、Dectin-1 KO マウスを用いて、炎症性腸炎の誘導を行った。その結果、Dectin-1 KO マウスでは、WT マウスと比較して、腸炎の重症度が有意に軽減された。そのメカニズムとして、腸管で Dectin-1 が活性化されると IL-17 の誘導を介して抗菌タンパク質が産生されること、その結果、*lactobacillus* の増殖が抑制されることを示した。逆に Dectin-1 欠損マウスでは、抗菌タンパク質が減少するため *lactobacillus* が増殖し、その結果抑制性 T 細胞が増加して大腸炎の発症や食物アレルギーが抑制されることを明らかにした。同様の結果は、Dectin-1 アンタゴニストである短鎖 グルカンの投与によっても得られること、さらに短鎖 グルカンはヒトでも *lactobacillus* の増殖を促進することを見出した。これらの結果は、食品や常在細菌がもつ、他の様々な自然免疫受容体リガンドも、同様に腸管の自然免疫受容体に働きかけて腸管の微生物叢を制御している可能性を示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計8件)

Lamprinaki D, Beasy G, Zhekova A, Wittmann A, James S, Dicks J, Iwakura Y, Saijo S, Wang X, Chow CW, Roberts I, Korcsmaros T, Mayer U, Wileman T, Kawasaki N. LC3-Associated Phagocytosis Is Required for Dendritic Cell Inflammatory Cytokine Response to Gut Commensal Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Immunol.* 8:1397. 2017 査読有

Nakagawa S, Matsumoto M, Katayama Y, Oguma R, Wakabayashi S, Nygaard T, Saijo S, Inohara N, Otto M, Matsue H, Núñez G, Nakamura Y. *Staphylococcus aureus* Virulent PSM α Peptides Induce Keratinocyte Alarmin Release to Orchestrate IL-17-Dependent Skin Inflammation. *Cell Host Microbe.*, 22(5):667-677. 2017 査読有

Ito T, Hirose K, Norimoto A, Tamachi T, Yokota M, Saku A, Takatori H, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H. Dectin-1 Plays an Important Role in House Dust Mite-Induced Allergic Airway Inflammation through the Activation of CD11b⁺ Dendritic Cells. *J Immunol.* 198(1):61-70. 2017 査読有

Shiokawa M, Yamasaki S, Saijo S. C-type lectin receptors in anti-fungal immunity. *Curr Opin Microbiol.*, 40:123-130. 2017 査読有

Yoshikawa FS, Yabe R, Iwakura Y, de Almeida SR, Saijo S. Dectin-1 and Dectin-2 promote control of the fungal pathogen *Trichophyton rubrum* independently of IL-17 and adaptive immunity in experimental deep dermatophytosis. *Innate Immun.* 22(5):316-24. 2016 査読有

Lee MJ, Yoshimoto E, Saijo S, Iwakura Y, Lin X, Katz HR, Kanaoka Y, Barrett NA. Phosphoinositide 3-Kinase δ Regulates Dectin-2 Signaling and the Generation of Th2 and Th17 Immunity. *J Immunol.*

197(1):278-87. 2016 査読有

Wittmann A, Lamprinaki D, Bowles KM, Katzenellenbogen E, Knirel YA, Whitfield C, Nishimura T, Matsumoto N, Yamamoto K, Iwakura Y, Saijo S, Kawasaki N. Dectin-2 Recognizes Mannosylated O-antigens of Human Opportunistic Pathogens and Augments Lipopolysaccharide Activation of Myeloid Cells. *J Biol Chem*. 291(34):17629-38. 2016 査読有

Kimura Y, Inoue A, Hangai S, Saijo S, Negishi H, Nishio J, Yamasaki S, Iwakura Y, Yanai H, Taniguchi T. The innate immune receptor Dectin-2 mediates the phagocytosis of cancer cells by Kupffer cells for the suppression of liver metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(49):14097-14102. 2016 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

Saijo S. Roles of cytokines in the anti-fungal immunity. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Kanazawa Japan, 2017

Yabe R, Kobayashi M, Wakatsuki M, Akahori Y, Saijo S. Microbial recognition by C-type lectin receptors encoded in the Dectin-1/Dectin-2 cluster. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Kanazawa Japan, 2017

Akahori Y, Yabe R, Iwakura Y, Saijo S. Molecular mechanism of anti-pneumococcal immune responses by Dectin-1. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Kanazawa Japan, 2017

Kobayashi M, Yabe R, Wakatsuki M, Akahori Y, Saijo S. STING is a negative regulator of innate immune responses in *Cryptococcus neoformans* infection. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Kanazawa Japan, 2017

西城忍 真菌の細胞壁構成成分と C 型レクチン受容体による認識. 第 81 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 学術集会. 長崎市. 2016 年

〔図書〕(計 2 件)

Yabe R. and Saijo S. Dectin-2 in

antimicrobial immunity and homeostasis. "C-type lectin receptors in immunity", Yamasaki S. ed. Springer Japan, 3-13, 2016.

Saijo S: Roles of C-type lectin receptors in inflammatory responses. "Chronic inflammation", Miiyasaka M. and Takatsu K. eds., Springer Japan 333-44, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://cytokine.pf.chiba-u.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西城 忍 (SAIJO, Shinobu)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号 : 60396877