

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19147

研究課題名(和文) 免疫抑制性C型レクチン受容体による抗真菌免疫誘導機構の解明

研究課題名(英文) The role of inhibitory-type C-type lectin receptors in fungal immunity

研究代表者

矢部 力朗 (Yabe, Rikio)

千葉大学・真菌医学研究センター・助教

研究者番号：00598229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：C型レクチン受容体(CLR)は、活性化型CLRと抑制型CLRが知られており、自己・非自己由来のリガンド認識を通じて、生体恒常性の維持や免疫活性化・制御に深く関与している。本研究では抑制型CLRに焦点を当て、真菌感染応答における役割を明らかにした。抑制型CLRは、Candida菌種などを認識し、糖鎖成分を認識することが明らかになった。またこれら真菌を感染させた際、抑制型CLRはマクロファージおよび好中球からのサイトカイン産生に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：C-type lectin receptors are a large family of transmembrane proteins containing extracellular C-type lectin-like carbohydrate-recognition domain(s) and signal transduction region(s), i.e., immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM). Although ITAM-coupling CLR are best-characterized as direct receptors for fungi, the role of ITIM-bearing CLR has been poorly understood. In this study, we found that a soluble form of inhibitory-type CLR bound to Candida species. Furthermore, inhibitory-type CLR mediated inflammatory cytokine production in macrophages and neutrophils following stimulation with those fungi. These data suggest that inhibitory-type CLR play an important role in immune responses to fungal infection.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：真菌 自然免疫受容体 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

C型レクチン受容体 (CLR) は、糖鎖認識ドメイン (CRD) をもつ膜貫通型タンパク質で、カルシウム依存的に糖鎖を認識する。近年、カルシウム非依存的に糖鎖を認識する CLR や、糖鎖以外のリガンドを結合する CLR が存在することが明るみになり、CLR は多様な様式で物質を捉えることがわかってきた。この CLR ファミリーには、細胞質内領域にシグナル伝達モチーフ immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を共役する活性化 CLR および immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif (ITIM) を有する抑制型 CLR が存在する。ITAM 共役型 CLR は、内在性・外来性物質を感知した際、細胞質内に活性化シグナル伝達する。対照的に、ITIM 共役型 CLR は抑制性シグナルを伝達する。これにより、ITAM および ITIM 共役型 CLR は、生体の恒常性維持、免疫応答の惹起・炎症の収束など多彩な生命現象に重要な役割を果たすとされている。

活性化型 CLR として、Dendritic cell-associated C-type lectin 1 (Dectin-1) およびその姉妹分子 Dectin-2 が知られている。Dectin-1 は、CRD で  $\beta$  グルカンを認識し、ヘム ITAM を介して、自然免疫細胞の活性化を誘導する。一方、Dectin-2 は CRD で マンナンを認識するが、ITAM をもたない。代わりに、Dectin-2 は ITAM を有する FcR $\gamma$  と会合することで細胞質内に活性化シグナルを伝達し、免疫応答を誘導する。これまで我々は、Dectin-1 および Dectin-2 が病原性真菌カンジダやニューモシスティスによる感染に感染し、生体防御において重要な役割を担うことを報告してきた。一方、感染応答における抑制型 CLR の役割については不明な点が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

マウス Dectin-1 および Dectin-2 をコードする遺伝子近傍に 6 種の抑制型 CLR が存在する。本研究では、これら抑制型 CLR に注目し、真菌感染応答における役割を明らかにする目的で、高病原性真菌の認識機構および真菌免疫応答制御機構を解明する。

## 3. 研究の方法

- (1) 抑制型 CLR の細胞外ドメインをコードする遺伝子領域を、イムノグロブリンの Fc 領域を含むプラスミドへ導入する。それらプラスミドを哺乳細胞へトランスフェクションし、培養上清を回収する。培養上清から Fc 融合タンパク質を、ProteinA セファロースを用いて単離、精製する。高病原真菌をポテトデキストロース培地で培養し、調製する。CLR-Fc と真菌を混合し、結合をフローサイトメトリーで調べる。
- (2) 真菌をポテトデキストロース培地で培養し、精製後、アルカリ法で処理し、細胞壁成分を調製する。真菌由来細胞壁成分を固相化し、CLR-Fc との親和性を固相化法にて調べる。
- (3) マウスから骨髓細胞を調製し、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) および顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) 存在下で培養し、骨髓由来マクロファージ (BMDM) および骨髓由来樹状細胞 (BMDC) を調製する。好中球を、骨髓細胞から磁気細胞分離装置を用いて単離する。これら自然免疫細胞を真菌およびアルカリ処理真菌と培養する。上清中の炎症性サイトカイン産生、好中球細胞外トラップ産生および活性酸素種の産生を調べる。

## 4. 研究成果

- (1) 抑制型 CLR 細胞外ドメイン遺伝子を含むプラスミドを構築した。トランスフェクションされた哺乳細胞培養上清から精製し、可溶性 CLR-Fc を得た。これら CLR-Fc と真菌ライブラリーとの結合を評価した結果、CLR-Fc1 は *Candida albicans* および *Aspergillus fumigatus* との結合が認められた。また、CLR-Fc2 は、*A. fumigatus* に結合を示した。次にこれらの CLR の 5 種の病原性 *Candida* 株および 4 種の *Aspergillus* 株に対する結合を調べた。CLR-Fc1 は、一部の *Candida* 株および一部の *Aspergillus* 株に結合を示した。CLR-Fc2 はすべての *Aspergillus* 株に結合を示した。さらに、CLR-Fc1 は酵母型・菌糸型 *Candida* および孢子型 *Aspergillus* の両方に結合がみられた。CLR-Fc2 は、孢子型 *Aspergillus* に結合を示した。一方、大腸菌を含む細菌に対しては結合がみられなかった。
- (2) 真菌細胞壁を認識することが示唆されたため、*Candida* および *Aspergillus* を調製し、アルカリ処理後、それぞれの細胞壁成分を得た。アルカリ処理細胞壁成分をプレートへ固定化し、CLR-Fc1.2 との結合を固相化法にて評価した。その結果、CLR-Fc1.2 は不溶性画分に対し結合を示した。
- (3) BMDM と *Candida* および *Aspergillus* とを培養した結果、CLR1 欠損 BMDM では、炎症性サイトカイン産生および活性酸素種の産生に機能障害がみられた。同様に、好中球においてもこれら産生に機能障害が認められた。また、好中球細胞外トラップ産生に機能障害がみられた。アルカリ処理細胞壁成分で刺激した場合、BMDM、好中球をにおいて同様の結果が得られた。BMDM と *Aspergillus* を培養した結果、CLR2 欠損 BMDM は野生型 BMDM と同等のサイトカイン産生を示した。

本研究により、CLR1 は *Candida* および *Aspergillus* を認識し、自然免疫応答に関与することが示唆された。CLR2 は *Aspergillus* を認識するが自然免疫応答の誘導に関与しないことが示唆された。以上のことから、両 CLR は真菌感染に応答し、生体内で重要な役割を果たすことが示唆された。今後、CLR を標的とした製剤および治療法の開発が真菌に対する感染防御につながることを期待できる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Fabio SY Yoshikawa、[Rikio Yabe](#)、[Yoichiro Iwakura](#)、Sandro R de Almeida、[Shinobu Saijo](#)、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 Immunity*、査読有、Vol22、2016、316-324  
doi:10.1177/1753425916645392

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) Yukiko Akahori、[Rikio Yabe](#)、[Yoichiro Iwakura](#)、[Shinobu Saijo](#)、Dectin-1 mediates innate immune responses in *Streptococcus pneumoniae* infection、第 46 回日本免疫学会学術集会、仙台国際センター(宮城)、2017 年 12 月 12 日
- (2) [Rikio Yabe](#)、Mutsuki Kobayashi、Maki Wakatsuki、Yukiko Akahori、[Shinobu Saijo](#)、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、石川音楽堂、(石川)、2017 年 11 月 1 日

- (3) Yukiko Akahori、Rikio Yabe、Yoichiro Iwakura、Shinobu Saijo、Molecular mechanism of anti-pneumococcal immune responses by Dectin-1、The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society、石川音楽堂、(石川) 2017年11月1日
- (4) Mutsuki Kobayashi、Rikio Yabe、Maki Wakatsuki、Yukiko Akahori、Shinobu Saijo、STING is a negative regulator of innate immune responses in Cryptococcus neoformans infection、The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society、石川音楽堂、(石川) 2017年11月1日
- (5) 赤堀 ゆきこ、矢部 力朗、横山 隣、河野 弥季、長沢 光章、西城 忍、Streptococcus pneumoniae に対する宿主認識と感染免疫応答機構の解明、第66回日本医学検査学会、幕張メッセ(千葉) 2017年6月17日
- (6) 海部 知則、矢部 力朗、岩倉 洋一郎、C型レクチン受容体 DCIR の機能的リガンドの同定、第185回日仏生物学会例会、東北大学学際科学フロンティア研究所(宮城) 2016年11月26日
- (7) 矢部 力朗、海部 知則、丸橋 拓海、西城 忍、館野 浩章、平林 淳、岩倉 洋一郎、DCIR - 糖鎖間相互作用による骨代謝制御機構、第35回日本糖質学会年会、高知市民文化プラザかるぼーと(高知) 2016年9月3日

〔図書〕(計 3件)

- (1) 矢部 力朗、他、化学療法の領域、C型レクチン受容体 Dectin-1 および Dectin-2 による感染防御機構および炎症制御機構、2017、105-111、医薬ジャーナル社

- (2) 矢部 力朗、他、臨床免疫・アレルギー科、Dectin-2 による生体応答制御、2016、95-99、科学評論社
- (3) Rikio Yabe、他、C-Type Lectin Receptors in Immunity、Dectin-2 in Anti-microbial Immunity and Homeostasis、2016、3-13、Springer、査読有

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢部 力朗 (YABE, Rikio)

千葉大学・真菌医学研究センター・助教

研究者番号：00598229

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

西城 忍 (SAIJO, Shinobu)

岩倉 洋一郎 (IWAKURA, Yoichiro)

鄭 琇絢 (CHUNG, Soo-Hyun)