

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15730

研究課題名(和文) 制御性免疫受容体を介した結核菌に対する免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) Immune regulation by inhibitory immune receptors against Mycobacteria

研究代表者

本園 千尋 (Motozono, Chihiro)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10642910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫受容体には活性化型と抑制型があり、それらの認識に伴う正負のシグナル伝達のバランスによって免疫応答を制御している。これまでに活性化型受容体が結核菌および損傷自己由来の糖脂質を認識する受容体として機能し、特徴的な自然免疫及び獲得免疫応答を惹起することを明らかにしてきた。その一方で、生体の恒常性維持に寄与していると考えられている抑制型受容体についてはそのリガンドを含め依然として不明な点が多い。本研究では抑制型受容体の損傷自己由来の新規脂質リガンドを同定し、リガンド認識を介した活性化の抑制効果を明らかにした。本研究により死細胞が有する炎症抑制機構を説明する新たな分子機序の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで一連の活性化型免疫受容体が脂質認識受容体として機能し、それぞれが特徴的な自然免疫ならびに獲得免疫応答の惹起することが明らかになってきた。その一方で抑制型免疫受容体に関する研究はそのリガンドを含めてその全貌は明らかではなかったが、本研究により抑制型免疫受容体の脂質リガンドを新たに同定することが出来た。本研究成果は、抑制型免疫受容体を介した新たな免疫応答制御機構の解明に寄与することが示唆され、1) リガンド成分含有のアジュバントを用いた免疫応答制御法、ならびに、2) 抑制型免疫受容体の認識阻害により免疫応答を活性化する新たな治療法の開発に発展すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Although the activating signals are balanced by inhibitory receptor-mediated signals, which maintains immune homeostasis, ligand recognitions and functions via inhibitory immune receptor remains unclear. In this study, we identified a novel ligand recognized by an inhibitory immune receptor and revealed the inhibitory function.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 免疫受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体は常に様々な侵襲に晒されている。それらの危険を感知する免疫受容体には活性型と抑制型があり、それらのリガンド認識に伴う正負のシグナル伝達のバランスによって、自然免疫ならびに獲得免疫応答は適切に制御されている。自然免疫受容体の一つであるC型レクチン受容体(C-type lectin receptor: CLR)にも活性型と抑制型があり、これまでに我々は一連の活性型CLRが結核菌および損傷自己由来の糖脂質受容体として機能し、それぞれ特徴的な自然免疫及び獲得免疫応答を惹起することを明らかにしてきた。その一方で、生体の恒常性維持に寄与していると考えられている抑制型CLRについてはそのリガンドを含め依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

2-1. 本研究では抑制型CLRに着目し、病原体および損傷自己由来の新規リガンドの同定することを目的とした。

2-2. 抑制型CLRがリガンドの認識を介してどのように免疫応答を抑制するのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 抑制型CLRの細胞内ドメインにCD3鎖を結合させたキメラ受容体を発現するGFPレポーター細胞を作製し、そのリガンド活性をGFPの発現を指標として解析を行った。

3-2. レポーター細胞の活性を指標として、結核菌ならびに死細胞由来の活性画分の精製を行い、マススペクトロメトリーならびに核磁気共鳴スペクトルによりリガンド構造の同定を行った。

3-3. 抑制型受容体とヒト免疫グロブリン(Ig)との可溶性融合タンパク質を調製し、リガンドとの結合能について調べた。

3-4. CRISPR/Cas9システムを用いて抑制型受容体を欠損したマウスを樹立し、活性化リガンド存在下における抑制効果について解析を行った。

4. 研究成果

4-1. 結核菌成分由来リガンドの同定

抑制型CLRを発現するレポーター細胞は結核菌株に対してリガンド活性を示すことを見出した。そのリガンド成分を明らかにするため、結核菌から抽出した画分を脂質と水溶性画分に分離し、それぞれの成分に対するレポーター細胞の活性化を調べたところ、水溶性画分に強いリガンド活性を示した(図1)。

4-2. 死細胞由来成分由来リガンドの同定

同様に抑制型CLRを発現するレポーター細胞を用いて、死細胞成分に対する応答性を調べたところ、結核菌とは異なり疎水性成分に対して活性を示すことを見出した(図2)。

4-3. リガンド構造の同定

結核菌由来の水溶性成分ならびに死細胞由来の疎水性成分について、それぞれリガンド活性を基に精製を行い、マススペクトロメトリーならびに核磁気共鳴スペクトルによって構造解析を行った。結核菌成分のリガンドについては同定には至っていないが、死細胞由来の脂質リガンドについてはその構造を同定することが出来た。

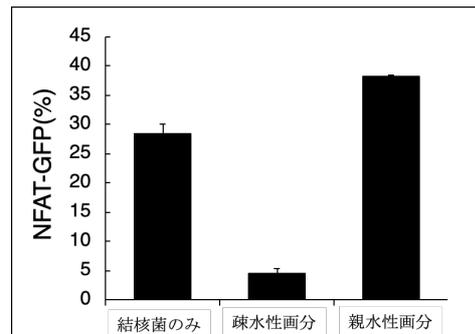


図1 結核菌成分に対する応答性
抑制型受容体が発現する細胞は結核菌の水溶性画分に応答性を示した。細胞の活性化に伴うGFPの発現についてはフローサイトメトリーによって解析した。

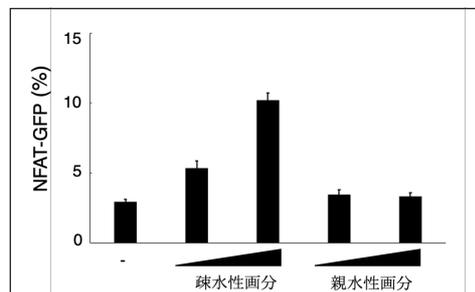


図2 死細胞に対する応答性
抑制型受容体が発現するGFPレポーター細胞は死細胞の疎水性画分に対してリガンド活性を示した。細胞の活性化に伴うGFPの発現についてはフローサイトメトリーによって解析した。

4-4. 抑制型免疫受容体の死細胞に対する結合

抑制型受容体とヒト Ig との融合タンパク質を作製し、死細胞に存在する脂質リガンドに対する結合能を調べた。その結果、抑制型受容体は死細胞に結合することが明らかになった(図3)。

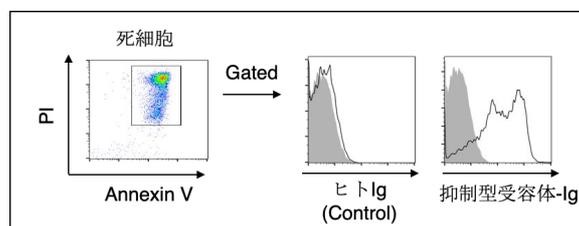


図3 抑制型受容体は死細胞に結合する
抑制型受容体の融合タンパク質は死細胞 (PI⁺ Annexin V⁺集団) に結合した。ヒストグラムの灰色は2次抗体のみを示す。

4-5. 抑制型免疫受容体を介した抑制効果について

抑制型受容体を欠損したマウスを樹立した。野生型 (WT) ならびに欠損マウス (KO) の骨髄からそれぞれマクロファージを誘導し、活性化リガンドである LPS (リボ多糖) 存在下で死細胞を投与し炎症性サイトカインの産生を調べた。その結果、受容体欠損のマクロファージ (図4A) において死細胞の投与により炎症性サイトカインである TNF の産生が上昇することが明らかになった (図4B)。以上より、抑制型受容体が死細胞を介したリガンド認識により活性化を抑制することが示唆された。このことは死細胞が有する新たな炎症反応制御機構である可能性が示唆された。

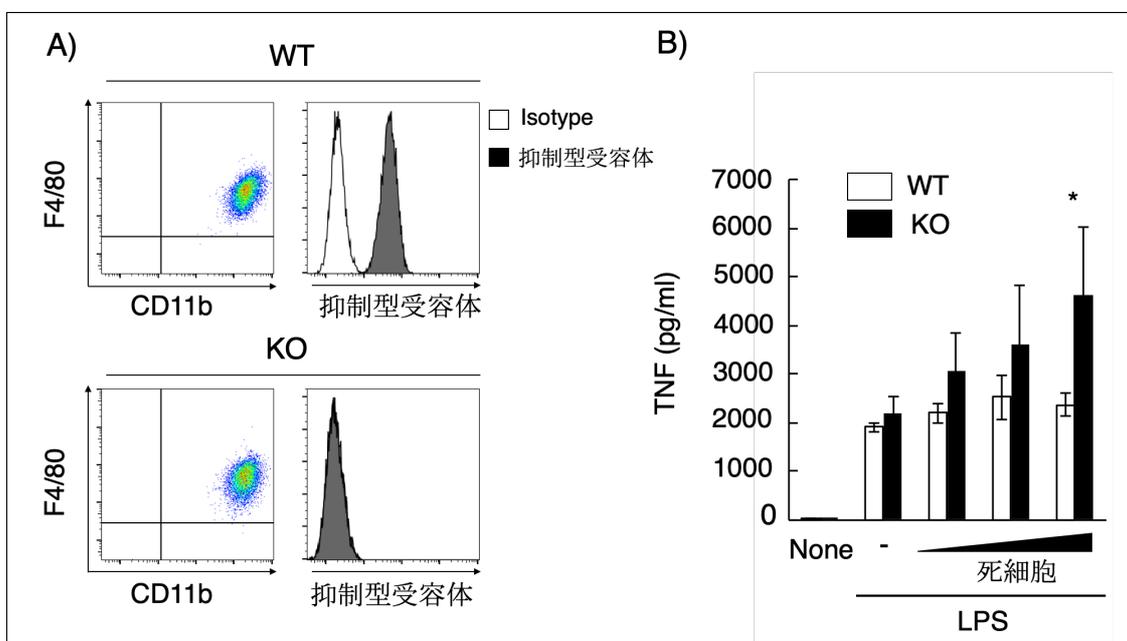


図4 抑制型受容体を介した活性化シグナルの抑制効果

A) 野生型 (WT) ならびに抑制型受容体を欠損したマウス (KO) より樹立したマクロファージについて、CD11b⁺F4/80⁺集団における受容体の発現を特異的抗体を用いて検出を行った。
B) WT ならびに KO 由来のマクロファージを用いて、LPS 存在下において死細胞を投与し TNF の産生について ELISA 法により解析した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Ishifune C, Tsukumo SI, Maekawa Y, Hozumi K, Chung DH, Motozono C, Yamasaki S, Nakano H, Yasutomo K.

Regulation of membrane phospholipid asymmetry by Notch-mediated flippase expression controls the number of intraepithelial TCR⁺CD8⁺ T cells.

PLoS Biol. 17(5):e3000262, 2019. 査読有

2. Takano T, Motozono C*, Imai T, Sonoda KH, Nakanishi Y, Yamasaki S*.

Dectin-1 intracellular domain determines species-specific ligand spectrum by modulating receptor sensitivity.

J. Biol. Chem. 292(41):16933-16941, 2017. 査読有

*Corresponding equally

〔学会発表〕(計 2件)

1. Motozono C, Shimane T, Torigoe S, Nishimura N, and Yamasaki S. Recognition of phospholipids on dead cells via inhibitory C-type lectin receptor. 第47回日本免疫学会学術集会. 2018年12月10-12日、福岡.

2. Motozono C, Takano T, Imai T, Sonoda K and Yamasaki S. Dectin-1 intracellular domain determines species-specific ligand spectrum by modulating receptor sensitivity. 第91回日本生化学学会大会、シンポジウム、2018年9月24-26日、京都.

〔図書〕(計 1件)

本園 千尋 他、羊土社、実験医学 脂質クオリティ、2018、Vol.36 No.10 p125-130

〔その他〕

ホームページ等

<http://molimm.biken.osaka-u.ac.jp>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。