

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06572

研究課題名(和文)6位硫酸化コンドロイチン硫酸欠損マウスにおける肺炎球菌抵抗性の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Mechanism of Streptococcus pneumoniae-resistance in chondroitin 6-sulfate-deficient mice

研究代表者

内藤 裕子(Naito-Matsui, Yuko)

藤田医科大学・医療科学部・講師

研究者番号：10456775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖の構造は多様かつ細胞種特異的であるだけでなく、細胞の分化、活性化に伴い劇的に変化しており、糖鎖は病原体の感染成立や細胞自身の機能制御において重要な役割を果たす。コンドロイチン硫酸の6位硫酸化酵素であるC6ST-1をマウスで欠損させると肺炎球菌に対する感受性が著しく低下することを見出したことから、C6ST-1欠損マウスの免疫系の解析を進めた結果、C6ST-1の欠損が炎症誘導の異常をもたらす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

肺炎球菌は肺炎や敗血症、細菌性髄膜炎の主たる原因菌である。肺炎球菌感染による細菌性髄膜炎では、脳内への薬物移行性の問題から抗菌薬の選択肢が限られている。本研究で得られた結果をさらに発展させることにより、これまで標的として理解されていなかったコンドロイチン硫酸の免疫系における機能、肺炎球菌の感染における役割が明らかになれば、肺炎球菌感染症の新たな治療薬、ワクチンの開発にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：The structures of glycans differ not only by cell species, but also by cell differentiation or activation. Thus, glycans play important roles in pathogen infection and modulation of cellular functions. Since deletion of chondroitin 6-sulfotransferase-1 (C6ST-1) made mice resistant to Streptococcus pneumoniae infection, phenotypes of C6ST-1 knockout mice were analyzed focusing on immune system. The results indicated that inflammation might be affected by C6ST-1 deficiency.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：コンドロイチン硫酸 肺炎球菌 免疫系

1. 研究開始当初の背景

細菌等の病原体感染に対する生体の防御機構には、皮膚・粘膜のバリアによる体内への侵入の阻止、自然免疫である好中球やマクロファージによる貪食、そして獲得免疫である液性免疫、細胞性免疫があり、これらの免疫応答が連携して働くことで身を守っている。病原体が感染する過程、そして病原体や感染した細胞を駆除する過程では、宿主、そして病原体による相手方の認識が生じる。

宿主である細胞の表面は、膜タンパク質等に付加された糖鎖で覆われている。つまり、糖鎖が、宿主や病原体が相手方と出会った際に最初に接する分子となることが多い。糖鎖の構造は多様かつ細胞種特異的であることから、病原体による宿主の選別において、決定基として機能する。また、細菌が宿主の糖鎖を利用して免疫系の攻撃から逃れる例も報告されている。一方で、糖鎖の構造は同一の細胞においても普遍ではなく、細胞の分化、活性化に伴い劇的に変化する。この糖鎖構造の変化が糖鎖認識分子との相互作用を変化させることで、細胞自身の機能を制御していることも明らかになってきた。例えば、研究代表者は以前、細胞表面の糖鎖の最も外側に位置するシアル酸の活性化依存的な分子種変化がリンパ球の活性化亢進をもたらすことを明らかにした。このように、糖鎖は病原体の感染過程及び感染に対する防御反応において、極めて重要な役割を担っている。

グリコサミノグリカン (GAG) は、二糖繰り返し構造からなる直鎖状糖鎖であり、細胞表面や細胞外マトリクス中に、主に特定のコアタンパク質に四糖結合領域を介して結合したプロテオグリカンとして存在する (図1)。GAGの一つであるコンドロイチン硫酸 (CS) は、グルクロン酸 (GlcA) と N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) から成る二糖単位が数十回繰り返した硫酸化多糖である。哺乳動物細胞に存在する CS の多くは、硫酸基転移酵素により GalNAc 残基の 4 位・6 位、GlcA の

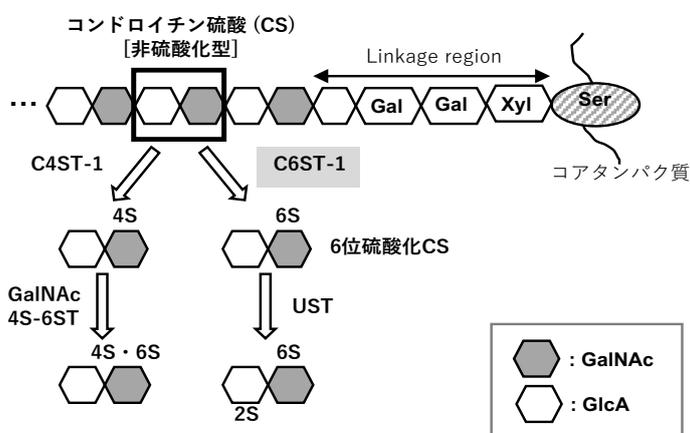


図1. CS鎖の構造と生成

2 位に硫酸化修飾を受けている。研究代表者が本研究課題に応募した時点で所属していた研究室では、CS が脳・神経系や骨、筋肉において硫酸化パターン依存的にその機能を発揮することを世界に先駆けて明らかにしてきた。

研究代表者の予備的実験により、CS の 6 位硫酸化を担う硫酸基転移酵素、C6ST-1 のノックアウト (KO) マウスが、肺炎球菌の感染に対し高い生存率を示すことが明らかになった。肺炎球菌は肺炎や敗血症、細菌性髄膜炎の主たる原因菌である。血液脳関門突破において糖鎖が重要な役割を果たすことが示唆されるなど、感染と特定の糖鎖構造の関連が予想されるものの、感染時に糖鎖が果たす役割は未だ不明な部分が多い。他の感染症でも、GAG のうちヒアルロン酸やヘパラン硫酸については関与が明らかにされつつあるが、CS の寄与はほとんど不明である。肺炎球菌に対する感受性の違いという予備的実験の結果等から、C6ST-1 の欠損により自然免疫系が亢進する可能性が示唆され、コンドロイチン硫酸が硫酸化パターン依存的に免疫系の制御に関わる可能性が考えられた。そこで本研究では、特にマクロファージや好中球など自然免疫を担う細胞に着目した。マクロファージにおいて、その機能制御に CS が関与する可能性を示唆する報告として、ヒアルロン酸受容体である CD44 とヒアルロン酸の結合の制御がある。ヒアルロン酸と CD44 の結合は、損傷部位へのマクロファージの動員に関わる。CD44 には CS 付加部位があるが、この CS の硫酸化はヒアルロン酸と CD44 の結合を抑制的に制御しており、マウスのマクロファージを M1 マクロファージへと分化させる条件で刺激すると、CS の硫酸化が低下し、CD44 とヒアルロン酸の結合が増加すること、また、この時 C6ST-1 の発現量が減少しており、6 位硫酸化 CS の制御が示唆されることが報告されている (Ruffell *et al.*, JBC, 2011)。一方で、C6ST-1 の siRNA を肺気腫モデルのマウスに投与したところ、肺における過剰なマクロファージの集積が抑えられ、症状が改善したとの報告もある (Kai *et al.*, Respiratory Research, 2015)。

2. 研究の目的

本研究では、CS の 6 位硫酸化を担う硫酸基転移酵素、C6ST-1 の KO マウスが、肺炎球菌の感染に対し高い生存率を示すという予備的知見を踏まえ、CS が肺炎球菌等の病原体の感染成立に寄与する機構の解明を目指し、6 位硫酸化 CS を欠損する C6ST-1 KO マウスの肺炎球菌感染に対する抵抗性の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

CSの機能解明を目指した研究では、一般的にコンドロイチナーゼを用いたCS分解の系が用いられる。しかし、生体内におけるCSの機能制御は、CSの発現を失いその機能全てを欠失させるのではなく、状況に応じて硫酸化パターンを変化させ、硫酸化パターン依存的な機能を発揮・消失させるという形で行われていることが、研究代表者が所属していた研究室により明らかになってきた。本研究では、CSの硫酸化酵素を欠損させた糖鎖改変マウスを使用して研究を進めるため、実際に生体内で生じている「硫酸化の制御を介したCSの生理機能の調節機構」の解明に直結した結果が得られると考えられた。

肺炎球菌感染による細菌性髄膜炎では、脳内への薬物移行性の問題から抗菌薬の選択肢が限られており、本研究により、これまで標的として理解されていなかったCSの免疫系における機能、肺炎球菌の感染における役割が明らかになれば、肺炎球菌感染症の新たな治療薬、ワクチンの開発にもつながると期待された。

3. 研究の方法

C6ST-1 KOマウスに関しては、これまでに脾臓のnaïve T細胞減少の報告があるものの、それ以外に免疫系に関する表現型の報告はなかった(Uchimura *et al.*, JBC, 2002)。そこで本研究では、6位硫酸化CS欠損マウスの肺炎球菌感染に対する抵抗性の分子メカニズムを明らかにするため、まず*C6ST-1* KOマウスと野生型マウスで免疫細胞の分化、成熟、活性化等に差があるか調べた。

(1) *C6ST-1* KOマウスにおける免疫細胞の分化・成熟の解析

C6ST-1 KOマウスにおいて免疫細胞の割合や成熟に変化がないか調べるため、野生型マウスおよび*C6ST-1* KOマウスから各種免疫系組織及び末梢血、腹腔液を採取し、これらに含まれる単球・マクロファージ、樹状細胞、B細胞、T細胞などについて、各種細胞のマーカーとなる細胞表面抗原に対する抗体で染色してフローサイトメトリーを行い、解析した。

(2) *C6ST-1*欠損がマクロファージへの分化に与える影響の解析

野生型マウスと*C6ST-1* KOマウスでマクロファージなど自然免疫系に差があるか調べるため、まず骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)により*in vitro*で刺激した場合のマクロファージへの分化が*C6ST-1* KOマウスで正常に起こるか、細胞表面マーカーの発現をフローサイトメトリーで解析することにより調べた。

(3) *C6ST-1*欠損がマクロファージの機能に与える影響の解析

野生型マウスと*C6ST-1* KOマウスでマクロファージの機能に差があるか調べるため、野生型マウスおよび*C6ST-1* KOマウスの骨髄細胞を*in vitro*で刺激してマクロファージへと分化させ、得られた骨髄由来マクロファージによる肺炎球菌の殺菌能を比較した。

4. 研究成果

本研究では、*C6ST-1* KOマウスの肺炎球菌感染抵抗性の分子メカニズムを解明することを目的とし、*C6ST-1* KOマウスと野生型マウスで、免疫細胞の分化や成熟、活性化等に差があるか調べた。

(1) *C6ST-1* KOマウスにおける免疫細胞の分化・成熟の解析

野生型マウスおよび*C6ST-1* KOマウスから、胸腺、脾臓、リンパ節などの免疫系組織および末梢血、腹腔液を採取し、各種免疫系細胞のマーカーで染色してリンパ球やマクロファージなどの割合、分化・成熟を調べたところ、*C6ST-1* KOマウスでは野生型マウスと比較して顕著な違いは見られなかったものの、炎症に関わると考えられる一部の細胞集団の割合が変化している可能性が示唆された。

(2) *C6ST-1*欠損がマクロファージへの分化に与える影響の解析

次に、野生型マウスと*C6ST-1* KOマウスで自然免疫系の機能に差があるか検討するため、まず、骨髄細胞をM-CSFで刺激した際のマクロファージへの分化が*C6ST-1* KOマウス由来の細胞で正常に起こるか調べた。野生型マウスおよび*C6ST-1* KOマウスから採取した骨髄細胞をM-CSF存在下で約1週間培養し、細胞表面マーカーの発現をフローサイトメトリーで解析したところ、野生型マウスと*C6ST-1* KOマウス由来の細胞でマクロファージへの分化に差は見られなかった。

(3) *C6ST-1*欠損がマクロファージの機能に与える影響の解析

上述の通り、野生型マウスと*C6ST-1* KOマウスで骨髄細胞の*in vitro*での刺激によるマクロファージへの分化に特に差が見られなかったことから、次に、この骨髄由来マクロファージを用いて肺炎球菌の殺菌能を調べた。野生型マウスおよび*C6ST-1* KOマウスの骨髄由来マクロファージと肺炎球菌を混和した際の肺炎球菌の増殖能に差は見られず、*C6ST-1*欠損はマクロファージの殺菌能には影響しない可能性が示唆された。

以上の結果より、*C6ST-1* KO マウスでは肺炎球菌感染時の炎症誘導に変化が生じている可能性が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yang Sujeong, Gigout Sylvain, Molinaro Angelo, Naito-Matsui Yuko, Hilton Sam, Foscarin Simona, Nieuwenhuis Bart, Tan Chin Lik, Verhaagen Joost, Pizzorusso Tommaso, Saksida Lisa M., Bussey Timothy M., Kitagawa Hiroshi, Kwok Jessica C. F., Fawcett James W.	4. 巻 26
2. 論文標題 Chondroitin 6-sulphate is required for neuroplasticity and memory in ageing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 5658 ~ 5668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41380-021-01208-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 湯浅大史, 濱野久美子, 関亮祐, 内藤裕子, 岡昌吾, 竹松弘
2. 発表標題 スフィンゴ糖脂質CD77によるB細胞抗原受容体シグナル伝達の制御機構の解析
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点 第16回「若手の力」フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内藤裕子
2. 発表標題 Change in sensitivity to bacterial toxin by lack of N-glycolylneuraminic acid
3. 学会等名 第92回 日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯浅大史, 濱野久美子, 関亮祐, 岡昌吾, 内藤裕子, 竹松弘
2. 発表標題 ヒト胚中心B細胞マーカーであるスフィンゴ糖脂質CD77はCD19のN型糖鎖付加を亢進させると共にB細胞抗原受容体シグナル伝達を抑制する
3. 学会等名 第63回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内藤裕子, 浅野光, 濱野久美子, 岡昌吾, 竹松弘
2. 発表標題 胚中心B細胞におけるピーナッツレクチン結合糖鎖発現の生理的意義
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------