

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07623

研究課題名（和文）抑制型免疫受容体が内因性脂質変化を感知して誘導する新たな免疫応答制御機構の解明

研究課題名（英文）Immune regulation by sensing endogenous lipid composition changes via inhibitory C-type lectin receptor

研究代表者

本園 千尋 (Motozono, Chihiro)

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・講師

研究者番号：10642910

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：免疫応答は活性化型免疫受容体を介した活性化シグナルとそれを制御する抑制性シグナルとの正負のバランスによって適切に調節されているが、抑制型免疫受容体の機能は未だ不明な点が多い。本研究では抑制型免疫受容体が内因性脂質ならびに結核菌由来の脂質成分をリガンドとして認識することを見出し、そのリガンド構造についても同定することに成功した。結核菌感染において抑制性受容体欠損マウスにおいてT細胞応答が増強されることが明らかになった。以上から、この抑制型受容体の認識を阻害することでワクチンの作用を向上出来る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

免疫応答は活性化シグナルとそれを制御する抑制性シグナルとの正負のバランスによって適切に調節されているが、抑制性シグナルを担っている抑制型免疫受容体の機能は未だ不明な点が多い。本研究では、抑制型受容体の内因性脂質リガンドならびに結核菌由来の脂質リガンド構造の同定に成功した。また結核菌感染動物モデルにおいて、野生型と比較して抑制型受容体欠損マウスでT細胞応答が増強されることが明らかになった。以上から、この抑制型受容体の認識を阻害することで免疫応答を増強させる新たな免疫チェックポイント阻害剤の可能性が示唆された。

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 innate-receptors bearing ITIMs (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) remains unclear. To identify their endogenous ligands, we employed nuclear factor of activated T-cells (NFAT)-GFP reporter cells expressing chimeric inhibitory CLRs fused to CD3 and analyzed the reporter activity in response to various components. We identified the structure of their lipid ligands from plasma membrane and Mycobacteria. Mycobacteria infection experiment revealed that T cell recall responses were substantially enhanced in mice lacking the inhibitory receptor. These data indicate that blockade of the inhibitory receptor interaction and signaling potentiate cellular immunity against mycobacteria.

研究分野：感染免疫学

キーワード：免疫受容体 抑制型受容体 結核菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫系において免疫受容体は異物を感知し、シグナル伝達を介して適切な免疫応答を誘導することで生体防御に重要な役割を果たしている。免疫応答は活性化型免疫受容体を介した活性化シグナルとそれを制御する抑制性シグナルとの正負のバランスによって適切に調節されていることから、活性化型免疫受容体だけでなく、抑制型免疫受容体も生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、活性化型免疫受容体に比べてその機能は未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、抑制型免疫受容体の生体恒常性維持もしくは感染症における機能を明らかにする一環として、それらが認識する内因性ならびに外因性リガンド構造の同定を行った。さらに抑制型免疫受容体欠損マウスを用いて、抑制型受容体の認識を阻害することにより新たな免疫チェックポイント阻害剤としての可能性について明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 抑制型受容体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。

(2) レポーター細胞の活性を指標として、結核菌ならびに細胞膜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) 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、*in vitro* ならびに *in vivo* において抑制型受容体を介した免疫応答の抑制効果について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 結核菌成分由来リガンドの同定

種々の抑制型免疫受容体を発現する NFAT-GFP レポーター細胞を作製し、その結果、PLCR-1 が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、疎水性画分に強いリガンド活性を示した。そこでレポーター活性を指標としてリガンドの精製を行い、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る解析により、糖脂質リガンドの構造の同定に成功した。

(2) 死細胞成分由来リガンドの同定

同様に抑制型免疫受容体を発現する NFAT-GFP レポーター細胞を用いて死細胞成分を認識する受容体の探索を行ったところ、興味深いことに、同じ PLCR-1 が死細胞由来の疎水性画分に活性を示すことが明らかになった。同様にレポーター活性を指標として、リガンドの精製を行い、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る解析により、細胞膜由来の内因性の脂質リガンドの構造の同定に成功した。

(3) *In vitro* における抑制効果の検討

CRISPR/Cas9 システムを用いて抑制型受容体である PLCR-1 を欠損したマウスを樹立した。それらを用いて以下のことを明らかにした。

結核菌リガンドにおける抑制効果

PLCR-1 欠損の樹状細胞を用いて結核菌刺激に対する炎症性サイトカインの産生を調べたところ、野生型と比較して MCP-1 (CCL2) の産生が上昇することを見出した。MCP-1 は単球の誘導に関わっているケモカインの一種で、Th 1 型の T 細胞応答の誘導への関与が示唆されており、MCP-1 を増強させることで Th 1 型 T 細胞応答を促進する可能性が示唆された。

内因性リガンドにおける抑制効果

野生型ならびに PLCR-1 欠損マウス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 (リポ多糖) 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。

(4) *In vivo* における結核菌リガンドの抑制効果の検討

抑制型免疫受容体である PLCR-1 とリガンドの相互作用が結核菌に対する免疫応答に与える影響を明らかにするため、PLCR-1 欠損マウスを用いて結核菌感染実験を行った。その結果、菌量に

については有意な差が認められなかったが、感染後の結核菌タンパク質による再刺激により、PLCR-1 欠損マウスにおいて T 細胞応答が増強されることが明らかになった。そこで BCG ワクチン接種後の二次応答について調べたところ、PLCR-1 欠損マウスにおいて T 細胞応答が顕著に増強し、菌量が低下することが明らかになった。以上から、この抑制型受容体の認識を阻害することでワクチンの作用を向上出来る新たな免疫チェックポイント阻害剤としての可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Lynch, AT., Motozono, C., Foster, AJ., Kodar, K., Dangerfield, EM., Yamasaki, S., Wedlock, DN., Timmer, MSM., Stocker, BL.	4. 巻 110
2. 論文標題 Trehalose diamide glycolipids augment antigen-specific antibody responses in a Mincle-dependent manner.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorg Chem.	6. 最初と最後の頁 104747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioorg.2021.104747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsuoka, T., Motozono, C., Hattori, A., Kakeya, H., Yamasaki, S., Oishi, S., Ohno, H., Inuki, S.	4. 巻 22
2. 論文標題 The effects of 5-OP-RU stereochemistry on its stability and MAIT-MR1 axis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chembiochem.	6. 最初と最後の頁 672-678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202000466	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Braganza CD., Motozono C., Sonoda KH., Yamasaki S., Shibata K., Timmer MSM., Stocker BL.	4. 巻 56
2. 論文標題 Agonistic or antagonistic mucosal-associated invariant T (MAIT) cell activity is determined by the 6-alkylamino substituent on uracil MR1 ligands.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem Commun (Camb)	6. 最初と最後の頁 529-5294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc00247j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato S., Shirai Y., Motozono, C., Kanzaki, H., Mori, S., Kodama, T.	4. 巻 525
2. 論文標題 In vivo delivery of an exogenous molecule into murine T lymphocytes using a lymphatic drug delivery system combined with sonoporation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1025-1031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.174.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Braganza CD., Motozono C., Sonoda KH., Yamasaki S., Shibata K., Timmer MSM., Stocker BL.	4. 巻 56
2. 論文標題 Agonistic or antagonistic mucosal-associated invariant T (MAIT) cell activity is determined by the 6-alkylamino substituent on uracil MR1 ligands.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem Commun (Camb)	6. 最初と最後の頁 5291-5294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc00247j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kato S., Shirai Y., Motozono, C., Kanzaki, H., Mori, S., Kodama, T.	4. 巻 525
2. 論文標題 In vivo delivery of an exogenous molecule into murine T lymphocytes using a lymphatic drug delivery system combined with sonoporation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1025-1031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.174.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takamura, S., Kato, S., Motozono, C., Shimaoka, T., Ueha, S., Matsuo, K., Miyauchi, K., Masumoto, T., Katsushima, A., Nakayama, T., Tomura, M., Matsushima, K., Kubo, M. & Miyazawa, M.	4. 巻 216
2. 論文標題 Interstitial-resident memory CD8+ T cells sustain frontline epithelial memory in the lung.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 2736-2747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20190557	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

1. 著者名 Braganza, CD., Shibata, K., Fujiwara, A., Motozono, C., Sonoda, KH., Yamasaki, S., Stocker, BL., Timmer, MSM.	4. 巻 17
2. 論文標題 The effect of MR1 ligand glycol-analogues on mucosal-associated invariant T (MAIT) cell activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Org Biomol Chem.	6. 最初と最後の頁 8992-9000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9ob01436e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishifune, C., Tsukumo, S.I., Maekawa Y., Hozumi, K., Chung, D.H., Motozono, C., Yamasaki, S., Nakano, H., Yasutomo, K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Regulation of membrane phospholipid asymmetry by Notch-mediated flippase expression controls the number of intraepithelial TCR +CD8 + T cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Biol.	6. 最初と最後の頁 e3000262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000262	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 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 本園 千尋、鳥越 祥太、西村 直矢、森田 真也、宮本 智文、山崎 晶
2. 発表標題 抑制型免疫受容体が内因性脂質変化を感知して誘導する免疫応答制御
3. 学会等名 第36回 日本DDS会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 C. Motozono, H.S. Ismanto, K. Shibata, and S. Yamasaki.
2. 発表標題 Capturing and identification of MR1-binding molecules using unfolded MR1 protein.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, December 11-13, 2019, Shizuoka, Japan
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター 予防開発部門感染免疫学分野
<https://caids-kumamoto-u.wixsite.com/ueno-lab>
 大阪大学微生物病研究所分子免疫制御分野
<http://molimm.biken.osaka-u.ac.jp>

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
---------	---------