

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07551

研究課題名(和文) cサイトカイン受容体のシグナル伝達におけるITAM-Card9経路の役割解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of ITAM-Card9 pathway in beta c cytokine receptor signaling

研究代表者

飯笹 英一 (Iizasa, Ei'ichi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：20631998

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)：Immunoreceptor tyrosine-based activation motif(ITAM)を有するITAM分子のFcRやDap12は、マクロファージや樹状細胞で病原体を認識するパターン認識受容体(PRR)の下流で免疫応答に不可欠な役割を持つ。ITAM共役型PRRが病原体を認識すると、Sykをリン酸化し、Card9を介して免疫応答を惹起することはよく研究されている。しかし、サイトカインの情報伝達において、これらの分子の機能の寄与はまだ不明な点が多い。本研究では、GM-CSF受容体のシグナル伝達においてもFcR、Syk、Card9が重要な役割をしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、病原体認識のシグナル伝達で不可欠であるITAM分子やCard9が、GM-CSFの情報伝達にも重要な役割を果たしていることを示したものであり、病原体認識とサイトカインのシグナル伝達に重要な共通分子が存在することが明らかになった学術的意義は大きい。また、GM-CSFは、多発性硬化症、関節リウマチ、クローン病などの膠原病の発症や悪化にも重要な役割を持ち、新たなシグナル伝達分子が明らかになったことにより、新しい治療法開発のターゲットにもなりうる。

研究成果の概要(英文)：Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-bearing molecules, such as FcR and Dap12, have essential roles in immune responses downstream of pattern recognition receptors (PRRs) in macrophages and dendritic cells. It has been well studied that the ITAM-coupled PRRs recognition of pathogens induces phosphorylation of Syk and elicits immune response via Card9. However, the functions of these molecules in cytokine signaling remain unclear. In this study, we show that FcR, Syk, and Card9 also play important roles in GM-CSF receptor signaling.

研究分野：免疫学

キーワード：GM-CSF ITAM Card9 FcR DAP12 多発性硬化症 IL-3 IL-5

1. 研究開始当初の背景

マクロファージ(MΦ)や樹状細胞(DC)はパターン認識受容体(PRR)で病原体を感知し、自然免疫応答を惹起する。近年、ITAM 共役型の PRR が真菌や細菌の認識とその防御免疫応答に重要である事が明らかになっている(Shiokawa *et al.*, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2017)。ITAM 共役型 PRR は、Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) というシグナルモチーフを持つ Fc 受容体 γ 鎖(FcR γ)や DAP12 のような膜型シグナル分子(ITAM 分子)と共役するか、受容体自身の ITAM 様モチーフ(HemITAM)を介して活性化シグナルを伝達する。PRR が病原体分子パターン(PAMPs)を認識すると ITAM のチロシンリン酸化が生じ、そこに Spleen tyrosine kinase (Syk) がリクルートされることで、炎症惹起に重要な転写因子 NF- κ B や MAP キナーゼ(MAPK)が、Card9 を介して活性化される(Gross *et al.* *Nature* 2006, Hara *et al.* *Nat Immunol.* 2007)。

GM-CSF、IL-3、IL-5 は、特に炎症時における骨髓系細胞の増殖、分化、生存、炎症応答などに関わるサイトカインであり、多発性硬化症(MS)、関節リウマチ(RA)、喘息などの慢性炎症疾患の増悪に関与する。これらのサイトカインの受容体は、共通 β 鎖(β c)と、それぞれのサイトカインに特異的な α 鎖の複合体から形成される。 β c の下流では主として JAK2-STAT5 シグナル経路が活性化されることが知られるが、それ以外にも、細胞の活性化に関与する MAPK、PI3K-AKT、NF- κ B などの様々な経路も活性化されることが報告されている(Schwartz *et al.* *Blood* 2015, Dougan *et al.* *Immunity* 2019)。興味深いことに、GM-CSF、IL-3、IL-5 などの β c 鎖を情報伝達に介するサイトカイン(β c サイトカイン)は、Syk を活性化することが報告され

ている(Hida *et al.*, *Nat. Immunol.*, 2009)。しかし、 β c 鎖には、Syk 活性化に不可欠な ITAM や類似モチーフが無く、おそらく何らかの ITAM 分子がそこに介在している可能性がある。実際、IL-3 に応答した好塩基球の IL-4 産生には FcR γ が関与し、FcR γ と IL-3 受容体(IL-3R) β c 鎖が相互作用することが報告されている(Hida *et al.*, *Nat. Immunol.*, 2009)。しかし、GM-CSF 受容体(GM-CSFR)や IL-5 受容体(IL-5R)のシグナル活性化に ITAM 分子が関与するかは不明であった。また、ITAM 共役型 PRR を介した MAPK や NF- κ B 活性化に不可欠な Card9 が、 β c サイトカイン受容体のシグナル伝達に関与するかも全く未知であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以上の背景を踏まえ、 β c 鎖のシグナル伝達において、ITAM 分子あるいは Card9 が関与するかを検証し、関与する場合、どのような細胞内シグナルの活性化と細胞応答を制御するかを明らかにすることである。また、GM-CSF が関与する多発性硬化症(MS)のマウスモデル(実験的自己免疫性脳脊髄炎, EAE)における ITAM 分子、Card9 の関与を検証することである。

3. 研究の方法

(1) 骨髓由来樹状細胞(BMDC)の分化誘導

C57BL/6 野生型(WT)、FcR γ 欠損(KO)、Dap12 KO、Card9 KO の骨髓を採取し、RPMI 培地 10% 胎児ウシ血清(FCS)に 20 ng/ml GM-CSF を添加して、10 日間培養した。

(2) Syk のリン酸化

(1)の BMDC から FCS、GM-CSF、を除去後、3 h 培養する。その後、20 ng/ml GM-CSF で刺激し、0, 5, 15, 30 分後の細胞を回収して、反応を停止させ、蛋白質を抽出した。その後、抗リン酸化 Syk 抗体、抗

Syk 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって、Syk のリン酸化を検証した。

(3) 骨髄由来好塩基球の分化誘導

(1) と同様に骨髄を採取し、RPMI 培地 10% 胎児ウシ血清(FCS)に 5ng/ml IL-3 を添加して、12 日間培養した。

(4) 骨髄由来好塩基球の分化誘導

(1) と同様に骨髄を採取し、RPMI 培地 10% 胎児ウシ血清(FCS)に 100 ng/ml SCF, 100 ng/ml FLT3 ligand を添加して、3 日間培養した。その後、10 ng/ml IL-5 を添加して 11 日間培養した。

(5) EAE の誘導

WT、Card9 KO、FcR γ KO、 Δ Clec4a マウスにミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)を 200 μ g の MOG をフロイント完全アジュバント(CFA)と共にマウスの尾基底部の皮内に投与し、0 日目と 2 日目に 200 ng の百日咳毒素を腹腔内投与した。その後、EAE のスコアを評価した。

4. 研究成果

(1) 骨髄細胞から GM-CSF によって誘導される BMDC の分化・増殖解析

骨髄細胞を GM-CSF を添加して培養すると BMDC になる。近年の報告によると BMDC の中には、GM-Macs と呼ばれる M Φ 様の細胞と GM-DCs と呼ばれる DCs 様の細胞が混合して含まれることが報告されている(Helft et al., *Immunity* 2015)。FcR γ KO や Card9 KO の BMDC では、GM-Macs が減少することが明らかになった。一方で、Dap12 KO の GM-Macs の数は、WT と差がないことがわかった。このことから、GM-Macs の分化には、FcR γ と Card9 が必要であることが示唆された。

(2) 骨髄における前駆細胞の解析

BMDC は、骨髄細胞中の MDP、CDP、GMP、cMOP などの前駆細胞や単球から作られる。そこで、Card9 KO、FcR γ KO、Dap12 KO で、これらの細胞の解析を行ったところ、

全ての KO で、WT と差が見られなかった。このことから、FcR γ や Card9 は、骨髄の前駆細胞の分化や増殖には、影響ないことが示された。また、骨髄細胞から GM-Macs が分化する GM-CSF 受容体のシグナル伝達にこれらの分子が必要であることがわかった。

(3) GM-CSF における Syk の活性化、依存性の解析

GM-CSF 刺激による GM-CSF 受容体、FcR γ から Card9 へのシグナル伝達に Syk が関与しているか調べた。WT、FcR γ KO、Dap12 KO の BMDC を GM-CSF で刺激して、0、5、15、40 分後の Syk のリン酸化をウエスタンブロッティングで解析したところ、WT、Dap12 KO では、5 分後をピークに Syk のリン酸化が見られことがわかった。一方で、FcR γ KO では、それが見られなかったことから、GM-CSF 刺激では、FcR γ を介して、Syk がリン酸化されることがわかった。

(4) 他の β サイトカイン IL-3、IL-5 のシグナル伝達における FcR γ 、Card9 への関与

IL-3、IL-5 を添加した培地で骨髄細胞を培養すると、それぞれ、好塩基球、好酸球が分化誘導できる。そこで、IL-3、IL-5 のシグナル伝達における FcR γ や Card9 の重要性を調べるため、これらの分子の KO マウス由来骨髄細胞で、IL-3、IL-5 を加えて培養し、細胞の分化、活性化を調べた。まず、好塩基球について解析したところ、FcR γ KO、Card9 KO で、IL-3 によって誘導される好塩基球の分化や数は、WT と同程度であった。また、骨髄由来好塩基球を IL-3 によって刺激すると、IL-4 が産生されるが、FcR γ KO では、先行研究(Hida et al., *Nat. Immunol.*, 2009)と同様に、IL-3 刺激による IL-4 の産生が低下した。一方で、Card9 KO では、そのような低下が見られなかった。すなわち、

FcR γ 、Card9 は、好塩基球の分化に関わる IL-3 のシグナル伝達には関与しないが、FcR γ のみ好塩基球の IL-4 産生のための IL-3 シグナル伝達に寄与することがわかった。

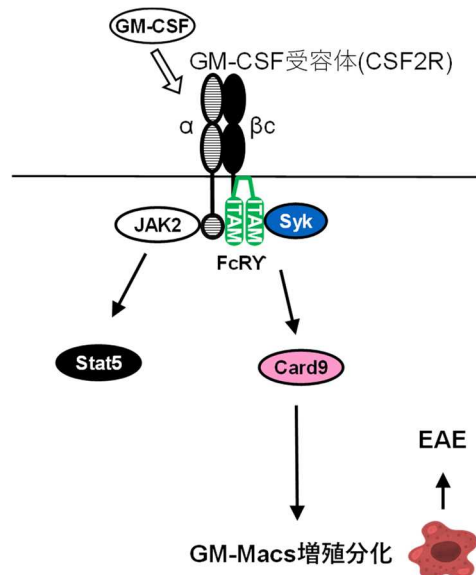
IL-5 による好酸球の分化誘導は、Card9 KO では、WT と同程度見られたが、FcR γ KO では、好酸球の数が減少することがわかった。このことから、骨髄細胞から好酸球を分化誘導する IL-5 のシグナル伝達に FcR γ が関与することが明らかになった。すなわち、GM-CSF 以外の βc サイトカインのシグナル伝達に FcR γ が関わっていることが明らかになった。しかし、Card9 は、他の βc のシグナル伝達に関与しないことが示された。

(5) EAE の発症、病態における FcR γ 、Card9 の関与

GM-CSF のシグナル伝達における FcR γ 、Card9 の重要性を *in vivo* で評価するため、GM-CSF が発症と病態に不可欠な MS モデルでこれらの分子の寄与を調べた。FcR γ 、Card9 は、上述のように PRR のシグナル伝達にも関与している。特に、結核菌の認識と免疫応答には、FcR γ 共役型の PRR が重要な役割を果たしている (Vinod *et al.*, *Microbiol. Res.*, 2020)。EAE は、MOG を免疫して、MS のような脳脊髄炎を誘導するモデルであるが、その免疫の際に結核菌の死菌をアジュバント (CFA) として用いる。そのため、PRR と GM-CSF 受容体経路の寄与を区別するため、結核菌を認識する FcR γ 共役型受容体欠損マウス Δ Clec4a をコントロールに用いた。FcR γ KO、Card9 KO、 Δ Clec4 マウスに MOG ペプチドを免疫し、EAE を誘導したところ、Card9 KO では、ほとんど EAE が発症せず、EAE のスコアも 0 に近かった。FcR γ KO は、WT と Card9 KO の中間程度の発症率とスコアを示した。一方で、 Δ Clec4 は、WT と同程度の発症率とスコアを示した。こ

のことから、EAE の発症には、既知の結核菌を認識する FcR γ 共役型の PRR は必要なく、FcR γ は、GM-CSF 受容体の下流で不可欠な働きをしていることが示唆された。また、Card9 は、EAE の発症、病態悪化において、GM-CSF 受容体-FcR γ の下流で不可欠な役割を果たすと共に、GM-CSF 受容体と結核菌を認識する PRR 以外のシグナル伝達にも重要な働きをしていることが示唆された。

以上をまとめると、本研究において、FcR γ 、Syk と Card9 は、*in vitro* における GM-CSF 誘導性 M Φ (GM-Macs) や、EAE の GM-CSF 受容体のシグナル伝達において、必要であることが明らかになった (下図)。



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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ei'ichi Iizasa, Yasushi Chuma, Takayuki Uematsu, Mio Kubota, Hiroaki Kawaguchi, Masayuki Umemura, Kenji Toyonaga, Hideyasu Kiyohara, Ikuya Yano, Marco Colonna, Masahiko Sugita, Goro Matsuzaki, Sho Yamasaki, Hiroki Yoshida, Hiromitsu Hara	4. 巻 12
2. 論文標題 TREM2 is a receptor for non-glycosylated mycolic acids of mycobacteria that limits anti-mycobacterial macrophage activation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 2299-2299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22620-3	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ei'ichi Iizasa, Hideo Mitsuyama, Yuki Oyamad, Hiromasa Inoue, Hiromitsu Hara
2. 発表標題 Card9 is crucial for bone marrow-derived inflammatory macrophage differentiation induced by GM-CSF
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯笹英一, 中馬康志, 植松崇之, 久保田未央, 川口博明, 梅村正幸, 豊永憲司, 清原秀泰, 矢野郁也, Marco Colonna, 杉田昌彦, 松崎吾朗, 山崎晶, 吉田裕樹, 原博満
2. 発表標題 TREM2は非糖鎖付加ミコール酸を認識し、抗結核免疫応答を抑制する
3. 学会等名 第32回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯笹英一, 中馬康志, 植松崇之, 久保田未央, 川口博明, 梅村正幸, 豊永憲司, 清原秀泰, 矢野郁也, Marco Colonna, 杉田昌彦, 松崎吾朗, 山崎晶, 吉田裕樹, 原博満
2. 発表標題 TREM2は非糖鎖付加ミコール酸を認識し、マクロファージの抗酸菌免疫応答を抑制する
3. 学会等名 第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会
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
---------	---------