

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16285

研究課題名（和文）抗酸菌感染初期におけるCARD9依存的な宿主防御応答の解析

研究課題名（英文）Analysis of CARD9 function in pulmonary mycobacterial infection

研究代表者

豊永 憲司（Toyonaga, Kenji）

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：90791567

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）：マクロファージや樹状細胞に発現しているC型レクチン受容体などのシグナル伝達に必須の役割を担うCARD9は、結核菌感染初期の宿主防御に重要であると考えられている。ところが、結核ワクチン株であるMycobacterium bovis BCG (M. bovis BCG) を用いたマウス経気道感染モデルでは、野生型とCARD9欠損マウスで感染7日後、21日後の肺内菌数に顕著な差は認められなかった。このことから、CARD9はM. bovis BCG感染初期の菌排除には積極的に寄与しない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

マウス感染モデルを用いた解析や、様々な疫学的知見から、CARD9を介した自然免疫活性化は、病原体感染に対する重要な宿主防御機構の一つと考えられ、CARD9経路を増強させることによって、病原体の排除を促す試みもいくつか行われている。このことから、本研究において見出した知見は、CARD9を介した免疫活性化機構の解明だけでなく、関連する感染性疾患の新規治療法開発にも繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：CARD9 is known to play an essential role in innate immune signaling via C-type lectin receptors. CARD9-deficient mice were shown to be highly susceptible to Mycobacterium tuberculosis. In CARD9-deficient mice, the antigen-specific T cell response after infection is comparable to that of wild-type (WT) mice, and it is thus considered that CARD9 deficiency affects innate immunity rather than acquired T cell responses during infection. However, the contribution of CARD9 to early mycobacterial infection is poorly understood.

To clarify the role of CARD9 in the early stages of mycobacterial infection, CARD9-deficient mice were infected intratracheally with M. bovis BCG. We found that bacterial loads in the lungs were comparable between WT and CARD9-deficient mice 7 and 21 days after infection. These results suggest that CARD9 might not contribute to the elimination of bacteria in the early stages of pulmonary M. bovis BCG infection.

研究分野：免疫学

キーワード：宿主防御 抗酸菌感染 Th1応答

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに、Mincle や MCL、DCAR といった ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif) 共役型の C 型レクチン受容体 (CLR) が、結核菌細胞壁に含まれる糖脂質を認識し、炎症性サイトカイン・ケモカインの産生や補助刺激分子の発現上昇を誘導することで、結核菌に対する免疫応答を活性化させることを明らかにしてきた。骨髄系細胞に発現しているこれらの受容体の下流には、シグナル伝達に必須の役割を担うアダプター分子 CARD9 が存在し (Hara *et al. Nat Immunol.* 2007)、CARD9 欠損マウスは、結核菌感染において、生存率の低下や菌の排除が遅れることが報告されている (Dorhoi *et al. J Exp Med.* 2010)。ところが、CARD9 欠損マウスにおいても、感染後の抗原特異的 T 細胞応答は野生型マウスと同等に認められることから、CARD9 は特に感染初期の宿主防御に重要であると考えられるが、寄与する免疫応答の詳細は未だ不明である。

そこで、*Mycobacterium bovis* BCG (*M. bovis* BCG) 株を用いたマウス腹腔内感染実験を行ない、*M. bovis* BCG マウス腹腔内感染においては、感染局所への Ly6C 陽性炎症性単球や NK 細胞の浸潤に CARD9 が重要な役割を担っていることを見出した。感染初期の NK 細胞の機能については未だよく分かっていないが、CARD9 欠損マウスでは、感染 7 日後における腹腔内 IFN $\gamma$  が低く、既に *M. bovis* BCG 排除が遅れる傾向にあったことから、浸潤した NK 細胞による IFN $\gamma$  産生が抗酸菌感染に対する初期防御機構の一端を担っている可能性を考え、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

CARD9 欠損マウスでも、結核菌感染後の抗原特異的 T 細胞応答は野生型マウスと同等に認められることから、CARD9 は特に感染初期の宿主防御に重要であると考えられていたが、寄与する免疫応答の詳細はよく分かっていなかった。そのため、本研究では、抗酸菌感染初期において、CARD9 が担う宿主防御応答を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

*M. bovis* BCG を用いたマウス腹腔内感染モデルにおいて認められた CARD9 依存的な防御応答が、抗酸菌の主な感染経路である経気道感染においても重要な役割を明らかにするため、CARD9 欠損マウスを用いて、経気道での *M. bovis* BCG 感染実験を行う。具体的には、野生型および CARD9 欠損マウスに *M. bovis* BCG を経気道的に感染させ、感染後の臓器 (肺、脾臓) 内の菌数、サイトカイン発現量 (ELISA 法やマルチプレックス解析、および mRNA の qPCR 解析)、組織病理の解析を行う。

これらの実験を行うことにより、結核菌感染早期の宿主防御において、CARD9 がどのような免疫応答に寄与しているかを明らかにする。

## 4. 研究成果

マウスに *M. bovis* BCG を経気道的に感染させ、感染後 7、21 日後の肺内菌数を解析したが、両日間において、野生型と CARD9 欠損マウスの菌排除に顕著な差は認められなかった。マウス腹腔感染モデルでは、感染後の細胞浸潤にも顕著な差が認められていたため、フローサイトメーターを用いて経気道感染マウス肺でも浸潤細胞の解析を行ったが、野生型と CARD9 欠損マウスで顕著な差は認められなかった。一方で、感染 21 日後の臓器内 IFN $\gamma$  量は CARD9 欠損マウスにおいて低い傾向にあったため、このことが、その後の防御応答へ与える影響を明らかにするため、より長期間の感染実験を行った。感染 3 週間と 9 週間後の肺内菌数を検討したところ、感染 3 週間後では、これまで同様に臓器内菌数に差は認められなかったが、9 週間後では CARD9 欠損マウスにおいて臓器内菌数が多い傾向にあることを見出した。以上の結果から、*M. bovis* BCG を用

いた経気道感染マウスモデルにおいては、CARD9 は感染初期の菌排除には積極的に寄与せず、より後期の段階での宿主防御機構に寄与する可能性が示唆された。このように、当初の予想とは異なる結果が得られたものの、より後期の防御応答、特に慢性感染状態における CARD9 の重要性を示唆する知見が得られた。現在、CARD9 欠損が *M. bovis* BCG 感染後期に与える影響を解析するとともに、結核菌感染における役割を検討している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagao Jun-ichi, Kishikawa Sari, Tanaka Honami, Toyonaga Kenji, Narita Yuka, Negoro-Yasumatsu Kanae, Tasaki Sonoko, Arita-Morioka Ken-ichi, Nakayama Jiro, Tanaka Yoshihiko	4. 巻 40
2. 論文標題 Pathobiont-responsive Th17 cells in gut-mouth axis provoke inflammatory oral disease and are modulated by intestinal microbiome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111314 ~ 111314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111314	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 -

1. 著者名 Iizasa Ei'ichi, Chuma Yasushi, Uematsu Takayuki, Kubota Mio, Kawaguchi Hiroaki, Umemura Masayuki, Toyonaga Kenji, Kiyohara Hideyasu, Yano Ikuya, Colonna Marco, Sugita Masahiko, Matsuzaki Goro, Yamasaki Sho, Yoshida Hiroki, Hara Hiromitsu	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 -
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 該当する

1. 著者名 豊永憲司、山崎晶	4. 巻 76 (1)
2. 論文標題 C型レクチン受容体はHelicobacter pyloriの代謝産物を認識して胃炎の増悪に寄与する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 84-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Toyonaga K, Yamasaki S.	4. 巻 429
2. 論文標題 Recognition of Mycobacteria by Dendritic Cell Immunoactivating Receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current topics in microbiology and immunology	6. 最初と最後の頁 103 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/82_2020_203	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 Nagata M, Toyonaga K, Ishikawa E, Haji S, Okahashi N, Takahashi M, Izumi Y, Imamura A, Takato K, Ishida H, Nagai S, Illarionov P, Stocker B, Timmer MS, Smith DGM, Williams SJ, Bamba T, Miyamoto T, Arita M, Appelmeik BJ, Yamasaki S.	4. 巻 218
2. 論文標題 Helicobacter pylori metabolites exacerbate gastritis through C-type lectin receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20200815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20200815	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12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kenji Toyonaga, Emi Kaji, Jun-ichi Nagao, Sonoko Tasaki, Sari Kishikawa, Kanae Negoro-Yasumatsu, Yoshihiko Tanaka
2. 発表標題 Analysis of immune responses in a murine oral candidiasis model
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toyonaga K, Nagao J, Mizukami K, Tasaki S, Kishikawa S, Kaji E, Negoro K, Tanaka Y
2. 発表標題 Analysis of immune responses to Candida albicans in a murine oral infection model
3. 学会等名 The 64th Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenji Toyonaga, Masayuki Umemura, Goro Matsuzaki, Hiromitsu Hara, Yoshihiko Tanaka, and Sho Yamasaki
2. 発表標題 Analysis of Card9 function in pulmonary mycobacterial infection
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊永憲司、永尾潤一、岸川咲史、田中芳彦
2. 発表標題 口腔内細菌脂質成分の自然免疫活性化能の解析
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊永憲司
2. 発表標題 抗酸菌の糖脂質はどのようにして宿主免疫を活性化するのか
3. 学会等名 第96回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ヘリコバクター属菌に起因する疾患または状態を処置する方法、およびその利用	発明者 山崎 晶、豊永 憲 司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-157742	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------