

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06969

研究課題名(和文) 病原体の免疫抑制機構を利用した致死性サイトカインストームを抑制する糖鎖の開発

研究課題名(英文) Development of anti-cytokine storm polysaccharides based on immunosuppressive activities of pathogens

研究代表者

高原 和彦 (Takahara, Kazuhiko)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：90301233

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)：敗血症や感染症で起きる過剰な炎症は死に繋がるが、その有効な治療法は存在しない。本研究では、病原体が持つ免疫抑制作用の炎症制御への応用を目標としている。先に、日和見感染菌 *Candida albicans* の細胞壁糖鎖がマウス敗血症モデルで、免疫抑制性サイトカインIL-10を誘導し生存率を改善する事を見出した。しかし、当該糖鎖の構造は複雑で、合成が困難であった。そこで、糖鎖中の活性構造を同定し合成可能な範囲まで絞り込んだ。これにより、当該糖鎖の医薬品としての応用に大きく近づいた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界では年間に数千万人が急性の炎症性疾患に罹患する。死亡率は高く、例えば敗血症では4割を超える。COVID-19における主たる死亡原因も肺および全身性炎症によるサイトカインストームの結果である。しかし、有効な薬剤は存在しない。

一方で、病原体と宿主は互いに牽制しつつ進化してきた。この長い歴史の中で、病原体は宿主免疫の回避・抑制を図り感染を続けてきた。その結果として病原体には宿主の中で有効な免疫回避・抑制機構が選択されて残っていると思われる。よって、病原体の免疫抑制機構を同定すれば、宿主の人為的な免疫制御に応用できる可能性が高いと考え本計画を立案した。

研究成果の概要(英文)：Excessive inflammation observed in sepsis and infection can lead to lethal reactions. However, there is no effective treatment at present. The goal of this research is to apply the immunosuppressive activities of pathogens to the control of the excessive inflammation. Previously, we found that cell wall polysaccharides of the opportunistic *Candida albicans* induce the immunosuppressive cytokine IL-10 and improve survival rates in a mouse sepsis model. However, the structure of the polysaccharides is complex, making it difficult to synthesize. Therefore, we identified the active site/structure inducing IL-10 in vivo in the polysaccharides, enabling us to synthesize artificial polysaccharides suppressing excessive inflammation.

研究分野：免疫生物学

キーワード：微生物糖鎖 *C. albicans* 敗血症 免疫抑制 レクチン IL-10 合成糖鎖

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界では年間に数千万人が急性の炎症性疾患・感染症に罹患する。死亡率は高く、例えば敗血症では4割を超える。COVID-19における主たる死亡原因も肺および全身性炎症によるサイトカインストームによるものである。しかしながら、これらを抑える有効な薬剤は現状では存在せず、個体レベルで炎症/サイトカインストームを抑える手法の開発は喫緊の課題である。

一方で病原体と宿主は互いに牽制しつつ進化してきた。この長い歴史の中で、宿主は免疫という盾を得て、病原体はその破壊若しくは回避・抑制を図り宿主への感染を続けてきた(図1)。このせめぎ合いの中で、程度は異なるものの病原体には宿主の中で有効な病原体の免疫回避・抑制機構が選択されて残っていると思われる。よって、病原体の免疫抑制機構を同定すれば、人為的な宿主の免疫制御に応用できる可能性が高い。

先に、日和見感染菌 *Candida albicans* J-1012 株感染患者の血清中に T 細胞の活性化を抑える作用物質の存在が示唆されていた [Fisher A. et al. (1978) J. Clin. Invest. 62, 1005]。そこで、*C. albicans* の菌体から表面 N 型糖鎖(図2)を精製し、その炎症抑制能をリポ多糖(LPS) マウス敗血症モデルにて検討したところ、炎症を抑制する血中サイトカイン IL-10 の量が増加し、炎症を昂進する TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β は低下した。更に、マウス生存率も有意に改善した。この過程で構造が異なる幾つかの *Candida* 株由来の糖鎖の間で IL-10 や TNF- α の産生パターンが異なる事を見出した(基盤 C25460494)。これらは、一定の糖鎖構造が特定のサイトカイン産生に働いている事を示唆している。そこで、各サイトカインの産生に対応する糖鎖構造を同定すれば、複雑な糖鎖全体で誘導される様々な細胞応答から望みの応答だけを引き出し、免疫制御の新たな手段となると考えた。

しかし、天然の糖鎖構造は複雑(図2)かつ合成も困難である。そこで先ず糖鎖構造と IL-10 産生活性の関係を追究し、さらにレセプター(Dectin-2)を同定することで、活性に必要な糖鎖を合成可能な個数まで絞り込んだ。

2. 研究の目的

炎症を抑制する最も強力なサイトカインである IL-10 は、生体の免疫応答を制御する重要な因子である。例えば、IL-10 の欠損・低下は腸炎や脊髄炎など多様な炎症性疾患を誘導する。よって、個体において IL-10 産生を制御することは免疫学/医学の大きな目標であるが、その現実的な方法はまだない。また、外部からの IL-10 の投与では今のところ有効な結果が見られていない。この原因は、IL-10 の生体内での産生場所や周囲の免疫細胞とのインターアクションを可能にする微小環境が重要であると思われる。よって、生体内では本来 IL-10 産生を担う細胞の働きを制御する事が重要と考えられる。

我々の見出した *C. albicans* 由来糖鎖はカンジダ症への関与が確認されている物質で、免疫の制御の新たな手段となる可能性が高い。しかしながら、例えば菌体の糖鎖合成には揺らぎがあり、糖鎖全体を均一な標品として得ることが難しく、医薬品としての実用化は難しい。その構造も非常に複雑であり(図2)、全合成は技術・コスト的に不可能に近い。そこで申請者は、巨大な糖鎖から活性を担う最小構造を同定し、合成糖鎖として再構築する事を考えた。

この目的の為に、構造の異なる数種の *Candida* 属の糖鎖間で *in vivo* の IL-10 産生を比較すると共に、いくつかの遺伝子欠損マウスも用いて検討した。その結果、糖鎖の敗血症改善効果はその直鎖 α -マンナンとコアマンナンが樹状細胞(DCs)上の Dectin-2 を介して IL-10 産生に働くことで発揮されると考えられた。本計画では、これらの知見を基にマウス敗血症モデルにおいて *in vivo* で免疫抑制作用も発揮する合成糖鎖の作製を目指した。

一方で、ヒトを含めた現在の敗血症モデルでは、初期の IL-10 産生が後の免疫低下を誘導すると考えられている。しかし、先の研究では当該糖鎖は敗血症の急性炎症期では IL-10 を誘導する一方で後期の免疫低下状態を改善した。例えば、予備実験では敗血症の1週間後に観察されるヒツジ赤血球(SRBC)に対する細胞性免疫(遅延型過敏皮膚炎/DTH)が糖鎖の投与によりほぼ完全なレベルまで回復した。そこで、本計画ではその機構をさらに明らかにし、免疫抑制能をもつ糖鎖の医薬品としての応用への基盤を固める。

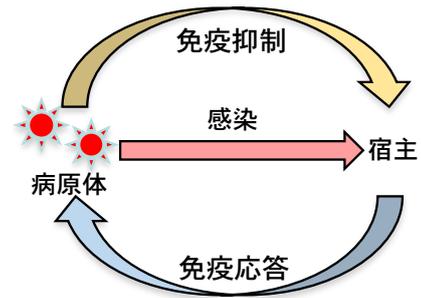


図1 病原微生物と宿主の関係
宿主は免疫で微生物を排除し、微生物はその免疫を抑制する。

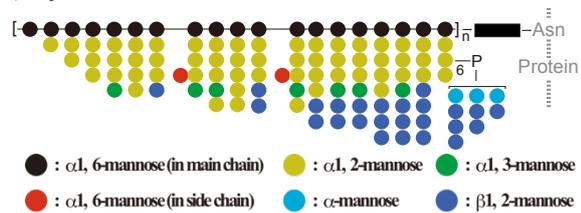


図2 *C. albicans* 糖鎖の例

J-1012 株細胞壁 N 型糖鎖の構造。■ : コアマンナン部分

3. 研究の方法

(1) 合成糖鎖の作製:

C. albicans の菌体表面 N 型糖鎖中でコアマンナン部分に着目し、コアマンナン (Man₉Core) 単量体若しくはコアマンナン結合システインを 5 量体化した糖鎖をさらに牛血清アルブミン (BSA)、biotin または dextran に結合した糖鎖を合成した (図 3)。コントロールとして Man₃Core を BSA に結合させた糖鎖を用いた。この他、マンノース単体を結合させた BSA (Man₅₁-BSA) は、Shau-Ku Huang 博士 (Taipei Medical University) より分与を受けた。

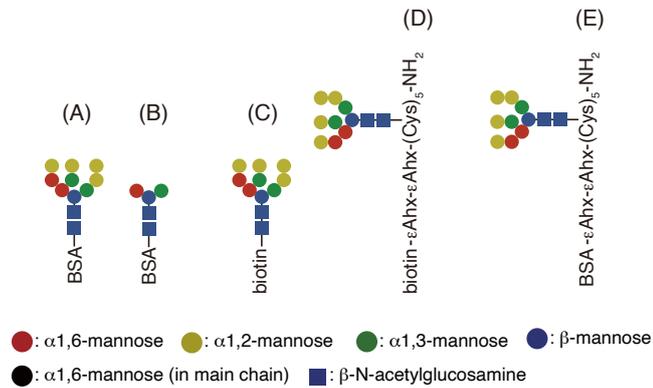


図 3 合成糖鎖

(2) 敗血症の誘導と IL-10 産生誘導の測定

Ultra-pure LPS (15 μg/20 g mouse body weight) を尾部より *i.v.* 投与し敗血症を誘導した。合成糖鎖は LPS と混合し投与した。投与後、1、2、6 および 24 時間に採血し血清中の IL-10 量を測定した。

(3) 常在性腹腔マクロファージ (rpMφ) の調製

WT および Dectin-2KO マウスの腹腔内細胞よりビオチン化抗体を使用して CD3ε、B220、CD19、Gr-1、CD49b 発現細胞を磁気ビーズを用いてネガティブに調製した。得られた細胞の 95% 以上が CD11b 陽性であった。

(4) 骨髄由来樹状細胞 (BMDC) 調製

WT および Dectin-2KO マウスの骨髄細胞より GM-CSF (250 U/ml) を添加した 10% FCS を含む RPMI1640 培地中で 10 日間培養して樹状細胞を誘導した。

(5) *in vitro* での IL-10 産生誘導の測定

BSA 結合糖鎖 (0.5 mg/ml) はプラスチックプレート上で一晩インキュベートし吸着させた。Biotin-結合糖鎖 (10 μg/ml) はアビジンプレート上で一晩インキュベートし固相化して使用した。ウエル洗浄後に BMDC (1 x 10⁷ 個/well) を加え、Ultra-pure LPS (0.1 μg/ml) で 24 時間刺激し、上清中の IL-10 を測定した。

(6) DTH の誘導と脾細胞の抗原刺激

マウス左後肢足蹄にヒツジ赤血球 (2 x 10⁶ 個) を投与し、同時に *C. albicans* J-1012 株の N-glycan (400 μg/20 g) および ultra-pure LPS を *i.v.* 投与し敗血症を誘導した。7 日後に右後肢足蹄に再度ヒツジ赤血球を投与し、24 時間後に足蹄の腫れを計測した。抗原特異的 IFN-γ 産生は、卵白アルブミン/OVA (400 μg/20 g)、ultra-pure LPS および J-1012 糖鎖 (400 μg/20 g) を *i.v.* 投与し、1~4 週間後に脾臓細胞を 10% FCS を含む IMDM 培地中で OVA (100 μg/ml) で再刺激し、4 日間後に上清の IL-10 他サイトカイン量を測定した。

また、IL-10 の影響を検討する為には、敗血症誘導時に抗 IL-10 抗体 (JES-16E3、50 μg/20 g) 若しくはコントロール抗体を *i.v.* 投与した。

(7) DO11.10 T 細胞の調製と移入

DO11.10 TCR トランスジェニックマウスのリンパ節細胞からビオチン化抗体を使用して B220、CD8、CD11c、CD16/32、CD19、Gr-1、CD49b、I-A^d、Mac1、γδTCR 発現細胞を除去し CD4⁺ T 細胞を磁気ビーズを用いてネガティブに調製した。得られた細胞の 90% 以上は KJ1-26 陽性であった。次にこの細胞 (2.5 x 10⁶ 個) を BALB/c マウスに *i.v.* 投与し、24 時間後に上記の条件で OVA 存在下敗血症を誘導した。2 週間後、リンパ節内の 7-AAD⁻CD4⁺KJ1-26⁺ 細胞の PD-1 および CD62L の発現をフローサイトメーターで検討した。

4. 研究成果

(1) 合成糖鎖の *in vitro* における IL-10 産生誘導

まず、BSA を担体として 9 個のマンノースをコアマンナン (Man₉Core) (図 3A) に結合させ、プラスチックプレートに固相化した。これに腹腔細胞より精製した rpMφ を加え LPS で刺激を加えたところ、IL-10 の有意な産生が確認された (図 4)。一方で、マンノース 3 糖からなる糖鎖 (図 3B) では認められなかった。しかしながら、Dectin-2 欠失マウスより調製した rpMφ では依然として IL-10 産生が認められ、先の *in vivo* の結果と異なった。そこで、マウス骨髄より GM-CSF で誘導した樹状細胞を用いて同様の実験を行ったところ、Dectin-2 を欠失すると IL-10 産生が認められなかった (図 5)。一方で、マンノース単体を結合させた Man₅₁-BSA では IL-10 産生

は起きなかった。以上とおよび先の *in vivo* の結果と合わせると、マウス個体内ではコアマンナンが樹状細胞に作用し IL-10 産生に関わっている事が示唆された。

次に、担体として用いた BSA の影響を排除するために、コアマンナンをビオチン化した糖鎖 (図 3C) をアビジンプレートに固相化し BMDC からの IL-10 産生を検討したが認められなかった。そこで、糖鎖を高密度化する為に、Man₉Core をシステイン 5 残基のペプチド上で 5 量体化し、更にビオチン化 (図 3D) した。その結果、アビジンプレート上で有意な IL-10 産生を誘導した (図 6)。この応答は Dectin-2 依存的であった。以上の結果より、*C. albicans* N 型糖鎖のコアマンナンが *in vitro* で IL-10 誘導能を持つことが確認された。

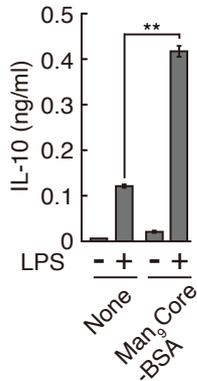


図 4 コアマンナン-BSA の rpMφ からの IL-10 産生誘導

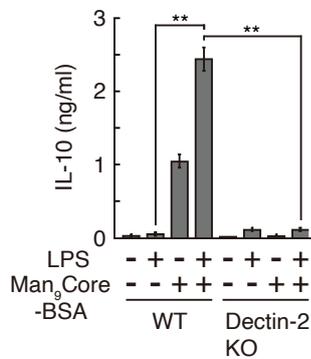


図 5 コアマンナン-BSA の BMDC からの IL-10 産生誘導

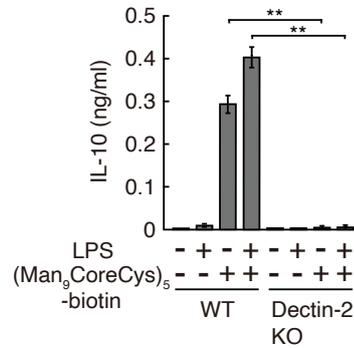


図 6 コアマンナン-BSA の BMDC からの IL-10 産生誘導

(2) 敗血症後期における免疫低下に対する改善作用の検証

マウスに N 型糖鎖と LPS 投与後、SRBC (ヒツジ赤血球) を足蹄に投与し、更に 1 週間後に別の足蹄に SRBC をチャレンジし肥厚の変化を DTH として測定した。その結果、糖鎖により応答性が維持される事、則ち細胞性免疫が維持されている事を確かめた。

次に、細胞性免疫に働く抗原特異的 IFN- γ 産生を卵白アルブミン、LPS および糖鎖を静脈投与し、炎症の治まった 2 週間後に脾臓細胞を同抗原で刺激する事で検討した。その結果、糖鎖による IFN- γ の産生昂進、即ち免疫不応答の改善が見られた (図 7)。IL-10 産生は糖鎖の有無で変化は無かった。また、この IFN- γ 産生の回復は、炎症惹起時の抗 IL-10 中和抗体の存在で打ち消された (図 8)。よって、IFN- γ の産生能維持には敗血症惹起時に糖により誘導された IL-10 が働い

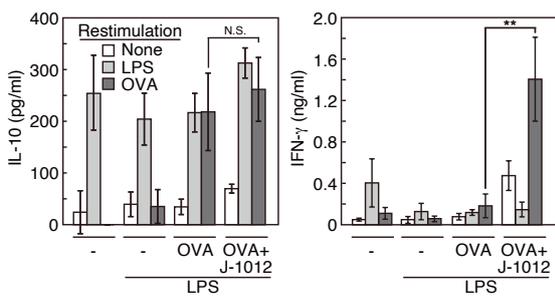


図 7 炎症後の IFN- γ 産生における糖鎖の影響

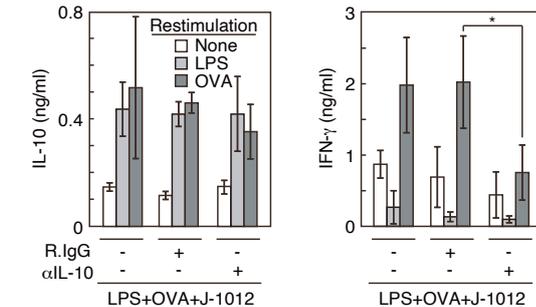


図 8 IFN- γ 産生回復における抗 IL-10 抗体の影響

ている事が示唆された。一方で、IL-10 産生には影響が認められなかった。

次に、上記 IFN- γ 産生を担うと考えられる抗原特異的 T 細胞の状態を検討した。その為に DO11.10 T 細胞を移入したマウスに、糖鎖および抗原として OVA の共存下で敗血症を惹起し 2 週間後に DO11.10 T 細胞の CD62L と PD-1 の発現を解析した。その結果、糖鎖の存在下では DO11.10 T 細胞のリンパ節への

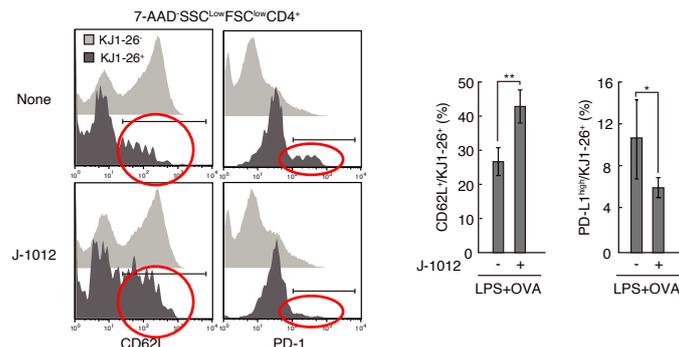


図 9 糖鎖の T 細胞疲弊への影響

ホーミング能を示す CD62L の発現が高く、一方で T 細胞の疲弊を示す PD-1 の発現は低かった (図 9)。よって、糖鎖の存在により T 細胞が敗血症/過剰炎症による強い刺激から守られることが示唆された。

以上の結果より、*C. albicans* 糖鎖は敗血症の初期炎症/サイトカインストームを抑えマウスの生存率を改善し、さらに炎症が消失した後の免疫不応答も回復することがその機構と共に確認された (図 10)。

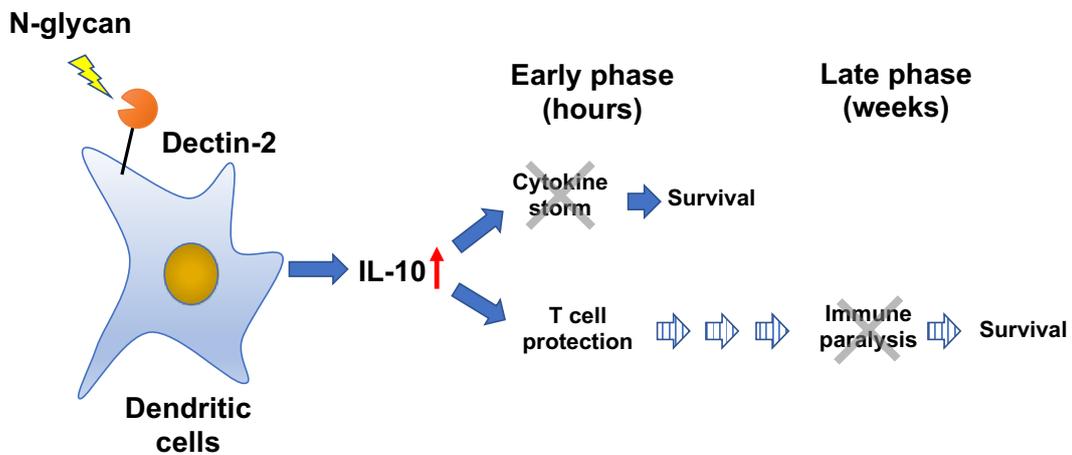


図 10 IL-10 産生誘導を介した *C. albicans* 糖鎖による初期および後期敗血症の改善

(今後の予定)

上記 (1) と (2) の結果より、*C. albicans* 細胞壁 N 型糖鎖の作用機構が明らかになり、合成糖鎖による活性も確認できたことから、免疫抑制能をもつ糖鎖の開発に大きく前進した。

まずは、*in vivo* で IL-10 産生誘導能を持つ糖鎖を目指して 5 量体化コアマンナンを更に BSA 上に固定化した糖鎖 (図 3E) の作製しマウスで IL-10 産生を確認することを計画している。

以上

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 Kawakita, M., Oyama, T., Shirai, I., Tanaka, S., Akaki, K., Abe, S., Asahi, T., Cui, G., Itoh, F., Sasaki, M., Shibata, N., Ikuta, K., Hatakeyama, T. and Takahara, K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Cell wall N-glycan of <i>Candida albicans</i> ameliorates early hyper- and late hypo-immunoreactivity in sepsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	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/s42003-021-01870-3	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shuto Tanaka, Masataka Kawakita, Kazuhiko Takahara
2. 発表標題 A lethal cross-talk between innate immune and adrenergic receptor signaling
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中高士、赤木宏太郎、阿部真也、旭拓真、Guangwei Cui、生田宏一、高原和彦
2. 発表標題 <i>Candida albicans</i> の細胞壁N型糖鎖は敗血症の初期の過剰応答と後期の免疫抑制状態を改善する
3. 学会等名 第 50 回日本免疫学会学術集会、奈良、2021年12月8日-10日
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学 生命科学研究科 高次生命科学専攻 生体応答学分野
<https://zoo.zool.kyoto-u.ac.jp/imm/index.html>
京都大学生命科学研究科
<https://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/>
京都大学 生命科学研究科 生体応答学分野
<https://zoo.zool.kyoto-u.ac.jp/imm/index.html>

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