

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790471

研究課題名（和文）

生理的および病的条件下におけるC型レクチン Mincle 発現細胞の特定と機能解析

研究課題名（英文）

Visualization and functional analysis of Mincle expression cells

研究代表者

三宅 靖延（MIYAKE YASUNOBU）

九州大学・生体防御医学研究所・分子免疫学分野・助教

研究者番号：10392143

研究成果の概要（和文）：

結核菌認識受容体 Mincle の遺伝子座に GFP を組み込むことにより、Mincle 発現細胞を GFP でモニターできるレポーターマウスを作製した。生理的条件下においては、末梢血、骨髄、脾臓、リンパ節、肺等の組織には GFP 陽性細胞は観察されなかった。ところが当該マウスに結核菌糖脂質の TDM を投与して肺肉芽腫を誘導したところ、肺肉芽腫中に著量の GFP 陽性細胞の集積が観察された。これらの GFP 陽性細胞は CD11b 陽性 Gr1 陽性の好中球であった。これらの結果より、TDM による肺肉芽腫形成において Mincle 発現細胞が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

I have generated GFP knock-in mice for visualization of Mincle-expressing cells in vivo. In steady-state condition, GFP positive cells were not detected in peripheral blood, bone marrow, spleen, lymph node and lung. On the other hand, abundant number of GFP positive cells were accumulated in the lung granulomas induced by mycobacterial glycolipid, TDM administration. Most of these GFP positive cells were neutrophils (CD11b positive and Gr1 positive). These results indicated that Mincle positive cells could play an important role in granuloma formation induced by TDM.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：

医歯薬学

科研費の分科・細目：

基礎医学・免疫学

キーワード：

(1) 自然免疫

(2) C型レクチン

(3) Mincle

(4) 肉芽腫

1. 研究開始当初の背景

C型レクチン Mincle による外来微生物の認識

C型レクチンは多細胞生物に広く保存されているレセプターファミリーであるが、そのリガンドや生理機能については未解明な点が多かった。ところが近年、酵母や真菌、ウイルスなど様々な外来微生物の PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) を C型レクチンが認識して免疫系を活性化することが次々と報告された (Geijtenbeek, *Nat Rev Immunol.* 2009)。申請者の研究室においても、C型レクチン Mincle が病原性真菌 *Malassezia* および結核菌の受容体であることを明らかにした (Yamasaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Ishikawa, *J. Exp. Med.* 2009)。

病原性真菌 *Malassezia* は健常人においては常在菌であるにも関わらず、ある条件化では癬癩、脂漏性皮膚炎、毛包炎、アトピー性皮膚炎などを引き起こす (Ashbee, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006)。このことから健常人では *Malassezia* 菌は免疫系により排除されるが、その防御機構に異常が生じると皮膚炎が発症するものと推測されるが、その詳細は不明である。*Malassezia* 認識受容体として Mincle が同定されたことにより、*Malassezia* 認識細胞 (Mincle 発現細胞) の特定が可能となり、それにより *Malassezia* 菌に対する防御機構およびその破綻による皮膚炎の発症機序の解明が期待される。

C型レクチン Mincle によるネクローシス細胞の認識

生体においては組織の新陳代謝などにより常に死細胞が発生しているが、これらはマクロファージなどの食細胞により速やかに貪食処理される (Tanaka and Miyake, *Curr. Med. Chem.* 2007)。ところが組織損傷などにより大量の死細胞が発生した場合は、既存のシステムでは処理しきれず、放置された死細胞がネクローシスを起こして局所的な炎症反応「sterile inflammation」が引き起こされるが、その分子機構は長年不明であった。近年、Mincle がネクローシス細胞から放出される SAP130 を認識して炎症性サイトカインの産生を誘導することが明らかとなり、「sterile inflammation」の分子機構の一端が解明された (Yamasaki, *Nat. Immunol.* 2008)。その後、同じく C型レクチンの Clec9A もネクローシス細胞を特異的に認識することが報告され (Sancho, *Nature* 2009)、C型レクチンによる DAMPs (damage-associated molecular patterns)

の認識という概念が確立されつつある。

C型レクチン Mincle 発現細胞の特定

このように C型レクチンは、非自己 (外来微生物) と自己 (ネクローシス細胞) 両方の危機を感知するレセプターとして一躍脚光を浴びるようになった。その中でも Mincle は一分子で「非自己」と「自己」を認識できるユニークな dual レセプターであり、生体防御に重要な役割を果たしていると考えられる。これまでに Mincle は、活性化した腹腔内マクロファージや骨髄由来マクロファージに発現していることが確認されているが、その他の細胞における発現は不明である。リガンドの局在 (ネクローシス細胞は全身で発生しうる、*Malassezia* 菌は皮膚感染する、結核菌は肺に感染する) を考えると Mincle 発現細胞は様々な組織に広く存在する可能性が推測され、それらを特定することは免疫系による生体防御機構の理解に大いに貢献すると考えられる。

C型レクチン Mincle 発現細胞の機能解析

申請者はこれまでジフテリア毒素とその受容体を用いた誘導型細胞欠損システム TRECK 法 (Saito, *Nat. Biotechnol.* 2001) を用いて、様々な組織マクロファージの欠損マウスを作製してその機能を明らかにしてきた (Miyake, *J. Clin. Invest.* 2007, Miyake, *J. Immunol.* 2007)。本研究ではその経験を生かして、TRECK 法による Mincle 発現細胞の欠損誘導システムを確立して、Mincle 発現細胞の生理的機能の解明を行う。

2. 研究の目的

近年、申請者の研究室では C型レクチンの一つである Mincle (Macrophage inducible C-type lectin receptor) がネクローシス細胞および病原性真菌 *Malassezia*、結核菌を認識して FcR γ 依存的に免疫応答を惹起することを明らかにした (図 1 ; Yamasaki, *Nat. Immunol.* 2008, Yamasaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Ishikawa, *J. Exp. Med.* in press)。「自己」と「非自己」双方の「危機」を感知する Mincle は生体防御において重要な役割を果たしていると考えられる。そこで本研究は、生理的および病理的条件下における Mincle 発現細胞を特定して、その機能と意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

Mincle 発現細胞を可視化して、さらに欠損誘導を可能にするために Mincle 遺伝子座に GFP-IRES/DTR (diphtheria toxin receptor) を組み込んだノックインマウス (Mincle-GID マウス) を作製する (図 2)。このマウスでは GFP を指標に Mincle 発現細胞を検出することができる。また Mincle 発現細胞に DTR が発現するため、ジフテリア毒素を投与することにより Mincle 発現細胞を欠損させることができる。このマウスを用いて生理的および病理的条件下における Mincle 発現細胞を特定し、当該細胞の有無状態を比較検討することによりその機能を明らかにする。

4. 研究成果

◆GFP-IRES/DTR ノックインマウスの作製

Mincle 遺伝子の開始コドンに合わせ、GFP-IRES/DTR を組み込んだノックインマウスのターゲティングコンストラクトを作製した。共同研究先の岩倉洋一郎教授 (東大医科研) の研究室にて ES 細胞にターゲティングコンストラクトを遺伝子導入して、得られた 489 クローンをサザンブロットにより解析して、正しい相同組換えクローンを選抜した。選抜した ES 細胞を用いて凝集法により個体作製を行いキメラマウスを取得した。得られたキメラマウスをサザンブロットにより、正しい相同組み換えを確認し、C57BL/6J マウスと交配した。得られた F1 を PCR によりジェノタイプングを行い germ line transmission を確認した。

◆生理的条件下における Mincle 発現細胞の検出および欠損誘導

GFP-IRES/DTR ノックインマウスから調整した、腹腔細胞、末梢血細胞、脾臓細胞、骨髄由来マクロファージを *in vitro* において LPS で刺激することにより Mincle の発現を誘導し、GFP 発現を検討した。その結果、Mincle 陽性細胞が GFP 陽性になることが確認された。またジフテリア毒素を加えることにより、GFP 陽性細胞が消失したことから、ジフテリア毒素受容体も発現していることが確認された。さらに LPS を尾静脈投与して *in vivo* において Mincle の発現を誘導したところ、マクロファージや好中球において GFP の発現が認められ、これらの細胞はジフテリア毒素の投与により消失した。以上の結果より、Mincle 発現細胞を GFP によりモニターし、さらにそれらをジフテリア毒素の投与により欠損させることのできるマウスが樹立できた。

◆結核菌構成成分による肉芽腫形成における Mincle 陽性細胞の検出

結核菌の細胞壁構成成分のひとつである

TDM (trehalose dimycolate) は古くよりコードファクターと呼ばれ、それ単独投与により、結核菌感染の特徴である肺肉芽腫形成を引き起こすことが知られている。我々はこれまでにこの肺肉芽腫を形成している細胞には Mincle 陽性細胞が含まれることを *in situ hybridization* により明らかにしている。そこで肺肉芽腫における Mincle 陽性細胞の役割を解明するために、作製した Mincle-GID マウスに TDM を尾静脈投与して、肺肉芽腫が十分に形成された 7 日後に肺を回収し、コラゲナーゼ処理により肺肉芽腫に含まれる細胞を回収して、FACS により解析を行った。その結果、肺肉芽腫に含まれる細胞の約 80% は CD11b 陽性 Gr1 陽性のミエロイド系の細胞であり、そのうち約 30% が GFP 陽性 (Mincle 陽性) であることが明らかとなった。またこのマウスを用いることにより、GFP を指標に、肺肉芽腫中の Mincle 陽性細胞を分取して機能解析を行うことが可能であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Miyake Y, Yamasaki S.

Sensing necrotic cells.

Adv Exp Med Biol. (2012) 738, 144-52, 査読無

2. Miyake Y, Ishikawa E, Ishikawa T, Yamasaki S.

Self and nonself recognition through C-type lectin receptor, Mincle.

Self Nonsel. (2010) 1, 310-313, 査読有

3. Asano K, Nabeyama A, Miyake Y, Qiu CH, Kurita A, Tomura M, Kanagawa O, Fujii S, Tanaka M.

CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens.

Immunity. (2011) 34, 85-95, 査読有

4. Ishikawa E, Miyake Y, Hara H, Saito T, Yamasaki S.

Germ-line elimination of electric charge on pre-T-cell receptor (TCR) impairs autonomous signaling for beta-selection and TCR repertoire formation.

Proc Natl Acad Sci U S A. (2010) 107, 19979-84, 査読有

5. Nabeyama A, Kurita A, Asano K, Miyake Y, Yasuda T, Miura I, Nishitai G, Arakawa S, Shimizu S, Wakana S, Yoshida H, Tanaka M. xCT deficiency accelerates chemically induced tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. (2010) 107, 6436-41, 査読有

[学会発表] (計4件)

1. 三宅靖延、角田茂、岩倉洋一郎、山崎晶、Mincle 発現細胞の可視化と時期特異的欠損誘導
第40回日本免疫学会学術集会、千葉、(2011)
2. 三宅靖延、新規結核菌認識受容体を介する獲得免疫活性化機構の解析
Kyoto T cell Conference、京都、(2011)
3. Miyake, Y., and Yamasaki, S., Mincle is a receptor for mycobacterial glycolipid, cord factor.
International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan (2011)
4. 三宅靖延、死細胞認識受容体 Mincle の発現制御の破綻に伴う致死性疾患
BMB2010、神戸、(2010)

[図書] (計1件)

1. Miyake, Y, Self/Nonself, Landes Bioscience, (2012) p342

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 靖延 (MIYAKE YASUNOBU)

九州大学・生体防御医学研究所・分子免疫学分野・助教

研究者番号：10392143

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号：