

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390256

研究課題名(和文)肺感染症における新規自然免疫受容体の役割の解明

研究課題名(英文)Role for novel innate immune receptors for pulmonary pathogens

研究代表者

原 博満(Hara, Hiromitsu)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：20392079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌細胞壁を構成するミコール酸を認識する新規自然免疫受容体としてIgMB1とIgMB2を同定した。IgMB1は非糖化ミコール酸であるGroMMや遊離MAを認識し、マクロファージからのMCP-1産生を誘導するが、TNF産生は誘導しないこと、一方、MincleはTDMやGMMなどの糖脂質を認識し、TNFとMCP-1の両方をマクロファージから産生させる事がわかった。また、IgMB1はMincleを介した応答を抑制することも明らかにした。

インフルエンザウイルスを認識する新規受容体としてIgRF1を同定し、IgRF1を介した自然免疫応答がインフルエンザ肺炎の増悪に貢献していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified two novel innate immune receptors, IgMB1 and IgMB2, that recognize Mycobacterium tuberculosis. We found that IgMB1 recognizes non-glycosylated mycolates (MA) such as GroMM and free MA and induces MCP-1, but not TNF, production by macrophages, whereas the CLR Mincle recognizes the glycosylated-mycolates, TDM and GMM, and induces both TNF and MCP-1 production. In addition, we found that IgMB1 inhibits the cytokine responses through Mincle in macrophages. We also identified a novel innate immune receptor, IgRF1, that recognizes influenza virus. We found that the innate cytokine response through IgRF1 contributes to influenza pneumonia.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 結核

1. 研究開始当初の背景

骨髄系細胞が発現する ITAM-coupled 受容体 (骨髄系 ITAMR) -CARD9 経路は、自然免疫の重要な活性化経路の一つである。しかし、同経路の肺感染症における役割に関する知見はまだ少なかった。我々は、独自に作成した ITAMR-Ig ライブラリーを用いたスクリーニング、および ITAM 骨髄系 ITAMR を発現させた NFAT-GFP レポーター細胞を用いた検討により、結核菌体およびインフルエンザウイルス (IFV) 粒子を認識し、感染病態形成に關与すると推測される新規な骨髄系 ITAMR を見いだした。

2. 研究の目的

(1) 結核認識受容体の機能解析

我々が新規に同定した IgRMB1、IgRMB2 によって認識される結核菌成分の同定を試み、新しい自然免疫の結核菌センサーである可能性を探究する。さらに、これら受容体を介した免疫応答の結核感染病態形成における生理的役割を明らかにする。

(2) IFV 認識受容体の機能解析

我々が新規に同定した IgRF1 によって認識される IFV の成分の同定を試みるとともに、自然免疫の IFV センサーである可能性ならびに IFV のエンター受容体である可能性を探究する。さらに、これら受容体を介した免疫応答の IFV 感染病態形成における生理的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 結核認識受容体の機能解析

IgRMB1 または IgRMB2 を発現させたレポーター細胞を使用して、結核菌細胞壁の TLC 分離画分および既知の細胞壁成分の精製品を用いてリガンドの同定を試みた。IgRMB1、IgRMB2 の欠損マウスおよびマクロファージ (M) を用いてリガンド刺激後の自然免疫応答を調べた。

(2) IFV 認識受容体の機能解析

IgRF1 発現レポーター細胞を用いて、IFV 表層成分に対する応答性を調べ、リガンド成分の同定を試みた。IgRF1 欠損マウスに IFV を感染させ、肺中のウイルス数、死亡率、サイトカイン産生、病理学的解析を行い、野生型と比較した。

4. 研究成果

(1) 結核認識受容体の機能解析

リガンドの同定

リガンドスクリーニングの結果、IgRMB1

は遊離ミコール酸 (fMA) やトレハロースジミコール酸 (TDM) を認識することを見いだした。様々な MA 糖脂質やミコール酸誘導体を用いて認識に必要なリガンド構造を探索した結果、IgRMB1 は MA の分岐アルキル鎖構造を認識していることが明らかになった。一方、IgRMB2 を刺激する活性成分は脂溶性が高く、これを精製し、質量解析を行ったところ、未報告のリン脂質である可能性が得られた。今後、さらに詳細に構造を決定していく予定である。

受容体機能の解析

結核菌が合成する代表的な MA 含有脂質である fMA、グリセロールモノミコール酸 (GroMM)、グルコースモノミコール酸 (GMM)、TDM について IgRMB1 と Mincle との反応性を比較した。その結果、IgRMB1 は非糖化 MA である fMA や GroMM には高い親和性で結合したが、糖脂質である GMM や TDM には非常に弱い結合しか示さなかった。逆に、Mincle は fMA や GroMM には殆ど結合を示さなかったが、糖脂質である GMM や TDM には強く反応した。Mincle および IgRMB1 を欠損するマウス由来の腹腔 M を用いてこれらの MA 含有脂質に対する応答性を調べた所、GMM、TDM に対する細胞応答は Mincle に依存し、GroMM や fMA に対する応答は IgRMB1 に依存することが明らかとなった。また、我々のこれまでの研究から以下の点が明らかになった。

1. Mincle 依存性の反応と IgRMB1 依存性の反応では M のサイトカイン応答が異なる。すなわち、Mincle リガンド刺激は TNF と MCP-1 の両方を誘導するが、IgRMB1 リガンド刺激は MCP-1 のみを誘導する。
2. IgRMB1 欠損 M では Mincle を介した細胞応答が増強される。
3. IgRMB1 欠損、Mincle 欠損 M で見られる不全が、それぞれ DAP12 欠損、FcR γ 欠損 M において全く同様に見られる。Mincle を介した TNF 産生は CARD9 に依存するが、MCP-1 産生は、IgRMB1 と Mincle のどちらを介した場合も CARD9 に依存しない。

過去の報告で、TDM、GMM などの糖脂質は活動性結核菌で多く合成されるが、休眠菌では著しく減少すること、一方で、GroMM や fMA は休眠結核菌で合成が更新することが示されている。また、fMA はバ

イオフィルムを形成して薬剤耐性にも貢献する。これらの事実や、今回の我々のデータおよび過去報告で示されている TNF および CARD9 の結核感染防御における重要性を考慮すると、IgRMB1 が病原性結核菌および休眠結核菌の免疫回避に関わっている可能性が考えられる。今後、この点について明らかにしていきたいと思う。

(2) IFV 認識受容体の機能解析 リガンド成分の同定

IFV 粒子の表層に存在する IgRF1 のリガンド成分の探索を行った結果、IgRF1 レポーター細胞は HA スプリットワクチンにも反応することから、HA を認識していると考えられた。この結合は HA をグリコシダーゼ処理することにより失われたことから、IgRF1 は HA の糖鎖構造を認識していると考えられた。

受容体機能の解析

IgRF1 欠損樹状細胞 (DC) は IFV 接触後の炎症性サイトカイン産生が WT に比べて減少する一方、Type-I インターフェロン産生に関しては低下が見られなかった。同様な不全が CARD9 欠損 DC でも見られた。IgRF1 欠損マウスを用いた IFV 感染実験を行った結果、CARD9 欠損マウスと同様に、IgRF1 欠損マウスは野生型マウスに比べ生存率が有意に上昇し、肺組織の病理所見の改善および炎症性サイトカイン産生の低下が見られた。従って、IgRF1 を介した IFV の直接認識によって DC から産生される炎症性サイトカインがインフルエンザ肺炎の増悪に関与していることが推察された。

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 0 件)

[学会発表](計 15 件)

原博満、飯笹英一、久保田未央、植松崇之、清原秀泰、山崎暁、松崎吾朗、吉田裕樹: 自然免疫による結核菌ミコール酸脂質の認識. 第 88 回日本細菌学会総会ワークショップ「PAMPs 受容体研究の最前線」(岐阜) 2015/3/26-28.

原博満: 骨髄系 ITAM 受容体を介した免疫応答の制御. 第 60 回日本臨床検査医学会九州地方会(第 26 回日本臨床化学会九州支部総会合同開催)(鹿児島) 2015/3/7.

原博満: ITAM シグナルを介した自然免疫応答. 沖縄感染症医療研究ネットワーク基盤構築事業「ワクチン及びアジュバントの研究ネットワーク活用型研究開発」平成 26 年度シンポジウム(那覇) 2014/12/19.

Iizasa E-iichi, UEMATSU Takayuki, KUBOTA Mio, KIYOHARA Hideyasu, CHUMA Yasushi, MATSUZAKI Goro, YAMASAKI Sho, YOSHIDA Hiroki, HARA Hiromitsu: Innate recognition of mycolic acid-containing lipids in mycobacteria. The 43rd annual meeting of the Japanese Society for Immunology (Kyoto) 2014/12/10-12.

UEMATSU Takayuki, IIZASA Ei-ichi, KOBAYASHI Noritada, Yoshida Hiroki, HARA Hiromitsu: Activation of innate immunity mediated by the IgSFR2/CARD9 pathway is involved in severe influenza pneumonia. The 43rd annual meeting of the Japanese Society for Immunology (Kyoto) 2014/12/10-12.

飯笹英一、植松崇之、久保田未央、清原秀泰、中馬康志、松崎吾朗、山崎暁、吉田裕樹、原博満: 結核菌細胞壁のミコール酸含有脂質を認識する新規自然免疫受容体. 第 67 回日本細菌学会西日本支部会(鹿児島) 2014/9/5-6.

植松崇之、飯笹英一、小林憲忠、吉田裕樹、原博満: インフルエンザウイルス感染における ITAM 関連受容体-CARD9 シグナルを介した新規自然免疫活性化経路の解析. 第 51 回日本ウイルス学会九州支部総会(鹿児島) 2014/9/5-6.

飯笹英一、植松崇之、杉田昌彦、山崎暁、吉田裕樹、原博満: IgSFR2 は結核菌細胞壁のミコール酸含有脂質を認識する自然免疫受容体である. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会(札幌) 2014/6/19-20.

E. Iizasa, T. Uematsu, G. Matsuzaki, S. Yamasaki, H. Yoshida and H. Hara: Identification of an ITAM-coupled pattern recognition receptor that recognizes the mycobacterium cell wall component mycolic acids. 第 42 回日本免疫学会学術集会(幕張) 2013/12/11-13.

M. Kubota, E. Iizasa, K. Hideyasu, N. Yasushi, H. Hara and H. Yoshida: Adjuvant activity of *Mycobacterium tuberculosis*-derived mycolic acid through activation of the ITAM receptor/CARD9-mediated innate immunity. 第 42 回日本免疫学会学術集会(幕張) 2013/12/11-13.

E. Iizasa, T. Myamoto, T. Uematsu, T. Ishikawa, S. Yamasaki, G. Matsuzaki, H.

Yoshida, H. Hara: Identification of novel innate pattern recognition receptors for mycobacterium tuberculosis. ICI2013 (Milano, Italy), 2013/8/22-27.
T. Uematsu, E. Iizasa, N. Kobayashi, H. Yoshida, H. Hara: Activation of innate immunity through the CARD9 pathway is involved in severe influenza pneumonia. ICI2013 (Milano, Italy), 2013/8/22-27.
Ei'ichi Iizasa, Tomofumi Miyamoto, Takayuki Uematsu, Tetsuaki Ishikawa, Sho Yamasaki, Goro Matsuzaki, Hiroki Yoshida, Hiromitsu Hara: Identification and analysis of two novel pattern recognition receptors for Mycobacterium tuberculosis. 第78回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会(東京)2013/5/21-2
IIZASA Ei'ichi, MIYAMOTO Tomofumi, ISHIKAWA Tetsuaki, ISHIKAWA Eri, YAMASAKI Sho, MATSUZAKI Goro, YOSHIDA Hiroki, HARA Hiromitsu: Identification and functional analysis of novel mycobacterium receptors. 第41回日本免疫学会学術集会(神戸)2012/12/5-7.
UEMATSU Takayuki, IIZASA Eiichi, KOBAYASHI Noritada, YOSHIDA Hiroki, HARA Hiromitsu: Activation of innate immunity through the CARD9 pathway is involved in severe influenza pneumonia. 第41回日本免疫学会学術集会(神戸)2012/12/5-7.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~mdio/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 博満 (HARA, Hiromitsu)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 20392079

(2)研究分担者

なし。

(3)連携研究者

松崎 吾朗 (MATSUZAKI Goro)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号: 30229455

山崎 晶 (YAMASAKI Sho)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号: 40312946