

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460494

研究課題名(和文) C型レクチンを介した微生物多糖による免疫応答制御

研究課題名(英文) Immune regulation through C-type lectin using microbial polysaccharides

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：1970年代からC. albicans感染患者の血清に免疫抑制的な成分が存在する事が知られていた。そこで申請者は、C. albicans表面マンノプロテイン由来N-glycanを用い、その免疫抑制作用を検討した。当該N-glycanをリポ多糖と共にマウスに投与したところ、血液内の免疫抑制性サイトカインIL-10の産生昂進を認めた。一方で、IFN-gおよびTNF-aの産生は抑制された。また、当該N-glycanは致死的な敗血症モデルにおいてマウスの死亡率を改善した。よって、当該N-glycanは生体のIL-10産生を昂進し、免疫応答を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In 1970s, it was reported that there was immunosuppressive factor(s) in serum of Candidiasis patients. In this study, the immunosuppressive effects of N-glycan purified from C. albicans surface mannoprotein. After injection of the N-glycan with lipopolysaccharide, up-regulation of immunosuppressive cytokine IL-10 in serum, but not IFN-g and TNF-a was observed. In a lethal model of sepsis, the N-glycan ameliorated survival rate of mice. These results suggest that N-glycan from C. albicans surface mannoprotein suppresses immune response through augmentation of immunosuppressive IL-10 production.

研究分野：免疫学

キーワード：C. albicans C型レクチン 糖鎖 IL-10 免疫制御

1. 研究開始当初の背景

免疫系細胞に発現する PRRs (pattern recognition receptors) は、感染過程の最初に病原体成分を認識するアンテナとしての役割を有している。PRRs としては Toll-like receptor (TLR) やレクチン等が挙げられる。この中でレクチンは、病原体上の糖鎖構造を認識するレセプターであり、抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) およびマクロファージ (Mφ) は多様なレクチンを発現している。DC/Mφ はこれらを介して病原因子の取り込み・排除およびその後の抗原提示を行う多機能分子である。

更に近年、これらレクチンが細胞内に明確なシグナルを伝えることが報告されてきた。例えば、酵母細胞壁成分β-glucan を認識する Dectin-1 は、その細胞質領域に hemITAM (hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation motif) を持ち、殺菌性の細胞内活性化素種や Syk/Card9/NF-κB によるサイトカイン産生に働くことが示された。また、細胞質領域に抑制性のシグナル配列 ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) を有する DCIR1 (Dendritic cells Immunoreceptor 1) は、フォスファターゼ SHP-1/2 を介して Fc レセプターおよび TLR からのシグナル応答を負に制御することが報告されており、実際 DCIR1 を欠失したマウスは、リュウマチを自然発症する。この他の例から、レクチンが病原体の破壊・抗原提示だけでなく、細胞内シグナル伝達を介してその後の免疫応答にも影響すると考えられている。

また、もう一つの注目すべき点は、レクチンを介した免疫制御の可能性である。例えば、DC は強力な抗原提示細胞であり、これに発現するレクチン、例えば DEC-205 へ抗原をターゲティングすることで、効率的な抗原特異的免疫応答を起こす事ができ、新たなワクチン開発にも繋がると考えられる。他方、ヒト DC や一部の Mφ に発現するレクチン DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) が、病原体認識時に TLR シグナル存在下で免疫抑制性の IL-10 産生を促す事から、病原体によるレクチンを介した免疫抑制も察せられる。

以上のように、レクチン分子は病原体を破戒し抗原提示に働くだけでなく、明らかにされつつある種々の細胞内シグナル系を介して、その後のサイトカイン産生および免疫応答を制御し、かつ人為的免疫制御の為の新たなターゲットになり得る。

これまで申請者は、マウス DC および Mφ に発現するレクチンに着目してきた。この中で DCIR1、FcRγ をアダプターとする DCAR、ランゲルハンス細胞に発現する Langerin およびヒト DC-SIGN マウスホモログ mDC-SIGN、SIGNR1~4 を同定し、それらの機能解析を進めてきた。この中で、SIGNR1 が脾臓辺縁帯および常在性腹腔 Mφ (rpMφ) の主要な糖レ

セプターであること、および病原性 *C. albicans* 等を認識することを示した。また、*S. typhimurium* 等のリポ多糖 (LPS) コア糖鎖非還元末端を介して認識し LPS レセプター TLR4/MD-2 と物理的会合を生じそのシグナルを昂進することを明らかにした。加えて、SIGNR1 が *C. albicans* 表面可溶性マンノプロテインの N-glycan 側鎖糖鎖α-mannose 構造を認識すること、菌体に対して Dectin-1/Syk と共同して殺菌性活性化素種の産生を昂進すること、並びに TLR2 と共同し TNF-α の産生昂進に働くことを確認した。他のグループより SIGNR1 が免疫抑制傾向の強い腸管においては IL-10 を介して免疫寛容に働く (Zhou et al: Nat Med 16, 1128-1133, 2010) こと、また SIGNR1 が LPS による endotoxin shock を増悪化すること (Saunders et al: J Immunol 184: 2627-37, 2010) も示されている。

2. 研究の目的

1970年代より *C. albicans* 感染患者の血清には菌体表面の可溶性マンノプロテインに由来する免疫抑制的な成分が存在する事 (Nelson et al: Clinical Microbiol Rev 4, 1-19, 1991 参照) また蛋白部分を残した *C. albicans* 糖鎖がマウスの *C. albicans* に対する DTH (遅延型過敏症) を抗原特異的に抑制する事が示唆されている。そこで申請者は、LPS とともに高度に精製した *C. albicans* マノプロテイン由来 N-glycan を腹腔投与し、endotoxin shock/敗血症におけるその作用、および生体より調製した rpMφ の同 N-glycan に対する IL-10 産生を予備的に検討した。その結果、N-glycan が endotoxin shock におけるマウスの生存率を改善すること、および rpMφ の IL-10 産生を昂進する可能性を見出した。また、前述の様に SIGNR1 は脾臓辺縁帯 Mφ および rpMφ に発現する主要な糖レセプターの一つで、かつ当該 N-glycan を認識すること (Takahara et al: Infect Immun 89, 1699-1706, 2012) を勘案すると、SIGNR1 が当該 N-glycan を認識し、局面に依っては免疫抑制的に働くと共に、微生物多糖を用いた免疫制御のターゲットとして有用である可能性がある。

3. 研究の方法

(1) *C. albicans* N-glycan の敗血症への影響の検討

Fehling 法により精製した *C. albicans* N-glycan (400 μg/20 g 体重) を大腸菌 LPS (30 μg/20 g 体重) と共にマウスに静脈投与し、経時的に血清内サイトカインを測定した。また、致死量の LPS (200 μg/20 g 体重) および当該 N-glycan を腹腔内投与しその後の生存率を検討した。IL-10 中和抗体 (clone JES5-16E3, 50 μg/20 g 体重) はリポ多糖と同時に投与した。

(2) Clodronate liposome による *in vivo* における Mφ の除去

マウス腹腔内および静脈にそれぞれ 60 μl

の Clodronate liposome を投与し、24 時間後に *C. albicans* N-glycan (400 $\mu\text{g}/20\text{g}$ 体重) および大腸菌 LPS (30 $\mu\text{g}/20\text{g}$ 体重) を静脈投与し、経時的に血清内サイトカインを測定した。Clodronate liposome 処理により脾臓および腹腔内の M ϕ が除かれていることを F4/80 をマーカーとしてフローサイトメーターで確認した。

(3) IL-10 産生における rpM ϕ および SIGNR1 の関与の検討

培養プレートに当該 N-glycan (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加え 12 時間静置し吸着させた。次に、常在性腹腔細胞より磁気ビーズを用いて rpM ϕ を精製し、大腸菌 LPS (100 ng/ml) 存在下で先のプレートで培養した。24 時間後に、上清中のサイトカインを測定した。SIGNR1 の関与を検討する際は、培養時に抗 SIGNR1 抗体 (clone 22D1) を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で加えるか、SIGNR1 ノックアウトマウスから精製した rpM ϕ を用いた。

(4) *C. albicans* N-glycan の DTH への影響の検討

マウス左後肢足蹄にヒツジ赤血球 (2×10^6 個) を投与し、同時に *C. albicans* N-glycan (400 $\mu\text{g}/\text{マウス}$) および大腸菌 LPS (30 $\mu\text{g}/\text{マウス}$) を静脈投与した。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。

4. 研究成果

C. albicans 菌体より Fehling 方にて精製した N-glycan (400 $\mu\text{g}/\text{マウス}$) を大腸菌 LPS (30 $\mu\text{g}/\text{マウス}$) と共にマウスに投与し、エンドトキシンショックにおける N-glycan の影響を検討した。その結果、血液中の免疫抑制性のサイトカイン IL-10 の産生昂進が確認された (図 1)。この際、他の炎症性サイトカイン IFN- γ 、TNF- α の産生は抑制された (図 1)。また、*C. albicans* 表面に存在する O-glycan の混入の可能性を排除するために、糖鎖精製過程で β -elimination 処理を行ったが、上記サイトカイン産生誘導には影響しなかった。また、TLR4 ノックアウトマウスを用いた場合は、IL-10 産生が認められなかった。よって、*C. albicans* 表面 N-glycan が LPS 刺激下での IL-10 産生昂進に働く事が明らかになった。

次に、LPS の投与量を上げ (200 $\mu\text{g}/\text{マウス}$) 致死性のエンドトキシンショックにおける

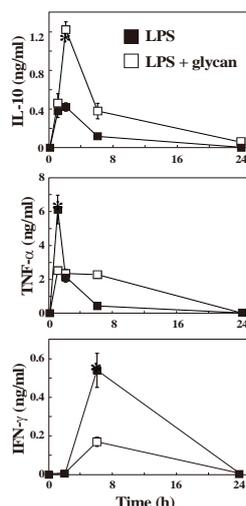


図 1

当該 N-glycan の影響を検討したところ、前述と同様に IL-10 の産生昂進と死亡率の改善が認められた ($p < 0.01$, Wilcoxon test) (図 2)。

また、マウスを Clodronate liposome 処理しマクロファージを欠失すると、IL-10 産生が大きく減少した。

また、マウス腹腔より常在性 M ϕ を精製し、*in vitro* にて LPS にて刺激したところ、N-glycan 存在下で IL-10 の産生が 3 倍以上昂進した (図 3)。この際に、M ϕ を抗 SIGNR1 抗体及び抗マクロファージマンノースレセプター抗体で処理した結果、前者によって IL-10 の産生が低下した。

以上の結果より、*C. albicans* 表面 N-glycan がマクロファージの SIGNR1 を介して IL-10 産生を昂進し、免疫抑制効果を発揮することが明らかとなった。

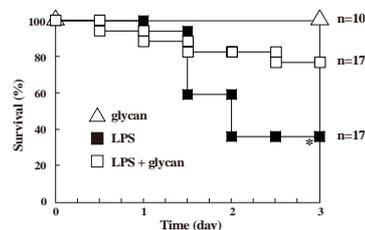


図 2

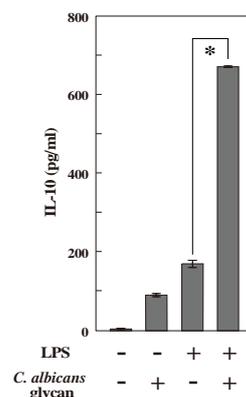


図 3

次に、*in vivo* において N-glycan に誘導される IL-10 の意義を確認する為に、マウス敗血症誘導時に N-glycan および IL-10 に対する中和抗体を投与したところ、マウス生存率が大きく低下した。

一方で、敗血症は急性期 (3~5 日) に過剰な免疫応答を引き起こすだけでなく、後期 (1~3 週間) においては逆に危険な免疫抑制状態を惹起する。また、当該 N-glycan が急性期に IL-10 産生を誘導する事から、後期において Tr1 細胞等を誘導し更なる免疫抑制状態を誘導する可能性があるためこの点を検討した。まず、敗血症誘導時にオポアルブミン (OVA) を投与し、2 週間後の抗原特異的 IL-10 産生を脾臓細胞を OVA で刺激した。その結果、N-glycan による IL-10 産生への影響は認められなかった。よって、*C. albicans* N-glycan は敗血症急性期における免疫抑制に働くものの、少なくとも後期における IL-10 産生には影響しない事が示唆された。

次に、ヒツジ赤血球を用いた DTH における LPS および当該 N-glycan の影響を検討した。マウスの一側の足蹄にヒツジ赤血球を投与し、同時に LPS および当該 N-glycan を静脈投与した。1 週間後に別の足蹄に赤血球を投与し、24 時間後に腫れを測定した。その結果、LPS を投与すると足蹄の腫れが減少することから、敗血症による後期免疫抑制が生じていることが示唆された (図 4)。一方で、当該

N-glycan を投与すると足蹄の腫れはほぼ正常レベルまで回復した (図 4)。よって、*C. albicans* N-glycan は敗血症後期には免疫抑制を解除する事が示唆された。予備的な実験で、前述の様に敗血症誘導時に卵白アルブミン (OVA) を抗原として投与し、2 週間後に *in vitro* における脾臓細胞の抗原特異的サイトカイン産生を検討したところ IL-10 の産生には変化がなかったが、一方で IFN- γ 産生の顕著な昂進が見られた。この結果は、当該 N-glycan が敗血症後期における免疫抑制の解除を超えて免疫応答の促進に働く事を示唆している。

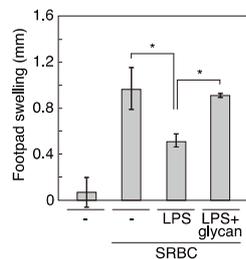


図 4

以上の結果から、*C. albicans* N-glycan が敗血症の初期における過剰な免疫応答、および後期における抑制的な免疫応答の双方を改善できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Ushida, M., Iyoda, T., Kanamori, M., Watarai, H., Takahara, K.* and Inaba, K. (2015) In vivo and in vitro analyses of α -galactosylceramide uptake by conventional dendritic cell subsets using its fluorescence-labeled derivative. *Immunol. Lett.* 168, 300-5. (*corresponding author). doi: 10.1016/j.imlet.2015.10.008 (査読有り)

Tokieda, S., Komori, M., Ishiguro, Iwakura, Y., Takahara, K.* and Inaba, K. (2015) Dendritic cell immunoreceptor 1 alters neutrophil responses in the development of experimental colitis. *BMC Immunol.* 16, 64. (*corresponding author).doi: 10.1186/s12865-015-0129-5 (査読有り)

Taneo, J., Adachi, T., Yoshida, A., Takeyasu, K., Takahara, K.* and Inaba, K. (2015) Amyloid β oligomers induce interleukin-1 β production in primary microglia in a cathepsin B- and reactive oxygen species-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458, 561-567. (*corresponding author). doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.006 (査読有り)

Naito-Matsui, Y., Takada, S., Kano, Y., Murata, K., Iyoda, T., Sugai, M., Shimizu, A., Inaba, K., Nitschke, L., Tsubata, T., Oka, S., Kozutsumi, Y. and Takematsu, H. (2014) Functional Evaluation of Activation-dependent Alteration of Sialoglycans in T Cells. *J.Bio.Chem.* 289:1564-1579.

doi: 10.1074/jbc.M113.523753. (査読有り)

Tomura, M., Hata, A., Matsuoka, S., Shand, F.H., Nakanishi, Y., Ikebuchi, R., Ueha, S., Tsutsui, H., Inaba, K., Matsushima, K., Miyawaki, A., Kabashima, K., Watanabe, T. and Kanagawa, O. (2014) Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci. Rep.* doi: 10.1038/srep06030. (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

高原 和彦 N-glycan of *C. albicans* mannoprotein effectively induces IL-10 production in the presence of LPS. 日本免疫学会. 2013 年 12 月 11-13 日. 千葉幕張.
石黒 俊文 Ameliorated acute liver injury in DCIR1-deficient mice. 日本免疫学会. 2013 年 12 月 11-13 日. 千葉幕張.

〔図書〕(計 0 件)

〔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

<http://zoo.zool.kyoto-u.ac.jp/imm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高原 和彦 (TAKAHARA, Kazuhiko)
京都大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号: 90301233

(2) 研究分担者

稲葉 力ヨ (INABA, Kayo)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号: 00115792