

平成 2 8 年 6 月 1 5 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460593

研究課題名(和文)新規結核菌認識受容体MCLによる獲得免疫活性化機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of MCL-mediated activation of acquired immune responses.

研究代表者

三宅 靖延 (Miyake, Yasunobu)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：10392143

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)：MCLは、結核菌認識受容体であるMincleと相互作用することにより、Mincleを安定化させることで、Mincleを介した結核菌応答を増強することが分かった。MincleとMCLは、リガンド認識部位と膜貫通部位の間にあるストーク領域に存在する疎水性アミノ酸を介して、相互作用する。MCLは、直接のリガンド認識ではなく、Mincleの安定化を介して結核菌に対する免疫応答に寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Two C-type lectin receptors, Mincle and MCL, are required for immune responses against mycobacterial glycolipid, TDM. We demonstrate that MCL interacts with Mincle to promote its surface expression. After LPS or zymosan stimulation, MCL-deficient BMDCs had a lower level of Mincle protein expression. Meanwhile, BMDCs from MCL transgenic mice showed an enhanced level of Mincle expression on the cell surface. MCL was associated with Mincle through the stalk region and this region was necessary and sufficient for the enhancement of Mincle expression. This interaction was mediated by the hydrophobic repeat of MCL, as substitution of four hydrophobic residues with serine abolished the function to enhance the Mincle expression. This mutant failed to restore the defective TDM responses in MCL-deficient BMDCs. These results suggest that MCL positively regulates Mincle expression through protein-protein interaction via its stalk region, thereby magnifying Mincle-mediated signaling.

研究分野：免疫学

キーワード：C型レクチン受容体

1. 研究開始当初の背景

結核は結核菌の感染により引き起こされる疾患であり、世界の約 1/3 にあたる 20 億人が感染し、毎年 150 万人以上が死亡している。日本における罹患率および死亡率は先進国の中では突出して高く、今なお新たな治療法の開発が望まれている。そのためには未だ不明な点が多い宿主免疫系による結核菌の認識機構を分子レベルで解明することが必要と考えられる。結核菌は多くの免疫活性化物質を含有するが、その中でも TDM (trehalose dimycolate) は古くからコードファクターとして知られ、非常に強い免疫賦活化作用を有するために精力的な研究が行われてきたが、宿主免疫系における認識受容体は半世紀以上の間不明であった。近年申請者の研究室では、マクロファージや樹状細胞に発現する Mincle (Macrophage-inducible C-type lectin) が TDM 認識受容体であることを明らかにした (Ishikawa, *J. Exp. Med.*, 2009)。Mincle 欠損マウスでは、TDM 投与によるサイトカイン産生や肺肉芽腫形成が完全に消失することから、Mincle は TDM による自然免疫応答に必須であることが判明した。最近申請者らは Mincle 遺伝子の進化的な解析を行い、有胎盤類以降に遺伝子重複と思われるホモログが複数出現し、そのうちのひとつ MCL (macrophage C-type lectin) が TDM を認識することを見出した。MCL はヒトに至るまで保存されており、ヒト MCL も TDM を認識することから、TDM 認識受容体として重要な機能を果たしている可能性が考えられた。そこで MCL 欠損マウスを作製して、その可能性を検証したところ、TDM による自然免疫応答の顕著な減弱が認められたことから、MCL も TDM 応答に重要な役割を担っていることが明らかとなった。その後の解析により、両分子は共にアダプター分子 FeR α を介して活性化シグナルを伝えること、発現細胞は共にマクロファージや樹状細胞などのミエロイド系細胞であること、MCL と TDM との結合力は Mincle と比較して弱いこと、Mincle はストレスにより一過的に発現が誘導されるのに対して、MCL は恒常的に発現していることを明らかにした。これらの知見から、Mincle と MCL には機能的な差異があると考えて解析を行い、恒常的に発現している低親和性受容体 MCL が初めに TDM を認識して、高親和性 TDM 受容体 Mincle の発現を誘導することにより、高親和性 Mincle が TDM を認識して、炎症性サイトカイン産生などの自然免疫応答を強力に誘導することを明らかにした。

2. 研究の目的

新規 TDM 認識受容体 MCL による獲得免疫の活性化機構を明らかにすることにより、TDM を介した結核菌に対する宿主免疫系による自然免疫・獲得免疫応答の全容解明を

目指す。

3. 研究の方法

Mincle および MCL の欠損マウス、過剰発現マウスを作成して、TDM 応答を比較検討することにより、両分子の TDM 応答における役割を解明する。

4. 研究成果

C 型レクチン受容体 Mincle と MCL は結核菌の細胞壁に存在する糖脂質 TDM を認識して、宿主免疫応答を惹起する。両分子はどちらも TDM 応答及び結核菌の排除に必須であることから、非冗長性の役割を果たしていると考えられた。MCL は Mincle と比較して TDM に対する結合力が極めて弱いことから、直接的な TDM 認識受容体以外の機能を果たしているのではないかと推測して検討を行い、MCL が Mincle の発現を制御していることを見出した。MCL はストーク領域の疎水性アミノ酸残基を介して Mincle と相互作用することで、Mincle の細胞表面発現を安定化していた。当該疎水性アミノ酸残基を親水性アミノ酸に置換すると、両分子の相互作用が破綻して、Mincle の発現量が減少し TDM に対する適切な免疫応答ができなくなった。一方で、MCL の TDM 認識に重要な領域を変異させても、TDM 応答には影響がなかった。以上の結果より、MCL は直接的な TDM の直接的な認識受容体として機能しているのではなく、Mincle の安定化を介して間接的に TDM 応答に寄与していることが明らかとなった。

結核菌感染の実験動物モデルであるモルモットの Mincle は他種と同様に TDM を認識した。しかしながら、モルモットの MCL は突然変異により、TDM 認識領域の一部を欠損しており TDM を認識できないが、Mincle との相互作用能力は保持していた。このことは、MCL の主たる機能が TDM 認識ではなく、Mincle の安定化である可能性を強く示唆している。

Mincle および MCL の相同分子である Dectin-2 が結核菌のリポアラビノマンナンを認識して、祝湯免疫応答を惹起することを見出した。これまでは SIGNR1 がリポアラビノマンナンの受容体と考えられてきたが、SIGNR1 欠損マウスを作成して、当該分子の寄与は低いことを明らかにした。

ヒト MCL およびヒト Mincle の結晶構造を明らかにし、TDM 認識に必要な部位を特定した。Mincle および MCL の C 末部分には疎水性残基に富む特徴的な領域が存在し、この領域を介して TDM の疎水性脂肪酸側鎖と相互作用している可能性を明らかにした。TDM に対する Mincle と MCL の結合力の違いが、この領域に存在する疎水性アミノ酸残基の数と関連することを見出した。

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 7 件)

Miyake, Y., Oh-Hora, M. and Yamasaki, S.
C-type lectin receptor MCL facilitates Mincle expression and signaling through complex formation.
J. Immunol. 194 5366-5374 (2015) 査読有

Yonekawa, A., Saijo, S., Hoshino, Y., Miyake, Y., Ishikawa, E., Suzukawa, M., Inoue, H., Tanaka, M., Yoneyama, M., Oh-Hora, M., Akashi, K. and Yamasaki, S.
Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria.
Immunity. 41 402-413 (2014) 査読有

Miyake, Y., and Yamasaki, S.
結核菌コードファクターに対する免疫賦活化作用を担うC型レクチン受容体
医学のあゆみ 250, 287-288 (2014) 査読無

Toyonaga, K., Miyake, Y.*, and Yamasaki, S*.
Characterization of the receptors for mycobacterial cord factor in Guinea pig.
PLoS One 9 e88747 (2014) *corresponding author 査読有

Furukawa, A., Kamishikiryo, J., Mori, D., Toyonaga, K., Okabe, Y., Toji, A., Kanda, R., Miyake, Y., Ose, T., Yamasaki, S. and Maenaka, K.
Structural analysis for glycolipid recognition by the C-type lectins Mincle and MCL.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110 17438-17443 (2013) 査読有

Miyake, Y., Toyonaga, K., Mori, D., Kakuta, S., Hoshino, Y., Oyamada, A., Yamada, H., Ono, K., Suyama, M., Iwakura, Y., Yoshikai, Y., and Yamasaki, S.
C-type lectin MCL is an FcR γ -coupled receptor that mediates the adjuvant activity of mycobacterial cord factor
Immunity 38, 1050-1062 (2013) 査読有

Miyake, Y., and Yamasaki, S.
死細胞を認識する受容体 Mincle
医学のあゆみ 246, 438-442 (2013) 査読無

〔学会発表〕(計 6 件)

Yasunobu Miyake, Sho Yamasaki and Hiroki Yoshida
Phospholipids bind to siglec-9 and induce immunosuppressive effect against LPS

stimulation.

第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌、(2015)

三宅靖延、山崎晶、吉田裕樹
結核菌認識受容体 Mincle の安定化を担う分子 MCL
第 80 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、(2015)

Yasunobu Miyake and Sho Yamasaki
MCL forms a complex with Mincle and enhances its surface expression.
第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、(2014)

Yasunobu Miyake, Sho Yamasaki
Stabilization of C-type lectin receptors Mincle and MCL through post-transcriptional regulation.
ICDI symposium, Ghent, Belgium, 2014

Yasunobu Miyake, Kenji Toyonaga, Daki Mori, Shigeru Kakuta, Yoshihiko Hoshino, Yoichiro Iwakura and Sho Yamasaki
MCL is a novel receptor for mycobacterial cord factor TDM, and critically involved in TDM-induced immune responses through the induction of Mincle.
15th International Congress of Immunology, Milano, Italy, 2013

Yasunobu Miyake, Kenji Toyonaga, Sho Yamasaki
C-type lectin, MCL is associated with Mincle.
第 42 回日本免疫学会学術集会、千葉、(2013)

〔図書〕(計 1 件)

三宅靖延、山崎晶
Mincle
疾患モデルの作製と利用 - 脂質代謝異常と関連疾患(下巻)(尾池 雄一、佐々木雄彦、村上 誠、矢作 直也編)
エル・アイ・シー, 第 4 章 12 節, pp.126-132
(2015) 査読無

〔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)
佐賀大学医学部・分子生命科学講座・免疫
学分野・准教授
研究者番号：10392143

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：