

平成 28 年 6 月 17 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：25460594

研究課題名(和文) 原虫感染に対するCARD9を介した新規自然免疫活性化経路の解析

研究課題名(英文) Analyses of the roles of CARD9-dependent innate immunity against protozoa infection

研究代表者

吉田 裕樹 (Yoshida, Hiroki)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：40260715

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)：本研究では、原虫感染に対するCARD9依存性自然免疫経路の関与を解析した。原虫*Leishmania major*をCARD9欠損マウスに感染させたところ、感染抵抗性の減弱を認め、感染初期には感染部位における炎症性サイトカインの発現低下を、感染後期においては、Th1型の免疫反応の誘導に障害を認めたため、CARD9は自然免疫と引き続くTh1型免疫の誘導に重要な役割を担っていることが示された。原虫認識受容体に関しては、ITAM受容体の可溶性蛋白ライブラリーを用いて候補を同定した。このうち一つの受容体に関して解析を進め、この受容体は原虫表面の糖鎖を認識している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of CARD9-dependent innate immunity against protozoa infection. When infected with *Leishmania major*, CARD9-deficient mice demonstrated impaired resistance to infection with reduced inflammatory cytokine production at an early phase and impairment of Th1 response induction at a late phase of infection. CARD9, thus, is important in the initial defense and subsequent induction of Th1 responses during protozoa infection. By taking advantage of an ITAM-receptor protein library, we identified a couple of protozoa-binding receptors. One of the candidate receptors is shown to recognize carbohydrate motif on the surface of *L. major*.

研究分野：感染免疫

キーワード：原虫 自然免疫 CARD9 炎症性サイトカイン Th1

1. 研究開始当初の背景

近年、Toll 様受容体(TLR)の発見とそのリガンドの同定により、TLRなどを介した自然免疫系が細菌やウイルスに対する感染防御において重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。これらの研究では、ウイルス、および原核病原体である細菌に対する自然免疫活性化機構が、その受容体と受容体が認識する病原体関連分子パターン(PAMPs)、および受容体下流のアダプター分子やシグナル伝達経路に至るまで明らかにされ、炎症性サイトカインやインターフェロン産生が誘導される分子機構が詳細に解明されてきた。

一方、真核病原体である真菌や寄生虫に対する自然免疫の解明は、細菌やウイルスに対する物と比べて遅れていた。最近になって、細胞表面に存在するITAM(受容体免疫受容体活性化チロシンモチーフ=immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 関連受容体が真菌の構成成分を認識し、下流のアダプター分子CARD9-Bcl10-MALT1複合体を介して炎症性サイトカイン産生を誘導する機構が明らかにされ、TLRなどを介した上記の自然免疫活性化経路とは全く別に存在するこのITAM 関連受容体~CARD9を介した経路が真菌に対する自然免疫を誘導する事が明らかになってきた。この経路に関しては、Dectin-1/2が真菌 *Candida albicans* の糖をPAMPsとして認識することや、Mincleが同じく真菌マラセチアの糖を認識することなどが次々に明らかにされ、さらにこれらの受容体の下流ではCARD9が炎症性サイトカイン産生に必須の役割を果たすことが明らかとなり、真菌に対する自然免疫の研究が大きく展開したが、同じ真核病原体である寄生虫(原虫・蠕虫)に対する自然免疫の研究は大きく後れを取っている。

いわゆる寄生虫のうち、本研究者が研究を行っている原虫類は、特に発展途上国などにおいて重篤な感染症を引き起こす病原体であり、その中で *Leishmania major*(リーシュマニア)は、熱帯リーシュマニア症を引き起こす病原体である。前述のように原虫に対する自然免疫はこれまでほとんど明らかにされておらず、一部の原虫の構成成分やそのDNAがTLRにより認識されることが報告されているが、報告を見る限り、原虫に対する自然免疫の中で大きな役割を果たしているとは考えにくく、TLR以外の系による自然免疫の関与が示唆されていた。本研究の中心となるCARD9依存性自然免疫活性化経路は、前述のように、TLRを介した自然免疫経路とは全く異なる経路であり、申請者は、原虫(*L. major*)に対する自然免疫活性化にこの新規自然免疫活性化経路が関与するとの仮説を立て、その検証を行ってきた。これまでの予備的検討により、樹状細胞やマクロファージなどの自然免疫

細胞が原虫 *L. major* と接触し炎症性サイトカインを産生する際、CARD9を欠損する細胞では、*L. major* 認識後のTNF- α などの炎症性サイトカインやケモカインの産生が著しく減弱することを見出した。原虫認識による炎症性サイトカイン産生においては、TLRの下流で機能するMyD88欠損による障害は見られなかった。これらのことは、原虫 *L. major* に対する自然免疫活性化においては、CARD9を介した経路が重要な役割を果たしていることを示している。

2. 研究の目的

本研究では、以下の三点を明らかにすることを目的とする。(下図参照)

①原虫 *L. major* に対する自然免疫活性化におけるCARD9依存性経路の関与とその分子機構の解明

②原虫 *L. major* のPAMPsを認識する受容体の同定とその認識するリガンドの同定

③CARD9依存性自然免疫活性化経路の、*L. major* 以外の原虫感染における関与の検討

①においては、予備的検討により得られた知見をさらに詳細に検討し、*in vitro*のみならず *in vivo*におけるこの経路の防御免疫における役割を明らかにする。また、CARD9と複合体を形成すると考えられるBcl10やMALT1の関与を検討するとともに、上流で機能することが考えられるSykキナーゼの関与などを、それぞれ遺伝子欠損細胞を用いるなどして明らかにし、*L. major* に対する自然免疫における本経路の関与とその分子機構を明らかにする。

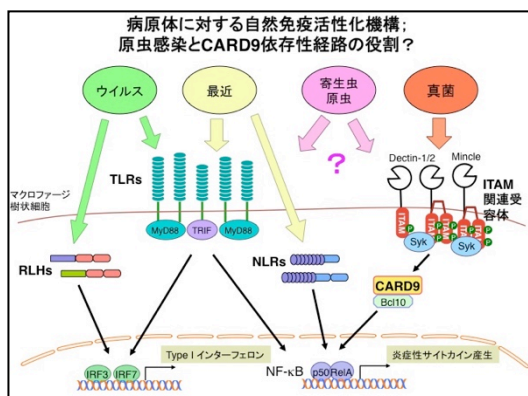
②においては、*L. major* 由来の成分を認識し、このCARD9依存性自然免疫経路を活性化する受容体の同定を目指す。本系を活性化する受容体が多数存在することに加え、現在それぞれのリガンドもほとんど不明であること、また原虫自身も複雑な生活環を持ち、ステージ特異的な抗原(PAMPs)を発現する可能性も有るため、どの受容体が病原体のどのコンポーネントを認識して活性化するのかの推測は困難である。このため、研究方法に詳細を述べる手法、すなわち、ITAM 関連受容体のライブラリーや受容体発現レポーター細胞を用いて、受容体の候補を同定する。さらに、受容体を用いて、生化学的手法によりそのリガンドの同定を目指す。

③においては、現在予備的検討によりCARD9経路の関与が示唆されている原虫 *L. major* で見られる事象が、その他の原虫においても当てはまるか、すなわち、CARD9依存性経路がその他の原虫においてもその自然免疫活性化に関わるかを検討する。原虫には様々な種や属が有り、その生活環や寄生宿主、病原性、感染標的細胞などはきわめて多彩であるが、感染実験な

どに頻用される原虫、*L. major* 以外のリーシュマニアや、トリパノゾーマ、トキソプラズマ、および赤痢アメーバなどを用いて、同様の検討を行い、真菌における CARD9 依存性経路の関与と同様に、様々な原虫に対して CARD9 依存性新規自然免疫活性化経路が関与するかを検討する。

本研究は、TLR システムとは別個に機能する新規自然免疫活性化経路である、ITAM 関連受容体～CARD9 依存性経路に着目し、さらにこの経路が真菌に対する自然免疫に関わるとの知見から、同じ真核性病原体である原虫感染に対する自然免疫への関与を検討する点に特色がある。原虫、特に *L. major* 感染に対する免疫機構は申請者らが研究を続けてきたテーマであるが、原虫全般に、その感染に対する自然免疫活性化機構の解析は進んでいないことから、予備的検討を進めてきた *L. major* を突破口として、原虫に対する自然免疫活性化機構を解明しようとする点にも、本研究の特色がある。

本研究により、1) *L. major* を初めとして、原虫感染に対する自然免疫系を介した初期防御システムが明らかにされる。これは、原虫感染に対する新規の初期免疫システムの解明と言う点で重要であることに加えて、顧みられない熱帯病 (Neglected Tropical Diseases) の原因病原体の代表とも言える原虫感染の早期治療法の開発につながる事が期待される。また、2) CARD9 を介したサイトカイン産生経路の全体像を明らかにすることにより、この経路の自然免疫における役割が明らかにされる。この経路は、原虫のみならず、結核菌など一部の細菌に対する感染防御に重要な役割を果たすことも明らかにされており、新規自然免疫活性化機構の解明を通じて新規の感染免疫増強法や、新規アジュバントの開発なども期待される。



3. 研究の方法

①原虫 *L. major* 認識により活性化される CARD9 依存性自然免疫活性化経路の解明

CARD9 欠損樹状細胞を用いた *in vitro* の検討により、CARD9 欠損により *L.*

major 接触初期の、炎症性サイトカインやケモカインの産生が低下することを予備的に見いだしている。この経路の重要性、および関与する分子群を確定させるために、以下の実験を行う。

1) CARD9 と会合して機能するとされる、Bcl10 と MALT1 欠損細胞を用いて同様の実験を行うことにより、三分子が (複合体として) この経路において機能することを示す。

2) CARD9 の上流では、ITAM 関連受容体の直下で Syk キナーゼが機能するとされる。Syk 欠損細胞を用いて、同様に Syk の関与を明らかにする。

3) Syk～CARD9 複合体の上流の受容体は、ITAM を持つ DAP12 分子と会合するグループ、FcRg と会合するグループ、および自身に ITAM を持つグループに分けられる。DAP12 欠損マウス、および FcRg 欠損マウスを用いて同様の実験を行い、これらの会合分子の関与を検討、受容体候補のグループを決定する。

これらの検討により、*L. major* 感染における、受容体会合分子～Syk キナーゼ～CARD9 複合体を介した経路の役割が明らかにされる。

①-2*L. major* 感染時の CARD9 依存性自然免疫活性化経路の *in vivo* における役割の解明

CARD9 欠損マウスでは *L. major* 感染抵抗性が減弱することを予備的に見いだしている。以下の実験により、CARD9 依存性経路の *in vivo* における役割を明らかにする。

通常 *L. major* の排除は Th1 型免疫に依存しているため、感染マウスの所属リンパ節細胞の Th1 分化を解析する。同時に Th2 や Th17 の分化誘導、IL-6 や TGF- β 、IL-23 などの関連サイトカイン、IL-10 などの免疫抑制性因子の産生などを解析する。感染局所の原虫数 (排除の指標) を測定するほか、局所における炎症性サイトカインやケモカインの発現、Th1/2/17 の分化や iNOS/デフェンシンなど関連因子の発現などを測定し、CARD9 欠損における局所での免疫・炎症誘導能を解析する。

ITAM 関連受容体の可溶性リコンビナントタンパクのライブラリーを作成している。25 年度は、このライブラリーの拡充を図る。現在、このタンパクの原虫への結合能を解析することにより、*L. major* のパターン構造を認識する候補受容体を少なくとも一つ同定している。現在この受容体を発現し、その活性化によりレポーター遺伝子を発現する細胞を作成しつつあり、このレポーター細胞に試験管内で *L. major* を感染させることにより、この候補受容体が *L. major* の何らかの成分を認識して下流の CARD9 依存性経路を活性化するかを検討する。

③*L. major* 以外の原虫による感染実験

CARD9 欠損マウス、または欠損細胞を用いて、*L. major* 以外のリーシュマニア原虫、*Trypanosoma cruzi* や赤痢アメーバによる感染実験を行い、これらの原虫に対する CARD9 依存性経路の関与を検討する。

平成 26 年度以降

①原虫 *L. major* 認識により活性化される CARD9 依存性自然免疫活性化経路の解明

必要に応じて関連分子・受容体などの欠損マウスを入手するなどして、感染実験を継続する。

②*L. major* を認識する受容体の同定

前述の受容体ライブラリーやレポーター細胞を用いて、*L. major* の成分を認識する候補受容体を同定していく。当該受容体の遺伝子改変マウスを入手または作成し、個体を用いた感染実験や、細胞を用いた試験管内感染実験などにより、その役割を明らかにする。

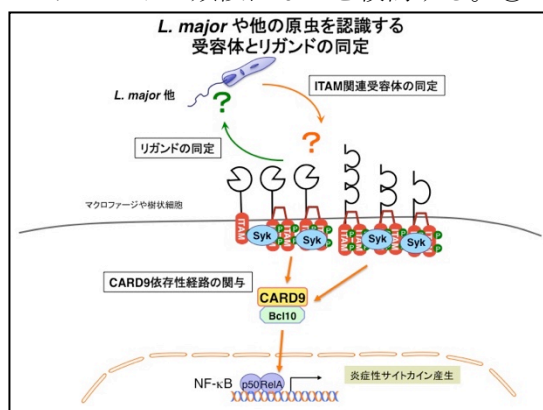
②-2 受容体が認識する成分（リガンド・PAMPs）の同定

②により同定された受容体（候補）リコンビナント蛋白を用いて、原虫を染色するなどしてリガンドの発現を確認し、さらに生化学的手法を用いて、受容体が認識する原虫側の分子を同定・精製し、構造決定を行う。リガンドが蛋白である場合は、プルダウン法などで精製の上質量分析計での同定が可能であるが、脂質や糖鎖である場合は、クロマトグラフィーによる分離精製を行う。

この受容体とリガンドの同定においては、原虫の生活環におけるリガンド発現特異性に留意する必要があるため、現在 *L. major* の発育ステージを揃える培養系や特定のステージのもののみを濃縮精製する手法を確立しつつ有り、25 年度以降この方法の精度を上げることを目指す。

③*L. major* 以外の原虫における受容体やリガンドの同定を行う。

L. major 以外の原虫感染において、CARD9 経路の関与が示唆されたものに関して、同様の手法により、認識受容体とリガンドの同定を順次試みる。また、原虫間でのリガンドの類似性などを検討する。②



において同定・精製されたリガンドに関しては、自然免疫活性化能を *in vitro*、*in vivo* の実験系において検討する。

4. 研究成果

本研究では、寄生虫のうち、原虫を認識する自然免疫受容体とそのリガンドの同定を目指した。原虫として *Leishmania major* を用い、これを ITAM 受容体の下流でアダプター分子として機能する CARD9 欠損マウスに感染させたところ、感染抵抗性の減弱を認めたため、この経路が *L. major* 感染に対する自然免疫を担っていることが確認された。CARD9 欠損マウスでは、感染初期には感染部位における炎症性サイトカインの発現低下を認め、また感染後期においては、Th1 型の免疫反応の誘導に障害を認めたため、CARD9 に依存する自然免疫が引き続く Th1 型免疫の誘導に重要な役割を担っていることが示された。CARD9 の上流に位置する受容体に関しては、ITAM 受容体の可溶性蛋白ライブラリーを作成し、この原虫への結合能を指標に候補受容体を検索したところ、複数の受容体の結合が確認された。このうち一つの受容体に関して解析を進めたところ、この受容体は原虫表面の糖鎖を認識している可能性が示された。現在、リガンドの同定を目指すとともに、この受容体の自然免疫活性化可能、および Th1 型免疫誘導能などを解析している。

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 11 件)

- ① Furusawa, J.-i., I. Mizoguchi, Y. Chiba, M. Hisada, F. Kobayashi, H. Yoshida, S. Nakae, A. Tsuchida, T. Matsumoto, H. Ema, J. Mizuguchi, and T. Yoshimoto. 2016. Promotion of Expansion and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells by Interleukin-27 into Myeloid Progenitors to Control Infection in Emergency Myelopoiesis. *PLOS Pathog* 12:e1005507. (査読有り)
- ② Yoshida, H., and C.A. Hunter. 2015. The immunobiology of interleukin-27. *Annu Rev Immunol* 33:417-443. (査読有り)

- ③ Uematsu, T., E. Iizasa, N. Kobayashi, H. Yoshida, and H. Hara. 2015. Loss of CARD9-mediated innate activation attenuates severe influenza pneumonia without compromising host viral immunity. *Sci Rep* 5:17577. (査読有り)
- ④ Mi-Ichi, F., A. Nozawa, H. Yoshida, Y. Tozawa, and T. Nozaki. 2015. Evidence that the *Entamoeba histolytica* Mitochondrial Carrier Family Links Mitosomal and Cytosolic Pathways through Exchange of 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate and ATP. *Eukaryot Cell* 14:1144-1150. (査読有り)
- ⑤ Mi-Ichi, F., T. Miyamoto, S. Takao, G. Jeelani, T. Hashimoto, H. Hara, T. Nozaki, and H. Yoshida. 2015. *Entamoeba* mitosomes play an important role in encystation by association with cholesteryl sulfate synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E2884-2890. (査読有り)
- ⑥ Hara, H., T. Yokosuka, H. Hirakawa, C. Ishihara, S. Yasukawa, M. Yamazaki, H. Koseki, H. Yoshida, and T. Saito. 2015. Clustering of CARMA1 through SH3-GUK domain interactions is required for its activation of NF-kappaB signalling. *Nat Commun* 6:5555. (査読有り)
- ⑦ Yasukawa, S., Y. Miyazaki, C. Yoshii, M. Nakaya, N. Ozaki, S. Toda, E. Kuroda, K. Ishibashi, T. Yasuda, Y. Natsuaki, F. Mi-ichi, E. Iizasa, T. Nakahara, M. Yamazaki, K. Kabashima, Y. Iwakura, T. Takai, T. Saito, T. Kurosaki, B. Malissen, N. Ohno, M. Furue, H. Yoshida, and H. Hara. 2014. An ITAM-Syk-CARD9 signalling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. *Nat Commun* 5:3755. (査読有り)
- ⑧ Sato, Y., H. Hara, T. Okuno, N. Ozaki, S. Suzuki, T. Yokomizo, T. Kaisho, and H. Yoshida. 2014. IL-27 affects helper T cell responses via regulation of PGE2 production by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 451:215-221. (査読有り)
- ⑨ Nonomura, K., Y. Yamaguchi, M. Hamachi, M. Koike, Y. Uchiyama, K. Nakazato, A. Mochizuki, A. Sakaue-Sawano, A. Miyawaki, H. Yoshida, K. Kuida, and M. Miura. 2013. Local Apoptosis Modulates Early Mammalian Brain Development through the Elimination of Morphogen-Producing Cells. *Dev Cell* 27:621-634. (査読有り)
- ⑩ Iwasaki, Y., K. Fujio, T. Okamura, A. Yanai, S. Sumitomo, H. Shoda, T. Tamura, H. Yoshida, P. Charnay, and K. Yamamoto. 2013. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1 mediated IL-10 production in IL-27 stimulated CD4(+) T cells. *Eur J Immunol* 43:1063-1073. (査読有り)
- ⑪ Hirase, T., H. Hara, Y. Miyazaki, N. Ide, A. Nishimoto-Hazuku, H. Fujimoto, C.J.M. Saris, H. Yoshida, and K. Node. 2013. Interleukin 27 inhibits atherosclerosis via immunoregulation of macrophages in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305:H420-429. (査読有り)

- ① Miyake, Y., S. Yamasaki, and H. Yoshida. 2015. C-type lectin receptor MCL stabilizes Mincle through complex formation for enhancement of inflammatory cytokine production upon mycobacterial infection. In Cytokines Congress 2015 (3rd Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society). Germany, Bamberg.
- ② Miyake, Y., S. Yamasaki, and H. Yoshida. 2015. Phospholipids bind to siglec-9 and induce immunosuppressive effect against LPS stimulation. In The 44th annual meeting of the Japanese Society for Immunology. Japan, Sapporo.
- ③ 三宅靖延, 山崎晶, 吉田裕樹. 2015. 結核菌認識受容体Mincleの安定化を担う分子MCL. In 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. 日本, 東京.
- ④ Iizasa, E., T. Uematsu, M. Kubota, H. Kiyohara, Y. Chuma, G. Matsuzaki, S. Yamasaki, H. Yoshida, and H. Hara. 2014. Innate recognition of mycolic acid-containing lipids in mycobacteria. In The 43rd annual meeting of the Japanese Society for Immunology. Japan, Kyoto.
- ⑤ Kubota, M., E. Iizasa, H. Kiyohara, Y. Chuma, H. Hara, and H. Yoshida. 2014. Mycobacterium tuberculosis-derived mycolic acid shows an adjuvant activity by activation of the ITAM receptor/CARD9-mediated innate immunity. In 2nd Annual Meeting of the International Cytokine and

Interferon Society. Australia, Melbourne.

- ⑥ Uematsu, T., E. Iizasa, N. Kobayashi, H. Yoshida, and H. Hara. 2014. Activation of innate immunity mediated by the receptor/CARD9-mediated innate immunity. In The 42nd annual meeting of the Japanese Society for Immunology. Japan, Chiba.

[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
www.mcis-sagamed.info

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 裕樹 (YOSHIDA, Hiroki)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：40260715

(2) 研究分担者

原 博満 (HARA, Hiromitsu)
鹿児島大学・大学院医歯総合研究科・教授
研究者番号：20392079

(3) 連携研究者

宮本 智文 (MIYAMOTO, Tomofumi)
九州大学・薬学研究院・准教授
研究者番号：40182050