

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860831

研究課題名(和文) 貪食細胞によるスフィンゴ糖脂質を介した病原性抗酸菌の認識応答機構の解明

研究課題名(英文) The glycosphingolipid-mediated recognition of mycobacteria by human phagocytes

研究代表者

中山 仁志 (Nakayama, Hitoshi)

順天堂大学・医療看護学部・助教

研究者番号：70514933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌などの病原性抗酸菌は、好中球やマクロファージへ貪食されると、食胞とリソソームの融合(食胞成熟)を阻害する。本研究では、抗酸菌由来分子と貪食細胞に発現するスフィンゴ糖脂質との認識応答機構を明らかにすることで、病原性抗酸菌による食胞成熟阻害機構を解明することを目的とした。本研究によって、スフィンゴ糖脂質のラクトシルセラミド(LacCer)と抗酸菌由来リポアラビノマンナン(LAM)が結合すること、また、その結合様式がLacCerを介した食胞成熟に影響を与えることが明らかとなった。これらの研究成果は新たな抗酸菌感染症治療薬を開発するための一助となる。

研究成果の概要(英文)：Pathogenic mycobacteria such as *Mycobacterium tuberculosis* cause phagosomal maturation (phagosome-lysosome fusion) arrest. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of glycosphingolipid-mediated mycobacterial recognition. Our results showed that mycobacterial LAM bound to lactosylceramide (LacCer), and affected LacCer-mediated phagosomal maturation in human neutrophils. These results provide new insights into how pathogenic mycobacteria inhibit phagosome-lysosome fusion.

研究分野：生化学、糖鎖生物学、感染免疫学

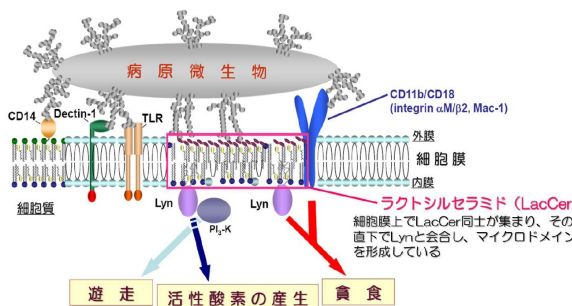
キーワード：病原性抗酸菌 リポアラビノマンナン 好中球 ラクトシルセラミド 貪食 食胞成熟阻害

1. 研究開始当初の背景

病原微生物は菌体特有のパターン分子 (PAMPs) を利用して宿主細胞に侵入・感染する。それに対して、宿主細胞側もパターン認識受容体 (PRR) を用いた自然免疫応答によって病原微生物の排除を試みる。これまでに、結核菌などの病原性抗酸菌がリポアラビノマンナン (LAM) などの菌体壁成分を利用して、貪食細胞上の PRR やマイクロドメイン (リポドラフト) と結合し、細胞内へ取り込まれた後、食胞へのリソソーム融合に必要なシグナル伝達経路を攪乱することで、細胞内寄生してしまうことが報告されている。しかしながら、その詳細なメカニズムについては不明のままである。特に、抗酸菌特有の PAMPs と貪食細胞に発現するスフィンゴ糖脂質との相互作用に着目した研究はほとんどない。

好中球や樹状細胞は生体防御上重要な自然免疫担当細胞であり、スフィンゴ糖脂質であるラクトシルセラミド (LacCer) は、これらの細胞に豊富に発現している。また、LacCer はコレステロールや様々なシグナル伝達分子と共に、特殊なマイクロドメインを形成している。これまでの研究から、LacCer がマイクロドメインを形成するだけでなく、*Candida albicans* 由来 β -グルカンを認識し、貪食や遊走を仲介する PRR として機能することを明らかにした (図 1)。

図1. ラクトシルセラミドのマイクロドメイン



2. 研究の目的

本研究では、抗酸菌特有の分子 (PAMPs)

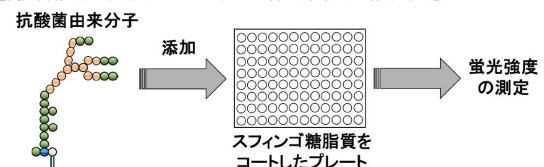
と貪食細胞に発現するスフィンゴ糖脂質との認識応答機構を明らかにすることを目的とした。そのためにまず、スフィンゴ糖脂質と抗酸菌特有の成分との結合特異性を比較・検討することとした。また、このような検討をした後、抗酸菌特有成分をコーティングしたポリスチレンビーズを作成し、貪食における PAMP-PRR 相互作用を人工的に作製することで、抗酸菌成分が貪食及び食胞成熟に及ぼす影響について調べることにした。このような検討を行い、ヒト自然免疫担当細胞における病原性抗酸菌の細胞内寄生機構へ、抗酸菌成分とスフィンゴ糖脂質との相互作用がどのような影響を与えているのかを明らかにし、最終的にはこれらの相互作用を標的とした薬剤の開発に結びつけることを目的としている。

3. 研究の方法

1) スフィンゴ糖脂質と LAM との結合実験

本実験では、エタノールへ溶解した GM1、GM3、LacCer などの各種スフィンゴ糖脂質を 96 穴プラスチックプレートへコーティングし、ブロッキングした後、ビオチン化した結核菌、*Mycobacterium avium-intracellulare* complex 及び *M. smegmatis* 由来のリポアラビノマンナン (LAM) とインキュベーションした。その後、蛍光標識ストレプトアビジンあるいは HRP 結合ストレプトアビジンとインキュベートし、検出を行った (図 2)。

図2. 抗酸菌由来分子とスフィンゴ糖脂質との結合実験

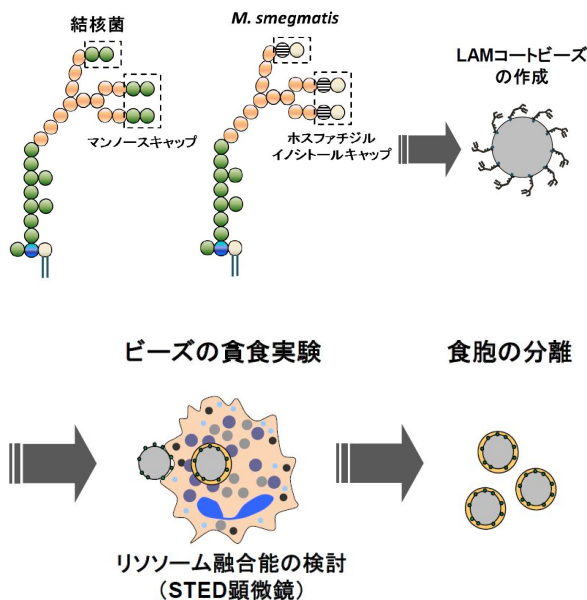


2) LAM コートポリスチレンビーズの貪食実験

結核菌ならびに *M. smegmatis* 由来 LAM を

ポリスチレンビーズへのコーティングし、LAMコートポリスチレンビーズを作製した(図3)。また、それらをヒト末梢血由来好中球へ非オプソニン条件下で45分間貪食させて、貪食能とリソソーム融合能について検討した。リソソーム融合能については、好中球へ予めLysoTracker Red DND-99を取り込ませた後LAMコートポリスチレンビーズを貪食させる場合と、LAMコートポリスチレンビーズを貪食させた後細胞を固定し抗lysosomal-associated membrane protein (LAMP)-3抗体により免疫染色する場合を試みた。また、これらの試料を超解像度顕微鏡(STED)により観察し、分子の発現パターン並びに蛍光強度の解析を行った。

図3. LAMコートポリスチレンビーズの作製と貪食実験



3) 食胞分離と免疫沈降実験

ヒト好中球へLAMコートポリスチレンビーズを貪食させた後、細胞をN₂cavitation法により破碎し、細胞内で形成されるファゴゾーム(食胞)をNycodenz密度勾配遠心法により分離した。また、分離ファゴゾームを界面活性剤入りのLysis bufferに溶解し、ダウンスホモゲナイザーにより破碎した。次にこれらの溶液から抗LacCer抗体を用いて免

疫沈降を行い、磁気ビーズによるプルダウンを行った。さらに、免疫沈降物に対して、Hckなどの情報伝達分子に対する特異抗体によるウェスタンブロッティング解析を行った。

4. 研究成果

本研究では、抗酸菌の病原性の有無に係らず、LAMとスフィンゴ糖脂質であるラクトシルセラミド(LacCer)が、特異的に結合することを明らかにした。さらには、病原性抗酸菌特有のLAMをコートしたポリスチレンビーズへは、非病原性由来のLAMをコートしたポリスチレンビーズと比較して、リソソーム融合が起こらず、その融合にはSrc family情報伝達分子のHckが重要であることを明らかにした。しかしながら、LAMのどのような構造が、貪食細胞によるLacCerを介した自然免疫応答に重要なのかは未だに不明のままである。そのため今後は、『LacCerがLAMのどのような構造を認識するのか』、『構造の違いが食胞成熟を含む細胞応答へどのような影響を与えるのか』に着目して研究を進めていきたい。このような点に着眼して研究を推進することで、新たな抗酸菌感染症治療薬の開発に結びつくことが期待される。

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5件)

Iwabuchi K, Masuda H, Kaga N, Nakayama H, Matsumoto R, Iwahara C, Yoshizaki F, Tamaki Y, Kobayashi T, Hayakawa T, Ishii K, Yanagida M, Ogawa H, Takamori K: Properties and functions of lactosylceramide from mouse neutrophils. *Glycobiology*, 査読有, 2015 *in press*.

Doi:10.1093/glycob/cwv008.

Chiricozzi E, Ciampa MG, Brasile G, Compostella F, Prinetti A, Nakayama H, Ekyalongo RC, Iwabuchi K, Sonnino S, Mauri L: Direct interaction, instrumental for signaling processes, between LacCer and Lyn in the lipid rafts of neutrophil-like cells. *J Lipid Res*, 査読有, 56(1), 2015, 129-41. Doi:10.1194/jlr.M055319.

Ekyalongo RC, Nakayama H, Kina K, Kaga N, Iwabuchi K: Organization and functions of glycolipid-enriched microdomains in phagocytes. *Biochim Biophys Acta*, 査読有, 1851(1), 2015, 90-7. Doi:10.1016/j.bbailip.2014.06.009.

Nakayama H and Iwabuchi K: Glycosphingolipid-Receptor Interactions in the Innate Immune Responses. *Glycoscience: Biology and Medicine*, 査読有, Part VII, 2014, pp699-705. Doi:10.1007/978-4-431-54836-2_141-1.

Oizumi A, Nakayama H, Okino N, Iwahara C, Kina K, Matsumoto R, Ogawa H, Takamori K, Ito M, Suga Y, Iwabuchi K: *Pseudomonas*-derived ceramidase induces production of inflammatory mediators from human keratinocytes via sphingosine-1-phosphate. *PLoS One*, 査読有, 9(2), 2014, e89402. Doi:10.1371/journal.pone.0089402.

H. Nakayama and K. Iwabuchi: Lactosylceramide mediates innate immune responses depending on PAMPs in human neutrophils. Joint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) and the Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR). Honolulu, Hawaii, United States, Nov 2014.

中山仁志, 玉木友樹, ルーディ チミンチ イキャロンゴ ボ ラウエレ, 栗原秀剛, 岩淵和久: リポ多糖はヒト好中球におけるラクトシルセラミドを介したシグナル伝達機構を活性化する. 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 平成 26 年 10 月

中山仁志, 玉木友樹, ルーディ チミンチ イキャロンゴ ボ ラウエレ, 岩淵和久: ヒト好中球における CD14 依存性 LPS シグナルはラクトシルセラミドのマイクロドメインにより仲介される. 第 7 回セラミド研究会, 東京, 平成 26 年 10 月

中山仁志, 岩淵和久: 病原性抗酸菌によるラクトシルセラミドを利用した食胞成熟回避機構について. 難治疾患共同研究拠点集会「糖鎖免疫 Glyco-Immunology 2014」, 東京医科歯科大学 M&D タワー, 平成 26 年 2 月

中山仁志, 栗原秀剛, 森田康裕, 木下タロウ, 高森建二, 小川秀興, 岩淵和久: 病原性抗酸菌のラクトシルセラミドを利用したヒト好中球食胞成熟回避機構. 第 6 回セラミド研究会, 北海道大学学術交流会館, 平成 25 年 11 月

[その他]
ホームページ等
http://www.nurs.juntendo.ac.jp/education/teacher/profile_nakayama.html

(1)研究代表者

中山 仁志 (Nakayama, Hitoshi)

順天堂大学・医療看護学部・助教

研究者番号 : 70514933