

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293094

研究課題名(和文) 真菌感染防御機構の分子基盤

研究課題名(英文) Anti-fungal Immunity

研究代表者

西城 忍 (Saijo, Shinobu)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：60396877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：真菌の多くは環境中あるいは宿主に常在し、通常は病原性を示さない。そのため、これまでその病原性に対する重要性は見過ごされることが多くあった。そこで、本研究では最終的に真菌感染治療薬の標的を見出すことを目的に、真菌感染防御機構の分子基盤を明らかにすることを目的とし研究を行った。その結果、病原真菌の感染防御には糖鎖を認識する宿主分子が、協調的に関与していることを明らかにした。また、病原真菌の慢性感染マウスモデルの確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：Myeloid cells act central roles in inflammatory responses. C-type lectin receptors (CLRs) are key players that are expressed mainly in these cells to orchestrate immune responses for maintaining immune homeostasis. These receptors recognize carbohydrate structures in microbes, including fungi, bacteria, viruses, and parasites, as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Owing to the activities, the pleiotropic roles of CLRs has been suggested to have an important effect on homeostasis in the body. In this study, we found that collaboration of several C-type lectins are important in anti-fungal immunity.

研究分野：実験動物学

キーワード：C-type lectin 遺伝子改変動物 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

Candida albicans (*C. albicans*)は、健常な宿主に常在し、微生物叢を構成する真菌の一つと考えられている。一方で、免疫不全の状態では致死性の病態を引き起こすこと、健常人においても時として感染症を引き起こすことなどから、日和見感染の原因菌としても重要である。

C. albicans の感染防御機構に関し、研究代表者らは C 型レクチンファミリーに属する Dectin-1 と Dectin-2 が重要な役割を果たしていることを見出した (Saijo et al., *Nat. Immunol.*, 2007, Saijo et al., *Immunity*, 2010)。その結果、これまであまり重要性が認識されていなかった真菌感染防御の分子機構に関し、注目が集められたが、未だ不明な部分を多く残している。

2. 研究の目的

C 型レクチンは膜タンパク質で、細胞外の CRD と呼ばれる領域で糖鎖を認識する。これまで、DC やマクロファージに発現する C 型レクチンの機能はほとんど不明であったが、申請者らは、Dectin-1、Dectin-2 がそれぞれ別個の真菌細胞壁糖鎖を認識することにより感染防御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。しかし、これらの C 型レクチン以外にも真菌感染防御に関与する分子が存在する可能性を示唆する予備データを得た。そこで、本研究では *C. albicans* に対する感染防御機構を包括的に解明することを目指し、研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) Dectin-1 と Dectin-2 の collaboration 機構の解析

これまでに作成した Dectin-1、Dectin-2 の KO マウスをもとに、これらの二重欠損マウス (Dectin-1/-2 DKO マウス) を作成し、真菌感染防御における役割を検討する。

WT マウスおよび Dectin-1/-2 DKO マウスよりマクロファージを単離し、蛍光標識した *C. albicans* を取り込ませ、コンフォーカル顕微鏡で観察する。

(2)慢性 *C. albicans* 感染モデルの作成

C. albicans はヒト皮膚常在真菌で、通常は顕在性疾患を引き起こさない。一方、幼少時より皮膚、粘膜に難治性 *C. albicans* 感染を発症する患者の存在や、AIDS 患者、あるいは健常人においても抗生物質摂取による皮膚 *C. albicans* 感染の発症は古くから知られている。しかし、発症機構の多くは不明である。その原因の一つとして、適切な実験系が存在しないことがあげられる。そこで、マウスでの *C. albicans* 皮膚感染モデルの確立と、皮膚での感染防御メカニズムを検討する。

(3)Dectin-1 による常在菌の制御機構の解明
Dectin-1 リガンドである グルカンは、食品中や腸管常在菌の構成成分にも含まれる。そ

こで、Dectin-1 KO マウスや Dectin-1 アンタゴニストを用いて、Dectin-1 による常在菌の制御機構に関して検討する。

4. 研究成果

(1) Dectin-1 と Dectin-2 の collaboration 機構の解析

Dectin-1 と Dectin-2 は、真菌細胞壁構成糖鎖のうち、異なる構造を認識する。申請者らは、Dectin-1 KO マウスでは WT マウスと差が見られない一方で、Dectin-1/-2 DKO マウスでは Dectin-2 単独 KO マウスと比較し、有意にサイトカイン産生や感染後の生存率が低下することを見いだした。また、Dectin-1/-2 DKO マウスのマクロファージではサイトカイン産生が完全に抑制されている一方で、*C. albicans* の細胞内への取り込みは阻害されておらず、他の分子によって取り込まれた真菌が細胞内小胞で Dectin-1、Dectin-2 に認識されることでサイトカイン産生を誘導している可能性が示された。

(2)慢性 *C. albicans* 感染モデルの作成

マウス背部の被毛を取り除き、 10^7 CFU の *C. albicans* 懸濁液を含ませたガーゼを貼付、滅菌フィルムで密封した。7 日後に密封を解除し、感染部位の観察、病理像の解析、CFU アッセイなどの解析を行った。その結果、野生型 (WT) マウスでは、感染 7 日後には完全に真菌を排除している一方で、IL-17A/F DKO マウスでは膿疱形成を伴うカンジダ症を発症しており、CFU アッセイの結果でも WT マウスと比較し、約 1,000 倍程度コロニー数が増加していた。これらの結果から、皮膚感染でも IL-17A あるいは IL-17F、またはその両方が感染防御に重要であることが示された。大変興味深いことに、Dectin-1/-2 DKO マウスでも WT マウスと同様に *C. albicans* を完全に排除し、Dectin-1 も Dectin-2 も皮膚表面での感染防御には関与していないことが示唆された。

(3)Dectin-1 による常在菌の制御機構

我々は食品に含まれる グルカンの受容体が C 型レクチンの一つ Dectin-1 であることを示し、腸管で Dectin-1 が活性化されると IL-17 の誘導を介して抗菌タンパク質が産生されること、その結果、*Lactobacillus* の増殖が抑制されることを示した。逆に Dectin-1 欠損マウスでは、抗菌タンパク質が減少するため *Lactobacillus* が増殖し、その結果抑制性 T 細胞である Treg が増加して大腸炎の発症や食物アレルギーが抑制されることを明らかにした。同様の結果は、Dectin-1 アンタゴニストである短鎖 グルカンの投与によっても得られること、さらに短鎖 グルカンはヒトでも *Lactobacillus* の増殖を促進することを見出した。これらの結果は、食品や常在細菌がもつ、他の様々な自然免疫受容体リガンドも、同様に腸管の自然免疫受容体に働きかけて腸管の微生物叢を制御している可能性を示

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 21 件)

1. Kimura Y, Inoue A, Hangai S, Saijo S, Negishi H, Nishio J, Yamasaki S, Iwakura Y, Yanai H, Taniguchi T. The innate immune receptor Dectin-2 mediates the phagocytosis of cancer cells by Kupffer cells for the suppression of liver metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113:14097-14102, 2016.
2. Wittmann A, Lamprinaki D, Bowles KM, Katzenellenbogen E, Knirel YA, Whitfield C, Nishimura T, Matsumoto N, Yamamoto K, Iwakura Y, Saijo S, Kawasaki N: Dectin-2 recognises mannosylated O-antigens of human opportunistic pathogens and augments lipopolysaccharide activation of myeloid cells. *J Biol Chem*, 291:17629-38, 2016.
3. Lee MJ, Yoshimoto E, Saijo S, Iwakura Y, Lin X, Katz HR, Kanaoka Y, Barrett NA: hosphoinositide 3-Kinase δ Regulates Dectin-2 Signaling and the Generation of Th2 and Th17 Immunity. *J Immunol*, 197: 278-87, 2016.
4. Yoshikawa FS, Yabe R, Iwakura Y, de Almeida SR, Saijo S: Dectin-1 and Dectin-2 promote control of the fungal pathogen *Trichophyton rubrum* independently of IL-17 and adaptive immunity in experimental deep dermatophytosis. *Innate Immun*, 5: 316-24, 2016.
5. Higashino-Kameda M, Yabe-Wada T, Matsuba S, Takeda K, Anzawa K, Mochizuki T, Makimura K, Saijo S, Iwakura Y, Toga H, Nakamura A: A critical role of Dectin-1 in hypersensitivity pneumonitis. *Inflamm Res*, 65: 235-44, 2016.
6. Akahori Y, Miyasaka T, Toyama M, Matsumoto I, Miyahara A, Zong T, Ishii K, Kinjo Y, Miyazaki Y, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K: Dectin-2-dependent host defense in mice infected with serotype 3 *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Immunol*, 17: 1, 2016.
7. Tang C, Kamiya T, Liu Y, Kadoki M, Kakuta S, Oshima K, Hattori M, Takeshita K, Kanai T, Saijo S, Ohno N, Iwakura Y: Inhibition of Dectin-1 Signaling Ameliorates Colitis by Inducing Lactobacillus-Mediated Regulatory T Cell Expansion in the Intestine. *Cell Host Microbe*, 18: 183-97, 2015.
8. Akitsu A, Ishigame H, Kakuta S, Chung SH, Ikeda S, Shimizu K, Kubo S, Liu Y, Umemura M, Matsuzaki G, Yoshikai Y, Saijo S, Iwakura Y: IL-1 receptor antagonist-deficient mice develop autoimmune arthritis due to intrinsic activation of IL-17-producing CCR2(+)V γ 6(+) $\gamma\delta$ T cells. *Nat Commun*, 6: 7464, 2015.
9. Uryu H, Hashimoto D, Kato K, Hayase E, Matsuoka S, Ogasawara R, Takahashi S, Maeda Y, Iwasaki H, Miyamoto T, Saijo S, Iwakura Y, Hill GR, Akashi K, Teshima T: α -Mannan induces Th17-mediated pulmonary graft-versus-host disease in mice. *Blood*, 125: 3014-23, 2015.
10. Herbst S, Shah A, Mazon Moya M, Marzola V, Jensen B, Reed A, Birrell MA, Saijo S, Mostowy S, Shaunak S, Armstrong-James D: Phagocytosis-dependent activation of a TLR9-BTK-calcineurin-NFAT pathway co-ordinates innate immunity to *Aspergillus fumigatus*. *EMBO Mol Med*, 7: 240-58, 2015.
11. Nakamura Y, Sato K, Yamamoto H, Matsumura K, Matsumoto I, Nomura T, Miyasaka T, Ishii K, Kanno E, Tachi M, Yamasaki S, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K: Dectin-2 deficiency promotes Th2 response and mucin production in the lungs after pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 83: 671-81, 2014.
12. Bertuzzi M, Schrettl M, Alcazar-Fuoli L, Cairns TC, Muñoz A, Walker LA, Herbst S, Safari M, Cheverton AM, Chen D, Liu H, Saijo S, Fedorova ND, Armstrong-James D, Munro CA, Read ND, Filler SG, Espeso EA, Nierman WC, Haas H, Bignell EM: The pH-responsive PacC transcription factor of *Aspergillus fumigatus* governs epithelial entry and tissue invasion during pulmonary aspergillosis. *PLoS Pathog*, e1004413, 2014.
13. Yonekawa A*, Saijo S*, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-Hora M, Akashi K, Yamasaki S: Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity*, 41: 402-13, 2014. *equal contribution
14. Chiba S, Ikushima H, Ueki H, Yanai H, Kimura Y, Hangai S, Nishio J, Negishi H, Tamura T, Saijo S, Iwakura Y, Taniguchi T: Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *elife*, e04177, 2014.
15. Norimoto A, Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Yokota M, Takahashi K, Saijo S, Iwakura Y,

- Nakajima H: Dectin-2 promotes house dust mite-induced Th2 and Th17 cell differentiation and allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 51: 201-9, 2014.
16. Öhman T, Teirilä L, Lahesmaa-Korpinen AM, Cypryk W, Veckman V, Saijo S, Wolff H, Hautaniemi S, Nyman TA, Matikainen S. Dectin-1 pathway activates robust autophagy-dependent unconventional protein secretion in human macrophages. *J Immunol*, 192, 5952-62, 2014.
 17. Akitsu A, Kakuta S, Saijo S, Iwakura Y: Rag2-deficient IL-1 Receptor Antagonist-deficient Mice Are a Novel Colitis Model in Which Innate Lymphoid Cell-derived IL-17 Is Involved in the Pathogenesis. *Exp Anim*, 63: 235-46, 2014.
 18. Kobiyama K, Aoshi T, Narita H, Kuroda E, Hayashi M, Tetsutani K, Kyoyama S, Mochizuki S, Sakurai K, Katakai Y, Yasutomi Y, Saijo S, Iwakura Y, Akira S, Coban C, Ishii KJ. Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111, 3086-91, 2014.
 19. Parsons MW, Li L, Wallace AM, Lee MJ, Katz HR, Fernandez JM, Saijo S, Iwakura Y, Austen KF, Kanaoka Y, Barrett NA: Dectin-2 regulates the effector phase of house dust mite-elicited pulmonary inflammation independently from its role in sensitization. *J Immunol*, 192, 1361-71, 2014.
 20. Ikeda S, Saijo S, Murayama MA, Shimizu K, Akitsu A, Iwakura Y: Excess IL-1 signaling enhances the development of TH17 cells by downregulating TGF- β -induced Foxp3 Expression. *J Immunol*, 192, 1361-71, 2014.
 21. Wang H, Lebert V, Hung CY, Galles K, Saijo S, Lin X, Cole GT, Klein BS, Wüthrich M: C-type lectin receptors differentially induce th17 cells and vaccine immunity to the endemic mycosis of north america. *J Immunol*, 192: 1108-19, 2014.

〔学会発表〕(計6件)

1. 西城 忍 自然免疫による病原体防御の新展開 日本インターフェロンサイトカイン学会学術集会 2016.5.13 (長崎大学坂本キャンパス良順会館、長崎市)
2. 西城 忍 真菌による IL-17 産生機構 AMED-CREST 慢性炎症若手研究者報告会 2016.6.15 (大阪アカデミア、大阪市)
3. 西城 忍 C型レクチンによる感染防御機構 第34回日本糖質学会

- 2015.7.31 (東京大学安田講堂、東京)
4. 西城 忍 細菌・真菌の細胞壁構成成分とC型レクチン受容体による認識 第24回内毒素・LPS研究会 2015.6.27 東京大学農学部中嶋董一郎記念ホール、東京)
5. 西城 忍 真菌感染防御機構におけるC型レクチンの役割 第26回微生物シンポジウム 2014.9.19(都市センターホテル、東京)
6. 西城 忍 真菌感染防御機構におけるC型レクチンの役割 第87回日本生化学会大会 2014.10.15 (京都国際会館、京都市)

〔図書〕(計2件)

1. Yabe R. and Saijo S. Dectin-2 in antimicrobial immunity and homeostasis. "*C-type lectin receptors in immunity*", Yamasaki S. ed. Springer Japan, 3-13, 2016.
2. Saijo S: Roles of C-type lectin receptors in inflammatory responses. "*Chronic inflammation*", Miiyasaka M. and Takatsu K. eds., Springer Japan 333-44, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://cytokine.pf.chiba-u.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西城 忍 (SAIJO SHINOBU)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授
研究者番号: 60396877

(2)研究分担者

岩倉 洋一郎 (IWAKURA YOICHIRO)

東京理科大学・生命医学研究所・教授
研究者番号: 10089120

米山 光俊 (YONEYAMA MITSUTOSHI)

千葉大学・真菌医学研究センター・教授
研究者番号: 40260335