

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670209

研究課題名(和文) 真菌感染に应答した自然免疫誘導に関与する新規感染センサーの同定

研究課題名(英文) Identification of a novel sensor molecule(s) for anti-fungal innate immune responses.

研究代表者

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

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)：本研究は、真菌感染に应答した宿主免疫応答を明らかにするため、真菌の細胞壁の糖鎖構造のひとつであるchitin(キチン)を検知する受容体分子を同定することを目的とした。マウスの骨髄細胞から調整した初代培養細胞を用いたDNAマイクロアレイ解析により、chitin刺激によって発現誘導される複数の遺伝子を同定し、それらの誘導が既知のシグナル経路を介しているのかについて遺伝子改変マウス由来の細胞を用いて検討した。その結果、未知のシグナル経路が存在する可能性と、複数のシグナルが複合して関与している可能性の両者が示唆され、今後の解析の端緒となる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we tried to identify a sensor molecule(s), which is responsible for detecting fungal cell wall component, chitin, in the host innate immune system. DNA microarray analysis using mouse bone marrow-derived dendritic cells and macrophages revealed that several cytokine genes are specifically induced by treatment of chitin. Activation of these genes were also observed in the cells prepared from MyD88 KO and CARD9 KO mice, suggesting multiple usage of these signaling molecules or existence of uncharacterized signaling pathway. These observations would help us to reveal molecular machinery of fungi-induced immune responses.

研究分野：分子生物学

キーワード：免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 病原真菌は、免疫力が低下した人に対して日和見感染症を起こすことが知られるが、健常人では免疫システムによって容易に排除されるため、ウイルスや細菌などと比較して、それらに起因する感染症についての基礎研究が遅れていると言わざるを得ない。しかし、近年の超高齢社会や高度医療社会を背景にして、日和見感染症としての真菌症が重要な問題になりつつある。また、国際化の進展により、本来は国内に存在しない高度病原性を持つ真菌によるいわゆる輸入真菌症による致死的な真菌症も増加しつつある。一方で、ハウスダストなどに含まれるカビを含む真菌は、アレルギー性疾患の誘発や重篤化に深く関与することが明らかになりつつあり、病原真菌による疾患発症の理解は、今後さらに重要な課題になると考えられる。

(2) 感染症を理解するためには、個々の病原体の生活環や病原性の分子機構を理解するとともに、それらの感染によって惹起される宿主生体防御メカニズムを理解することが必要不可欠である。中でも、我々ヒトを含む高等脊椎動物では、自然免疫と獲得免疫が協調して病原体排除を行っていることが知られ、これらを総合的に理解する必要がある。高等脊椎動物の自然免疫においては、様々な細胞が感染性微生物に特異的な分子パターン (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) を認識するメカニズムを備えている。PAMPs の認識に関与するセンサー分子はパターン認識受容体 (pattern recognition receptor: PRR) と呼ばれ、これまで複数の分子群の機能が明らかになっている。また PRR を介した自然免疫系の活性化は、その後に誘導される獲得免疫系の調節に重要な役割を担っており、その制御の破綻はアレルギーや自己免疫などの疾患へとつながることが知られている。従って、PRR の同定とその機能解析は、免疫システムの理解と免疫性疾患の克服のために非常に重要である。真菌の感染の検知は、その細胞壁を構成する糖鎖構造が複数の PRR によって検知されることが明らかにされている (図1)。

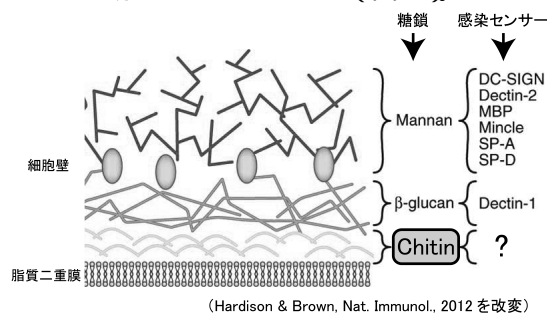


図1. 真菌細胞壁の構造と自然免疫の感染センサー
しかし、細胞壁の最下層に存在すると考えられるムコ多糖の一種である chitin (poly-N-acetylglucosamine) については、その検知メカニズムがほとんど明らかになっ

ていない。しかし一方で、chitin とアレルギー疾患の発症や重篤化には強い相関関係があることが示されており、機能的な受容体の同定とその機能解析は、重要な研究課題であると考えられた。

(3) 1990年代後半に初めて PRR として Toll 様受容体 (TLR) が発見されて以来、多くの PRR が同定され、その機能解析と生理機能が明らかにされてきた。研究分担者の西城らは、自己免疫疾患に関与する分子の K0 マウスを用いた解析を通じて、C-type lectin 様受容体 (CLR) である Dectin-1 と Dectin-2 が、いずれも真菌の細胞壁構成成分である β -glucan と α -mannan をそれぞれ PAMPs として検知する PRR であることを明らかにした (Saijo et al., *Nat. Immunol.*, 2007; Saijo et al., *Immunity*, 2010)。しかし、chitin の検知については、TLR2 や Dectin-1 の関与を示す報告があるものの、直接的な検知の分子機構について明確な報告はなく、未知のセンサー分子の存在の可能性も示唆されていた。一方で、研究代表者の米山らは、発現クローニング法を用いることで、ウイルス RNA を PAMPs として検知する PRR として RIG-I 様受容体 (RLR) を同定し、その抗ウイルス自然免疫誘導における重要性を明らかにしてきた (Yoneyama et al., *Nat. Immunol.*, 2004; Yoneyama et al., *J. Immunol.*, 2005)。従って、両者のこれまでの経験を有効に活かすことで、chitin による免疫誘導の分子機構を明らかにできる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、免疫系細胞膜上に発現していることが予想される chitin 受容体を同定し、その機能解析を目指した解析を行うこととした。すなわち、西城らによる遺伝子改変動物と免疫細胞を用いた真菌感染応答の解析技術と、米山らによる培養細胞を用いた遺伝子クローニング技術とを連携させることにより、機能的に chitin 検知に関与する分子の同定を行い、もし新規分子が同定できた場合には、その生理的な機能解析を行うことで、免疫制御機構とアレルギー疾患への関与を検討し、新たな真菌症・アレルギー疾患の治療戦略へつながる知見を得ることを目指すこととした。

3. 研究の方法

(1) chitin に対する細胞応答の詳細は明らかにされていないため、まず chitin 刺激による遺伝子発現を解析することにより、標的となる遺伝子を明らかにする解析を行う。マウス骨髄細胞 (Bone marrow: BM) から造血幹細胞を調整し、顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) 存在下で培養することで初代培養樹状細胞 (BM-derived dendritic cell: BMDC) を調整する。また、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 存在下での培養により、

初代培養マクロファージ (BM-derived macrophage: BMM)も同様に調整し、それらに chitin 刺激を加えた時の遺伝子発現について検討を加える。chitinは、シグマ社から入手した製品 (甲殻類由来) 及び Dextra Lab 社のものを使用する。シグマ社の chitin は不溶性であるものの比較的粒子が細かいため、超音波処理をすることで、細胞に取り込まれる程度の粒子状にした後に、細胞培養上澄に添加する。Dextra Lab 社のものは、破碎が困難であるため、濃塩酸処理により部分的に加水分解することで、細胞に取り込ませることとする。また、chitinをより強く加水分解して生成する短鎖で水溶性の N-acetyl-chito-oligosaccharide (NA-COS) (焼津水産化学工業社製) を対照として用いる。それぞれの chitin 関連分子による免疫誘導活性が異なることが予想されるため、それぞれの刺激による遺伝子発現を比較することで、長鎖 chitin 刺激に対する標的となる遺伝子を明確にする。遺伝子解析の方法としては、アレルギーに注目した遺伝子を選抜したフォーカストマイクロアレイチップ (三菱レーヨン社) を用いる。DNA マイクロアレイが不調の場合には、次世代シーケンサーを用いたより網羅的な解析も考慮する。

(2) 候補として選択された遺伝子について、上記した初代培養細胞や培養細胞を用い、定量 PCR を実施することにより、それぞれの遺伝子の chitin 刺激に応答した発現誘導を確認し、最適な標的遺伝子を選択する。

(3) 標的遺伝子の情報をもとに、chitin 刺激に応答したレポーター細胞とシグナル検出系を作成する。研究代表者らはこれまでに、I 型インターフェロン遺伝子の発現制御配列にホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーター細胞を用い、ウイルスセンサーである RLR を発現クローニングによって同定した実績があり、それを応用する。ルシフェラーゼのほか、Green Fluorescent protein なども考慮する。具体的には、遺伝子プロファイリングの情報より chitin 受容体を発現していることが予想される細胞を用いて発現 cDNA ライブラリーを作成し、そのライブラリーをプールに分けて調整した後、通常は chitin に応答しないことを確認したレポーター細胞に遺伝子導入してから chitin 刺激を行い、レポーター遺伝子の活性を上昇させるプールを選択する。レポーター活性を認めたプールからプラスミドを回収し、活性を持つ cDNA クローンを同定し、挿入されている cDNA の配列を決定する。同定した候補遺伝子に対する siRNA を作成し、各種細胞での遺伝子抑制実験を行い、chitin 応答への関与を明らかにする。また、必要に応じて遺伝子改変マウスを入手あるいは作出し、より生理的な解析も視野に入れる。一方で、複数の遺伝子産物が chitin 検知に関与する場合は、発現

クローニング法では同定が困難であることが予想される。その場合は、siRNA ライブラリーなどを用いた遺伝子発現抑制系を用いたスクリーニングも考慮する。

4. 研究成果

(1) DNA マイクロアレイ法により、chitin (シグマ社製) 刺激による遺伝子発現プロファイリングを行った。骨髄細胞から調整した樹状細胞及びマクロファージを用いた解析の結果、複数の遺伝子が、chitin 刺激により誘導されることを見出した。野生型マウス由来の樹状細胞には、炎症性サイトカインであるインターロイキン 1β (IL- 1β)、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、ケモカインである Ccl3、Ccl4、Cxc12、インターフェロン誘導遺伝子として知られる ISG15 といった遺伝子の発現が有意に上昇していた。一方で、マクロファージでの同様の解析では、上記の樹状細胞で検出された遺伝子群に加え、多くのサイトカイン、ケモカイン、細胞表面分子、シグナル伝達分子などの発現上昇が観察された。いずれの場合も NA-COS ではほとんど誘導が観察されなかったことから、長鎖 chitin がこれらの遺伝子の誘導に関与していることが示唆された。一部の遺伝子の発現パターンを図 2 に示す。

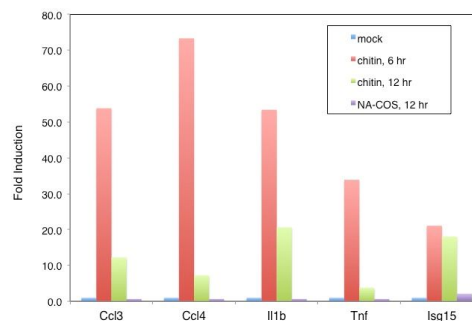


図2. 骨髄由来マクロファージにおける遺伝子発現誘導

(2)次に、これらの遺伝子発現が既知のシグナル伝達経路に依存したものであるか否かを検討するため、TLR を介したシグナルの下流のアダプターである MyD88 及び CLR を介したシグナルの下流アダプターである CARD9 をそれぞれ欠失したマウス (KO マウス) から同様に初代培養細胞を調整し、同様の解析を行った。その結果、MyD88 KO 由来の細胞では、野生型に比較して若干の発現低下は見られたものの、多くの遺伝子で明らかな発現誘導が観察された。一方で、CARD9 KO 細胞においては、むしろ野生型を上回る遺伝子発現が検出されたことから、本実験系においては、chitin を介したシグナルは MyD88 あるいは CARD9 いずれかに依存している単独のものではないことが明らかになった。従って、chitin を介したシグナルは、少なくとも TLR-MyD88 を介したシグナルが一部を担っている可能性があるものの、それ単独では不

分であり、加えて CARD9 以外の何らかのシグナル分子を介した経路が存在し、それらが協調的に働いている可能性を強く示唆していた。すなわち、ここに未知のシグナル経路が重要な役割を担っている可能性も十分に考えられることから、得られた結果は、今後の解析の報告性について重要な意味を示していると考えられた。

(3)次に、DNA マイクロアレイで得られた結果について再現性を得るために、一部の遺伝子に焦点を絞り、定量 PCR 法によりその発現誘導を確認した。また同時に、上記の解析で使用した超音波処理したシグマ製の chitin に加え、同サンプルを部分的に加水分解した場合、また Dextra Lab 社の chitin を同様に処理した場合を比較検討することで、異なる chitin サンプルでも同様の遺伝子誘導が見られるかどうかを確認した。標的遺伝子としては、樹状細胞とマクロファージの両方で顕著な発現増強が観察された IL-1 β と ISG15 を選択した。その結果、定量 PCR 法によっても DNA マイクロアレイの結果が再現され、両遺伝子の有意な発現誘導が観察された。しかし一方で、異なる調整法によって用意した chitin サンプルを用いた場合、その誘導能の強弱には大きなばらつきが見られたことから、その再現性について詳細に検討する必要が示唆された。このことは、chitin 鎖の長さや不溶性粒子の大きさなどにより、細胞への取り込みや受容体を介したシグナル誘導能が大きく影響される可能性を示唆しており、今後の解析において慎重な検討が必要であると考えられた。

(4)本研究により、マウス由来の BMDC 及び BMM における chitin 刺激に応答した標的遺伝子について、候補となる複数の遺伝子を同定することができた。残念ながら、これらの情報を用いたレポーター細胞の作成、さらには直接認識に関与する分子の同定までは、研究期間中に進行することはできなかったが、萌芽研究としては一定の成果が得られたと考えられる。本研究で得られた知見をさらに進めることで、将来的に真菌の感染検知とシグナル伝達の分子機構と生理機能までつなげることができれば、アレルギー疾患などへの関与あるいは新規真菌症治療戦略の開発へつながる可能性があると考ええる。なお、本研究の成果が、当初予定していたものに比較して進行に遅延が見られ、明確な成果の発表を行える段階にまで到達することができなかったことは反省すべき点である。これは、不溶性である chitin を用いた実験が技術的に困難であり、chitin の調整法により結果にばらつきが見られた点などが理由として挙げられる。今後、さらに慎重に条件検討と再現性を見極めた上で、解析を進めてゆく必要があると考えられる。

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0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[その他]

ホームページ等

千葉大学真菌医学研究センター感染免疫分野ホームページ

http://www.pf.chiba-u.ac.jp/bunya_kanse_nneneki/

千葉大学真菌医学研究センターホームページ

<http://www.pf.chiba-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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