

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04729

研究課題名(和文) 脂質センサー型ITAM受容体による抗酸菌特異的脂質の認識と結核病態の制御

研究課題名(英文) Regulation of innate immune response to mycobacteria through the recognition of immunoregulating cell wall lipids by ITAM-coupled receptors

研究代表者

原 博満 (hara, hiromitsu)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：20392079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸菌細胞壁の脂質成分は免疫を賦活化あるいは抑制する活性を有する。我々は、抗酸菌の免疫制御性脂質として知られるミコール酸(MA)およびフェノール糖脂質(PGL)を認識するDAP12会合型のITAM共役受容体を同定した。これらの受容体の欠損はこれら脂質に対するM<sub>φ</sub>の応答をほぼ完全に消失させた。また、MA受容体の活性化は抗酸菌増殖に許容的なM<sub>φ</sub>の動員を促すことが判った。MA受容体欠損マウスは、C型レクチンMincleを介した炎症応答が促進され、BCG菌の排除が促進されることが判った。従って、免疫制御性の抗酸菌脂質を認識するDAP12会合型受容体が、菌の免疫回避に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mycobacterial cell wall lipids have immune-stimulating or modulating activities. Several C-type lectin receptors associated with immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-bearing adaptor FcR $\gamma$  recognize mycobacterial glycolipids and play important roles in anti-mycobacterial immunity. On the other hand, previous studies suggested immunomodulatory role of DAP12, another ITAM-bearing adaptor, in anti-mycobacterial immunity, implicating the presence of DAP12-associated receptors that might recognize immunomodulatory ligands in mycobacteria. We identified two novel ITAM-coupled receptors that recognize the immunomodulatory mycobacterial lipids mycolate (MA) and phenolic glycolipids (PGL). Deficiency of these receptors in macrophages abrogated the response to these lipids. Activation of the MA receptor recruited mycobacterium permissive macrophages. Loss of the MA receptor enhanced mincle-induced inflammation in vivo and accelerated clearance of *M. bovis* BCG infected in mice.

研究分野：免疫学

キーワード：抗酸菌 ITAM CLR 自然免疫 マクロファージ 脂質

1. 研究開始当初の背景

結核は世界人口の約 1/3 が罹患する感染症である。成人肺結核に有効なワクチンは未だ無く、多剤耐性菌の出現や非結核性抗酸菌症例の増加も問題となっている。新規薬剤や効果的なワクチンを開発する上で宿主免疫系と抗酸菌の相互作用の理解は不可欠である。抗酸菌は、宿主免疫系とのインターフェースとなる細胞壁に免疫賦活化あるいは免疫抑制に働く多様な脂質を含む (図 1)。その主成分はミコール酸 (Mycolic acid: MA) であり、MA は極めて長鎖 (C70-90) の分岐アシル鎖を有する抗酸菌特有の脂肪酸である。MA は活動性結核菌では糖が付加した糖脂質 (Treharose di-mycolate (TDM) や Glucose mono-mycolate (GMM)) の形で菌表面に発現し、強い免疫賦活化及び肉芽腫形成能を有する。一方、休眠結核菌や肉芽腫内部の低酸素状態では糖化 MA 脂質の発現は低下し、非糖化 MA である Glycerol monoimycolate (GroMM) や遊離 MA (free MA: fMA) の発現が高まる。fMA はマクロファージ (Mφ) の活性化抑制やバイオフィルムの成分となつ病原性や薬剤耐性に寄与することが知られておる。

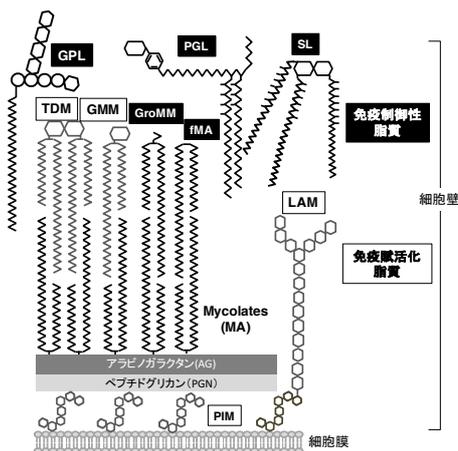


図1 免疫反応を制御する抗酸菌細胞壁の脂質成分  
 TDM, treharose-di-mycolate; GMM, glucose mono-mycolate; GroMM, glycerol mono-mycolate; fMA, free mycolate; PGL, phenolic glycolipid;  
 Man-LAM, mannose-capped lipoarabinomannan;  
 SL, sulfolipid; PIM, phosphatidylinositol mannoside; GPL, glycopeptidolipids

これまで、Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) 含有シグナルアダプター分子 FcRγ鎖と会合するいくつかの C 型レクチン (CLR) が、細胞壁の糖脂質成分を認識することで抗酸菌に対する防御的免疫応答を担うことが報告されている。その中でも Mincle は最もよく研究され、TDM の免疫賦活化性を媒介する必須の CLR として知られている。一方、FcRγとは別の ITAM 含有アダプター分子である DAP12 に関しては、その欠損マウスが BCG 菌および結核菌に対する抵抗性や肉芽腫形成が促進されることから、抗酸菌免疫応答にむしろ抑制的に働くことが示唆されている。このことから、DAP12 に会合する免疫抑制的受容体の存在が示唆されていた。

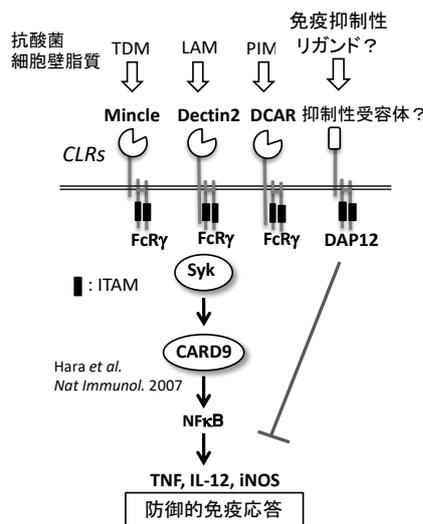


図2 CLR-FcRγ-CARD9シグナルを介した防御的免疫応答とDAP12シグナルを開始した制御

我々は、抗酸菌に結合する新規 ITAM 共役受容体を探索した結果、抗酸菌の細胞壁脂質の主成分であるミコール酸 (MA) に強く結合する DAP12 会合型のイムノグロブリンスーパーファミリー受容体を同定した (以下 MAR)。MAR および Mincle の欠損マウス由来の Mφ を用いて様々な MA 脂質に対する応答性を解析した結果、Mincle は MA 糖脂質 (TDM、GMM) に対するマクロファージ応答に必須であり、逆に MAR は非糖化 MA (GroMM、fMA) に対するマクロファージ応答に必須の役割を演じることを明らかにした。さらに面白いことに、MAR を欠損した Mφ では Mincle を介した応答が増強することを見出した。すなわち、MAR は Mincle を介した Mφ 活性化を負に制御していることが明らかとなった。

フェノール糖脂質 (PGL) は、我が国の臨床分離株の 7-8 割を占める高病原性結核菌 W 北京株の病原因子として同定された細胞壁脂質である。PGL は菌の最表層に発現して TLR のリガンドをマスクし、Mφ のサイトカイン産生を抑制する (Reed *et al.* Nature 2004) とともに、何らかの宿主受容体を介して菌増殖のリザーバーとなる iNOS 陰性の「許容的 Mφ」を CCR2 (MCP-1 受容体) 依存的に動員することでその病原性を発揮するとされる (Cambier *et al.* Nature 2014; Immunity 2017)。しかしながら、その生理活性を媒介する機構は明らかではなかった。我々は PGL 刺激に応答した Mφ 応答について解析し、それが DAP12 に依存することを見出した。そこで、DAP12 に会合型の ITAM 共役受容体を探索した結果、PGL に強い結合活性を示す受容体を同定した (以下、PGLR)。

2. 研究の目的

本研究では、我々が同定した抗酸菌免疫抑制性脂質を認識する ITAM 共役受容体 MAR および PGLR が媒介する自然免疫応答の性

質を分子および個体レベルで解析し、結核の病態形成および防御免疫における役割を明らかにする。これにより、脂質自然免疫を基盤とした結核制御の新戦略の構築を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) Mincle および MAR によって惹起される自然免疫応答の解析

Mincle リガンド TDM および MAR リガンド MA をマウスの腹腔内に投与し、誘導される腹腔内の TNF、MCP-1 産生、浸潤細胞中の iNOS 遺伝子の誘導および M $\phi$  のフェノタイプについて解析を行った。

(2) MAR による Mincle 応答制御の in vivo 解析

MAR による Mincle を介した M $\phi$  活性化の制御の in vivo 自然免疫応答における意義を明らかにするため、Mincle リガンドである TDM を MAR 欠損マウスに静脈投与し、それによって誘導される肺浮腫、胸腺萎縮、肺肉芽腫、サイトカインおよび iNOS 発現量に関して WT マウスと比較解析を行った。

(3) MAR の抗酸菌感染防御における役割の解析

MAR2 欠損およびコントロールマウスに *M. bovis* BCG (Tokyo 株) を腹腔内感染し、感染後 3 日目の腹腔内の浸潤細胞および菌数 (CFU) の比較解析を行った。

(4) M $\phi$  の PGL 応答における PGLR および DAP12 の役割の解析

PGLR の M $\phi$  応答における役割を明らかにするため、PGLR 欠損マウス由来の骨髄由来 M $\phi$  (BMM) を調製し、in vitro にて PGL 刺激を行った後、サイトカインおよびケモカイン産生に関して WT マウス由来 BMM と比較解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) Mincle および MAR によって惹起される自然免疫応答の解析

MA、TDM 接種の両方で同程度の数の M $\phi$  浸潤が観察された。MCP-1 の産生の誘導も両方で観察されたが、TNF 産生および iNOS 遺伝子の誘導は TDM のみで観察された。TDM 接種で動員された M $\phi$  は CD38<sup>hi</sup>/iNOS 陽性の M1 型 M $\phi$  であったが、MA で動員された M $\phi$  は CD38<sup>dull</sup>/iNOS 陰性のフェノタイプを示した。すなわち、MAR の活性化は、細胞内での殺菌力が虚弱な許容的 M $\phi$  を局所に誘導することが明らかとなった。

(2) MAR による Mincle 応答制御の in vivo 解析

MAR 欠損マウスでは、WT マウスに比べ顕著に肺浮腫、肉芽腫形成、胸腺萎縮が促進された。これに一致して、肺内の炎症性サイトカイン、ケモカイン、iNOS 遺伝子の発現量も

有意に上昇した。従って、MAR は Mincle を介した炎症応答を抑制していることが明らかとなった。

(3) MAR の抗酸菌感染防御における役割の解析

MAR 欠損マウスでは感染後の腹腔内への M $\phi$  動員数および MCP-1 産生が WT マウスに比べて有意に減少し、これに伴って BCG 菌の排除も WT に比べ有意に減少した。したがって、MAR は抗酸菌に対する防御自然免疫応答を負に制御していることが明らかとなった。

(4) M $\phi$  の PGL 応答における PGLR および DAP12 の役割の解析

WT マウス由来の BMM を PGL で刺激すると、TNF などの炎症性サイトカインの産生は観察できないが、MCP-1 産生のみが誘導されることが分かった。しかし、PGLR 欠損 BMM ではこの MCP-1 産生がほぼ完全に失われた。従って、PGLR は M $\phi$  の PGL に対する応答に必須の役割を演じることが明らかとなった。

### 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 10 件)

1. Murata K, Motomura Y, Tanaka T, Kanno S, Yano T, Onimaru M, Shimoyama A, Nishio H, Sakai Y, Oh-hora M, Hara H, Fukase K, Takada H, Masuda S, Ohga S, Yamasaki S, Hara T: Calcineurin inhibitors exacerbate coronary arteritis via the MyD88 signaling pathway in a murine model of Kawasaki disease. *Clinical & Experimental Immunology*. 2017 Jun 22. doi: 10.1111/cei.13002.
2. Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yoshida H: Pertussis toxin targets the innate immunity through DAP12, FcR $\gamma$ , and MyD88 adaptor proteins. *Immunobiology*. 2017, 222(4):664-671.
3. Kimura D, Miyakoda K, Kimura K, Honma K, Hara H, Yoshida H, and Yui K: IL-27-producing CD4<sup>+</sup> T cells regulate protective immunity during infection with malaria parasites. *Immunity*. 2016, 44:672-682.
4. 豊永憲司、飯笹英一、原博満: ITAM/ITIM 共役受容体によるパターン認識と自然免疫応答. *臨床免疫・アレルギー科* 66 (3):274-282 (2016) .
5. Uematsu T, Iizasa E-I, Kobayashi N, Yoshida H, and Hara H: Loss of

- CARD9-mediated innate activation attenuates severe influenza pneumonia without compromising host viral immunity. *Sci Rep.* 2015, 5:17577. doi: 10.1038/srep17577.
6. Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yoshida H: Evidence for TLR4 and FcRγ-CARD9 activation by cholera toxin B subunit and its direct bindings to TREM2 and LMIR5 receptors. *Mol Immunol.* 2015, 66(2):463-71.
  7. Mi-ichi F, Miyamoto T, Takao S, Jeelani G, Hashimoto T, Hara H, Nozaki T, and Yoshida H: Entamoeba mitosomes play an important role in encystation by association with cholesteryl sulfate synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015, 12(22):E2884-90.
  8. Hara H, Yokosuka T, Hirakawa H, Ishihara C, Yasukawa S, Yamazaki M, Koseki H, Yoshida H, and Saito T: Clustering of CARMA1 through SH3-GUK domain interactions is required for its activation of NF-κB signaling. *Nat Commun.* 2015, 6:5555. doi: 10.1038/ncomms6555.
  9. Phongsisay V, Hara H, Fujimoto S: Toll-like receptors recognize distinct proteinase-resistant glycoconjugates in *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *Mol Immunol.* 2015, 64(1):195-203. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.020.
  10. Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yamasaki S: 3-O-sulfo-β-d-galactose moiety of endogenous sulfoglycolipids is a potential ligand for immunoglobulin-like receptor LMIR5. *Mol Immunol.* 2015, 63(2):595-9. doi: 10.1016/j.molimm.2014.07.023.
- [学会発表] (計 19 件)
1. Iizasa E, Uematsu T, Kiyohara H, Chuma Y, Kubota M, Umemura M, Matsuzaki G, Yamasaki S, Yoshida H, Hara H: Two ITAM-coupled receptors recognizing mycobacterial mycolic acid-containing lipids and having the different roles. 第46回日本免疫学会学術集会 (仙台) 2017/12/12-14. 口頭発表
  2. 原博満: ITAM 共役受容体による抗酸菌脂質の認識と自然免疫応答の制御. 第36回日本認知症学会学術集会シンポジウム「アルツハイマー病脳内炎症の中核機構に迫る」(金沢) 2017/11/24-26. 招待講演
  3. Iizasa E, Uematsu T, Kiyohara H, Chuma Y, Kubota M, Umemura M, Matsuzaki G, Yamasaki S, Yoshida H, Hara H: Two distinct ITAM-coupled receptors recognize mycobacterial mycolic acid-containing lipids and differently regulate immune responses. Cytokines 2017 (5th Annual meeting of the International Cytokine & Interferon Society (Kanazawa, Japan). 2017/10/20-11/2. 口頭発表
  4. 原博満、飯笹英一: ITAM 共役型パターン認識受容体による抗酸菌脂質の認識と自然免疫応答の制御. 第27回樹状細胞研究会シンポジウム(東京)2017/6/30. 招待講演
  5. 豊永憲司、原博満、山崎晶: Identification of novel activating receptor for mycobacteria、第90回日本細菌学会総会シンポジウム～多様な研究分野から見えてくる抗酸菌学の魅力～、2017年3月19日、仙台、招待講演
  6. Toyonaga K, Hara H, Yamasaki S: The C-type lectin DCAR is an activating receptor for mycobacterial phosphatidyl-inositol mannoside、U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMS) 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases、2017年2月9日、韓国、口頭発表
  7. 飯笹英一、植松崇之、久保田未央、中馬康志、清原秀泰、三山英夫、梅村正幸、松崎吾朗、山崎晶、吉田裕樹、原博満: ミコール酸含有脂質を認識する自然免疫受容体とその免疫制御. 第1回抗酸菌研究会 (西原・沖縄) 2016/9/29-30.
  8. 豊永憲司、原博満、山崎晶: 結核菌を認識する新規活性化受容体の同定. 第1回抗酸菌研究会 (西原・沖縄) 2016/9/29-30.
  9. Ei' ichi Iizasa, Takayki Uematsu, Mio Kubota, Hideyasu Kiyohara, Yasushi Chuma, Goro Matsuzaki, Sho Yamasaki, Hiroki Yoshida, Hiromitsu Hara: Regulation of innate immune response to mycobacteria through DAP12 versus FcRγ-coupled myeloid receptors that recognize different mycolic acid-containing lipids. ICI2016 mini-symposium (Innate receptors & inflammasome) (Melbourne, Australia), 2016/8/21-26.
  10. 原博満、飯笹英一: ITAM 関連パターン認識受容体による抗酸菌認識と自然免疫応答の制御. 第27回日本生体防御学会学術総会シンポジウム「感染免疫応答の新局面」(福岡) 2016/7/7-9. 招待講演
  11. 原博満: ITAM 関連パターン認識受容体

によるミコール酸認識と結核免疫応答の制御. 平成 28 年度 日本 BCG 製造株式会社中央研究所研究報告会 (東京) 2016/6/30. 特別講演

12. 飯笹英一、植松崇之、久保田未央、清原秀泰、中馬康志、松崎吾朗、山崎晶、吉田裕樹、原博満: 結核菌のミコール酸含有脂質を認識する 2 つの受容体 IgSFR2 と Mincle による免疫制御. 第 81 回インターフェロン・サイトカイン学会シンポジウム「自然免疫による病原体防御の新展開」(長崎) 2016/5/13-14. シンポジウム演題に選出
13. 原博満: 第 81 回インターフェロン・サイトカイン学会シンポジウム「自然免疫による病原体防御の新展開」(長崎) 2016/5/13-14. Overview Talk・座長
14. 原博満: 脂質パターン認識受容体を介した結核免疫応答の制御. 第 9 回自己炎症研究会 (東京) 2016/2/6. 特別講演
15. 原博満: ITAM 関連受容体によるパターン認識と自然免疫応答. The 44th annual meeting of the Japanese Society for Immunology (Sapporo) 2015/11/18-20. **Overview Talk**
16. 原博満、飯笹英一、清原秀泰、中馬康志、矢野郁也、植松崇之、久保田未央、梅村正幸、山崎晶、松崎吾朗、吉田裕樹: 脂質センサー型 ITAM 受容体による結核自然免疫応答の制御. 沖縄感染免疫シンポジウム 2015 -結核の制圧に向けた基盤研究の現在- (那覇) 2015/7/31. 招待講演
17. 原博満、飯笹英一、清原秀泰、中馬康志、矢野郁也、植松崇之、久保田未央、梅村正幸、山崎晶、松崎吾朗、吉田裕樹: 脂質認識型 ITAM 受容体による結核菌の認識と自然免疫応答. 第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会大会シンポジウム「感染症」(東京) 2015/7/17-18. 基調講演
18. 原博満、飯笹英一、清原秀泰、中馬康志、矢野郁也、植松崇之、久保田未央、梅村正幸、山崎晶、松崎吾朗、吉田裕樹: 自然免疫 ITAM 関連受容体による結核菌脂質の認識と免疫応答. 第 26 回日本生体防御学会学術総会シンポジウム「自然免疫研究の新展開」(東京) 2015/7/10-12. 招待講演

[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

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~immuno1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原博満 ( HARA Hiromitsu )  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 20392079

(3) 連携研究者

山崎晶 ( YAMASAKI Sho )  
大阪大学・微生物病研究所・教授  
研究者番号: 40312946

(3) 連携研究者

松崎吾郎 ( MATSUZAKI Goro )  
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授  
研究者番号: 30229455

(3) 連携研究者

清原秀康 ( KIYOHARA Hideyasu )  
日本 BCG 研究所・第一研究科部・研究員  
研究者番号: 10514581

(3) 連携研究者

飯笹英一 ( IIZASA Eiichi )  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 20631998

(3) 連携研究者

前仲勝実 ( MAENAKA Katsumi )  
北海道大学・薬学研究科・教授  
研究者番号: 10322752

(3) 連携研究者

宮崎敦 ( MIYAZAKI Jun )  
国際医療福祉大学・医学部・教授  
研究者番号: 10550246