

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08737

研究課題名(和文) 微生物糖鎖を用いた免疫制御

研究課題名(英文) Immune control by polysaccharides derived from microbes

研究代表者

高原 和彦 (Takahara, Kazuhiko)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：90301233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症は、世界で年間約3千万人が発症し、日本においても30万人程度の患者、10～15万人程度の死亡者が出る。治療法は初期の炎症を薬剤で抑える方法が主流であるが、実際は後期に現れる免疫抑制状態による再感染等により死亡する例が約7割を占める。本計画では、病原体の免疫抑制機構を解析し、これを敗血症の治療に利用することを目的とした。

具体的には、日和見感染菌 *Candida albicans* の表面糖鎖がマウス敗血症の前期炎症に加えて後期免疫抑制状態の解除に働く事を示した。また、複雑な当該糖鎖構造中の α -マンノース構造が生体の免疫抑制性蛋白質 IL-10 の産生を介して上記の効果を発揮していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、病原性酵母由来の糖鎖が敗血症を改善する事を見いだした。糖鎖の作用機構を解析する中で、複雑な糖鎖から免疫を制御する蛋白質 (IL-10) の産生に働く部分を合成が可能な領域まで絞り込んだ。これにより、今後薬剤としての開発も可能になった。

また、本成果は病原性酵母戦略の一部を明らかにし、これを基に既存の薬剤により効果の認められない慢性化病原性酵母感染症の新たな治療法への開発へと繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： There are 2-3 million of sepsis patients per year in the world. In Japan, we approximately observe 300,000 sepsis patients, leading to 100,000 to 150,000 death per year. It is the major treatment of sepsis to suppress the initial inflammation by anti-inflammatory drugs. However, 70% of deaths are caused by hypo-immune responses induced in the late phase of sepsis. In this study, we attempted to identify an immune suppressive mechanism derived a pathogen, and applying it to new treatment of sepsis effective on the early and late phase.

We previously indicated that glycan in surface polysaccharides of opportunistic pathogen, *Candida albicans*, suppressed the initial inflammation. The we also found that the glycan ameliorate hypo-immune responses in the late phase of sepsis. In the glycan, alpha-mannan moieties in the glycan induced the effects though production of immune suppressive cytokine IL-10.

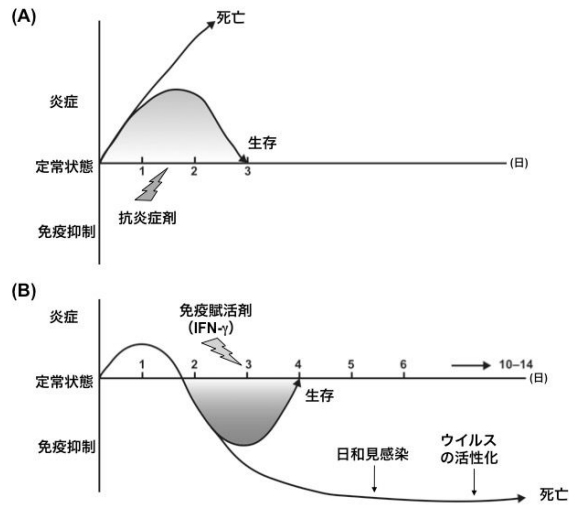
研究分野：免疫生物学

キーワード：微生物糖鎖 敗血症 免疫抑制 免疫賦活 *C. albicans* レクチン IL-10 IFN-gamma

1. 研究開始当初の背景

本来生体を護る免疫の異常は様々な疾患を引き起こす。例えば感染等による過剰な炎症は敗血症を惹起し、年間世界で約 2～3000 万人が罹患し（参考 NIGMS: https://www.nigms.nih.gov/education/Pages/factsheet_sepsis.aspx）発展途上国のみではなく先進諸国においてもその数が増加している。日本においては年間 30 万人程度の罹患患者、10～15 万人程度の死亡者があり、死亡率は 30～50%に達する。特に高齢者に多く、今後我が国でも患者数の増加が見込まれる。

敗血症の治療としては、感染初期の過剰な炎症をステロイド剤などの抗炎症剤および抗生物質で抑える方法が主流である（右図 A）。また、敗血症後期に強い免疫抑制状態（Hotchkiss et al: *Nature Rev Immunol* 13: 862, 2013）が誘導され、それにより再・日和見感染や潜伏ウイルスの活性化が起こり（右図 B）、その結果死亡する例も多数を占める。試験的な臨床の間では、この後期段階における免疫賦活剤のある IFN- γ 等の投与（Boomer et al: *Virulence* 5: 45, 2014）が行われる事があるが、免疫抑制状態をモニターする良好なマーカーは見いだされておらず、投与時期を誤ると非常に危険である。



敗血症は、免疫系細胞の病原体を認識する受容体 PRRs (Pattern recognition receptors) が菌体の様々な構成成分 (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) を認識して、その後開始される炎症応答により起きる。この PRRs としては toll-like receptor (TLR) およびレクチン等が挙げられる。TLR は病原体の多様な PAMPs を認識し炎症および Th1/17 応答を惹起する。他方、レクチンは樹状細胞 (DCs) およびマクロファージ (M ϕ) 等に発現され、菌体・ウイルス上の糖鎖構造を PAMPs として認識してそれらの取り込み・分解、および抗原提示などに働く事で感染防御に直接かつ多面的に働いている。

近年、レクチン研究の進展から、その感染防御以外における新たな働きが明らかに成りつつある。例えば、病原体を認識したヒトレクチン DC-SIGN は、DCs/M ϕ からの免疫抑制性の IL-10 産生を促し、これまでとは異なり免疫を抑える応答を誘導することが報告された。また、マウスにおいて、細胞内に抑制性のシグナル配列 ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) を有する DCIR1 (Dendritic cells Immunoreceptor 1) を欠失すると、T 細胞を介した自己免疫が自然発症すること (Maruhashi et al: *J Immunol* 194: 5681, 2015) から、DCIR1 の定常状態における免疫抑制的な働きが推察できる。さらに、他のグループから、我々の同定したマウス mDC-SIGN も単球の IL-10 産生を介して移植片の着生に働く事が報告された (Conde et al: *Immunity* 42: 1143, 2015)。そこで申請者は、レクチン分子が新たな免疫制御法を開発する為のターゲットになり得ると考えた。

2. 研究の目的

申請者は先に、マウス DC/M ϕ に発現するレクチンに着目し、ヒト DC-SIGN マウスホモログ mDC-SIGN, SIGNR1～4 を同定した (Park et al: *Int Immunol* 13: 1283, 2001)。この内、SIGNR1 は脾臓辺縁帯および常在性腹腔 M ϕ (rpM ϕ) の主要な糖レセプターであり、例えば *Candida albicans* 表面可溶性マンノプロテインの N-glycan 側鎖糖鎖中の α -mannose 構造を認識し (Takahara et al: *Infect Immun* 89: 1699, 2012)、菌体に対して Dectin-1/Syk と共同して ROS 産生を昂進すること (Takahara et al: *Eur J Immunol* 41: 1453, 2011) 並びに TLR2 と共同し TNF- α 産生を昂進する事を示した (Takahara: *Int Immunol* 24: 89, 2012)。この過程で、*C. albicans* およびその近縁種の N-glycans が、共にマンノースを構成糖鎖とするにも拘わらず、細胞および個体からの異なるサイトカイン産生誘導パターンを示す事に注目した。即ち、構成糖に依らず、それらから成る一定の構造が特定のサイトカインの産生を誘導する可能性が予想された。

他方、1970 年代に *C. albicans* に感染した患者の血液中に、遅延型皮膚過敏反応 (DTH) を抑制する物質の存在が報告された (Fischer et al: *J Clin Invest* 62: 1005, 1978)。申請者は先の基盤研究 (C) “C 型レクチンを介した微生物多糖による免疫応答制御” において、その免疫抑制物質が *C. albicans* 表面可溶性マンノプロテイン中の N-glycan であり、これがリポ多糖 (LPS) の存在下で M ϕ からの IL-10 を産生誘導する事、並びに LPS を用いたマウス敗血症モデルにおける TNF- α および IFN- γ 等炎症性サイトカインの産生を抑制し、初期死亡率を下げることを示した。この研究過程で、当該 N-glycan の投与が、敗血症誘導 1 週間後の DTH 反応の低下をキャンセルできるだけでなく、2 週間後における脾細胞の抗原特異的 IFN- γ 産生を 5～8 倍昂進するとの予

備的な知見を得た。即ち、当該 N-glycan は、敗血症後期の免疫抑制を回避するだけでなく抗原特異的免疫応答の維持を超えて促進に働く可能性が示された。

そこで申請者は、*C. albicans* の N-glycan 中にこの敗血症前期および後期の制御を担う特定の糖鎖構造が存在すると考えた。本計画では、N-glycan 中のその構造を明確にしさらに作用機作を明らかにする為に個体側レセプターの同定を行った。

3. 研究の方法

(1) マウスは、野生型マウスに加え SIGNR1 および Dectin-2 欠失マウスを使用した。

(2) *C. albicans* N-glycan の DTH への影響の検討

マウス左後肢足蹄にヒツジ赤血球 (2×10^6 個) を投与し、同時に Fehling 法により精製した *C. albicans* J-1012 株の N-glycan (400 μ g/マウス) および大腸菌 LPS (30 μ g/マウス) を静脈投与した。7 日後に右後肢足蹄に再度ヒツジ赤血球を投与し、24 時間後に足蹄の腫れを計測した。

(3) *C. albicans* および近縁菌由来 N-glycan の敗血症への影響の検討

各種 N-glycan (400 μ g/20 g 体重) を大腸菌 LPS (30 μ g/20 g 体重) と共にマウスに静脈投与し、経時的に血清内サイトカインを測定した。また、致死量の LPS (200 μ g/20 g 体重) および当該 N-glycan を腹腔内投与しその後の生存率を検討した。IL-10 中和抗体 (clone JES5-16E3, 50 μ g/20 g 体重) はリポ多糖と同時に投与した。

(4) 抗原特異的 IFN- γ 産生

敗血症誘導時にオボアルブミン (OVA) を投与し、1、2 および 4 週間後に脾細胞を調製して OVA で刺激し、1 日後の抗原特異的 IFN- γ 他のサイトカイン産生を測定をした。

(5) シグナル阻害実験

阻害剤として Genistein (Tyrosine kinase), Herbimycin A (Tyrosine kinase), PP2 (Src kinase), PP3 (PP2 control), DAG kinase inhibitor I (DAG kinase I), Rottlerin (PKC), AKT inhibitor (AKT1/2), SB 203580 (p38), PDTC (NF- κ B), SP600125 (JNK), Wortmannin (PI3K), L-744,832 (CaMK), NF-AT activation inhibitor III (NF-AT), GW5074 (Raf-1), Piceatannol (Syk) を用いた (括弧内はターゲット分子等)。先ず、*C. albicans* N-glycan をプレートにコートし、ここにマウス腹腔より精製した rpM ϕ および上記阻害剤を加え 1 時間培養した後、リポ多糖を加えて刺激した。24 時間培養後に、上清の IL-10 等のサイトカインを測定した。

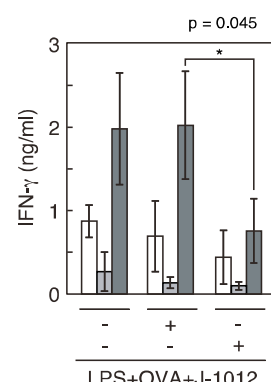
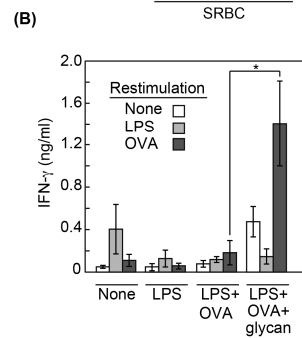
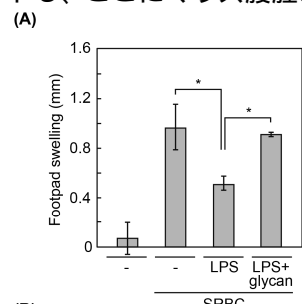
4. 研究成果

始めに、当該 N-glycan による免疫抑制解除を細胞性免疫が働くこととされる DTH を用いて再確認した。マウスの一方の後肢足蹄にヒツジ赤血球 (SRBC) を投与し、同時に LPS を静脈投与した。7 日後に SRBC を別の後肢足蹄に投与し足蹄の腫れを測定したところ、DTH の低下/免疫抑制状態が確認された (右図 A)。次に、LPS と共に *C. albicans* N-glycan を静脈投与したところ、腫れの程度が LPS の無い状態まで回復した。よって、当該 N-glycan の免疫抑制解除が個体レベルで確認された。

次に、抗原特異的な免疫抑制解除を検討する為に、マウスに LPS + OVA または LPS + N-glycan + OVA を静脈投与し、2 週間後に脾臓細胞を *in vitro* にて OVA で再刺激した。その結果、培養上清中の IFN- γ 産生量が 5~8 倍程度昂進した (右図 B)。一方で、免疫抑制性の IL-10 の産生には変化がなかった。同様の効果は、免疫後 1 および 4 週間後にも認められた。

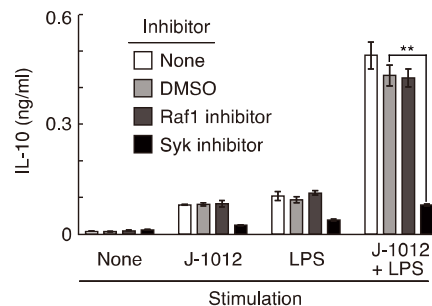
以上の結果より、*C. albicans* N-glycan が敗血症モデルにおいて後期免疫抑制を解除するだけでなく、抗原特異的免疫応答を促進する事が示唆された。

この抗原特異的 IFN- γ の産生に、敗血症惹起時の N-glycan による IL-10 産生が関与しているかを検討する為に、マウスに LPS + N-glycan + OVA に加え IL-10 中和抗体を投与したところ、後期における OVA 特異的 IFN- γ 産生の昂進が認められなくなった (右図)。よって、敗血症惹起時の N-glycan による IL-10 産生昂進が、初期の過剰な免疫応答と後期の免疫抑制の両局面の改善に働くことが示唆された。

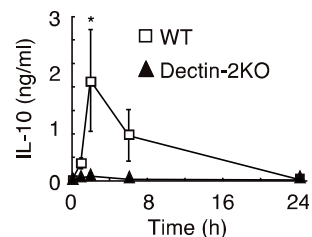


そこで次に、N-glycan による IL-10 産生における個体側のレセプターの同定を行った。先の結果では、腸管経由のマノース複合体の投与に対して免疫寛容を誘導する SIGNR1 の欠失マウスに敗血症を惹起しても、当該 N-glycan による IL-10 産生昂進は認められなかった。また、同マウス rpMφ を精製し、これを N-glycan および LPS で刺激したが IL-10 の産生に変化は認められなかった。

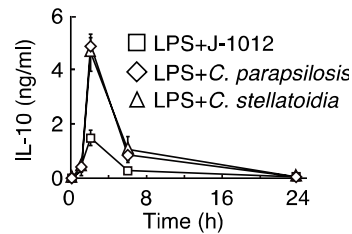
そこで、関与するレセプターの候補を絞る為に、rpMφ を N-glycan と LPS で刺激する系を用い、15 種のシグナル伝達関連分子阻害剤の影響を調べたところ、Syk キナーゼの阻害剤である Piceatannol が顕著に IL-10 の産生を阻害した (右図)。以上の結果より、当該 N-glycan を認識するレセプターとして、シグナル伝達に Syk を用い且つ *C. albicans* マンナンを認識する C 型レクチン Dectin-2 を想定した。



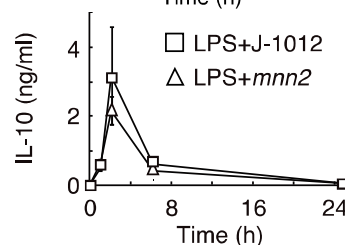
これを確認する為に、Dectin-2 の欠失マウスを用いて、N-glycan および LPS を投与し血液中の IL-10 産生を経時的に検討した。その結果、*in vivo* で顕著な IL-10 産生の低下を確認した (右図)。Dectin-2 欠損骨髄由来樹状細胞も N-glycan による IL-10 の産生能をほぼ欠いていた。よって、当該 N-glycan による個体レベルの敗血症改善効果には、Dectin-2 が働いている事が明らかになった。



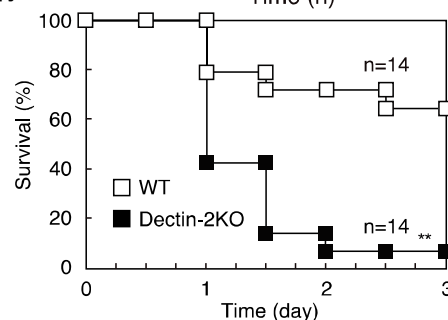
また、Dectin-2 が直鎖マンナンおよびマンノースコア構造を認識するとの報告に基づき、側鎖に直鎖マンナンのみを有する *C. stellatoidea* および *C. parapsilosis* 由来の N-glycan を検討したところ、個体にて *C. albicans* J-1012 の N-glycan と比較して 2-3 倍の IL-10 の産生誘導が確認された (右図)。



加えて、側鎖を含まずマンノースコアと $\alpha 1,6$ 結合の主鎖のみを含む *Saccharomyces cerevisiae* (*mnn2*) 変異体から精製した N-glycan によっても IL-10 の産生誘導が確認された (右図)。Dectin-2 は主鎖にある $\alpha 1,6$ 結合糖鎖配列を認識しないことが報告されているので、Dectin-2 は N-glycan のマンノースコア部分を認識し生体における IL-10 産生と免疫抑制に働いている事が示唆された。



最後に、Dectin-2 欠失マウスの *C. albicans* の N-glycan 存在下における敗血症への感受性を検討したところ、野生型マウスと比較して有意にその生存率が低下した (右図)。この結果は、当該糖鎖の敗血症改善の効果が Dectin-2 を介して発揮されていることを明確に示している。



以上の研究より、*C. albicans* N-glycan の α -mannan 側鎖とマンノースコアはマウス個体の Dectin-2 を介して免疫抑制性サイトカイン IL-10 の産生を誘導し、敗血症モデルにおいて初期炎症および後期免疫抑制状態の双方を改善する事が明らかになった。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Ishiguro, T.*, Fukawa, T.*, Akaki, K., Nagaoka, K., Takeda, T., Iwakura, Y., Inaba, K., and Takahara, K. (2017) Absence of DCIR1 reduces the mortality rate of endotoxemic hepatitis in mice. *Eur. J. Immunol.* 47, 704-712. (*equal contribution)

[学会発表](計 1 件)

Sudo, K and Takahara, K. (2018) Involvement of Dectin-1 in localization $\gamma\delta$ T cell in the skin. The 18th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology (国際学会)

[図書](計 1 件)

フロンティア生命科学 (2018)講談社 (13 章分担執筆)

〔その他〕

ホームページ等

<http://zoo.zool.kyoto-u.ac.jp/imm/>

6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。