

令和 2 年 4 月 1 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08888

研究課題名(和文) 病原性真菌による免疫抑制受容体を介した宿主免疫回避機構の解明と治療応用

研究課題名(英文) Immune evasion strategy of pathogenic fungi via inhibitory receptors

研究代表者

三宅 靖延 (Miyake, Yasunobu)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：10392143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：シアル酸認識受容体であるSiglec5と14が水虫の原因となる白癬菌トリコフィトン属を認識することを見出した。白癬菌はSiglec5と14を介して宿主免疫応答に干渉することが分かった。驚いたことに白癬菌におけるリガンドはシアル酸ではなく、トリアシルグリセロールとアルカンであった。さらに、Siglec5と14は他にも種々の脂質分子を認識することが明らかとなり、特に強いリガンドとしてカルジオリピンと5-PAHSAを見出した。これらの脂質分子の認識にはSiglec5と14のN末に存在する疎水性配列が重要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでSiglecはシアル酸を認識する受容体として様々な生命現象に関与することが明らかにされてきた。が、本研究によりSiglecが脂質リガンドを認識することが明らかになったことで、Siglecの生理的・病理的機能の理解が新たな方向へと進展する可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Siglecs are a family of cell-surface immune receptors that bind to sialic acid at terminal glycan residues. We found that Siglec5 and Siglec14 recognize pathogenic fungi, *Trichophyton* spp. *Trichophyton* spp modulated host immune responses via Siglec5 and 14. Biochemical approaches revealed that the Siglec ligands are fungal alkanes and triacylglycerols. Furthermore, Siglec5 weakly recognized several endogenous lipids. Among them, cardiolipin and 5-PAHSA exhibited potent ligand activity on Siglec5. Further, the hydrophobic stretch in the Siglec5 N terminus region was found to be required for efficient recognition of these lipids.

研究分野：免疫学

キーワード：レクチン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医療技術の高度化に伴う免疫不全患者の増加、人口の高齢化、HIV 感染者の蔓延などにより、このような患者に合併しやすい真菌症の臨床的重要性は高まっている。真菌症に対しては、抗真菌剤による除菌が主な治療方法であり、一定の効果を上げている。しかしながら近年、抗菌剤の乱用による多剤耐性菌の出現が社会問題化しており、抗真菌剤に頼らない新たな治療法開発の要請が高まっている。

申請者はこれまで、病原体を認識するレクチン受容体の研究に従事し、C 型レクチン受容体の MCL や Dectin-2 が結核菌を認識して、宿主免疫応答を惹起することを明らかにしてきた。この過程で、病原体認識の最前線であるマクロファージや樹状細胞に発現するレクチン受容体“Siglec”が、病原性真菌を認識することを見出した(未発表)。Siglec は、シアル酸を含む糖鎖構造を認識して、免疫細胞の活性化を負または正に制御する受容体である。申請者は、抑制型の Siglec5 と活性型の Siglec14 が、水虫の原因となる病原性真菌トリコフィトン属を認識することを見出している。このことは、トリコフィトン属が Siglec を介して宿主免疫応答に干渉している可能性を示唆している。そこで本研究では、トリコフィトン属による Siglec を介した免疫干渉機構の詳細を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

病原性真菌のトリコフィトン属が Siglec5 を介して宿主免疫応答を抑制するか、また Siglec14 を介して宿主免疫応答を活性化するかを明らかにする。

Siglec とトリコフィトン属の相互作用機構を分子レベルで解明する。具体的には、トリコフィトン属における Siglec のリガンドを同定し、Siglec におけるリガンド認識部位を特定する。

3. 研究の方法

Siglec5 と 14 の過剰発現細胞および欠損細胞を作成し、トリコフィトン属に対する免疫応答が変化するかを検討する。

生化学的手法によりトリコフィトンの成分を分画し、Siglec のリガンド認識をモニターできるレポーター細胞を用いて、リガンドの生成を行い、最終的には構造決定を行う。

4. 研究成果

ヒト単球系細胞株の THP-1 細胞は Siglec5 と 14 いずれも発現していない。ここに抑制型受容体 Siglec5 を発現させるとトリコフィトン属刺激による IL-8 産生が減弱し、逆に活性型受容体 Siglec14 を発現させると IL-8 産生が亢進した。別のヒト単球系細胞株 U937 細胞は Siglec5 のみを発現している。この内在性 Siglec5 を CRISPR-Cas9 により欠損させると、トリコフィトン属に対する IL-8 産生が亢進した。以上の結果から、トリコフィトン属が Siglec を介して宿主免疫応答に干渉していることが明らかとなった。

抑制型 Siglec5 と活性型 Siglec14 のどちらがドミナントなのかが問題となるが、ヒトの末梢血単球や好中球では Siglec5 の発現が高く、Siglec14 の発現は低かった。また、遺伝子多型により Siglec14 を欠損した人から採取した末梢血単球や好中球において、トリコフィトンに対する免疫応答は野生型と変わらなかったことから、Siglec14 はあまり重要ではなく、Siglec5 がドミナントである可能性が示唆された。

Siglec の主要なリガンドはシアル酸であるが、トリコフィトン属はシアル酸を持たないことが報告されていた(*Mycoses* 46, 197-202, 2003)。実際に、トリコフィトン属をシアル酸分解酵素や N 型糖鎖分解酵素で処理してもリガンド活性は失われなかったことから、シアル酸以外のリガンドの存在が示唆された。Siglec はシアル酸以外にもタンパク質リガンドを認識することが報告されていた(*J. Exp. Med.* 206, 1691-1699, 2009, *EMBO J.* 34, 2775-2788, 2015)。そこで、トリコフィトン属をタンパク質分解酵素や、95°C の熱変性処理を行ったが、リガンド活性は失われなかった。よって、トリコフィトン属は新規のリガンドを含む可能性が示唆された。そこで、有機溶媒を用いた液相分配と薄層クロマトグラフィーによりリガンドを単離し、質量分析と核磁気共鳴による化学構造の決定を行い、トリアシルグリセロールと直鎖アルカンを同定した。Siglec がこのような脂溶性リガンドを認識するという報告はなく、全く新しいタイプのリガンドの発見となった。Siglec による脂質リガンド認識という概念を拡張するために、内在性脂質分子を中心に広くリガンド活性を検討したところ、Siglec5 と 14 は様々な脂質分子を弱く認識することが明らかとなった。その中でも、ミトコンドリアリン脂質のカルジオリピンと、内在性微量脂質分子の 5-PAHSA には比較的強いリガンド活性が認められた。両脂質分子は、Siglec5 を介して免疫細胞の活性化を抑制し、Siglec14 を介して活性化した。また、脂質分子の認識には Siglec5 と 14 の N 末に存在する疎水性配列が重要であることを見出した。この疎水性配列は、Siglec の本来のリガンドであるシアル酸の認識部位とは、立体的に真逆の位置であることから、脂質分子はシアル酸とは競合せずに Siglec と結合できると考えられた。また、この疎水性配列は他の Siglec には保存されていないために、他の Siglec は脂質分子を認識できないのではないかと考えられた。

本研究により、シアル酸認識受容体の Siglec5 と 14 が脂質リガンドを認識することが分かった。

この発見により、これまで知られていなかった Siglec の新しい機能が解明される可能性が期待される。具体的には、脂質異常疾患などに Siglec が関与する可能性などが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyake, Y., Sho Yamasaki	4. 巻 1204
2. 論文標題 Immune recognition of pathogen-derived glycolipids through Mincle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lectins in Host Defense against Microbial Infections	6. 最初と最後の頁 31-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-15-1580-4_2.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suematsu, R., Miyamoto, T., Saijo, S., Yamasaki, S., Tada, Y., Yoshida, H. and Miyake, Y.	4. 巻 294
2. 論文標題 Identification of lipophilic ligands of Siglec5 and -14 that modulate innate immune responses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 16776-16788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.009835.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa Asako, Miyake Yasunobu, Kobayashi Kimiko, Murata Yuzo, Iizasa Sayaka, Iizasa Ei'ichi, Yamasaki Sho, Hirakawa Naomi, Hara Hiromitsu, Yoshida Hiroki, Yasaka Toshiharu	4. 巻 9
2. 論文標題 Essential roles of C-type lectin Mincle in induction of neuropathic pain in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37318-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 三宅靖延	4. 巻 71
2. 論文標題 Siglec5, 14は白癬菌トリコフィトン属を認識して免疫応答を制御する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 272-277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三宅靖延	4. 巻 71
2. 論文標題 Siglec5,14は白癬菌トリコフィトン属を認識して免疫応答を制御する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 272-277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Asako, Miyake Yasunobu, Kobayashi Kimiko, Murata Yuzo, Iizasa Sayaka, Iizasa Ei 'ichi, Yamasaki Sho, Hirakawa Naomi, Hara Hiromitsu, Yoshida Hiroki, Yasaka Toshiharu	4. 巻 9
2. 論文標題 Essential roles of C-type lectin Mincle in induction of neuropathic pain in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37318-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mi-ichi Fumika, Miyake Yasunobu, Tam Vo Kha, Yoshida Hiroki	4. 巻 8
2. 論文標題 A Flow Cytometry Method for Dissecting the Cell Differentiation Process of Entamoeba Encystation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2018.00250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tong Honglian, Miyake Yasunobu, Mi-ichi Fumika, Iwakura Yoichiro, Hara Hiromitsu, Yoshida Hiroki	4. 巻 13
2. 論文標題 Apaf1 plays a negative regulatory role in T cell responses by suppressing activation of antigen-stimulated T cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0195119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0195119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tong, H., Miyake, Y., Mi-Ichi, F., Iwakura, Y., Hara, H. and Yoshida, H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Apaf1 plays a negative regulatory role in T cell responses by suppressing activation of antigen-stimulated T cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0195119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0195119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiokawa Moe, Lu Xiuyuan, Miyake Yasunobu, Ishikawa Eri, Pages Gilles, Pouyssegur Jacques, Ogata Masato, Yamasaki Sho	4. 巻 29
2. 論文標題 Spontaneous chondroma formation in CD2-Cre-driven Erk-deficient mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 479 ~ 485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxx056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三宅靖延	4. 巻 67
2. 論文標題 パターン認識受容体としてのC型レクチン受容体	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床免疫アレルギー科	6. 最初と最後の頁 636-641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yasunobu Miyake
2. 発表標題 Identification of novel lipophilic ligands of Siglec5 and 14 that modulate innate immune responses.
3. 学会等名 第8回ITAM Workshop
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasunobu Miyake, Rie Suematsu and Hiroki Yoshida
2. 発表標題 Identification of novel lipophilic ligands of Siglec5 and 14 that modulate innate immune responses.
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅靖延
2. 発表標題 マクロファージの現代的意義とその研究手法
3. 学会等名 第31回 日本神経免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅靖延、末松梨絵、吉田裕樹
2. 発表標題 シアル酸認識受容体Siglecの新規脂溶性リガンドの発見
3. 学会等名 第84回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasunobu Miyake
2. 発表標題 Periodontal pathogen <i>P. gingivalis</i> modulates host immunity through Siglec receptors.
3. 学会等名 第7回 ITAM Workshop
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasunobu Miyake, Sho Yamasaki and Hiroki Yoshida
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis negatively regulates host immune responses through inhibitory receptor, Siglec
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rie Suematsu, Yasunobu Miyake, Shinobu Saijo and Hiroki Yoshida
2. 発表標題 Immunosuppressive receptor, Siglec5 recognizes lipophilic ligands extracted from pathogenic fungus, Trichophyton mentagrophytes
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tong H, Miyake Y, Mi-ichi F, Iwakura Y, Hara H, Yoshida H
2. 発表標題 Apaf1 plays a negative regulatory role in T cell responses by suppressing activation of antigen-stimulated T cells
3. 学会等名 The 11th International congress on Autoimmunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyake Y, Yoshida H
2. 発表標題 Novel immune evasion strategy of P. gingivalis via inhibitory receptor, Siglec.
3. 学会等名 6th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (ICIS) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩川 萌、陸 修遠、三宅靖延、緒方 正人、山崎 晶
2. 発表標題 CD2-Cre Tgを用いたErk欠損マウスにおける軟骨の過増殖
3. 学会等名 第3回 日本骨免疫学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasunobu Miyake, Eri Suematsu, Shinobu Saijo, Sho Yamasaki and Hiroki Yoshida
2. 発表標題 Pathogenic fungus, Trichophyton mentagrophytes negatively regulates host immune responses via Siglec receptors
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasunobu Miyake, Eri Suematsu, Shinobu Saijo, Sho Yamasaki and Hiroki Yoshida
2. 発表標題 Immunosuppressive receptor, Siglec binds to pathogenic fungus, Trichophyton mentagrophytes, and negatively regulates host immune responses
3. 学会等名 第46回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasunobu Miyake
2. 発表標題 Immune evasion strategy of P. gingivalis via inhibitory receptor, Siglec
3. 学会等名 第6回 ITAM Workshop
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉田裕樹、三宅靖延、原博満	4. 発行年 2017年
2. 出版社 CMC出版	5. 総ページ数 355
3. 書名 次世代アジュバント開発のためのメカニズム解析と安全性評価	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----