

令和元年6月19日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15733

研究課題名(和文) Th2型免疫応答誘導に関わるキチン受容体およびシグナル分子の同定

研究課題名(英文) Identification of chitin receptors and signal molecules involved in Th2 type immune response induction

研究代表者

飯笹 英一 (Ei'ichi, Iizasa)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：20631998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：キチンは、ダニやエビ、カニなどの外骨格に含まれる多糖である。キチンがアレルギーや寄生虫の排除に必要な免疫応答(2型免疫応答)を誘導することが知られているが、その認識や免疫応答誘導メカニズムは不明である。

これまで、TLR2やDectin-1と呼ばれる受容体がキチンの受容体として知られているが、本研究で、これらは、2型の免疫応答には不要であることがわかった。また2型免疫応答を誘導する新規キチン受容体候補を探索したところ、LMP1と今回名付けた新規タンパク質がキチンを認識し免疫応答を制御すること明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、アレルギー疾患は増加しているが、アレルギーのジャックメカニズムはまだ不明な点が多い。キチンは、ダニやエビ・カニに含まれアレルギー反応(2型免疫応答)を誘導するがそのメカニズムは不明であった。今回その受容体候補として、新規受容体LMP1を同定した。LMP1はキチンを認識し、キチンによって誘導される免疫応答を負に制御することが明らかとなった。現時点2での2型免疫応答への関与は不明であるが、今後、この欠損マウスを作製し、2型免疫応答への関与を解析し、その関与が明らかになった場合は、キチンによって誘導されるアレルギー反応における重要な発見である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Chitin is a polysaccharide included in the exoskeleton of house dust mites, shrimps, and crabs. Although Chitin is known to induce allergy responses (Type II immune responses), the mechanisms underlying the chitin recognition and the induction of immune responses remains unknown.

The pattern recognition receptors called TLR2 and Dectin-1 are known to the receptor for chitin. However, in this study, we found that these receptors are dispensable for the induction of type II immune responses. We also found a novel receptor named LMP1 that recognizes chitin and is essential for the regulation of immune receptor induced by chitin.

研究分野：免疫学

キーワード：キチン PRR 2型免疫応答

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

キチンは、N-アセチルグルコサミン(NAG)が β -1,4結合で直鎖状に結合した多糖であり、ダニなどの昆虫やエビ・カニなどの甲殻類、蠕虫類、あるいは、真菌類の細胞壁などに含まれる。しかし、哺乳類にはキチンが存在しないため、哺乳類はそれを認識することで免疫応答を誘導する。

自然免疫応答で主たる役割を持つマクロファージ(M Φ)は、キチンを認識し、TNF- α やIL-6、IL-10などのサイトカインを産生するが、その際、M Φ は、TLR2やNOD2、Dectin-1などのパターン認識受容体(PRR)を介して、キチンを認識することが報告されている(Carla A. *et al.*, *J. Immunol.*, 2009, Wagener J. *et al.*, 2014, Fuchs K. *et al.*, *EMBO rep.*, 2018)。一方で興味深いことに、キチンをマウスの腹腔や肺に投与すると、IL-4、IL-13の産生や好塩基球、M2マクロファージ(M Φ)の遊走、活性化などの2型の免疫応答を誘導することも知られている(Reese TA. *et al.*, *Nature*, 2007, Van Dyken SJ. *et al.*, *Immunity*, 2014)。キチンは、上述のように昆虫や甲殻類の外骨格や蠕虫にも含まれていることから、蠕虫感染の排除に重要な2型の免疫応答やダニや甲殻類に対するアレルギー反応にも重要な役割を果たしていると考えられる(Gregory L. *et al.*, *Trends Immunol.*, 2011)。しかし、キチンの認識メカニズムや2型免疫応答誘導メカニズムはまだ不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、2型の免疫応答を誘導するキチン受容体とその誘導メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下の方法を用いて、まず、既知のTLR2などの既知の受容体の2型免疫応答への関与を調べ、その関与が見られなかったため、新規のキチン受容体を*in silico*で探索し、その機能を調べた。

- (1) 既知の受容体の2型免疫応答への関与を調べるため、*Tlr2* KO、Dectin-1の下流にあるアダプター分子 *Card9* KOのマウスにキチンを投与して、2型免疫応答を調べた。
- (2) NAG含有糖認識ドメインであるLysMを持つタンパク質(LysMタンパク質)を、タンパク質ドメインのデータベース Pfam(<https://pfam.xfam.org/>)を用いて、マウスおよびヒトゲノムの中から探索し、系統樹解析を行った。
- (3) LysMタンパク質にGFPを融合して発現させ、細胞内局在を解析した。
- (4) LysMタンパク質-GFP融合タンパク質の組み換えタンパク質を作製し、キチンやペプチドグリカンなどNAG含有糖との結合を調べた。
- (5) マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7細胞にLysMタンパク質を過剰発現もしくは、CRISPR-Cas9法を用いてLysMタンパク質のKO細胞を作製し、キチンやペプチドグリカンなどNAG含有糖刺激によるサイトカイン産生を解析した。

4. 研究成果

まず、TLR2やDectin-1など既知のキチン受容体(Carla A. *et al.*, *J. Immunol.*, 2009, Wagener J. *et al.*, 2014)の2型免疫応答への関与を調べた。Dectin-1はHemITAMを有するPRRで、そのシグナル伝達には、アダプター分子の*Card9*が不可欠であることが報告されている(Gross O. *et al.*, *Nature* 2006, Hara H. *et al.*, *Nature Immunol.*, 2007)。そこで、*Tlr2* KOとこの*Card9* KOにキチンを腹腔投与して、以前の報告(Reese TA. *et al.*, *Nature*, 2007)でWTにキチン投与した際に見られた好塩基球の浸潤に変化があるか調べた。WT、*Tlr2* KO、*Card9* KOマウスとキチン投与48h後に腹腔滲出細胞(PEC)を回収し、好塩基球のマーカーであるCD11bとSiglec Fに対する抗体で染色し、好塩基球(CD11b⁺、SiglecF⁺)の細胞数をカウントした。その結果、WTとそれぞれのKOマウスで、好塩基球の数に差は見られなかった。このことから、TLR2とDectin-1は、2型の免疫応答には必要なく、2型の免疫応答誘導には、他の受容体の関与が示唆された。

そこで、続いて、新規のキチン受容体を探索することにした。植物は哺乳類と同様にPRRで微生物を認識し、免疫応答を誘導する。キチンの受容体に関しては、植物でよく研究が進んでいる。Lysin M(LysM)ドメインは、細菌や植物でペプチドグリカンやキチンなどNAGを持つ糖を認識するタンパク質ドメインであることが知られているが(Buist G. *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 2008)、モデル植物のシロイヌナズナでは、このLysMドメインを有するLysM-RLK1/CERK1、LYK5などの受容体がキチンの認識およびそれに対する免疫応答に不可欠であることが知られている(Iizasa E. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2010, Saijo Y. *et al.*,

The plant J., 2017)。そこで、哺乳類の LysM ドメインを有するタンパク質のキチン認識と免疫応答関与を調べることにした。

まず、Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) を用いて、マウスとヒトのゲノム中から LysM を持つタンパク質を探索したところ、TBC LysM Domain catalytic (TLDC) ドメインの一部として LysM ドメインを持つ OXR ファミリータンパク質の遺伝子が 2 つ、LysM ドメインのみを持つタンパク質の遺伝子が 4 つ見つかった(図 1)。今回は、LysM ドメインのみを持つ遺伝子 4 つに着目し、LysM domain protein (LMP) 1-4 と名付けて解析を行った。最尤法を用いて系統樹解析を行ったところ、LMP1 と 2、LMP3 と 4 がそれぞれクレードに別れ、近縁であることがわかった(図 1)。

続いて、LMP1-4 に GFP を融合して(LMP1-4-GFP)、RAW264.7 細胞株に発現させ、細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で調べたところ、LMP1 と 2 はサイトゾルに、LMP3 は、小胞体、LMP4 は、ゴルジ体に局在することを見出した。10 μm 以下のキチンは、マンノース受容体を介して貪食され、サイトゾルの NOD2 に認識されることが報告されている (Wagener J. *et al.*, 2014)。そこで、サイトゾルに局在が見られた LMP1, 2 に絞って以下の解析を行った。

まず、LMP1-GFP, LMP2-GFP, コントロールの GFP の組み換えタンパク質を作製し、キチンとの結合を調べたところ、LMP1 のみがキチンと結合することがわかった(図 2A)。また、LMP1-GFP, LMP2-GFP, GFP を過剰発現させた RAW264.7 を 10 μm 以下のキチンで刺激すると LMP1-GFP 過剰発現細胞では、IL-6 の産生が有意に低下することが明らかになった(図 2B)。さらに、CRISPR-Cas9 法で LMP1, LMP2 を KO し、同様の実験を行うと、逆に LMP1 KO で IL-6 の産生が上昇することがわかった。これらのことから、MΦに発現している LMP1 は、サイトゾルでキチンを認識し、IL-6 などの炎症性サイトカイン産生を抑制していることが明らかになった。

本研究成果をまとめると、まず、キチンの 2 型免疫応答には、既知のキチン受容体 TLR2 や Dectin-1 は必要ないことがわかった。さらにそれ以外の新規のキチン受容体を探索したところ、LysM を有する LMP1 が MΦ のサイトゾルでキチンを認識し、炎症性サイトカイン IL-6 の産生抑制することを明らかにした。LMP1 が 2 型免疫応答に関与するかは現時点では不明であるが、新規のキチン受容体として 1 つの候補になりうる。本研究期間内では、この研究成果は論文としてまとめられなかったが、今後、LMP1 KO マウスを作製し、2 型の免疫における関与を調べ、論文として報告する。

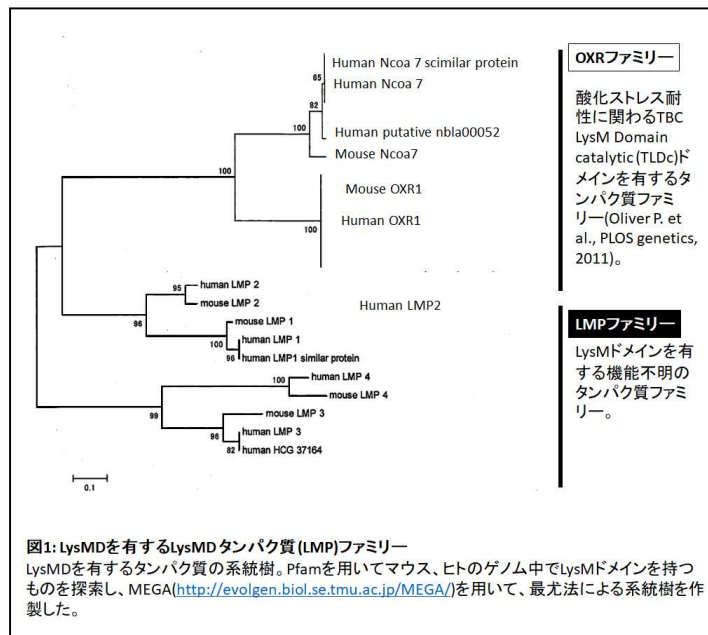


図1: LysMDを有するLysMDタンパク質(LMP)ファミリー

LysMDを有するタンパク質の系統樹。Pfamを用いてマウス、ヒトのゲノム中でLysMDドメインを持つものを探索し、MEGA(<http://evolgen.biol.se.tmu.ac.jp/MEGA/>)を用いて、最尤法による系統樹を作製した。

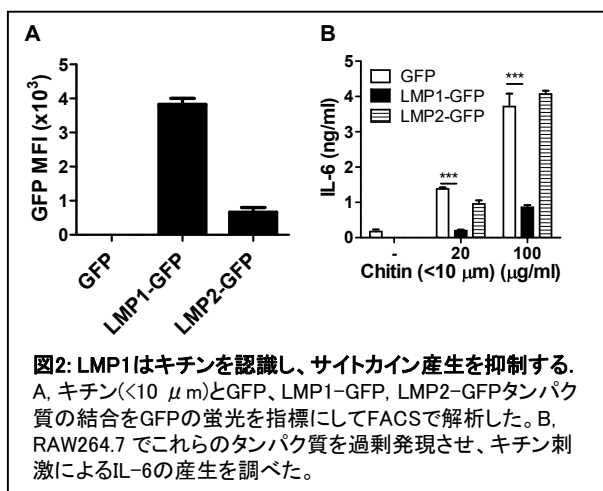


図2: LMP1はキチンを認識し、サイトカイン産生を抑制する。
A. キチン(<10 μm)とGFP, LMP1-GFP, LMP2-GFPタンパク質の結合をGFPの蛍光を指標にしてFACSで解析した。B. RAW264.7 でこれらのタンパク質を過剰発現させ、キチン刺激によるIL-6の産生を調べた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件) 全て査読あり。

- ① Ishikawa A, Miyake Y, Kobayashi K, Murata Y, Iizasa S, Iizasa E, Yamasaki S, Hirakawa N, Hara H, Yoshida H, Yasaka T, Essential roles of C-type lectin Mincle in induction of neuropathic pain in mice. *Sci. Rep.*, 9(1) 872 2019.
- ② Sasaguri T, Taguchi T, Murata Y, Kobayashi K, Iizasa S, Iizasa E, Tsuda M, Hirakawa N, Hara H, Yoshida H, Yasaka, Interleukin-27 controls basal pain threshold in physiological and pathological conditions. *T. Sci. Rep.*, 8(1) 11022 2018.

- ③ Iizasa S, Iizasa E, Watanabe K, Nagano Y, Transcriptome analysis reveals key roles of AtLBR-2 in LPS-induced defense responses in plants. BMC genomics 18(1) 995, 2017.
- ④ Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yoshida H, Pertussis toxin targets the innate immunity through DAP12, FcR γ , and MyD88 adaptor proteins. Immunobiol., 222(4) 664-671 2017.

[学会発表] (計4件)

- ① Iizasa E., Uematsu T., Chuma Y., Kiyohara H., Kubota M., Umemura M., Matsuzaki G., Yamasaki S., Hara H. The function of a DAP12-associated receptor recognizing mycobacterial lipids, 日米医学協力計画 抗酸菌専門部会 第52回日米合同部会 2018年3月 (招待あり)
- ② Iizasa E., Uematsu T., Chuma Y., Kiyohara H., Kubota M., Umemura M., Matsuzaki G., Yamasaki S., 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、2017年12月12日
- ③ 飯笹英一, 植松崇之, 清原秀泰, 中馬康志, 久保田未央, 三山英夫, 梅村正幸, 松崎吾朗, 山崎晶, 吉田裕樹, 原博満, 結核菌脂質を認識する DAP12 会合型 ITAM 関連受容体の免疫制御、第2回抗酸菌研究会、2017年11月23日
- ④ Iizasa E., Uematsu T., Chuma Y., Kiyohara H., Kubota M., Umemura M., Matsuzaki G., Yamasaki S., Hara H. Two distinct ITAM-coupled receptors recognize mycobacterial mycolic acid-containing lipids and differently regulate immune responses. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, 2017年10月30日

[図書] (計1件)

- ① 免疫ペディア~101のイラストで免疫学・臨床免疫学に強くなる! 飯笹 英一、原博満、羊土社 2017年6月

[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：
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：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

Researchmap: https://researchmap.jp/iizasa_eiichi/

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：永野幸夫、光富勝

ローマ字氏名：Yukio Nagano, Masaru Mitsutomi

※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。