

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15195

研究課題名(和文) C型レクチン受容体シグナルの新規制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) A novel regulatory mechanism of C-type lectin receptor-mediated antifungal immunity

研究代表者

豊永 憲司 (Toyonaga, Kenji)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：90791567

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)： 播種性カンジダ症などの原因となる *Candida albicans* (*C. albicans*) の認識と防御には、C型レクチン受容体(CLR)である Dectin-1/-2 とそのシグナル分子 CARD9 を介した自然免疫活性化が重要な役割を担うが、この経路の詳細な制御機構は未だ不明である。我々は、Trem2 が CLR を介した活性化シグナルの抑制に寄与している可能性を見出した。Trem2 欠損マクロファージでは、*C. albicans* 刺激に対する炎症性サイトカイン産生が増強されることから、Dectin-1/-2 を介した活性化シグナルの抑制に Trem2 が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性カンジダ症のマウスモデルを用いた報告や、様々な疫学的知見から、*C. albicans* に対する感染防御には、Dectin-1/Dectin-2-CARD9 経路を介した自然免疫応答の活性化が重要であることが明らかとなっている。この経路を抑制することが知られている Cbl-b の阻害剤は、*C. albicans* の排除応答を促進することも報告されているため、Trem2-Dap12 経路の阻害がカンジダ症の新規治療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： *Candida albicans* (*C. albicans*), which colonize the skin and mucous membranes as a resident fungus, causes severe symptoms such as disseminated candidiasis as an opportunistic infection. For the protection against *C. albicans*, activation of innate immunity through the C-type lectin receptors (CLRs) such as Dectin-1/Dectin-2 and its signaling adaptor molecule CARD9 plays an important role. However, the detailed regulatory mechanism of this pathway is still unknown. In this study, we found that Trem2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) might contribute to the suppression of CLR-mediated activation signals.

研究分野：感染免疫学

キーワード：自然免疫受容体 真菌感染症

## 1. 研究開始当初の背景

近年、自然免疫における新たなパターン認識受容体として、C型レクチン受容体 (CLR) や イムノグロブリン (Ig) スーパーファミリー受容体 (Tremファミリー、CD300ファミリー) などの ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif) 共役型受容体が注目されている (Hamerman *et al.* *Immunol Rev.* 2009)。これらの受容体は、自然免疫において重要な役割を担うマクロファージや樹状細胞に発現しており、そのリガンド認識に伴って、自身の細胞内領域に存在する、もしくは、会合するアダプター分子 (FcR、DAP12 など) が有する ITAM を介して細胞内に活性化シグナルを伝達する。例えば、Mincle や MCL、Dectin-2、DCAR といった FcR 共役型の CLR は、結核菌細胞壁に存在する糖脂質を認識し、炎症性サイトカインの産生などを介して結核菌に対する防御免疫応答を活性化させることが報告されている (Ishikawa *et al.* *Trends Immunol.* 2017)。獲得免疫応答を担うリンパ球では、抗原受容体を介した ITAM シグナルは、PD-1 などの抑制性受容体によって制御されることが知られているが、自然免疫応答を担う細胞での ITAM シグナルの制御機構はよく分かっていない。Mincle に関しては、その発現誘導や安定化機構が少しずつ明らかになってきているものの (Miyake *et al.* *J Immunol.* 2014)、活性化後に見られる発現低下の仕組みは明らかでなかった。我々は、CLR を介した自然免疫活性化の制御機構を研究する中で、Mincle の発現低下に関わる分子として Trem2 を同定し、Trem2 が Mincle の分解を促すことで Mincle を介した活性化シグナルを負に制御している可能性を見出した。Trem2 欠損マウスでは、Mincle を介した抗抗酸菌防御応答が増強され、菌の排除が亢進したことから、Trem2 が真菌感染に重要な CLR (Dectin-1 や Dectin-2) を介した自然免疫応答制御に寄与している可能性を考え、本研究の立案に至った。

## 2. 研究の目的

皮膚や粘膜の常在真菌である *Candida albicans* (*C. albicans*) は、先進国の重症真菌症例において最も高頻度に単離される病原性真菌であり、日和見感染症として播種性カンジダ症などの重篤な症状を引き起こし、免疫不全患者の主要な死因の一つとなる。重症カンジダ症に処方される抗真菌薬は選択肢が限られていることに加え、毒性や耐性の問題もあることから、新規治療法の開発が急がれている。ITAM 共役型 CLR である Dectin-1 と Dectin-2 は、真菌細胞壁に存在する  $\beta$ -グルカンと  $\beta$ -マンナンをそれぞれ認識し、下流のシグナルアダプター分子 CARD9 を介して自然免疫応答を活性化させる。Dectin-1 や Dectin-2、CARD9 の遺伝子欠損マウスでは、*C. albicans* 感染に対する抵抗性が著しく減弱することや (Saijo *et al.* *Nat Immunol.* 2007, *Immunity* 2010; Gross *et al.* *Nature* 2006)、Dectin-1 や CARD9 の遺伝子変異がカンジダ症の発症や重症化を促すという疫学的証拠から (Drummond *et al.* *Front Cell Infect Microbiol.* 2016)、Dectin-1/Dectin-2-CARD9 経路を介した自然免疫活性化が *C. albicans* 感染防御に極めて重要であると言える。すなわちこのことは、Dectin-1/Dectin-2-CARD9 経路を介した免疫応答を増強させることにより、*C. albicans* の排除を促すことができる可能性を示している。我々は、Trem2 欠損マクロファージでは、*C. albicans* 刺激後のサイトカイン産生が野生型に比べて増強することを見出したため、本研究では、Trem2 による CLR-CARD9 経路の抑制機構や、*C. albicans* 感染において Trem2 が担う役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *in vitro* での抗真菌応答における Trem2 の役割の解明

Trem2 欠損マウス骨髄由来マクロファージを用いて、*in vitro* での *C. albicans* 感染実験を行い、Trem2 欠損マクロファージで菌の排除や貪食が亢進するかを検討する。特に、Dectin-1 は貪食活性を有することが明らかになっているため、Trem2 欠損マクロファージでは貪食が亢進する可能性がある。また、Dectin-1 からのシグナルは、真菌排除に重要とされる活性酸素種の産生も誘導することから、合わせて解析を行う。

### (2) マウス *C. albicans* 感染実験

全身性カンジダ症のマウスモデルを実施する。*C. albicans* を野生型及び Trem2 欠損マウスに経静脈的に感染させ、感染後の生存率をモニターするとともに、感染臓器 (腎臓、脾臓、肝臓、肺) 内の菌数、サイトカイン発現量 (ELISA 及び mRNA の qPCR 解析) 組織病理の解析を行う。*C. albicans* 感染は、共同研究者である千葉大学真菌医学研究センターの西城忍准教授のご指導のもと、同センター内の動物感染実験施設で実施する。

## 4. 研究成果

これまでの *in vitro* での検討から、Trem2 欠損マクロファージでは、*C. albicans* 刺激に対

する炎症性サイトカインの産生が増強されることを見出していたため、細胞透過性の活性酸素インジケーターを用いて、Trem2 欠損細胞における活性酸素種の産生を解析した。骨髄由来マクロファージや樹状細胞、腹腔内チオグリコレート投与によって得られた腹腔内浸潤マクロファージを用いて、Heat-killed *C. albicans* 刺激を行なったが、この系においては、野生型及び Trem2 欠損マウス由来の細胞で産生量に有意な差は認められなかった。Trem2 欠損マウスを用いた *C. albicans* 感染実験に関しては、*C. albicans* SC5314 株をマウスに感染させ、死亡率、臓器内菌数およびサイトカイン産生について解析を行なったが、野生型マウスと明らかな差は認められなかった。今後は、Trem2 が、Dectin-1 と Dectin-2 のどちらに依存した初期防御応答の制御に重要であるかを明らかにし、カンジダ感染防御における役割を検討したいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Omahdi Zakaria, Horikawa Yuto, Nagae Masamichi, Toyonaga Kenji, Imamura Akihiro, Takato Koichi, Teramoto Takamasa, Ishida Hideharu, Kakuta Yoshimitsu, Yamasaki Sho	4. 巻 295(17)
2. 論文標題 Structural insight into the recognition of pathogen-derived phosphoglycolipids by C-type lectin receptor DCAR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5807-5817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1074/jbc.RA120.012491	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 Kamohara Asana, Hirata Hirohito, Xu Xianghe, Shiraki Makoto, Yamada Sakuo, Zhang Jing-Qi, Kukita Toshio, Toyonaga Kenji, Hara Hiromitsu, Urano Yasuteru, Yamashita Yoshio, Miyamoto Hiroshi, Kukita Akiko	4. 巻 32
2. 論文標題 IgG immune complexes with Staphylococcus aureus protein A enhance osteoclast differentiation and bone resorption by stimulating Fc receptors and TLR2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 89-104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1093/intimm/dxz063">https://doi.org/10.1093/intimm/dxz063</a>	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 豊永 憲司、山崎 晶	4. 巻 269(9)
2. 論文標題 C型レクチン受容体のリガンド認識と免疫調節機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 743-748
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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kenji Toyonaga, Hiromitsu Hara, Sho Yamasaki
2. 発表標題 Analysis of Card9 function in Mycobacterium bovis BCG infection
3. 学会等名 8th ITAM WS
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊永 憲司、原 博満、山崎 晶
2. 発表標題 BCG感染におけるCard9の機能解析
3. 学会等名 第4回抗酸菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Toyonaga, Ei ' ichi Iizasa, Hiromitsu Hara
2. 発表標題 Analysis of mycobacterial phenolic glycolipid-induced innate immune responses
3. 学会等名 第12回 寄生虫感染免疫研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Toyonaga, Ei ' ichi Iizasa, Hiromitsu Hara
2. 発表標題 Analysis of PGL-mediated innate immune responses
3. 学会等名 7th ITAM WS
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Toyonaga, Ei ' ichi Iizasa, Yasushi Chuma, Hideyasu Kiyohara, Kazuhiro Matsuo, Hiromitsu Hara
2. 発表標題 Identification of innate immune receptor for the mycobacterial virulence factor phenolic glycolipid
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 豊永憲司、飯笹英一、中馬康志、清原秀泰、松尾和浩、原博満
2. 発表標題 PGL受容体の機能解析
3. 学会等名 第29回 日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----