

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16510

研究課題名（和文）インフルエンザ誘発ARDSの新規制御機序確立に向けたC型レクチン受容体の機能解析

研究課題名（英文）Basic study in the role of C-type lectin receptors to develop novel regulating system of acute respiratory distress syndrome caused by influenza infection.

研究代表者

山本 秀輝（Yamamoto, Hideki）

新潟大学・研究推進機構・助教

研究者番号：90799082

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）：インフルエンザ発症病態における糖鎖認識受容体であるC型レクチン受容体（CLRs）の機能は未だ詳細に解明されていない。本研究では、骨髄由来樹状細胞をインフルエンザウイルスヘマグルチニン（HA）で刺激したところ、Dectin-2遺伝子欠損マウスにおいて炎症性サイトカイン産生が顕著に低下した。この低下は、HAに含まれている高マンノース糖鎖とDectin-2の相互作用が深く関連することが明らかとなった。以上から、急性呼吸促進症候群（ARDS）などのインフルエンザ重症化制御においてDectin-2が重要であ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

これまでの研究では、宿主によるインフルエンザウイルス認識機構へのCLRsの関与については報告されていた一方で、インフルエンザ感染による宿主免疫応答におけるCLRsの役割については理解が進んでいなかった。本研究結果は、Dectin-2を欠損した状態下では炎症反応誘導が抑制されるという重要な学術的知見が得られ、Dectin-2が炎症制御の鍵となることが分かった。今後、過剰免疫応答に関与する免疫系細胞や炎症性メディエーターの動態が明らかになれば、Dectin-2を標的とした過剰炎症抑制を目指した治療薬の開発などに応用可能であり、社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：The function of C-type lectin receptors (CLRs), known as pathogen-derived carbohydrate recognition receptors, in influenza infection has not been fully understood. Inflammatory cytokine production by bone marrow-derived dendritic cells upon stimulation with various types of influenza virus hemagglutinin (HA) was significantly reduced in Dectin-2 knockout mice compared to wild type mice. This reduction was closely related to the interaction between HA including high mannose polysaccharide and Dectin-2. The present studies suggested that Dectin-2 may play an important role for regulating severe influenza pneumoniae such as acute respiratory distress syndrome.

研究分野：免疫学

キーワード：インフルエンザ C型レクチン受容体 急性呼吸促進症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2003年に始まったH5N1高病原性鳥インフルエンザのヒトへの感染の世界的拡大や2009年のH1N1pdm09新型インフルエンザ、さらに2013年のH7N9鳥インフルエンザでは、致死的な急性呼吸促進症候群(acute respiratory distress syndrome; ARDS)が臨床的に問題となった(*J. Infect. Dis.*, 200(4):510-5, 2009; *J. Infect. Dis.*, 50(6): 850-9, 2010; *N. Engl. J. Med.*, 368(20): 1888-97, 2013)。ARDSは肺浮腫、毛細血管漏出、低酸素血症などにより重症呼吸不全をきたす致死的な病態であり、発症機序として、免疫細胞からの炎症メディエーターの過剰産生によるサイトカインストームの関与が示されている。この過剰炎症を制御するために、副腎皮質ステロイド薬などの抗炎症薬が用いられるが、免疫抑制による新たな感染症発症のリスクが増す一方で、その有効性を示す根拠は乏しい(*Clin. Infect. Dis.*, 53: 326-33, 2011; *J. Intensive Care*, 5: 50, 2017)。また、呼吸不全に対して体外式膜型人工肺(ECMO)を用いても救命困難なケースもあり(*Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 187(3): 276-85, 2013)。ARDS治療は多くの問題点を抱えている。

宿主免疫応答の開始においては、樹状細胞などの抗原提示細胞に発現し、微生物構成成分を認識する受容体である自然免疫受容体が重要である。近年は真菌感染症領域を中心に、微生物由来糖鎖を認識する自然免疫受容体であるC型レクチン受容体(C-type lectin receptors; CLR)が注目されている。一部のCLRはリガンドが明らかにされており、中でもDectin-2とMincleは高マンノース糖鎖を認識することが知られている。近年、インフルエンザウイルス(IFV)感染によるARDS誘発マウスモデルで、CLR下流のアダプター分子であるCARD9が肺の炎症の惹起に必要であることが報告された(*Sci. Rep.*, 5: 17577, 2015)。CARD9がCLRからのシグナルを転写因子に伝達することで、炎症性サイトカインが産生される。IFVは、その膜表面に高マンノース糖鎖などの豊富な糖鎖を有する(*J. Biol. Chem.*, 260: 14771-4, 1985)。したがって、Dectin-2やMincleがインフルエンザに起因するARDSなどの重症化を制御する鍵分子となる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

IFV感染に起因するARDS発症においてCARD9が関与することから、CARD9へシグナルを伝えるCLRのうち、高マンノース糖鎖を認識するDectin-2とMincleに着目する。これらを欠損するマウスを用いて、1)免疫応答の解析からARDS発症の機序を解明する。さらに、2)Dectin-2あるいはMincleがARDS治療のターゲットとなりうるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CLR遺伝子導入細胞を用いたレポーターアッセイによる結合能の解析

本実験では、Dectin-2またはMincle遺伝子を導入したNFAT-GFP細胞を用いた。この細胞はDectin-2またはMincleリガンドが受容体と結合すると、転写因子NFATの活性化を介して緑色蛍光タンパクGFPを発現する。この細胞を、A型IFV(由来株:A/Singapore/GP1908/2015(IVR-180)(H1N1)pdm09およびA/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(IVR-186)(H3N2))またはB型IFV(由来株:B/Maryland/15/2016(NYMC BX-69A)(Victoria系統)およびB/Phuket/3073/2013(Yamagata系統))由来ヘマグルチニン(HA)で刺激した。この刺激によって生じるGFP発現を解析し、Dectin-2またはMincleとHAとの相互作用について調べた。

(2) 骨髄由来樹状細胞を用いた炎症性サイトカイン産生能の解析

野生型(C57BL/6)マウス、Dectin-2遺伝子欠損(KO)マウス、またはMincle KOマウスより骨髄細胞を採取し、GM-CSFとの共培養により骨髄由来樹状細胞(BM-DCs)を作製した。このBM-DCsを各種HAおよびコントロールと共培養し、培養上清中の炎症性サイトカイン(IL-12p40、IL-6)濃度をELISAにて測定した。

(3) Syk阻害剤によるシグナル伝達経路の解析

CLRから開始されるシグナル伝達においては、チロシンキナーゼである細胞内シグナル分子Syk(spleen tyrosine kinase)が必須であることが知られている(*Cell Microbiol.*, 16(2): 185-94, 2015)。そこで、野生型のBM-DCsをSyk阻害剤であるBAY61-3606で処理した。Syk阻害剤処理またはSham処理後のBM-DCsを各種HAで刺激し、培養上清中のIL-12p40濃度をELISAにて測定した。

(4) 受容体に対するマンノース結合阻害によるサイトカイン産生への影響の解析

HA に含まれると想定される高マンノース糖鎖が CLR と相互作用している可能性をさらに解析するため、高マンノース糖鎖の受容体結合部位への競合的阻害剤である methyl- α -D-mannopyranoside (ManP) を野生型の BM-DCs と反応させた。この BM-DCs を各種 HA と共培養し、培養上清中の IL-12p40 濃度を ELISA にて測定した。

(5) マンノース除去によるサイトカイン産生への影響の解析

HA に含まれている糖鎖が高マンノース糖鎖であるかどうかを確認するため、各種 HA を Concanavalin A (ConA) 固相化セファロース粒子と作用させた。処理前後の HA を刺激物として BM-DCs を刺激し、培養上清中の IL-12p40 濃度を ELISA にて測定した。

4. 研究成果

(1) CLR 遺伝子導入細胞を用いたレポーターアッセイによる結合能の解析

Dectin-2 遺伝子導入レポーター細胞を各種 HA と刺激したところ、A/H3N2 亜型由来の HA が Dectin-2 と結合した。また、B/Yamagata 系統株由来の HA もわずかに結合した。Mincle 遺伝子導入レポーター細胞においても同様の刺激を行ったが、全ての HA 刺激において GFP の発現はみられなかった。一方で、受容体遺伝子を導入していないコントロール細胞においては、いずれの刺激においても GFP 活性は示さなかった。以上から、IFV 由来 HA は Dectin-2 と結合することが示唆されたが、この相互作用はウイルス株の違いによって異なることが考えられた。

(2) 骨髄由来樹状細胞を用いた炎症性サイトカイン産生能の解析

野生型マウスおよび Dectin-2 KO マウス由来の BM-DCs を各種 HA で刺激したところ、A/H1N1 亜型由来 HA を除く HA 刺激において Dectin-2 KO マウスにおける有意な IL-12p40 および IL-6 産生の低下がみられた。この差は、特に B 型系統株由来 HA において顕著であった。一方で、野生型マウスと Mincle KO マウスの間でも同様の検討を行ったところ、Mincle KO マウスにおいて B/Victoria 系統および B/Yamagata 系統株由来 HA 刺激による有意な IL-12p40 産生の増加がみられたが、A 型株由来 HA 刺激では両群間に差はみられなかった。また、IL-6 産生については、全ての HA 刺激において両群間で差はみられなかった。以上の結果から、Dectin-2 が IFV 由来 HA による炎症反応誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(3) Syk 阻害剤によるシグナル伝達経路の解析

Syk 阻害剤で処理した BM-DCs を各種 HA で刺激したところ、Sham 処理 BM-DCs と比較して、A/H3N2 亜型、B/Victoria 系統、および B/Yamagata 系統株由来 HA 刺激による IL-12p40 産生が、Sham 処理群と比較して有意に低下した。A/H1N1 亜型由来 HA 刺激では両群間で有意差はみられなかった。陽性コントロールとして用いた、Dectin-2 リガンドである Furfurman 刺激でも同様に Syk 阻害剤処理により IL-12p40 産生が Sham 処理群と比較して有意に低下した。一方で、Toll 様受容体 (TLR) シグナルを介することで知られる LPS 刺激においては、Syk 阻害剤処理の有無による両群間の差はみられなかった。以上から、IFV 由来 HA 刺激による炎症性サイトカイン産生は Syk が必須であることが明らかとなった。すなわち、Dectin-2-Syk 依存的シグナル伝達経路がインフルエンザにおける炎症反応誘導に関与していることが示唆された。

(4) 受容体に対するマンノース糖鎖結合阻害によるサイトカイン産生への影響の解析

ここまでのデータから、Dectin-2 のリガンドである高マンノース糖鎖が HA に存在し、Dectin-2 シグナルを活性化させている可能性が考えられた。そこで、高マンノース糖鎖と受容体との相互作用を競合的に阻害する ManP で BM-DCs を処理し、HA 刺激によるサイトカイン産生に影響がみられるかを解析した。ManP 処理を行った BM-DCs では、A/H1N1 亜型、A/H3N2 亜型、および B/Yamagata 系統株由来 HA 刺激による IL-12p40 産生が、ManP 未処理群と比較して有意に低下した。B/Victoria 系統株由来 HA 刺激では、ManP 処理の有無による IL-12p40 産生に有意差はみられなかった。この結果から、IFV 由来 HA は高マンノース糖鎖と結合する受容体と相互作用することが明らかとなり、その受容体は Dectin-2 である可能性が高いことが示唆された。

(5) マンノース除去によるサイトカイン産生への影響の解析

最後に、HA に含まれていると考えられる糖鎖が高マンノース糖鎖であるかどうかを確認するために、マンノース糖鎖を吸着する ConA を固相化させたセファロース粒子と HA を作用させ、HA

に含まれている高マンノース糖鎖を除去した。粒子処理 HA と sham 処理 HA のそれぞれを刺激物として BM-DCs を刺激したところ、粒子処理 HA 刺激では全ての HA において IL-12p40 産生が、sham 処理 HA 刺激と比較して顕著に低下した。陽性コントロールとして用いた α -マンナンにおいても、粒子処理群で IL-12p40 産生がほぼ消失した。一方で、TLR9 リガンドとして知られるオリゴ DNA である CpG1826 刺激においては、粒子処理の有無で IL-12p40 産生に影響はみられなかった。以上の結果から、IFV 由来 HA に含まれている糖鎖は高マンノース糖鎖であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hideki Yamamoto, Chikako Tomiyama, Sho Yamasaki, Kazuyoshi Kawakami
2. 発表標題 The role of C-type receptor Mincle in the recognition of Influenza virus.
3. 学会等名 The 26th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Yamamoto, Chikako Tomiyama, Sho Yamasaki, Yoichiro Iwakura, Kazuyoshi Kawakami
2. 発表標題 The role of Dectin-2 and Mincle in the initiation of immune responses caused by influenza virus hemagglutinin.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019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