

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 6月 2日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間： 2007~2008
課題番号： 19590498
研究課題名 (和文) ITAM 保有受容体の NF- κ B 活性化シグナル伝達機構と生理的役割の解明
研究課題名 (英文) Research for signaling mechanisms and physiological roles of ITAM-coupling receptors
研究代表者
原博満 (HARA HIROMITSU)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号: 20392079

研究成果の概要：今回の補助金を得て、リンパ球系細胞では、PKC 活性化に依存した CARMA1-BCL10 複合体が、マクロファージや樹状細胞などの骨髄系細胞では、PKC に依存しない CARD9-BCL10 複合体が、ITAM 受容体を介した NF- κ B 活性化とサイトカイン遺伝子の発現等の免疫反応に必須であることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学，シグナル伝達，感染症，アレルギー・ぜんそく

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫の中心、T/B 細胞の発現する抗原レセプター (TCR/BCR) は、受容体複合体に会合するアダプター分子が有する Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) が src family kinase によってリン酸化を受けることで、下流のシグナル伝達を開始されることが知られている。加えて、近年の研究により、自然免疫を司る NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞、好中球、マスト細胞なども、ITAM モチーフを持つ受容体 (ITAM 受容体) を数多く発現しており、これらの受容体が病原微生物に対する感染防御や、関節リウマチをはじめとする自己免疫疾患の発症に深く関与することが示唆されて

いる。

自然免疫、獲得免疫のいずれにおいても、免疫細胞の分化・増殖・活性化に NF- κ B 転写因子は必須の役割を演じる。しかし、獲得免疫の中心である T 細胞/B 細胞の抗原レセプター (TCR/BCR) を介した NF- κ B 活性化の機構は永らく謎であった。Bcl10 と Malt-1 は、Malt Lymphoma との関連が示唆されていた分子であるが、遺伝子欠損マウスを用いた解析により、Bcl10-Malt1 複合体が TCR/BCR を介した NF- κ B 活性化とリンパ球の活性化に必須のシグナル分子であることが明らかとなった (Ruland et al. *Cell* 2001; Ruefli-Brasse et al. *Science* 2003)。また、Bcl10 や Malt1 を欠損したマウスでは、Fc ϵ

RI を介した炎症性サイトカイン産生誘導が著しく不全となり、late phase の皮膚アナフィラキシー反応が著しく減弱する (Klemm et al. *J Exp Med* 2004)。さらに、Bcl10 や Malt1 欠損マウスはマクロファージ・樹状細胞などの骨髄系細胞が発現する ITAM 関連受容体 (Dectin-1, OSCAR, CD16, TREM1 etc.) を介した炎症性サイトカイン産生能もほぼ完全に失う。これらの一連の報告は、Bcl10-Malt1 複合体が ITAM 保有受容体の下流での NF- κ B 活性化をコントロールし、免疫細胞の活性化に必須の役割を演じていることを示している。

CARD ファミリー分子である CARD9 と CARD11 (Carmal) は、CARD-CARD 相互作用により Bcl10 に会合するとして同定されたアダプター分子である。我々に作製した Carmal 欠損マウス (*Card11*^{-/-}) の解析により、Carmal を欠損するリンパ球は、Bcl10 欠損マウスと同様に、抗原レセプターを介したリンパ球活性化が著しく不全となることが明らかとなった (Hara et al. *Immunity* 2003)。すなわち、CARD9 は抗原受容体 (TCR/BCR) を介した NF- κ B の活性化に必須の因子であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

NK 細胞が発現する活性化型 NK 細胞受容体は、TCR/BCR と同様に ITAM を介したシステムで活性化シグナルを伝達することが知られている。また、近年の報告により、樹状細胞やマクロファージなどの骨髄系細胞に発現する多種多様な C-型レクチンやイムノグロブリンスーパーファミリー受容体の多くも、ITAM を介して活性化シグナルを伝達することが次々と明らかになってきた。しかし、これらの受容体を介して NF- κ B 活性化を制御する機構は不明であった。そこで、これらの様々な免疫細胞が発現する様々な ITAM 受容体を介した活性化シグナルの伝達経路や免疫応答に、Carmal や CARD9、さらにこれらの分子が共に結合する Bcl10 がどう関わるかを明らかにし、これら ITAM 受容体を介する免疫応答の生理的意義を解明する。

3. 研究の方法

CARD9, Carmal, Bcl10 の遺伝子欠損マウスから、リンパ球や NK 細胞、骨髄系細胞 (樹状細胞, マクロファージ) を単離または誘導し、ITAM 受容体を刺激した際に誘導される免疫反応 (サイトカイン産生, 増殖, 細胞傷害活性など) を野生型コントロールと比較することで、これらの分子の関与を調べた。

4. 研究成果

骨髄系細胞 ITAM 受容体シグナルにおける役割

骨髄系細胞が発現する ITAM 受容体の殆どは、ITAM を有するアダプターである FcR γ 鎖か DAP12 に会合してシグナルを伝えるが、Dectin-1 のように自身の細胞質領域に ITAM を有するものもある。Dectin-1 は、真菌細胞壁の主成分 β -glucan を認識する C-型レクチン受容体である。Dectin-1 欠損マウスの解析等により、Dectin-1 がカンジダ (*Candida albicans*) やカリニ原虫 (*Pneumocystis carinii*) などの真菌の感染防御に重要である。我々は、FcR γ 鎖を介してシグナルを伝達する受容体 Fc γ RIII (CD16), OSCAR, また、DAP12 を介してシグナルを伝える受容体 TREM-1, MAIR-II を抗体刺激した場合、さらに Dectin-1 を β -glucan を含む酵母細胞壁成分 (zymosan) で刺激した際の炎症性サイトカインの産生が Card9 欠損樹状細胞では殆ど誘導されないことを見いだした。一方、CARD9 欠損は TCR や BCR を介したリンパ球の活性化には影響を与えないことも明らかとした。対照的に、Carmal 欠損は骨髄系細胞上の ITAM 受容体を介した活性化に影響を与えないことも我々は明らかにした。これらの骨髄系細胞上の ITAM 関連受容体を抗体でライゲーションした際のシグナリングを調べると、IKK 活性化と NF- κ B 活性化が著しく低下していた。しかし、ERK, p38, JNK の活性化はいずれも正常であった。以上のことから、骨髄系細胞の ITAM を介したシグナリング経路では、CARD9-Bcl10-Malt1 という複合体が形成され、NF- κ B 活性化経路を選択的に制御していると考えられた。これらの研究結果から、我々は、リンパ球で働いている CARD9-Bcl10-Malt1 複合体を lymphoid 型 ('L')-Carmal-Bcl10-MALT1 (L-CBM) 複合体、骨髄系で働いている CARD9-Bcl10-Malt1 複合体を myeloid 型 ('M')-CARD9-Bcl10-MALT1 (M-CBM) 複合体と名付けた。

To11様受容体シグナルにおける役割

Zymosan は Dectin-1 を刺激するが、To11様受容体 2 (TLR2) などの TLR に対するリガンド成分も含有しており、zymosan に応答した NF- κ B の活性化はむしろ Myd88 (TLR のアダプター分子) に依存すると報告されている。そこで我々は、*Dectin-1*^{-/-}, *Myd88*^{-/-}, *Card9*^{-/-} 骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用いて zymosan に対するサイトカイン応答 (TNF α , IL-6, IL-12) を調べたところ、いずれのサイトカイン産生も主に Myd88 に依存しており、Dectin-1 欠損は全くそれに影響しないことが判った。*Card9*^{-/-} BMDC では、TNF α と IL-6 産生の低下は著しいが、IL-12 産生に不全は見られなかった。一方、zymosan を次亜塩素酸処理して β -glucan 純度

を高めたoxidized-zymosan (OX-zymo)でBMDCを刺激した場合には、TNF α 、IL-6、IL-12すべての産生がDectin-1とCARD9に依存していた。これらの結果は、CARD9がITAMを介したシグナルのみならず、Myd88を介するシグナルにも関与することを示唆していた。そこで我々は、様々なTLRリガンドで*Card9*^{-/-} BMDCを刺激してサイトカイン産生を調べたところ、全てのTLRリガンドに対するTNF α およびIL-6の産生が低下することが判った。しかし、zymosan刺激の場合と同様、IL-12の産生に不全は認められなかった。同様なTLR応答の低下が*Bcl10*^{-/-} BMDCでも観察された。*Card9*^{-/-} BMDCをTLRリガンド刺激してシグナリングを解析したところ、NF- κ Bの活性化に異常は認められなかったが、p38とJnkの活性化に明らかな不全が見られた。従って、M-CBM複合体は、TLRの下流ではMAPKの活性化制御に働いていることが明らかとなった

活性化型NKレセプターシグナルにおける役割

NK細胞はNKレセプターによって標的細胞を認識し、細胞傷害やサイトカイン/ケモカイン産生を示す。活性化型レセプターはITAMを持つDAP12やFcR γ 鎖と会合して活性化シグナルを伝達する。CARD9-Bcl10シグナルが、DAP12/FcR γ 鎖を介する骨髄系細胞の活性化に必須であったことから、同じITAM含有アダプターを用いてシグナルを伝える活性化型NKレセプターでのCARD9およびBcl10の役割を検討した。その結果、*Bcl10*^{-/-} NK細胞は、あらゆる活性化型NKレセプター(CD16, NK1.1, NKG2D, Ly49H, Ly49D)を介したサイトカイン/ケモカイン産生の著しい不全を呈したが、*Card9*^{-/-} NK細胞のそれは全く正常であった。そこで、*Card11*^{-/-} NK細胞を調べたところ、*Bcl10*^{-/-} NK細胞と同様のサイトカイン/ケモカイン産生の不全が見られた。しかし、活性化型NKレセプターを介した細胞傷害活性には、*Bcl10*^{-/-} NK細胞、*Card11*^{-/-} NK細胞とも異常が見られなかった。ITAM下流のシグナルをみると、細胞傷害に関わる細胞内カルシウム濃度上昇、Vav活性化などに異常は認められず、MAPKの活性化も正常であったが、NF- κ B活性化経路に著しい不全が見られた。一方で、*Bcl10*^{-/-}や*Card11*^{-/-} NK細胞は、IL-18やTNF α を介するNF- κ B活性化は正常であった。従って、NK細胞では、L-CBM複合体がITAMを介するNF- κ B活性化経路を選択的にコントロールしており、このシグナルはサイトカイン/ケモカイン遺伝子の誘導に必須であるが、細胞傷害活性には関与しないことが判った。

PKCによる制御の相違

TCR、BCRを介するNF- κ B活性化には、それぞれPKC θ 、PKC β が関与することが知られている。これらのPKCがCarma1のリンカー領域の幾つかのセリン残基をリン酸化することで、Bcl10との会合が促されてシグナルが伝わりNF- κ Bが活性化される。従って、Carma1はPKC活性化をNF- κ B活性化へと変換する重要な分子である。実際、*Card11*^{-/-} T/B細胞やNK細胞では、PKCをダイレクトに活性化するPMA/カルシウムイオノフォア (P/I) 刺激によるIKKの活性化がほぼ完全に失われる。しかし、CARD9はPKCによるリン酸化される部位が欠失している。このことから我々は、CARD9はPKCによる制御を受けることができないと考え、検討を行った。*Card9*^{-/-} BMDCは、P/IによるIKKの活性化が正常に誘導された。Carma1は骨髄系細胞にも発現が見られるが、驚いたことに、Carma1欠損は、BMDCにおいてもP/I刺激によるIKKの活性化を失わせた。このことは、Carma1はどの細胞種でもPKCを介したIKKの活性化に必須であるが、骨髄系細胞のITAM関連受容体はこのPKC依存性経路を必要としないことを示していた。実際、NK細胞のITAM受容体介したサイトカイン産生はPKC阻害剤の添加により抑制されるが、BMDCのサイトカイン産生は影響されなかった。つまり、PKC-Carma1システムは骨髄系細胞では働くことが出来ず、ITAMシグナルとCARD9を結ぶ未知のシステムが存在していることを示していた。逆に、Carma1欠損JurkatにCARD9を過剰発現させても、P/I刺激によるNF- κ B活性化の不全は復帰できないことも判った。従って、ITAMを介したNF- κ B活性化メカニズムは細胞種によって異なっており、リンパ系細胞ではL-CBMを介したPKC依存性システム、骨髄系細胞ではM-CBMを介したPKC非依存性システムが働いていると考えられた。

原虫感染免疫におけるCARD9の役割

我々は、試験管内でマクロファージをトリパノソーマ原虫やリーシュマニア原虫の感染させた際に誘導されるTNF- α などの炎症性サイトカインの産生が*CARD9*^{-/-}マクロファージでは著しく低下することを見いだした。*CARD9*^{-/-}マウスは、リーシュマニアの足蹄皮下感染実験において、感染4週目での足蹄の腫脹およびTh1誘導に異常は見られないが、感染初期(2~3週)の足蹄の腫脹が野生型マウスと比較して明らかに減少した。この結果は、ITAM受容体—CARD9経路が原虫に対する自然免疫反応に関与することを示唆した初めての発見である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Hara H and Saito T: CARD9 vs. CARMA1 in innate and adaptive immunity. *Trends in immunol.*, 2009, 30(5): 234-242. 査読有。
2. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Hara H, Ogata K and Saito T: C-type lectin Mincle is an ITAM-coupled activating receptor. *Nat Immunol.* 2008, 9(10):1179-1188. 査読有。
3. Hara H, Ishihara C, (以下 4 名略) : Cell-type-specific regulation of ITAM-mediated NF- κ B activation by adaptors CARMA1 and CARD9. *J. Immunol.* 2008;181(2):918-930. 査読有。
4. Hara H, Ishihara C, (以下 14 名略) : The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2007;8(6):619-29. 査読有。
5. Imanishi T, Hara H, Suzuki S, Suzuki N, Akira S and Saito T: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J. Immunol.* 2007;178(11):6715-6719. 査読有。
6. Shambharkar PB, Blonska M, Pappu BP, Li H, You Y, Sakurai H, Darnay BG, Hara H, Penninger JM, Lin X: Phosphorylation and ubiquitination of the IkappaB kinase complex by two distinct signaling pathways. *EMBO J.* 2007;26(7):1794-805. 査読有。

[学会発表] (計 10 件)

1. 原博満, 島ノ江洋平, 宮崎義之, 吉田裕樹 CARD9 を介した自然免疫活性化経路の原虫感染防御における役割, 第 78 回日本寄生虫学会大会, 2009 年 3 月 29 日, 東京
2. 原博満, 吉田裕樹, 斉藤隆, CARMA1 と CARD9 により制御される細胞種特異的な ITAM を介した NF- κ B 活性化機構, 第 38 回日本免疫学会学術集, 2008 年 12 月 1 日, 京都
3. 島ノ江洋平, 宮崎義之, 原博満, 吉田裕樹, Role of CARD9 in anti-protozoan defense, 第 38 回日本免疫学会学術集会, 2008 年 1 月 2 日, 京都
4. Yohei Shimano, Hara, Hiromitsu, Yoshida Hiroki, Role of CARD9 in anti-protozoan defense, The 8th Awaji International forum on Infection and Immunigy, 2008 年 9 月 7 日, 淡路
5. 原博満, ITAM を介した細胞種特異的な NF- κ B 活性化機構 3 大会合同大会 2008 (第 73 回日本インターフェロンサイトカイン学会学術集会), 2008 年 7 月 1 日, 札幌
6. 吉田裕樹, 島ノ江洋平, 王森, 宮崎義之,

原博満, 新しい原虫感染防御因子 CARD9, 第 77 回日本寄生虫学会大会, 2008 年 4 月 2 日, 長崎

7. 原博満, Differential requirement of Carmal and CARD9 for FcR γ /DAP12-mediated activation of NF- κ B in NK cells and myeloid cells. 13th International congress of Immunology, 平成 19 年 8 月 21 日, ブラジル・リオデジャネイロ
8. 原博満, Differential regulation of innate immune signaling through Carmal and CARD9. 日本免疫学会学術集会 国際シンポジウム, 平成 19 年 1 月 20 日, 東京
9. 原博満, CARD9 と CARD11 による ITAM 関連受容体を介したサイトカイン産生の制御, 72 回日本インターフェロンサイトカイン学会, 平成 19 年 7 月 6 日, 京都
10. 原博満, Card9 is essential for myeloid cell activation through ITAM-bearing receptors. Keystone symposia, 平成 19 年 2 月 26 日, アメリカ・キーストン

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原博満 (HIROMITSU HARA)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号: 20392079

(2) 研究分担者

吉田裕樹 (YOSHIDA HIROKI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号: 40260715

(3) 連携研究者

小杉伊三夫 (KOSUGI ISAO)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10252173

濱野真二郎 (HAMANO SHINJIRO)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号: 70294915