

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07476

研究課題名（和文）真菌細胞壁キチンによるアレルギー性炎症の発症機序の解明

研究課題名（英文）Pathogenesis of allergic inflammation induced by fungal cell wall chitin

研究代表者

村長 保憲（Yasunori, Muraosa）

国立感染症研究所・安全実験管理部・主任研究官

研究者番号：10574668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：キチンによるアレルギー反応の発症機序は徐々に解明されつつあるが、その全容は未だ解明されていない。本研究では、生体による真菌細胞壁キチンの認識機序とアレルギー反応を引き起こす機序を解明することを目的とした。本研究では酵母 *Pichia pastoris* に発現させた LdpA の O-結合型糖鎖が Dectin-2 に認識されることを明らかにした。キチン粒子は BMDCs に貪食された後に細胞内で認識され、IL-1 の産生と細胞死を誘導したが、その機序を解明するまでには至らなかった。LdpA とキチンは相乗的かつ Dectin-2 依存的に Th2 型気道炎症を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界保健機関（WHO）によると、喘息は子供の間で最も一般的な慢性疾患であり、世界中で2億6,200万人以上が罹患している。喘息の根本的な原因は未だ明らかにされていないが、その危険因子の1つが真菌胞子の吸入であるとされている。我々が本研究でキチン粒子とキチン結合性糖タンパク質の O-結合型糖鎖が相乗的かつ Dectin-2 依存的に Th2 型気道炎症を誘導することを明らかにしたことにより、喘息などのアレルギー性疾患の発症機序の解明に寄与できたと考えている。

研究成果の概要（英文）：Although the mechanism of chitin-induced allergic reactions is gradually being elucidated, the full extent of the mechanism remains to be elucidated. In this study, we aimed to elucidate the recognition mechanism of fungal cell wall chitin by the organism and the mechanism by which it induces allergic reactions. In this study, we found that the O-linked glycan of LdpA expressed in yeast *Pichia pastoris* are recognized by Dectin-2. Chitin particles were recognized intracellularly after phagocytosis by BMDCs and induced IL-1 production and cell death, but the mechanism was not elucidated. LdpA and chitin induce Th2-type airway inflammation in a synergistic and Dectin-2-dependent manner.

研究分野：真菌感染症

キーワード：キチン 真菌 Dectin-2 C型レクチン IL-1 O-結合型糖鎖 アレルギー性炎症 *Aspergillus fumigatus*

## 1. 研究開始当初の背景

世界保健機関 (WHO) によると、喘息は子供の間で最も一般的な慢性疾患であり、世界中で 2 億 6,200 万人以上が罹患している。喘息の根本的な原因は未だ明らかにされていないが、その危険因子の 1 つは、真菌胞子、イエダニ、花粉などのアレルゲンの吸入であるとされている。最近の研究では、環境中に普遍的に存在する糸状真菌である *Aspergillus fumigatus* の感作がアレルギー性喘息や他の肺疾患の悪化に関与していることが示されている。

N-アセチル-d-グルコサミン (GlcNAc) のポリマーであるキチンはセルロースに次いで自然界に多く存在する多糖類であり、真菌は細胞壁の構成多糖としてキチンを生合成している。古くからキチンには免疫賦活作用があることが知られており、病原体関連分子パターン (PAMPs) として宿主に認識されると考えられてきた。2007 年の Nature 誌に Reese らによってキチンが気道のアレルギー反応を引き起こすことが報告されて以来、その発症機序は徐々に明らかにされつつあるが、未だ全容は解明されていない。キチンは粒子サイズに依存して自然免疫応答に影響を及ぼすことが報告されている。貪食可能なサイズのキチン粒子は、炎症性サイトカインの産生を誘導することが示されているが、より大きなサイズのキチン粒子は炎症性サイトカインの産生を誘導しないことが報告されている。また、貪食が不可能なサイズのキチン粒子は、TSLP、IL-25、IL-33 などの上皮細胞由来サイトカインの放出を介したマウスの肺への好酸球浸潤を誘導し、それに続いて 2 型自然リンパ球 (ILC2) が活性化されることが報告されている。さらに、キチンは適応免疫応答を増強する免疫アジュバントとして働くことも報告されている。これまでに多くの研究者がキチン受容体を発見しようと研究を重ねてきた。Silva ら (2008、2010) は TLR2 がキチンによるアレルギー反応に関与していると報告している。C 型レクチン受容体 (CLR) の一つである Dectin-2 は、マクロファージや樹状細胞サブセットを含む様々な骨髄系細胞集団で発現しており、 $\alpha$ -1,2-mannose を認識することが知られている。ダニアレルゲンは Dectin-2 依存的に Th2 細胞免疫を誘導することが示されているが、真菌によるアレルギー免疫反応における Dectin-2 の関与は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに *A. fumigatus* のキチン結合性細胞壁タンパク質 LdpA に関する研究を進めてきた。これらの一連の研究の中で、酵母 *Pichia pastoris* に異種タンパク質発現させた組換え LdpA (rLdpA) と小粒子キチンの複合体 (rLdpA-キチン粒子複合体) をマウスに経鼻投与すると気道への好酸球・好中球浸潤と Th2 型のアレルギー性免疫応答が強く誘導されることを確認している。LdpA はキチン結合モジュールである LysM ドメインを 3 つ保持しており、これらの N 末端側に O-結合型糖鎖の結合部位 (セリンとスレオニンの含有率が高い領域) が存在する。また、我々はこれまでにマウスの骨髄由来樹状細胞 (BMDCs) が rLdpA の糖鎖を認識し rLdpA-キチン粒子複合体を貪食することを明らかにした。さらに rLdpA-キチン粒子複合体が BMDCs に貪食されると TNF- $\alpha$  の産生が誘導されるのに対し、ポリスチレンビーズである DynaBeads と rLdpA の複合体 (rLdpA-DynaBeads 複合体) を貪食させた場合、TNF- $\alpha$  の産生が誘導されない現象を確認している。この現象は BMDCs が rLdpA の糖鎖を認識し複合体を貪食した後に、細胞内でキチンが認識されていることを示唆している。我々はこれらの現象が真菌細胞壁キチンによるアレルギー反応に深く関与していると考えた。しかしながら、この現象の中心的役割を担うであろうキチン受容体と rLdpA の糖鎖を認識している貪食受容体を同定するには至っていない。本研究では「真菌細胞壁キチンがどのような機序で生体に認識され、どのような機序でアレルギー反応を引き起こしているのか」を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) キチン粒子による炎症応答機序の解析

野生型マウスから骨髄細胞を採取し、GM-CSF で分化誘導することにより BMDCs を得た。BMDCs にキチン粒子 (約 0.6–5.9  $\mu$ m) を加え、キチン粒子を貪食している BMDCs をフローサイトメーターで測定した。また、24 時間後に培養上清中の TNF- $\alpha$ 、CXCL1、IL-1 $\alpha$  および細胞内の IL-1 $\alpha$  を ELISA で測定するとともに、キチン粒子による細胞傷害を培養上清中の LDH を測定することにより評価した。さらに、Cytochalasin D でキチン粒子の貪食を阻害した際の培養上清中の LDH と細胞内の IL-1 $\alpha$  を測定した。

### (2) LdpA の糖鎖を認識する受容体の同定

野生型マウスとノックアウトマウス (Card9<sup>-/-</sup>、Myd88<sup>-/-</sup>、Mincle<sup>-/-</sup>、MCL<sup>-/-</sup>、Dectin-2<sup>-/-</sup>、Dectin-1<sup>-/-</sup>) から骨髄細胞を採取し、GM-CSF で分化誘導することにより BMDCs を得た。各 BMDCs に rLdpA を加え、24 時間後に培養上清中の TNF- $\alpha$ 、CXCL1、CXCL2 を ELISA で測定した。

### ( 3 ) LdpA とキチン粒子の相乗効果による炎症反応の解析 ( *in vitro* )

野生型マウスと Dectin-2 ノックアウトマウスから骨髓細胞を採取し、GM-CSF で分化誘導することにより BMDCs を得た。各 BMDCs にキチン粒子および rLdpA-キチン粒子複合体をそれぞれ加え、キチン粒子および rLdpA-キチン粒子複合体を貪食している BMDCs をフローサイトメーターで測定した。また、BMDCs に rLdpA、キチン粒子、rLdpA-キチン粒子複合体をそれぞれ加え、1.5 時間後に BMDCs から RNA を抽出し、炎症性サイトカイン・ケモカイン ( TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-12 p35、IL-12p40、IL-6、CXCL1、CXCL2 ) の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で測定した。さらに 24 時間後に培養上清中の TNF- $\alpha$ 、CXCL1、IL-1 $\alpha$  を ELISA で測定した。

### ( 4 ) LdpA とキチン粒子の相乗効果による気道アレルギー性炎症反応の解析 ( *in vivo* )

rLdpA、キチン粒子、rLdpA-キチン粒子複合体を野生型マウスおよび Dectin-2 ノックアウトマウスに 3 回経鼻投与し、72 時間後に BALF 中の好中球数および好酸球数を測定した。また、72 時間後に採取した縦隔リンパ節細胞または脾細胞を rLdpA で再刺激し、培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5 を測定した。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) キチン粒子による炎症反応機序の解析

BMDCs を用いてキチン粒子による炎症反応を評価した。その結果、BMDCs がキチン粒子を貪食している様子が観察されたが、培養上清中の TNF- $\alpha$  および CXCL1 は検出されなかった。しかし、培養上清中の IL-1 $\alpha$  と細胞内の IL-1 $\alpha$  はともに上昇していた。さらに、これらの上昇は Cytochalasin D で貪食を阻害すると検出されなかった。IL-1 $\alpha$  は感染や傷害によって誘導される細胞死によって細胞外に放出にされ、炎症応答を誘導する代表的なアラームとして知られる。これらの結果から、キチン粒子は貪食された後に細胞内で認識されることにより IL-1 $\alpha$  の産生が誘導され、さらに細胞死が誘導されることにより IL-1 $\alpha$  が細胞外に放出されると考えられた。しかし、キチン粒子が細胞内で認識される分子機序を解明するまでには至らなかった。

### ( 2 ) LdpA の糖鎖を認識する受容体の同定

C 型レクチン受容体ノックアウトマウス由来の BMDCs を用いて rLdpA の糖鎖を認識する受容体の同定を試みた。その結果、野生型マウス由来の BMDCs では rLdpA の容量依存的に TNF- $\alpha$ 、CXCL1、CXCL2 の産生が誘導された。しかし、これらの産生誘導は C 型レクチン受容体シグナル伝達に参与するアダプタータンパク質である Card9 のノックアウトマウスおよび  $\alpha$ -1,2-mannose を認識する Dectin-2 のノックアウトマウスでは著しく低下していた。これらの結果から、rLdpA の糖鎖を認識する受容体は、Dectin-2 であることが明らかとなった。

### ( 3 ) LdpA とキチン粒子の相乗効果による炎症反応の解析 ( *in vitro* )

野生型マウスと Dectin-2 ノックアウトマウス由来の BMDCs を用いて、炎症反応に対する LdpA とキチン粒子の相乗効果を解析した。その結果、rLdpA-キチン粒子複合体はキチン粒子と比較して BMDCs による貪食が亢進していた。さらに Dectin-2 ノックアウトマウス由来の BMDCs では rLdpA-キチン粒子複合体の貪食が、野生型マウス由来の BMDCs と比較して低下していた。また、rLdpA-キチン粒子複合体は rLdpA およびキチン粒子と比較して、炎症性サイトカイン・ケモカインの遺伝子発現およびタンパク質発現ともに有意に増加していた。これらの結果から、Dectin-2 による rLdpA 糖鎖の認識は、rLdpA-キチン粒子複合体の貪食を促進し、炎症性サイトカイン・ケモカインを相乗的に強く誘導することが明らかとなった。

### ( 4 ) LdpA とキチン粒子の相乗効果による気道アレルギー性炎症反応の解析 ( *in vivo* )

野生型マウスと Dectin-2 ノックアウトマウスを用いて、気道アレルギー性炎症反応に対する LdpA とキチン粒子の相乗効果を解析した。その結果、rLdpA-キチン粒子複合体を投与した野生型マウスでは、BALF 中の好中球数および好酸球数が有意に増加していた。また、rLdpA-キチン粒子複合体を投与した野生型マウスから採取した縦隔リンパ節細胞または脾細胞を rLdpA で再刺激すると、Th2 サイトカインである IL-4 および IL-5 が有意に増加した。さらに、これらの増加は rLdpA-キチン粒子複合体を投与した Dectin-2 ノックアウトマウスでは、減弱していた。これらの結果から、rLdpA-キチン粒子複合体による気道アレルギー性炎症反応に Dectin-2 が関与することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Muraosa Yasunori, Hino Yutaro, Takatsuka Shogo, Watanabe Akira, Sakaida Emiko, Saijo Shinobu, Miyazaki Yoshitsugu, Yamasaki Sho, Kamei Katsuhiko	4. 巻 20
2. 論文標題 Fungal chitin-binding glycoprotein induces Dectin-2-mediated allergic airway inflammation synergistically with chitin	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1011878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1011878	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村長 保憲, 宮澤 拳, 高塚 翔吾, 星野 泰隆, 梅山 隆, 亀井 克彦, 宮崎 義継
2. 発表標題 Aspergillus fumigatusのO-結合型糖タンパク質による真菌免疫応答の解析
3. 学会等名 第66回 日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村長 保憲, 亀井 克彦, 宮崎 義継
2. 発表標題 Aspergillus fumigatusのO-結合型糖鎖を有する細胞壁糖タンパク質による真菌免疫応答の解析
3. 学会等名 第14回アスペルギルス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村長 保憲
2. 発表標題 Aspergillus fumigatus LdpA is a novel Dectin-2 ligand and induces Th2-driven airway inflammation synergistically with chitin
3. 学会等名 9th ITAM workshop
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------