

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07550

研究課題名(和文) 抗酸菌病原性脂質の宿主認識と免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of host recognition and immune control mechanisms for pathogenic lipids in acid-fast bacteria.

研究代表者

原 博満 (Hara, Hiromitsu)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：20392079

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)：抗酸菌の細胞壁脂質であるミコール酸とフェノール糖脂質を認識する自然免疫受容体を見出し、その感染病態形成における役割の解明を試みた。ミコール酸受容体TREM2は、M $\phi$ の許容的活性化を誘導し、Mincleを介した殺菌的M $\phi$ 活性化を抑制することが菌の免疫回避に関わっている可能性が示唆された。PGL受容体として同定したPGLRは、PGLが誘導するM $\phi$ のMCP-1産生に必須であり、MCP-1を介する結核菌の免疫回避に関わる可能性が示された。らい菌が発現するPGL-1による脱髄機構におけるPGLRの役割を明らかにするため、らい菌のマウス坐骨神経感染系を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究によって、結核菌やらい菌などの病原性抗酸菌が発現する病原性脂質が、宿主が発現する自然免疫受容体に作用することでその病原性を発揮することが明らかになりつつある。この分子機構が明らかになれば、結核やハンセン病の新しい治療薬の開発に資するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We identified host innate immune receptors that recognizes mycolic acid and phenolic glycolipid, which are cell wall lipids of acid-fast bacteria, and attempted to elucidate its role in the pathogenesis. The mycolic acid receptor TREM2 was suggested to be involved in the immune evasion of mycobacteria by inducing permissive activation of macrophages and suppressing the bactericidal M $\phi$  activation mediated by Mincle. PGLR, identified as a PGL receptor, was found to be essential for the production of MCP-1 induced by PGL in macrophages, and was suggested to be involved in the immune evasion of Mycobacterium tuberculosis mediated by MCP-1. To clarify the role of PGLR in the demyelination mechanism induced by PGL-1 expressed by Mycobacterium leprae, we established a mouse sciatic nerve infection model of leprosy.

研究分野：免疫学

キーワード：抗酸菌 自然免疫 マクロファージ 結核 ハンセン病

## 1. 研究開始当初の背景

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は世界人口の約四分の 1 が保有し、毎年 150 万人以上もの人が結核によって命を落としている。しかし、成人肺結核に対する有効なワクチンは今だに存在せず、超多剤耐性菌の出現や、エイズ患者や免疫抑制剤治療での再燃の増加など、その制圧は進んでいない。結核菌 W 北京株は世界中でしばしばアウトブレイクを引き起こす高病原性株であり、我が国の臨床分離株の 7~8 割がこの遺伝系統に属する。ハンセン病はらい菌 (*Mycobacterium leprae*) が引き起こす慢性感染症であり、現代の日本では稀な疾患であるが、世界的には年間約 60 万人の新規患者が発生しており、その三分の一以上が末梢神経障害を合併する。これは、らい菌が末梢神経の髄鞘を形成するシュワン細胞に親和性を有し、これに直接感染することで脱髄が誘導されるためであると言われている。しかし、らい菌による神経障害の機構は未だはっきりしない点が多い。

結核やハンセン病の効果的なワクチンや新規治療法を開発し、その制圧を目指す上で、抗酸菌と宿主免疫系との相互作用を理解することが不可欠である。抗酸菌はその細胞壁に免疫賦活活性を有する脂質や病原因子として働く脂質を発現する。フェノール糖脂質 (Phenolic glycolipid: PGL) は高病原性結核菌 W 北京株の細胞壁に発現する病原性因子として同定された。PGL はマクロファージの活性化を抑制するとともに、菌の最表層に発現することで TLR2 のリガンドをマスクし、殺菌性の iNOS 陽性マクロファージの集積を抑制する。さらに PGL は、未知の受容体を介して菌増殖のニッチとなる iNOS 陰性マクロファージ (許容的マクロファージ) を MCP-1 とその受容体 CCR2 依存的に動員することで病原性を発揮すると報告されている (Cambier et al. *Nature* 2014)。しかし、この PGL の作用の分子機構は未だ不明な点が多い。ハンセン病でみられる脱髄の誘導においても、らい菌特異的なフェノール糖脂質 PGL-1 の関与が報告されている。Ramakrishnan らのグループは、ゼブラフィッシュの脊髄内らい菌接種実験系を用いることで、PGL-1 の発現が抗酸菌による脱髄誘導に必要かつ十分であることを示し、さらに、PGL-1 がマクロファージに一酸化窒素 (NO) を産生させることが脱髄に必要であると報告した (Madigan et al. *Cell*. 2017)。しかし、PGL-1 がマクロファージの NO 産生を誘導する分子機構は不明である。

これまでの研究により、ITAM モチーフを有するアダプター分子 FcR 鎖に会合する C 型レクチン受容体 (CLR) である Mincle、Drcin-1、MCL、DCAR などが抗酸菌細胞壁の糖脂質分子を認識し、CARD9 シグナルを活性化することで肉芽腫形成や NO 産生などの抗抗酸菌的な自然免疫応答を惹起することが明らかにされている。一方、FcR 鎖と同じ ITAM 含有アダプター分子である DAP12 の欠損マウスでは、抗酸菌感染時における肺肉芽腫の形成や感染臓器での菌の増殖が抑制されることから、抗酸菌の免疫応答の抑制に働く可能性を持った DAP12 会合型 ITAM 共役型受容体の存在が示唆される。

## 2. 研究の目的

我々は、抗酸菌結合能を有する ITAM 共役型マクロファージ受容体のスクリーニングを実施した結果、DAP12 会合型のマクロファージ受容体 TREM2 が抗酸菌細胞壁のミコール酸 (Mycolic acids: MA) に強い親和性を有することを見出した。また、同様のスクリーニングを実施することで、抗酸菌のフェノール糖脂質 (PGL) を認識するマクロファージ受容体 PGLR (仮名) を見出した。PGLR もまた DAP12 に会合する ITAM 共役型受容体であった。本研究では、これらの受容体が認識する脂質構造を同定するとともに、これら受容体のマクロファージ活性化、抗酸菌免疫応答、結核、ハンセン病の病態形成における役割の解明を試みた。

### 3. 研究の方法

TREM2 を欠損する (*Trem2*<sup>-/-</sup>) マウスを作成し、*Trem2*<sup>-/-</sup>マウス由来のマクロファージの各種 MA 含有脂質に対する応答性を、野生型および Mincle、FcR<sub>2</sub>、DAP12 欠損マウス由来のマクロファージと比較した。また、TREM2 の抗酸菌感染防御における役割を調べるため、*Trem2*<sup>-/-</sup>マウスを用いた *Mycobacterium bovis* BCG 菌の肺感染試験を実施し、TREM2 欠損が抗酸菌の排除、感染組織における iNOS およびサイトカイン産生、肺肉芽腫形成に及ぼす影響を解析した。また、PGLR が認識する PGL 構造の同定を試みるとともに、PGLR 欠損マウス (*PGLR*<sup>-/-</sup>) を作成し、*PGLR*<sup>-/-</sup>マウス由来のマクロファージの PGL に対する応答性を調べた。また、結核やハンセン病の病態形成における PGLR の機能を見るため、らい菌や PGL 陽性結核菌である W 北京株 (HN878) のマウス感染試験系の樹立を試みた。

### 4. 研究成果

抗酸菌由来の MA 含有脂質は糖が付加したものと付加しないものに大別され、糖が付加しない MA 含有脂質によるマクロファージ活性化は、MCP-1 分泌と NO/TNF 非産生を特徴とする許容的マクロファージ活性化を誘導する。我々はこの応答が、TREM2 と DAP12 に依存することを見出した。一方、糖が付加した MA 含有脂質は TNF や NO 産生を特徴とする殺菌的なマクロファージ活性化を誘導するが、この応答は Mincle と FcR<sub>2</sub> に依存することを見出した。さらに、TREM2 や DAP12 を欠損したマウスは、MA 糖脂質が誘導する Mincle/FcR<sub>2</sub> を介した抗酸菌応答 (NO 産生、炎症サイトカイン産生、胸腺萎縮、肺肉芽腫形成) が亢進し、BCG 菌感染肺からの菌のクリアランスも促進されることを見出した。従って、TREM2 の活性化は許容的マクロファージの誘導を促すとともに、Mincle を介した殺菌的免疫応答を抑制して抗酸菌の免疫回避に関わっている可能性が示唆された (Iizasa et al. *Nat Commun.* 2021)。

抗酸菌由来の PGL 種は、非糖付加 MA と同様に、MCP-1 産生を特徴とする許容的マクロファージ活性化を誘導することを見出した。さらに、この応答が PGLR や DAP12 の欠損によってほぼ完全に消失することを見出した。Cambier らは、ゼブラフィッシュを用いたマクロファージ感染実験系で、PGL による MCP-1 産生は細胞内 DNA センサー STING が媒介すると報告している (Cambier et al. *Immunity* 2017)。しかし我々は、マウスのマクロファージでは STING 欠損は PGL による MCP1 産生に全く影響しないことを見出した。すなわち、哺乳類マクロファージにおける PGL 応答は、STING ではなく PGLR が媒介していることが示唆された。

抗酸菌の PGL 種は、共通のコア構造である PDIM (phthiocerol dimycocerosates) の末端に菌種に特徴的な糖が付加した構造を有する。PGLR が認識する PGL 構造を明らかにするため、PDIM によるマクロファージ活性化を試みた。その結果、PDIM は PGL と同様の許容的マクロファージ応答を誘導し、この PDIM による応答も PGLR と DAP12 に完全に依存することがわかった。すなわち、PGLR は PGL 末端の糖構造に関係なく、PDIM コア構造を認識していることが判った。

ハンセン病の脱髄誘導における PGLR の役割を *in vivo* で検証するため、マウス坐骨神経内にらい菌を接種することで脱髄を誘導する試験を試みた。らい菌接種後 3、7 日目に坐骨神経を採取し、電子顕微鏡観察により感染細胞の同定をおこなった。その結果、少なくとも感染後 7 日目までには、従来報告されているようなシュワン細胞内にらい菌は観察されず、浸潤したマクロファージや好中球内にのみらい菌と思われる菌体の存在が確認された。感染マクロファージの周辺では、脱髄した神経軸索や、ミエリンが解けた糸状の構造物が頻りに観察された。このこと

から、らい菌はシュワン細胞への直接感染ではなく、免疫細胞が引き起こす炎症応答によって脱髄を引き起こしている可能性が示唆された。また、国内には存在しなかった PGL 陽性の結核菌 W 北京株（HN878）を海外より入手し、噴霧感染によりマウスへの肺感染を試みた、しかし、感染後の肺に菌コロニーが形成されず、過去文献に記載されているような病原性を観察することができなかった。そのため別ルートより新しい北京株を再入手し、これを拡大培養中である。今後これを用いたマウス肺感染を行い、十分な病原性を確認した上で PGLR 欠損マウスへの感染を実施する予定である。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ei'ichi Iizasa, Yasushi Chuma, Takayuki Uematsu, Mio Kubota, Hiroaki Kawaguchi, Masayuki Umemura, Kenji Toyonaga, Hideyasu Kiyohara, Ikuya Yano, Marco Colonna, Masahiko Sugita, Goro Matsuzaki, Sho Yamasaki, Hiroki Yoshida, Hiromitsu Hara	4. 巻 12
2. 論文標題 TREM2 is a receptor for non-glycosylated mycolic acids of mycobacteria that limits anti-mycobacterial macrophage activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 2299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22620-3	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ei'ichi Iizasa, Kenji Toyonaga, and Hiromitsu Hara
2. 発表標題 Immunoregulation of mycobacteria through the recognition of lipids by host ITAM-coupled receptors
3. 学会等名 第95回日本ハンセン病学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原博満
2. 発表標題 抗酸菌ミコール酸含有脂質に対するパターン認識と応答
3. 学会等名 第31回日本生体防御学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原博満
2. 発表標題 ITAM 共役型パターン認識受容体を介した抗酸菌免疫応答の制御
3. 学会等名 第 39 回九州実験動物研究会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原博満
2. 発表標題 TREM2を介した抗酸菌の免疫回避貴校
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原博満
2. 発表標題 宿主自然免疫受容体による脂質認識を介した抗酸菌の免疫制御
3. 学会等名 第26回日本神経感染症学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究分担者	久住 聡  (kusumi satoshi)  (00758039)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教   (17701)	
研究分担者	柴田 昌宏  (shibata masahiro)  (10343253)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授   (17701)	
研究分担者	阿戸 学  (ato manabu)  (20392318)	国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・部長   (82603)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	宮本 友司  (miyamoto yuji)  (40392328)	国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・主任研究官    (82603)	

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