

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：32409
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009 年～2011 年
 課題番号：21590489
 研究課題名（和文）宿主免疫応答におけるカンジダ核酸成分の認識と C タイプレクチン受容体による調節機構
 研究課題名（英文）
 Recognition of Candida DNA and regulation of signaling by C type lectin receptor
 研究代表者
 宮里 明子（MIYAZATO AKIKO）
 埼玉医科大学・医学部・講師
 研究者番号：50400370

研究成果の概要（和文）：カンジダ・アルビカンスは、ヒトの口腔内および消化管に常在する真菌であるが、免疫の低下したヒトでは感染症の原因となる。本研究は、カンジダ感染症の発症メカニズムの一端を理解するため、感染防御の初期段階である、免疫細胞上あるいは細胞内にある受容体を介した微生物の認識経路を検討した。その結果、カンジダの DNA を認識する Toll 様受容体（TLR）9 からのシグナルと、近年多糖成分を認識する受容体として報告された dectin-2 の細胞内シグナルには相互作用があり、両受容体が共同してカンジダ感染時の宿主免疫応答を調節していることが示された。

研究成果の概要（英文）：The fungus *Candida albicans* colonizes the mucosal tissue of the oral cavity and the gastrointestinal tract, where it is part of the normal commensal microflora. However, under immune-compromised conditions, it can cause local and systemic candidiasis. To understand host defense mechanism against *Candida*, we analysed the interaction of signaling between TLR9 and dectin-2. As a result, we observed the collaborative induction of immune responses by these two receptors, which regulated the immunological status of the host during *Candida albicans* infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：感染免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 微生物が体内に侵入すると、はじめにマクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞が、受容体を介して微生物を認識する。そして、細胞内で様々なシグナルが活性化し、

その結果産生されたサイトカインによって、より特異的な T 細胞リンパ球（Th）による免疫応答が誘導され、微生物の排除に向かう。
 (2) *Candida albicans* は酵母型と菌糸型の両方の形態をとる二形成真菌で、ヒトの口腔内、消化管の常在菌である。しかし免疫の低下し

た宿主では感染症を起こすことがあり、感染防御には Th1 型および Th17 型の免疫応答が重要であることが報告されている。この Th1 の誘導には Toll 様受容体 (TLR) からのシグナルが関与しており、Th17 の誘導には C タイプレクチン受容体 (CLR) からのシグナルの関与が示唆されている。

(3) またこれらの、TLR や CLR からのシグナルが細胞内で相互に作用していることが知られるようになり、真菌感染においては、*Candida* 細胞壁成分の受容体である TLR2 からのシグナルを、グルカンの受容体である dectin-1 (CLR の 1 種) が増強し、サイトカイン産生量に影響を及ぼすことがわかっている。

(4) 我々は *Candida* の核酸成分である DNA に着目し、TLR9 を介した自然免疫活性化を報告してきた。一方、CLR の一つで *Candida* の細胞壁のマンナンを受容体である dectin-2 が発見され、感染防御に重要であると報告されたが、この dectin-2 を欠損した細胞内では DNA によるシグナルの活性化が消失することが観察され、TLR9 と dectin-2 の相互作用が推測された。

2. 研究の目的

Candida の核酸成分の受容体である TLR9 と、細胞壁のマンナンを認識する受容体である dectin-2 からのシグナルの相互作用を解明する。このことで *Candida* 感染に体する宿主免疫応答の詳細をさらに明らかにし、免疫療法などの新たな治療法を模索する。

3. 研究の方法

本研究では in vitro および in vivo のモデルを用いて解析を行った。

(1) in vitro の解析

TLR9 と dectin-2 のシグナル伝達レベルでの影響を解析するため、両遺伝子をマウスマクロファージ細胞株 RAW 細胞に導入して、各種 TLRs リガンド、*Candida* DNA (CA-DNA) および *Candida* 菌体で刺激し、上清中のサイトカイン濃度を測定した。また同細胞より mRNA を抽出して、各受容体遺伝子の発現の推移について解析した。

TLR9 遺伝子欠損 (TLR9KO)、dectin-2 遺伝子欠損 (dectin-2KO) および両遺伝子を欠損 (DKO) マウスを作製し、骨髄より樹上細胞 (BM-DC) を採取して、上記同様の検討を行った。

(2) In vivo の検討

TLR9KO、dectin-2KO、DKO および野生型マウスに *Candida* 1×10^5 を尾静脈より経

静脈的に感染させ、生存率を観察した。また感染 10 日後に腎臓での菌数をカウントした。

感染によって誘導されるリンパ球分画を検討するために、感染 10 日後に脾細胞を分離し、CD4 および IFN- γ 、IL-17 抗体で染色を行いフローサイトメトリーで解析した。さらに mRNA を抽出し、Tbet、GATA3、ROR γ t および Foxp3 の転写遺伝子の発現を解析して、誘導される T 細胞サブセットを明らかにした。

両受容体の生体での役割を明らかにするため、感染後の腎臓、脾臓および肝臓の HE 染色組織を解析した。

感染後の各群マウス血清中の抗カンジダ抗体を、熱処理した *Candida* 菌体を用いて ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) in vitro の検討結果

RAW 細胞に dectin-2 遺伝子を導入し *Candida* DNA (CA-DNA) および *Candida* 菌体で刺激すると、各種サイトカイン (TNF- α 、IL-12p40、IL-10) の産生に影響を及ぼした。負および正の影響についてはサイトカインによって異なっていた。

刺激を与えたときの細胞での dectin-2 と TLR9 の遺伝子の発現量を検討したところ、一方の刺激によって他方の遺伝子の発現増強がみられた。このことから両遺伝子の相互作用が示唆された

TLR9KO、dectin-2KO および DKO から採取した骨髄由来樹状細胞 (BM-DC) を各種リガンドで刺激したところ、両遺伝子の欠損では、単一の遺伝子の欠損よりサイトカイン産生能の低下がみられた。このことから両遺伝子の相互作用が示唆された

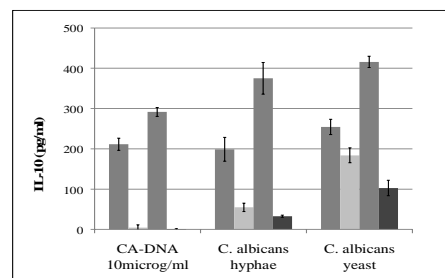
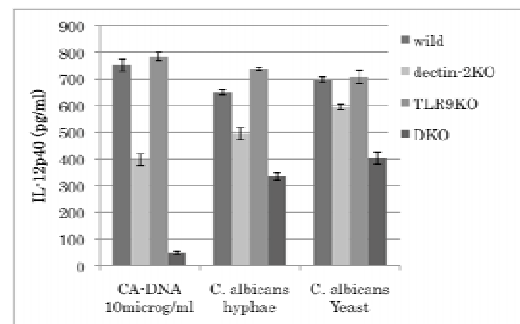


図 1. *Candida* 刺激時の遺伝子欠損マウス BM-DC からの IL-12p40 および IL-10 産生の比較

(2) in vivo の検討結果

野生型および各遺伝子欠損マウスに、経静脈的に *Candida* を感染させ、10 日後に腎臓および脾臓を摘出し検討した。その結果、TLR9KO, dectin-2KO および DKO マウスは、野生型と比較し腎臓内の菌数が著明に増加していたが、その程度は各群間で差はなかった。しかし、好中球を主体とした炎症細胞浸潤、微小膿瘍からなる腎盂炎の程度は単独遺伝子欠損群と比較し、DKO においてより強くみられた。このことから、腎臓での炎症細胞誘導に、両遺伝子が共同して作用していることが示唆された。

脾臓のリンパ球分画では、DKO マウスで IFN- γ 産生細胞が他群より減少していたが、IL-17 および IL-4 産生細胞については差がみられなかった。

TLR9KO および dectin-2KO マウスでは、野生型マウスと比較して脾臓の形質細胞数に差はなかったが、DKO では形質細胞の増数がみられ、慢性炎症によるリンパ濾胞の萎縮がみられた。さらに、血清中の抗カンジダ抗体価が他群と比較して上昇していた。ことから液性免疫の成立に、両受容体からのシグナルが共同で作用していることが示唆された。

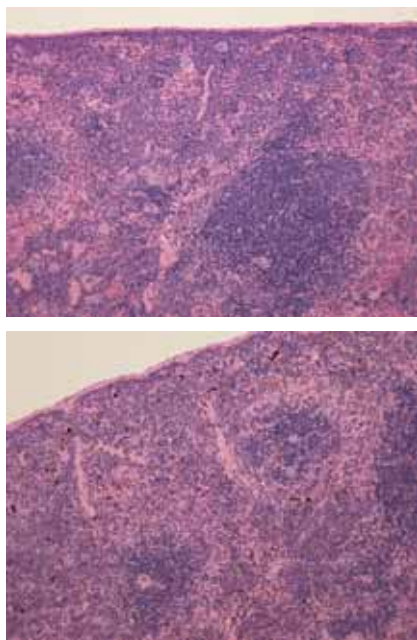


図 2. *Candida* 感染マウスモデルの脾臓組織所見. Dectin-2KO (上) および DKO (下)

(3) 得られた成果の国内外における位置づけ

CLR のような ITAM を有する受容体は、TLR やサイトカインによるシグナル伝達経路を、細胞内レベルで調節すると報告されている。例えば dectin-1 は TLR2 のシグナルを増強し、TNF- α などのサイトカイン産生を促進する。一方、dectin-2 と他の受容体の相互作用に関する報告は現在までに報告がないものの、dectin-2 の遺伝子欠損マウスは *Candida* 感染に対して感受性が高まることが報告近年され、dectin-2 と他の受容体の相互作用について検討することは、感染防御機構を理解するためには重要であると考えられる。

Candida に対する自然免疫応答は、主に細胞壁の成分である多糖の認識に関して検討されてきた。そのため受容体として TLR2、TL4 のシグナル活性化については詳細に解析されているが、我々は核酸成分 DNA の TLR9 を介したシグナル活性化についての細胞レベルでの詳細な検討をはじめて報告した。また我々の in vivo の検討で、TLR9KO マウスは *Candida* 感染に対して野生型と比較し耐性を示すことかは、感染防御における TLR9 の重要性を裏付けるものと考えられる。

以上のように *Candida* 感染時の宿主免疫応答に dectin-2 と TLR9 は重要な役割を果たすもので、本研究は両受容体の相互作用を国内外ではじめて示したものである。また、受容体の相互作用のマウスモデルを用いた in vivo での検討も、*Candida* 感染においては本研究がはじめてであり、生体内での宿主免疫応答を理解するうえで、重要な知見を与えるものであると考える。

(4) 今後の展望

DNA の受容体である TLR9 と、多糖成分マンナンの受容体である dectin-2 が相互に関わり、*Candida* 感染に対する宿主免疫応答を調節していることが、本研究で明らかになった。*Candida* はヒトの口腔内および消化管の常在菌であるが、様々な状況において感染症の原因となる。しかしその過程についてはまだ不明な点も多いが、今回の結果をふまえて各受容体のリガンドを用いた免疫療法の可能性について、検討する予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計5件)

- 1) 宮里明子 他、カンジダ全身感染マウスモデルでの TLR9 遺伝子欠損の影響、日本免疫学会総会、2011 年 11 月 28 日、千葉
- 2) 宮里明子 他、Candida albicans に対する宿主免疫応答での TLR9 と dectin-2 シグナルの相互作用、感染症学会、2011 年 4 月 22 日、東京
- 3) Miyazato A., et al. Host immune response to stimulation of Candida albicans DNA. 14th International Congress of Immunology. 2010.8.24. Tokyo.
- 4) 宮里明子 他、自然免疫によるカンジダ核酸成分の認識と dectin-2 シグナルの影響、日本生体防御学会、2010 年 7 月 23 日、宮城
- 5) 宮里明子 他、宿主自然免疫によるカンジダ核酸の認識と感染防御、日本細菌学会、2010 年 3 月 27 日、神奈川

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮里 明子 (MIYAZATO AKIKO)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：50400370