

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390101

研究課題名(和文) C型レクチンによる真菌感染防御機構の解明

研究課題名(英文) The role of C-type lectins in the host defense against fungal infections

研究代表者

西城 忍 (Saijo, Shinobu)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任准教授

研究者番号：60396877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：病原真菌の多くは環境中あるいは宿主に常在し、通常は病原性を示さない。ところが、宿主免疫応答の低下により日和見感染症を引き起こし、時に致命的な病態に発展する。そこで本研究では、将来的な治療薬の新しい分子標的を見いだすことを目指し、マウスモデルを用いて真菌感染防御機構の分子基盤を明らかにすることを目的とした解析を行うこととした。その結果、1)糖鎖を認識する分子群であるC型レクチンファミリー分子が感染防御に重要な役割を担っていること、2)これらの分子の間で、互いに協働して機能すること、などを明らかにした。これらの研究成果は新しい治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The C-type lectin is a large group of transmembrane and extracellular proteins and is characterized by the extracellular domain called CRD (carbohydrate binding domain). Although C-type lectins expressed in dendritic cells (DCs) and macrophages had been suggested to be members of pattern recognition receptors (PRRs), their functions have long been remained unclear. Therefore, we aimed to clarify the molecular mechanisms of C-type lectins in the host defense against microbial infections. In this study, we found that Dectin-1 is a receptor for fungal cell wall beta-glucans and Dectin-2 is a receptor for another fungal cell wall carbohydrate alpha-mannans as well as bacterial cell wall component. More importantly, these C-type lectins are crucial for the host defense against fungal and bacterial infections. Thus, the studies clearly showed that both Dectin-1 and Dectin-2 are PRRs that control microbial infections.

研究分野：医歯薬学

キーワード：サイトカイン C型レクチン 真菌感染防御 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

病原真菌の多くは環境中あるいは宿主に常在し、通常は病原性を示さない。ところが、宿主免疫応答の低下により日和見感染症を引き起こし、時に致命的な病態に発展する。従って、近年の超高齢社会や免疫抑制を伴う高度医療の進展により、真菌感染症は見過ごすことのできない重大な問題になりつつある。一方でこれまでは、その発症頻度が低いことなどの理由により、真菌に対する宿主応答機構はあまり注目されてこなかった。そのため、真菌症の発症機構も不明な点が多く残っており、治療薬の選択肢も限られたものとなっている。そこで本研究では、将来的な治療薬の新しい分子標的を見いだすことを目指し、マウスモデルを用いて真菌感染防御機構の分子基盤を明らかにすることを目的とした解析を行うこととした。

2. 研究の目的

C型レクチンは膜タンパク質で、細胞外のCRDと呼ばれる領域で糖鎖を認識する。これまで、DCやマクロファージに発現するC型レクチンの機能はほとんど不明であったが、申請者らは、Dectin-1、Dectin-2がそれぞれ別個の真菌細胞壁糖鎖を認識することにより感染防御に重要な役割を果たしていること、DCIRがDCの数を制御することにより、免疫系の恒常性を維持していること等を明らかにした(Saijo et al., *Nat. Immunol.*, 2007, Saijo et al., *Immunity*, 2010, Fujikado, Saijo et al., *Nat. Med.*, 2008)。しかし、Dectin-1やDectin-2以外にも真菌を感知するレセプターの存在も示唆されること、これらのシグナルを負に制御する分子についてはこれまで知られていないこと等、真菌感染防御機構にはまだ不明な点が多く残る。そこで本研究では、複数のC型レクチンやサイトカインのKOマウスを用い、1) C型レクチンによる真菌感染防御機構の解明、2) DCやマクロファージに発現する機能未知のC型レクチンの機能解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

DCやマクロファージに発現するC型レクチンは、マウスでは6番染色体のテロメア側、ヒトでは12番染色体短腕にクラスター状に存在し、相同性も高い。本研究では、このクラスター上にコードされる遺伝子のうち、すでに作製したDectin-1、Dectin-2のKOマウス用い *Candida albicans* (*C. albicans*) や *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*)等の真菌感

染時のこれらの分子の役割を検討するとともに、Dectin-1/Dectin-2二重欠損マウスの作製、Dectin-1やDectin-2の下流でシグナル伝達に関与していると考えられる分子のKOマウスを作製する。さらに、6番染色体のC型レクチンクラスターに存在する他の分子のKOマウスを作製し、真菌感染防御における役割を検討し、最終的に真菌感染防御機構におけるC型レクチンの役割を包括的に明らかにする。

4. 研究成果

Dectin-1とDectin-2は共に微生物特有成分(Pathogen Associated Molecular Patterns: PAMPs)として真菌細胞壁の構成成分を認識するが、認識する糖鎖構造は異なり、Dectin-1はβグルカン、Dectin-2はαマンナンを認識する。これらのC型レクチンがリガンドを認識後、どのような生物現象が起きるのか等の点については全く不明であったが、申請者らはKOマウスを用いた解析から、Dectin-1がβグルカンの主要なレセプターであり強力にサイトカインや活性酸素種(ROS)の産生を誘導すること、実際、*Pneumocystis carinii* (*P. carinii*)の感染時には、Dectin-1がROSの産生を介して菌体の排除に重要な役割を担っていることなどを明らかにした。ところが、Dectin-1は別の病原性真菌である *C. albicans* に対する感染感受性は正常で、野生型(WT)マウスと違いは見られなかった。この反応性の差に関し、真菌細胞壁の構造を考えると、Dectin-1のリガンドであるβグルカンは比較的内側に位置しており、菌種により外側に露出されている割合が異なるため、宿主の感染防御機構におけるDectin-1の寄与の程度が異なると考えられた。そこで、SC5314株とATCC18804株の2種類の菌株を用いて観戦実験を行ったところ、ATCC18804株では観戦後の生存率にWTマウスと差が見られなかったが、SC5314株では有意に生存率が低下した。Dectin-2 KOマウスでは両方の菌株で生存率が低下した。興味深いことに、Dectin-1とDectin-2の二重欠損マウスでは、Dectin-2単独KOマウスと比較して有意に生存率が低下しており、Dectin-1とDectin-2にcollaboration機構があることが示された。

一方、Dectin-2の認識する糖鎖である高マンノース構造は、真菌以外にも病原細菌やウイルスなどにも存在する。そこで、Dectin-2 KOマウスを用いて抗酸菌の一種である *Mycobacterium avium* complex (MAC)の感染実験を行ったところ、感染後の肺重量はDectin-2 KOマウスで有意に増加し、CFU値も増加傾向があった。これらの結果から、Dectin-2は真菌以外にも抗酸菌細胞壁成分を

認識し、感染防御にも関与していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 22 件)

1. Akitsu A, Ishigame H, Kakuta S, Chung S-H, Ikeda S, Shimizu K, Kubo S, Liu Y, Umemura M, Matsuzaki G, Yoshikai Y, Saijo S, and Iwakura Y. IL-1 receptor antagonist-deficient mice develop autoimmune arthritis due to intrinsic activation of IL-17-producing CCR2⁺V γ 6⁺ γ δ T cells. *Nat. Commun.* In press. 2015. 査読有り
2. Yabe R, Iwakura Y, Saijo S*. Host defense by C-type lectin receptors against microbial pathogens. *Glycoscience: Biology and Medicine*, Springer Japan, 2014 doi: 10.1007/978-4-431-54836-2_180-1 査読有り
3. Yonekawa A, Saijo S, Hosino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-hora M, Akashi K, Yamasaki S. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of Mycobacteria. *Immunity*. 41:402-413, 2014. doi: 10.1016/j.immuni.2014.08.005. 査読有り
4. Chiba S, Ikushima H, Ueki H, Yanai H, Kimura Y, Hangai S, Nishio J, Negishi H, Tamura T, Saijo S, Iwakura Y, Taniguchi T. Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *eLife* e04177. 2014. doi: 10.7554/eLife.04177. 査読有り
5. Ohman T, Teirila L, Lahesmaa-Korpinen AM, Cypryk W, Veckman V, Saijo S, Wolff H, Hautaniemi S, Nyman TA, Matikainen S. Dectin-1 pathway activates robust autophagy-dependent unconventional protein secretion in human macrophages. *J Immunol*. 192(12):5952-62. 2014. doi: 10.4049/jimmunol.1303213. 査読有り
6. Akitsu A, Kakuta S, Saijo S, Iwakura Y. Rag2-deficient IL-1 Receptor Antagonist-deficient Mice Are a Novel Colitis Model in Which Innate Lymphoid Cell-derived IL-17 Is Involved in the Pathogenesis. *Exp Anim*. 63(2):235-46. 2014. Doi: <http://doi.org/10.1538/expanim.63.235> 査読有り
7. Norimoto A, Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Yokota M, Takahashi K, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H. Dectin-2 promotes house dust mite-induced T helper type 2 and type 17 cell differentiation and allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 51(2):201-9. 2014. doi: 10.1165/rcmb.2013-0522OC. 査読有り
8. Kobiyama K, Aoshi T, Narita H, Kuroda E, Hayashi M, Tetsutani K, Koyama S, Mochizuki S, Sakurai K, Katakai Y, Yasutomi Y, Saijo S, Iwakura Y, Akira S, Coban C, Ishii KJ. Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(8):3086-91. 2014 査読有り
9. Parsons MW, Li L, Wallace AM, Lee MJ, Katz HR, Fernandez JM, Saijo S, Iwakura Y, Austen KF, Kanaoka Y, Barrett NA. Dectin-2 regulates the effector phase of house dust mite-elicited pulmonary inflammation independently from its role in sensitization. *J Immunol*. 192(4):1361-71. 2014. doi: 10.1073/pnas.1319268111. 査読有り
10. Ikeda S, Saijo S, Murayama MA, Shimizu K, Akitsu A, Iwakura Y. Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF- β -induced Foxp3 expression. *J Immunol*. 192(4):1449-58. 2014. doi: 10.4049/jimmunol.1300387. 査読有り
11. Wang H, LeBert V, Hung CY, Galles K, Saijo S, Lin X, Cole GT, Klein BS, Wüthrich M. C-type lectin receptors differentially induce th17 cells and vaccine immunity to the endemic mycosis of North America. *J Immunol*. 192(3):1107-19. 2014. doi: 10.4049/jimmunol.1302314. 査読有り
12. Murayama MA, Kakuta S, Maruhashi T, Shimizu K, Seno A, Kubo S, Sato N, Saijo S, Hattori M, Iwakura Y. CTRP3 plays an important role in the development of collagen-induced arthritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 443(1):42-8. 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.040. 査読有り
13. Miyasaka T, Akahori Y, Toyama M, Miyamura N, Ishii K, Saijo S, Iwakura Y, Kinjo Y, Miyazaki Y, Oishi K, Kawakami K. Dectin-2-dependent NKT cell activation and serotype-specific antibody production in mice immunized with pneumococcal polysaccharide vaccine. *PLoS One*. 8(10):e78611. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0078611. 査読有り
14. Ishikawa T, Itoh F, Yoshida S, Saijo S, Matsuzawa T, Gonoi T, Saito T, Okawa Y, Shibata N, Miyamoto T, Yamasaki S. Identification of distinct ligands for the C-type lectin receptors Mincle and Dectin-2 in the pathogenic fungus *Malassezia*. *Cell Host Microbe*. 13(4):477-88. 2013. doi: 10.1016/j.chom.2013.03.008. 査読有り
15. Ahn J, Delia G, Saijo S, Barber GN,

- STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(47): 19386-19391, 2012. doi: 10.1073/pnas.1215006109. 査読有り
16. Saijo S, and Iwakura Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol* 23: 467-472, 2011. doi: 10.1093/intimm/dxr046. 査読有り
 17. Rivera A, Hohl TM, Collins N, Leiner I, Gallegos A, Saijo S, Coward JW, Iwakura Y, and Pamer EG. Dectin-1 diversifies *Aspergillus fumigatus*-specific T cell responses by inhibiting T helper type 1 CD4 T cell differentiation. *J Exp Med* 208(2): 369-381, 2011. doi: 10.1084/jem.20100906. 査読有り
 18. Qi C, Cai Y, Gunn L, Ding C, Li B, Kloecker G, Qian K, Vasilakos J, Saijo S, Iwakura Y, Yannelli JR, and Yan J. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived -glucans. *Blood* 117: 6825-6836, 2011. doi: 10.1182/blood-2011-02-339812. 査読有り
 19. Fei M, Bhatia S, Oriss TB, Yarlagadda M, Khare A, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Fallert Junecko BA, Reinhart TA, Foreman O, Ray P, Kolls J, and Ray A. TNF- α from inflammatory dendritic cells (DCs) regulates lung IL-17A/IL-5 levels and neutrophilia versus eosinophilia during persistent fungal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5360-5365, 2011. doi: 10.1073/pnas.1015476108. 査読有り
 20. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, and Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34: 149-162, 2011. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.012. 査読有り
 21. Drummond RA, Saijo S, Iwakura Y, and Brown GD. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *Eur J Immunol* 41: 276-281, 2011. doi: 10.1002/eji.201041252. 査読有り
 22. Bhatia S, Fei M, Yarlagadda M, Qi A, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, van Rooijen N, Gibson GA, St. Croix CM, Ray A, and Ray P. Rapid host defense against *Aspergillus fumigatus* involves alveolar macrophages with a predominance of alternatively activated phenotype. *PLoS One* 6: e15943, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0015943. 査読有り
- 〔学会発表〕(計 12件)
1. 西城忍: 「真菌感染に対する生体防御システム」千葉大学未来医療教育研究機構シンポジウム 第4部「玄鼻キャンパスの特色ある先端研究・教育の紹介」2014.7.26日(ステーションコンファレンス東京、東京)
 2. 西城忍: 「真菌感染防御におけるC型レクチンの役割」糖鎖免疫研究会 Glyco-Immunology 2014, 2014.2.18(東京医科歯科大学、東京)
 3. 西城忍: 「カビの病気を防ぐ免疫のしくみ」平成25年度国立大学附置研究所・センター長会議 第2部会シンポジウム「超高齢社会に忍びよるカビの脅威～病原真菌による疾患の制圧を目指して～」2013.10.25(京成ホテルミラマール、千葉市、千葉)
 4. 西城忍: 「C型レクチンによる炎症反応制御機構の解明」JST さきがけ研究報告会, 2013.12.10(東京コンファレンスセンター、東京)
 5. 西城忍: 「C型レクチンと真菌感染防御機構」感染症研究グローバルネットワークフォーラム 2013, 2013.11.30(千葉大学、千葉市、千葉)
 6. Saijo S, and Iwakura Y., The roles of Dectin-1 and Dectin-2 in the innate immune response. *The 18th congress of ISHAM*, Berlin, Germany, June 11-15, 2012.
 7. Saijo S. C-type lectins: Their roles in innate and acquired immunity. *JSICR-MMCB*, ANA Gate tower Hotel, Izumisano, Osaka Japan, May 25-27, 2011.
 8. 西城忍: C型レクチンによる真菌感染防御機構の解明, 第22回日本生体防御学会学術総会, 那覇市、沖縄, 6月29日～7月1日, 2011.
 9. Saijo S. C-type lectins: their roles in the host defense against fungal infection. RCAI 10th Anniversary Seminar Series, RCAI, Yokohama Japan, October 19, 2011
 10. 西城忍: C型レクチンによる真菌感染防御機構, 第55回日本医真菌学会学術集会, ホテル椿山荘、東京, 10月21日～10月22日, 2011.
 11. Saijo S. C-type lectins and fungal infection. 6th Chiba University Global COE Symposium. Makuhari Messe, Chiba Japan, November 30, 2011
 12. 西城忍: C型レクチンによる生体防御機構, 千葉大学 G-COE セミナー, 4月6日, 千葉大学、千葉, 2011
- 〔図書〕(計 4件)
1. 西城忍: C型レクチン. 「疾患モデルの作製と利用-免疫疾患」岩倉洋一郎編集, 第4節自然免疫欠損マウス, 第2項 493-496, 株式会社エル・アイ・シー, 2011.
 2. 西城忍: Dectin-2誘導 Th17細胞によるカンジダ感染防御. 感染・炎症・免疫 41: 75-77, 医薬の門社, 2011

3. 角田茂, 西城忍: 真菌免疫応答における C 型レクチン受容体の役割. 化学療法領域 28: 59~66, 医薬ジャーナル社, 2011
4. 西城忍: 真菌による自然免疫活性化機構. 炎症と免疫 20: 16-20, 先端医学社, 2011

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

http://www.pf.chiba-u.ac.jp/bunya_kansenmeneki/

/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西城 忍 (SAIJO, Shinobu)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任准教授

研究者番号: 60396877

(2) 研究分担者

岩倉 洋一郎 (IWAKURA, Yoichiro)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授

研究者番号: 10089120

米山 光俊 (YONEYAMA, Mitsutoshi)

千葉大学・真菌医学研究センター・教授

研究者番号: 40260335