

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790919

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス感染におけるITAM受容体-CARD9シグナルの役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of innate immune responses through ITAM coupled receptor-CARD9 signaling in influenza virus infection.

研究代表者

植松 崇之 (UEMATSU, Takayuki)

北里大学・北里大学メディカルセンター・上級研究員

研究者番号：90414060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ITAM関連受容体の下流でNF- κ Bを活性化するアダプター分子として知られるCARD9のインフルエンザウイルス(IFV)感染における役割を解明すべく、CARD9欠損マウスを用いた感染実験を実施した。その結果、IFV感染に伴う自然免疫の過剰な活性化に、主に樹状細胞におけるCARD9シグナルを介した自然免疫応答機構が関与し、CARD9欠損マウスでは野生型マウスに比較してIFV感染後の生存率が有意に改善し、インフルエンザ肺炎に付随する炎症性サイトカインの過剰産生や肺組織障害の発生などの臨床的症狀が軽減することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We focused on the function of the adaptor molecule CARD9, which is essential for NF- κ B signaling pathway activation through ITAM-coupled receptors, and analyzed the role for innate immune activation through the CARD9 pathway in IFV infection. CARD9-deficient mice showed improved survival rate compared with control mice in pulmonary IFV infection. In CARD9-deficient mice, decrease in the production of inflammatory cytokines in BAL fluid and the inflammatory cell infiltration was observed, and the amount of viral RNA in the lungs was also slightly decreased compared with control mice. Cytokine production by macrophages stimulated with IFV remained unchanged, but that by bone marrow-derived conventional DCs or plasmacytoid DCs was decreased in CARD9-deficient mice. Collectively, our findings indicate that activation of innate immunity through the CARD9 pathway in DCs is involved in the excessive inflammation in IFV-infected lungs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、呼吸器内科学

キーワード：自然免疫 肺炎 インフルエンザウイルス

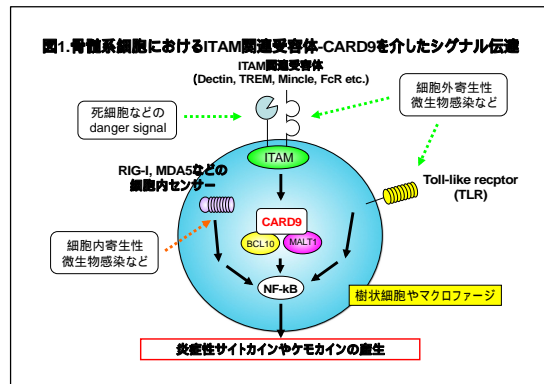
1. 研究開始当初の背景

小児や高齢者にとって、感染症は時に生命をも危険にさらす脅威である。その中でも、インフルエンザウイルス (IFV) 感染症は、本邦では毎年 200~300 万人の小児が罹患すると言われているが、特に免疫が未発達な小児では肺炎や急性脳症を合併する例も多い。ワクチン接種や抗ウイルス剤の投与は有効であるが、重篤な症例を寛解させるための根本的な手段とはならないことから、既存の概念に因らない有効な対策が求められている。

いわゆるインフルエンザ肺炎や急性脳症重篤化の要因は、IFV 感染により自然免疫系が混乱を来し、生じた獲得免疫系発動の遅れによる。加えて、肺炎球菌や肺炎桿菌などの日和見感染による二次的感染が挙げられる。また、H5N1 型トリ IFV などの高病原性 IFV は、宿主に対して Toll-like receptor (TLR) 4 のリガンドとして機能する酸化脂質の産生を促すことにより過剰に自然免疫系を活性化させ、産生された多量の炎症性サイトカインが急性肺障害を増悪させる機構が存在することなどが示されている。ゆえに、しばしば致死的な転帰を辿る IFV 感染症を制圧するためには、IFV 感染に対していかに自然免疫系を適切かつ速やかに発動させるかが重要であるといえる。

IFV 感染時の自然免疫応答に関わる分子については、TLR や RIG-like receptors (RLRs) などのパターン認識受容体 (PRRs) が良く解析されており、これらの PRRs はウイルス RNA を検知することで I 型インターフェロン系を発動させ、効率的なウイルス排除に寄与する。一方、活性化モチーフ ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) を有する ITAM 関連受容体が TLR や RLRs とは全く異なる病原体関連分子構造 (PAMPs) を認識し、新たな PRRs として機能することが報告されている (図 1)。ITAM 関連受容体のウイルス感染への寄与については、CLEC5A がデングウイルスを認識することが知られているが、興味深いことにこの報告では ITAM 関連受容体シグナルはウイルス排除のみならず、自然免疫の過剰な活性化による感染重篤化にも関与することが示されている。近年、研究協力者の原 (佐賀大学医学部) らのグループにより、マクロファージや樹状細胞に発現するアダプター分子 CARD9 が、数々の ITAM 関連受容体を介した転写因子 NF- κ B の活性化と炎症性サイトカインやケモカインの産生誘導に必須であることが示された (図 1)。CARD9 欠損マウスでは真菌感染に対する抵抗性が

著しく減弱することが示されているが、ウイルス感染における寄与については、具体的な解析が成されていなかった。



2. 研究の目的

以上の研究開始当初の学術的背景を踏まえ、本研究では主に CARD9 欠損マウス (*Card9*^{-/-}マウス)を用いた *in vitro*, *in vivo* 双方での IFV 感染実験を実施し、IFV 認識に関わる具体的な ITAM 関連受容体-CARD9 シグナル経路を同定し、ITAM 関連受容体-CARD9 シグナルが、IFV 感染マウス肺炎モデルにおける感染防御と、宿主側の過剰な免疫応答を介した肺組織障害発生にどの時期にどのように関与するのかを、感染の時間軸に沿って明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Card9*^{-/-}マウスを用いた IFV 感染マウス肺炎モデルの解析

野生型マウス (C57BL/6 マウス) および *Card9*^{-/-}マウスに、マウス馴化 IFV (A/PR/8/34 株) を $10^3 \sim 10^4$ PFU/mouse にて経気道感染させ、IFV 感染マウス肺炎モデルを構築した。その後、経日的に生存率推移、肺におけるウイルス力価や病理組織像、炎症性サイトカイン/ケモカインの産生量を野生型マウスと *Card9*^{-/-}マウスとの間で比較した。

(2) *Card9*^{-/-}マウス由来骨髄系細胞を用いた責任細胞の同定

野生型マウスおよび *Card9*^{-/-}マウスより、定法に従って、様々なマクロファージおよび樹状細胞を分離・調製した。これらの細胞を IFV (A/PR/8/34 株) で 24 時間刺激した場合の培養上清における炎症性サイトカイン産生量を、ELISA 法などにより野生型マウスと *Card9*^{-/-}マウスとの間で比較した。

(3) IFV に結合する ITAM 関連受容体のスクリーニング

これまで報告されている主要な ITAM 関連受容体の C 末端にヒト免疫グロブリン Fc 部

位を融合させた分泌型組換えタンパク質の発現ベクターを構築した後、これをリポフェクション法にて HEK293T 細胞に導入した。これらの細胞を無血清培地で培養し、得られた培養上清を濃縮・精製することにより、組換えタンパク質 (ITAMR-Ig) を回収した。

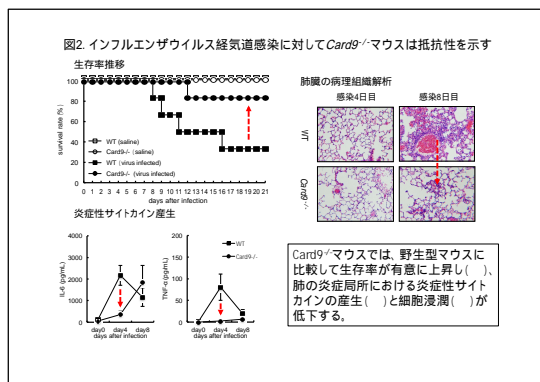
次に、不活化した IFV(A/PR/8/34 株) を ELISA プレートに固相化した後、精製した ITAMR-Ig を添加し、IFV に結合した ITAMR-Ig を HRP 標識ヤギ抗ヒト IgG(H+L) ポリクロナール抗体で検出することにより、IFV に結合する ITAMR-Ig のスクリーニングを実施した。

4. 研究成果

(1) *Card9*^{-/-}マウスを用いた IFV 感染マウス肺炎モデルの解析

生存率推移を比較したところ、*Card9*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比較して、IFV 感染後の生存率推移が有意に改善することが明らかとなった。また、経日的に肺胞-気管支洗浄液 (BALF) を採取し、炎症性サイトカイン測定、肺臓のウイルス力価測定および組織学的解析を行ったところ、*Card9*^{-/-}マウスでは、特に感染4日目の BALF 中における IL-6, TNF-

などの炎症性サイトカイン、MIP-1, CXCL1/KC, CXCL10/IP-10 などの炎症性ケモカインの産生が、野生型マウスに比較して有意に低下していることが分かった。一方で、直接的な抗ウイルス応答に関わる I 型インターフェロンの産生については、野生型マウスと差異を認めなかったことから、CARD9 欠損は IFV 感染に対する抵抗性には影響を与えないことが分かった。また、*Card9*^{-/-}マウスでは肺胞内への炎症性細胞の浸潤やウイルスゲノム量も減少していた (図 2)。以上の結果から、IFV 感染に伴う自然免疫の過剰な活性化に、CARD9 シグナルを介した自然免疫応答機構が関与することが明らかとなった。



(2) *Card9*^{-/-}マウス由来骨髓系細胞を用いた責任細胞の同定

野生型マウスおよび *Card9*^{-/-}マウス由来の

マクロファージや樹状細胞に IFV を *in vitro* で接触させた際に誘導される炎症性サイトカインを測定したところ、IFV 接触時の骨髓由来およびチオグリコレート誘導マクロファージからの IL-6, TNF- 産生は両者で差がなかったが、骨髓由来樹状細胞および形質細胞様樹状細胞からの IL-6, TNF- 産生は *Card9*^{-/-}マウスで大きく減少することが明らかとなった。以上の結果から、IFV 感染に伴う自然免疫の過剰な活性化に、樹状細胞における CARD9 を介した新規の IFV 認識機構が関与する可能性が示唆された。

(3) IFV に結合する ITAM 関連受容体のスクリーニング

固相化した IFV に対する ITAMR-Ig 結合活性を *in vitro* で検討したところ、IFV との結合が既に報告されている ITAMR-Ig に加え、IgSFR2-Ig, IgSFR7-Ig および CLR1-Ig が IFV に対する結合活性を有することが明らかとなった。このうち、IgSFR2-Ig については IFV に対して非常に強く結合することが確認された。

本研究の結果、我々は IFV 感染に伴う自然免疫の過剰な活性化に、主に樹状細胞における CARD9 シグナルを介した自然免疫応答機構が関与し、*Card9*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比較して IFV 感染後の生存率が有意に改善し、インフルエンザ肺炎に付随する炎症性サイトカインの過剰産生や肺組織障害の発生などの臨床的症状が軽減することを明らかにすることができた。また、さらに、*in vitro* で IFV と結合する ITAM 関連受容体のスクリーニングを実施したところ、複数の ITAM 関連受容体が IFV と結合することが示された。

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5件)

Fukuyama T, Yamazaki T, Fujita T, Uematsu T et al. (以下4名) *Helicobacter pylori*, a carcinogen, induces the expression of melanoma antigen-encoding gene (MAGE)-A3, a cancer/testis antigen. *Tumour Biol.* 査読有 Vol.33, No.6, 2012, pp.1881-1887.

<http://dx.doi.org/10.1007/s13277-012-0448-6>.

Kashio M, Sokabe T, Shintaku K,

Uematsu T et al. (以下 4 名) Redox signal-mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有 Vol.109, No.17, 2012, pp.6745-6750.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1114193109>.

Uematsu T, Konishi C, Hoshino D, Han X, Tomari T et al. (以下 4 名) Identification of proteins that associate with integrin 2 by proteomic analysis in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *J Cell Physiol*. 査読有 Vol.227, No.8, 2012, pp.3072-3079.
<http://dx.doi.org/10.1002/jcp.23054>.

植松崇之、小林憲忠、鈴木達夫、老齡マウスに存在する自己細胞反応性 Th17 様細胞の機能解析、**臨床免疫・アレルギー科**、査読無、Vol.55、No.4、2011、pp.470-474.

Kobayashi N, Saito T, Uematsu T et al. (以下 4 名) Oral administration of heat-killed *Lactobacillus pentosus* strain b240 augments protection against influenza virus infection in mice. *Int Immunopharmacol*. 査読有 Vol.11, No.2, 2011, pp.199-203.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2010.11.019>

[学会発表](計5件)

Uematsu T, Iizasa E, Kobayashi N, Yoshida H, Hara H. Activation of innate immunity through the CARD9 pathway is involved in severe influenza pneumonia. 15th International Congress of Immunology, 2013/8/23, Milano(Italy)
植松崇之、飯笹英一、小林憲忠、原博満、吉田裕樹、インフルエンザウイルス感染における ITAM 関連受容体-CARD9 シグナルを介した新規自然免疫活性化経路による肺炎増悪化機構の解析、第 16 回北里微生物アカデミー、2013/8/8、神奈川
Uematsu T, Iizasa E, Kobayashi N, Yoshida H, Hara H. Activation of innate immunity through the CARD9 pathway is involved in severe influenza pneumonia. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会、

2012/12/6、兵庫

植松崇之、小林憲忠、原博満、吉田裕樹、インフルエンザウイルス感染における ITAM 関連受容体-CARD9 シグナルを介した自然免疫活性化経路による肺炎増悪化機構の解析、第 25 回北里大学バイオサイエンスフォーラム、2012/8/3、神奈川
植松崇之、小林憲忠、原博満、吉田裕樹、インフルエンザウイルス感染における CARD9 を介した自然免疫応答機構の解析、2011/11/27、千葉

[その他]

<http://researchmap.jp/tuematsu/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

植松 崇之 (UEMATSU, Takayuki)

北里大学・北里大学メディカルセンター研究センター・上級研究員

研究者番号：90414060