

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860292

研究課題名(和文)結核菌を認識する新規骨髄系ITAMRの同定

研究課題名(英文)Identification of novel myeloid ITAMRs that recognize Mycobacterium tuberculosis

研究代表者

飯笹 英一 (Iizasa, Ei'ichi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：20631998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規の結核菌認識受容体を骨髄系ITAM関連受容体(mITAMRs)の中から探索したところ、候補として、IgSFR2とIgSFR5の2つが同定された。そこで、それらのリガンドとなる結核菌の成分の探索、機能解析を行った。まず、リガンド探索を行ったところ、IgSFR2は結核菌の細胞壁構成主成分のミコール酸含有脂質であることがわかった。一方で、IgSFR5のものは、カルジオリピンであることも分かった。さらにIgSFR2に関して機能解析を行ったところ、IgSFR2は上のリガンドを認識することで、免疫応答を制御し、結核菌の排除に重要な役割をしていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：For the identification of novel myeloid ITAM-coupled receptors (mITAMRs) that recognize Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis), we have screened ITAMR library. As the result, we identified two novel ITAMRs, IgSFR2 and IgSFR5. In addition, We have identified the ligands of the receptors. MA-containing lipids are the ligands for IgSFR2 and cardiolipin is that for IgSFR5. Furthermore, we have analyzed the function of IgSFR2 and found that IgSFR2 recognizes the ligands and plays important roles in the regulation of immune response against M. tuberculosis for the eradication of the infection.

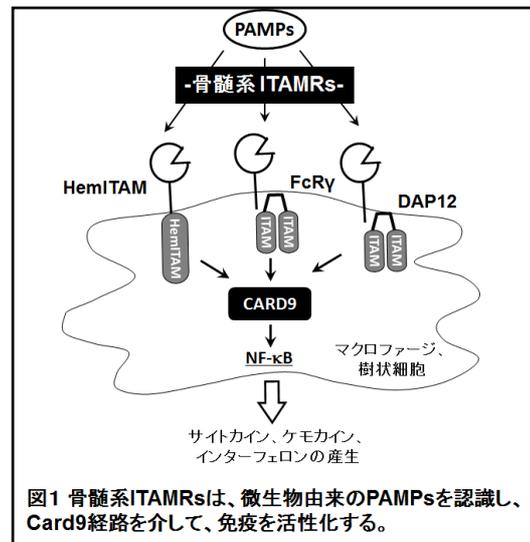
研究分野：免疫学

キーワード：結核 ITAM 自然免疫 受容体

1. 研究開始当初の背景

結核は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, 以下 Mtb) の感染によって起こる世界三大感染症の1つである。世界人口の1/3 が感染していると考えられており、毎年約 200 万人を死に至らしめている。この病気は、Mtb が、宿主の激しい免疫応答を誘導し、肺などの組織に重大なダメージを与えるために起こる。そのため、Mtb がどのように宿主の免疫応答を誘導するか解明することが、結核を理解、また治療する上で重要である。

宿主の免疫応答は、マクロファージ(以下 M ) や樹状細胞(以下 DC)などの骨髄系の細胞が、パターン認識受容体を介して、微生物由来の分子構造パターン (pathogen-associated molecular patterns, 以下 PAMPs) を認識することによって誘導される。代表的なパターン認識受容体として、Toll 様受容体 (Toll-like receptor、以下 TLR) のファミリーがよく知られており、実際、Mtb の PAMPs 認識にも TLR2 や TLR9 の関与が示唆されている。TLR は、Myd88 と呼ばれるアダプター分子を介して、M や DC の免疫応答を活性化する。しかし、Myd88 ノックアウト(以下 KO)マウスでは、Mtb 感染に対して抵抗性が低下することが報告されているのに対し、TLR2/TLR9 ダブル KO あるいは、TLR2/TLR4/TLR9 トリプル KO マウスでは、Mtb 感染に対する感受性は WT とほとんど差がないことが報告されている (Hölschler C. *et al. Eur. J. Immunol.* 2008)。さらに、Myd88 はインターロイキン(以下 IL)-1 や IL-18 などのサイトカインのシグナル伝達にも必要であり、Mtb 感染の際、TLR のシグナル伝達よりも、むしろ、これらのサイトカインのシグナル伝達に重要であるという報告もいくつかある (Schneider B.E. *et al. Eur. J. Immunol.* 2010 など)。これらのことから、TLR は Mtb 認識において必ずしも必要でない可能性が示唆される。



一方で、近年、TLR-Myd88 経路を介さずに、Card9 という別のアダプター分子を介するシグナル経路が、真菌類をはじめとした微生物感染の際の免疫応答に重要であることがいくつも報告されている (Gross O. *et al., Nature*, 2006, Poeck H., *et al., Nature Immunol.*, 2010, Uematsu T. *et al., Sci. Rep.*, 2015)。実際に、Mtb に対する免疫応答においても、Card9 は重要な役割を果たしており、Card9 KO マウスを用いた感染実験により、その KO マウスの Mtb に対する抵抗性が著しく低下することが報告されている (Dorhi A., *et al., J. Exp. Med.* 2010)。これは、Card9 シグナル経路が、Mtb 感染において必要不可欠な役割を持っていることを示している。Card9 経路の上流では、骨髄系 ITAM 関連受容体 (mITAMR) ファミリーの受容体が PAMPs を認識し、Card9 を介して、NF-κB などの転写因子を活性化し、サイトカインやケモカインの産生を誘導する。mITAMR ファミリーは、tyrosine-based activation motif (ITAM) を持つ FcR や DAP12 などの会合分子と会合しているか、もしくは、それ自身が HemITAM と呼ばれる半分の ITAM を持った受容体ファミリーで (図 1)、PAMPs を認識することによって、ITAM のチロシンがリン酸化され、下流の Card9 が活性化される。このことから、この mITAMR ファミリーの受容体が

Mtb 感染において、重要な役割を果たしていると考えられる。実際いくつかの Mtb を認識する mITAMR が知られており、例えば、Mtb 由来の PAMPs の一つである TDM を認識する Mincle、また別の PAMPs の Man-LAM を認識する Dectin-2、またリガンドの PAMPs は未知であるが、hemITAM タイプの受容体の Dectin-1 などが報告されている (Ishikawa E. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 2009, Yonekawa Y. *et al.* *Immunity*, 2014, Rothofucus AG. *et al.* *J. immunol.*, 2007)。しかし、これらの受容体の単独の KO では、Card9 KO で見られたような、Mtb 感染に対する抵抗性の著しい低下はみられない。このことは、Mtb を認識し、Card9 経路を活性化する主たる mITAMR が他に存在することを示唆している。

そこで、申請者は、研究開始当初、Mtb 感染の際に、Card9 経路を活性化させる主要な mITAMR を同定することを目指し、研究を行っていた。まず既知の 20 個程度の mITAMR の中で、Mtb と直接結合するものを探索した。その結果、IgSFR2 と IgSFR5 の 2 つの Mtb 受容体を見出した。また、これら受容体が PAMPs を認識すると、GFP が発現する NFAT-GFP レポーター細胞を作成し、レポーターの活性を指標にして、これらの受容体のリガンドも探索した。IgSFR2 のリガンドは Mtb の主要な細胞壁成分のミコール酸 (以下、MA) であることを同定し、IgSFR5 のリガンドはリン脂質の一種であることも突き止めていた。さらに、これらの受容体 KO マウス由来の M は、これらの

リガンド刺激の際に産生される TNF や MIP-2 などのサイトカインの産生が低下する、すなわち、これらのリガンドが誘導する免疫応答の活性化にこれらの受容体が不可欠であることも突き止めていた。そこで、本研究では、これらの受容体の機能を調べるため、*in vitro* や *in vivo* で解析を行った。また、IgSFR2 に関しては、ウシ型結核菌 *M. bovis* BCG の感染を行い、結核菌感染時の IgSFR2 の重要性を調べた。

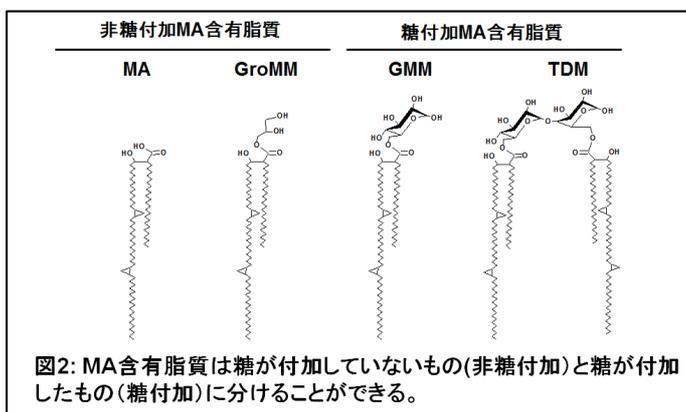
## 2. 研究の目的

IgSFR2、IgSFR5 のリガンド認識機構とその機能を解明する事。また実際の結核菌感染におけるこれらの受容体の重要性を明らかにすること。

## 3. 研究の方法

(1) IgSFR2 は、遊離型の MA を認識することがわかったため、IgSFR2 が結核菌の細胞壁に含まれている他の MA 含有脂質 (図 2) を認識するか調べた。MA 含有脂質は、糖が付加していない MA 含有脂質である MA とグリセロールモノミコール酸 (GroMM)、および、糖が付加している MA 含有脂質、トレハロースジミコール酸 (TDM)、グルコースモノミコール酸 (GMM) の 2 種類に分けることができる (図 2)。そこで、これらの 4 種類の MA 含有脂質で、まず、IgSFR2 NFAT-GFP レポーター細胞を刺激し、応答を調べた。また続いて、MA 含有脂質の認識によるサイトカインやケモカインの産生が IgSFR2 に依存するかどうかを調べるため、WT と IgSFR2 KO マウス由来のチオグリコレート誘導 M をこれら MA 含有脂質で刺激して、サイトカイン、ケモカインの産生を ELISA で調べた。

(2) *in vivo* で (1) と同様に、MA 含有脂質認識における IgSFR2 の重要性を調べるため、マウス個体に MA 含有脂質を投与した。MA 含有脂質を鉱物油、生理食塩水と混合してエマルジョンを作製し、WT と IgSFR2 KO マウスの



腹腔に投与し、細胞の浸潤、サイトカイン産生を調べた。

(3)実際の結核菌感染における IgSFR2 の役割を調べるため、*M. bovis* BCG を腹腔に投与し、腹腔細胞、肺、肝臓、脾臓における菌数、およびサイトカイン産生を調べた。

(4) 結核菌から精製した IgSFR5 のリガンドの構造解析を NMR を用いて行った。

#### 4. 研究成果

以下の()内の番号は、『3. 研究の方法』に対応している。

(1)4種類の MA 含有脂質で、IgSFR2 NFAT-GFP レポーター細胞を刺激したところ、MA と GroMM に強く反応し、一方で、TDM と GMM には弱く反応すること、すなわち、興味深いことに IgSFR2 は、糖が付加している MA 含有脂質に強く反応し、付加していないものに対しては、弱い反応しか示さないことがわかった。続いて、まず、MA 含有脂質で W マウス由来腹腔 M を刺激して、サイトカインケモカイン産生を調べたところ、興味深いことに、糖が付加した MA 含有脂質は、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12 などの炎症性サイトカイン、ケモカインの MCP-1 を産生するが、一方で、糖が付いていない MA 含有脂質に関しては、ケモカインの MCP-1 しか産生が見られないことがわかった。これらの産生を WT, IgSFR2 KO マウス由来の M で刺激したところ、レポーター細胞の実験で強い反応が見られた糖が付加していない MA による MCP-1 の産生は、IgSFR2 で有意に低下することがわかった。また、興味深いことに、弱く反応を示していた糖が付加した MA によるサイトカイン産生は、IgSFR2 KO M では、逆に上昇することがわかった。このことから、糖付加 MA 含有脂質は、IgSFR2 を介して、MCP-1 を産生し、また、一方で、糖が付いていない MA に関しては、IgSFR2 は弱く結合し、サイトカイン産生を抑制すること

がわかった。

(2) *in vivo* でも同様に MA 含有脂質に応答する免疫応答を調べた。GroMM, GMM は結核菌から大量に精製することが困難なので、糖付加、非糖付加の MA 含有脂質の代表として、それぞれ、比較的精製の容易な TDM と MA を用いて行った。MA と TDM のエマルジョンを作製し、WT と IgSFR2 KO マウスの腹腔内に投与し、細胞の浸潤、サイトカイン、ケモカインの産生を調べたところ、*in vitro* の実験とほぼ同様の結果が得られ、MA による細胞の浸潤、サイトカインの産生は IgSFR2 KO で有意に低下し、一方で、TDM に対するものは、IgSFR2 KO で上昇することが分かった。これらの結果から、IgSFR2 は、*in vitro* でも *in vivo* でも糖付加 MA を認識し、免疫応答を誘導し、逆に糖が付加していない MA を認識し、免疫応答を抑制していることが示唆された。

(3) (1), (2)の結果から、IgSFR2 は、MA 含有脂質を認識し、その種類によって、免疫応答を誘導または抑制することが示唆された。そこで、実際の結核感染では、IgSFR2 はどのように働いているかを調べた。WT と IgSFR2 KO の腹腔に *M. bovis* BCG 株を投与し、腹腔、肺、肝臓、脾臓の菌数を調べたところ、IgSFR2 KO の腹腔細胞で菌数の有意な低下が見られた。すなわち、IgSFR2 KO では、菌の排除が促進していることがわかった。このことから、IgSFR2 は、実際の感染においては、MA 含有脂質を認識することで、菌の排除を抑制していることが明らかになった。

(4) IgSFR5 のリガンドの構造解析を行ったところ、そのリガンドは、カルジオリピンであることがわかった。

#### 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4件)

Uematsu T., lizasa E., Kobayashi N., Yoshida H., and Hara H., Loss of CARD9-mediated innate activation attenuates severe influenza pneumonia without compromising host viral immunity., *Sci. Rep.*, 5, 17577, 2015, 査読有り

Phongsisay V., lizasa E., Hara H., and Yoshida H. Evidence for TLR4 and FcR -CARD9 activation by cholera toxin B subunit and its direct bindings to TREM2 and LMIR5 receptors., *Mol Immunol.*, 66:463-71, 2015, 査読有り

Phongsisay V., lizasa E., Hara H., and Yamasaki S., 3-O-sulfo- -d-galactose moiety of endogenous sulfoglycolipids is a potential ligand for immunoglobulin-like receptor LMIR5, *Mol. Immunol.*, 63: 595-599, 2014, 査読有り

Phongsisay V., lizasa E., Hara H., and Yamasaki S., LMIR5 extracellular domain activates myeloid cells through Toll-like receptor 4, *Mol. Immunol.*, 62:169-77, 2014, 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

飯笹英一、植松崇之、杉田昌彦、山崎晶、吉田裕樹、原博満、IgSFR2 は結核菌の遊離ミコール酸およびミコール酸糖脂質を認識する自然免疫受容体である、第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会、2014年6月、北海道札幌市

飯笹英一、植松崇之、久保田未央、清原秀泰、中馬康志、松崎吾郎、山崎晶、吉田裕樹、原博満、結核菌細胞壁のミコール酸含有脂を認識する新規自然免疫受容体、第67回日本細菌学会九州支部総会、2014年9月、鹿児島県鹿児島市

lizasa E., Uematsu T, Kubota M, Kiyohara H, Chuma Y, Matsuzak, G, Yamasaki S, Yoshida H, Hara H, Innate recognition of mycolic acid-containing lipids in mycobacteria、第43回日本免疫学会、2014年12月、京都府京都市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者  
飯笹英一(IIZASA, Ei'ichi)  
鹿児島大学・医歯学域医学系、助教

研究者番号：20631998

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし