

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860613

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスと内因性リガンドを認識する新規自然免疫受容体の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel innate immune receptor which recognizes influenza virus and endogenous ligand

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルス(IFV)感染におけるITAM関連受容体IgSFR2を介したIFV認識の役割を解明するために、IgSFR2欠損マウスを用いたIFV感染実験などを実施した。その結果、IFV感染に伴う自然免疫の過剰な活性化に、主に形質細胞様樹状細胞におけるIgSFR2を介したIFV認識機構が関与し、IgSFR2欠損マウスではインフルエンザ肺炎の症状が軽減することを明らかにした。また、レポーター細胞を用いたin vitroでの検討の結果、IgSFR2はIFV感染によって生じた死細胞から放出される内因性リガンドである複数の脂質や糖質を認識する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We focused on the function of ITAM-coupled receptor IgSFR2 which recognizes influenza virus (IFV), and analyzed the role for innate immune activation through the IgSFR2-mediated pathway in IFV infection. We revealed that activation of innate immunity through the IgSFR2-mediated pathway in mainly plasmacytoid dendritic cells is involved in the excessive inflammation in IFV-infected lungs. And we founded that influenza pneumonia was dramatically attenuated in Igsfr2-deficient mice, which showed improved survival rate compared with control mice. Furthermore, we clarified that IgSFR2 recognizes endogenous ligand, i.e., lipids or carbohydrates derived from dead cells due to IFV infection.

研究分野：免疫学

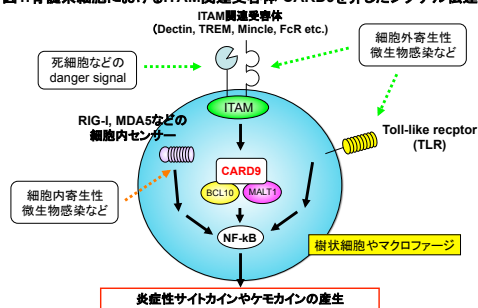
キーワード：自然免疫 肺炎 インフルエンザウイルス

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス (IFV) 感染症は、小児や高齢者では肺炎や急性脳症を合併する例も多く、注意すべき感染症の一つである。インフルエンザ肺炎重篤化の要因については、これまで肺炎球菌や黄色ブドウ球菌などによる細菌性複合感染によるところが大きいとされてきたが、近年 IFV 感染マウス肺炎モデルを用いた解析や IFV 感染により急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) を発症したヒト検体などを用いた解析の結果、宿主の自然免疫の過剰な活性化が IFV 感染症の重篤化の新たな一因として挙げられている。

骨髄由来の樹状細胞やマクロファージは、自然免疫系の主要な機能を担っている。これらの細胞は広く生体に分布し、病原微生物と遭遇した場合には病原微生物に由来する様々な分子構造を検知する。樹状細胞やマクロファージに存在するこれらの受容体はパターン認識受容体 (PRRs) と呼ばれ、Toll-like receptor (TLR) などが最も良く知られている。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 PRRs が良く解析されており、これらの PRRs は広くウイルス 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 (図 1 参照)。一方で、活性化モチーフである ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) を有する ITAM 関連受容体が近年同定され、この受容体は他の PRRs 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から、非常に注目を集めている (図 1 参照)。

図1. 骨髄系細胞におけるITAM関連受容体-CARD9を介したシグナル伝達



こうした背景から、我々は *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 と結合することを明らかにした。さらに予備的検討の結果、ITAM 関連受容体の一つである IgSFR2 は IFV の赤血球凝集素 (ヘマグルチニン: HA) と特異的に結合し、レポーター細胞において NFAT 活性化シグナルを細胞内へと伝達できることが既に明らかとなっていた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では IFV 認識に関わる ITAM 関連受容体 IgSFR2 の欠損マウス (*Igsfr2* 欠

損マウス: *Igsfr2*^{-/-}マウス)を用いたインフルエンザ肺炎モデルマウスの解析を実施することにより、IgSFR2 を介したシグナルが、IFV 感染防御と宿主側の過剰な免疫応答を介した炎症増悪化をどのようにリンクさせるのかを明らかにすることを目的とした。さらに、IgSFR2 は病原体刺激などによってその発現が増強し、死細胞や何らかの宿主細胞由来成分に強く結合することが明らかとなっており、IFV 感染から肺における炎症増悪への負のリンクを司る非常に重要な分子である可能性が示唆されている。そこで、IgSFR2 が認識する具体的な宿主細胞由来成分についても、分子生物学的・生化学的手法を用いて解析した。

3. 研究の方法

(1) *Igsfr2*^{-/-}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 *Igsfr2*^{-/-}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 *Igsfr2*^{-/-}マウスとの間で比較した。

(2) *Igsfr2*^{-/-}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 *Igsfr2*^{-/-}マウスより、定法に従って、複数種類の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 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/ケモカイン産生量を、ELISA 法により野生型マウスと *Igsfr2*^{-/-}マウスとの間で比較した。

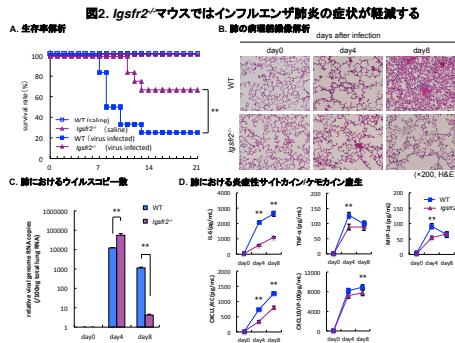
(3) IgSFR2 が認識する内因性リガンドのスクリーニング

IgSFR2 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 293F 細胞に導入した。この細胞を無血清培地で高密度培養し、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 (IgSFR2-Fc) を回収した。また、比較対照として IgSFR2 との構造的類似性が認められる IgSFR1 についても、同様の手法で組換えタンパクを回収した。最後に、回収した IgSFR2-Fc をアナライトとして、市販の脂質アレイおよび糖鎖アレイを用いて、*in vitro* における IgSFR2-Fc と脂質および糖質との結合を評価した。また、IgSFR2 とともにアダプター分子を発現する 2B4 NFAT-GFP レポーター細胞を作成し、同定されたリガンドによる刺激が IgSFR2 を介して活性化シグナルを細胞内に伝達できるか否かを、フローサイトメーターを用いた手法により解析した。

4. 研究成果

(1) *Igsfr2*^{-/-}マウスを用いた IFV 感染マウス肺炎モデルの解析

まず、生存率推移を比較したところ、*Igsfr2*^{-/-}マウスでは IFV 感染後の生存率が有意に改善し、肺組織障害の発生が軽減することが明らかとなった。また、*Igsfr2*^{-/-}マウスの肺におけるウイルス力価については、感染 4 日目にかけて一時的に増加するものの、野生型マウスにおいて肺組織障害の発生が観察される感染 8 日目の時点では大きく減少していた。また、肺胞-気管支洗浄液における炎症性サイトカイン/ケモカイン産生も、*Igsfr2*^{-/-}マウスは野生型マウスに比較して、IL-6, TNF- α , CCL3/MIP-1 α , CXCL1/KC, CXCL10/IP-10 などの値が軒並み低値を示す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、ITAM 関連受容体 IgSFR2 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 (図 2 参照)。



(2) *Igsfr2*^{-/-}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、*Igsfr2*^{-/-}マウスおよび IgSFR2 からシグナル伝達に関与することが示唆される分子の欠損マウス由来の骨髄などから分離・調製した複数種類のマクロファージおよび樹状細胞を *in vitro* にて IFV で刺激し、培養上清中に産生される炎症性サイトカイン/ケモカイン量を比較したところ、形質細胞様樹状細胞における炎症性サイトカイン/ケモカイン産生が、IgSFR2/DAP12/Syk シグナル依存的に調節されてい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、形質細胞様樹状細胞における IgSFR2/DAP12/Syk 依存的なシグナルを介した新規の IFV 認識機構が関与する可能性が示唆された。

(3) IgSFR2 が認識する内因性リガンドのスクリーニング

市販の脂質アレイおよび糖鎖アレイを用いて、脂質および糖鎖に対する IgSFR2-Fc の結合活性を *in vitro* で比較したところ、IgSFR2-Fc は複数の脂質および糖鎖を直接結合することが明らかとなった。このうち、IgSFR2 のリガンド候補分子の一つとして同定されたスルファチド (硫酸化ガラクトシル

セラミド) で、IgSFR2/DAP12 発現レポーター細胞を刺激したところ、IgSFR2/DAP12 複合体を介した活性化シグナルの細胞内への伝達を確認された。その他のリガンド候補分子については、IgSFR2-Fc との結合、レポーター細胞における活性化シグナル伝達の可否などを現在評価中である。以上の結果から、IgSFR2 は IFV のみならず、IFV 感染によって外部環境に放出される複数の内因性リガンドを認識する可能性が示唆された。

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 3 件)

- ① Uematsu T, Iizasa E, Kobayashi N, Yoshida H, Hara H, Loss of CARD9-mediated innate activation attenuates severe influenza pneumonia without compromising host viral immunity, *Sci Rep*, 査読有, Vol. 5, 2015, pp. 17577, 10.1038/srep17577
- ② Itoh K, Izumi Y, Inoue T, Nakayama Y, Uematsu T et al (以下 10 名), Expression of Three Isoforms of Na-K-2Cl Cotransporter (NKCC2) in the kidney and regulation by dehydration, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, Vol. 453, No. 3, 2014, pp. 356-61, 10.1016/j.bbrc.2014.09.089
- ③ Nagai T, Yasuoka Y, Izumi Y, Horikawa K, Kimura M, Nakayama Y, Uematsu T et al (以下 13 名), Reevaluation of erythropoietin production by the nephron, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, Vol. 449, No. 2, 2014, pp. 222-8, 10.1016/j.bbrc.2014.05.014

[学会発表] (計 7 件)

- ① 梁光耀、猪野千恵子、植松崇之、小林憲忠、折原裕、Lignosus rhinoceros 培養菌糸体の抗菌化合物の探索、日本薬学会第 135 年会、2015/3/27、兵庫県神戸市(神戸学院大学他)
- ② 原博満、飯笹英一、久保田未央、植松崇之、清原秀泰、山崎晶、松崎吾朗、吉田裕樹、自然免疫による結核菌ミコール酸脂質の認識、第 88 回日本細菌学会総会、2015/3/14、岐阜県岐阜市(長良川国際会議場)
- ③ Iizasa E, Uematsu T, Kubota M, Kiyohara H, Chuma Y, Matsuzaki G, Yamasaki S, Yoshida H, Hara H, Innate recognition of mycolic acid-containing lipids in mycobacteria, 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、2014/12/12、京都府京都市(国立京都国際会館)
- ④ Uematsu T, Iizasa E, Kobayashi N, Yoshida H, Hara H, Activation of innate

immunity mediated by the IgSFR2/CARD9 pathway is involved in severe influenza pneumonia, 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、2014/12/11、京都府京都市（国立京都国際会館）

- ⑤ 飯笹英一、植松崇之、久保田未央、清原秀泰、中馬康志、松崎吾朗、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質を認識する新規自然免疫受容体、第 67 回日本細菌学会/ウイルス学会九州支部総会、2014/9/5、鹿児島県鹿児島市（城山観光ホテル）
- ⑥ 植松崇之、飯笹英一、小林憲忠、吉田裕樹、原博満、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の解析、第 67 回日本細菌学会/ウイルス学会九州支部総会、2014/9/5、鹿児島県鹿児島市（城山観光ホテル）
- ⑦ 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、2014/6/19、北海道札幌市（北海道大学医学部学友会館）

〔その他〕

ホームページ等

<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・

上級研究員

研究者番号：90414060