

# 研究報告書

## 「C型レクチンによる炎症性疾患制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年3月～平成26年3月

研究者: 西城 忍

### 1. 研究のねらい

C型レクチンは多様な生物活性を有する糖鎖結合性の分子群で、外来性あるいは内在性リガンドを認識し、サイトカインや活性酸素種(ROS)などの炎症性メディエーターの産生を強力に誘導する分子や、逆に抑制性シグナルを伝え免疫系を負に調節する分子などが存在する。そのため、生体恒常性維持における寄与はきわめて大きなものであると予想されるが、未だリガンドや機能が不明な分子が存在し包括的な解析が待たれる。そこで本研究では、最終的にC型レクチンによる炎症反応の制御機構を包括的に解明することを目的とし、1)機能やリガンドが未知のC型レクチンのノックアウト(KO)マウスを新たに作製するとともに、これまでに作製した複数のC型レクチン、種々のサイトカインKOマウスと組み合わせた解析を行い、機能未知のC型レクチンの機能を解析すること、2)これらのマウスを用いて、アレルギーや自己免疫疾患の発症における役割を明らかにすること、3)C型レクチン下流のシグナル伝達機構を解析し、炎症を惹起、あるいは終息させる分子機構を解明すること、を試みることにした。本研究により、C型レクチンによる炎症反応の制御機構を正・負の両面から解明することができれば、将来的にこれらの分子を標的とした自己免疫疾患をはじめとする慢性炎症性疾患に対する新たな治療法の開発へとつながる可能性がある。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

樹状細胞(DC)は、抗原提示細胞として外来異物をT細胞に提示するとともに、サイトカインなどの液性因子の分泌や補助刺激分子の発現を介してT細胞の運命を決定する。この一連の過程において、C型レクチンは自然免疫機構と獲得免疫機構を仲介する重要な役割を担っている。私達は、これまでC型レクチンを介したシグナルが活性酸素種(ROS)の産生を介して真菌感染防御に重要な役割を果たしていること(Saijo et al., *Nat. Immunol.*, 2007)、サイトカイン産生を介してナイーブT細胞をTh17細胞に分化させること(Saijo et al., *Immunity*, 2010)、あるいは細胞内に抑制性のシグナルを伝えることで免疫系を調整していること(Fujikado, Saijo et al., *Nat. Med.*, 2008)などを明らかにしてきた。また、Dectin-1は $\beta$ グルカン、Dectin-2は $\alpha$ マンナンの機能的レセプターであることを見いだした。本研究では、Dectin-1とDectin-2にcollaboration機構があり、Dectin-1とDectin-2の二重欠損(Dectin-1/-2DKO)マウスでは、病原真菌 *Candida albicans* (*C. albicans*)によって誘導されるサイトカイン産生がほぼ完全に抑制されること、逆にDectin-1/-2DKOマウスでは誘導性炎症モデルでは症状が重症化することなどを見いだした。

#### (2) 詳細

##### 1) 機能未知のC型レクチンに関する研究

私達は、C型レクチンファミリーの Dectin-1 と Dectin-2 が、それぞれ真菌細胞壁構成糖鎖である  $\beta$  グルカン、および  $\alpha$  マンナン機能的レセプターであること、Dectin-1 は *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) に対する感染防御、Dectin-2 は *Candida albicans* (*C. albicans*) に対する感染防御に重要な役割を担っていることなどを明らかにしてきたが、また、Dectin-1 が別の病原真菌である *A. fumigatus* の認識にも関与していること、Dectin-2 は真菌だけではなく寄生虫である *Schistosoma mansoni* の認識にも関与していることなどを見いだした(論文 1-3)。ところで、*C. albicans* は環境に応じ酵母型および菌糸型の二つの形態を示す二形性真菌であることが知られている。これまでの研究から、酵母型 *C. albicans* による骨髄由来樹状細胞(BMDC)からのサイトカイン産生は、Dectin-2 の欠損によりほぼ完全に抑制されるが、菌糸型 *C. albicans* では、Dectin-1 KO では阻害されず、Dectin-2 欠損による阻害も部分的であったことがわかっている。そのため、菌糸型 *C. albicans* は、Dectin-1 や Dectin-2 以外のサイトカイン誘導性のレセプターを持つことを予想した。ミエロイド系の細胞で、Dectin-1、Dectin-2 をはじめとする C 型レクチンは、Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を介して活性化シグナルを細胞内へ伝達するが、そのシグナル伝達系に必須なアダプター分子の CARD9 の KO マウスでは、菌糸型 *C. albicans* によるサイトカイン産生はほぼ完全に抑制されたことから、このレセプターは C 型レクチンである可能性が高いと考えていた。ところが、Dectin-1/-2 DKO マウスを作製したところ、予想に反してこのマウスでは菌糸型 *C. albicans* に対するサイトカイン産生もほぼ完全に抑制することが明らかとなった。さらに、Dectin-1 KO、Dectin-2 KO、Dectin-1/-2 DKO マウスを用いて感染実験を行ったところ、Dectin-1 KO マウスの生存率は野生型(WT)マウスと差を認められなかったのに対し、Dectin-1/-2 DKO マウスでは WT マウスとの比較だけでなく、Dectin-2 KO マウスと比較しても有意に生存率が低下することが明らかとなった。この結果から、Dectin-1 と Dectin-2 は共同してサイトカイン産生を誘導する機構があることが示された。

そこで、その collaboration 機構を明らかにする目的で、Dectin-1 と Dectin-2 の細胞内局在を検討したところ、Dectin-1 は細胞表面にも発現しているが、Dectin-2 の発現は細胞内により強く発現していることがわかった。さらに、Dectin-1/-2 DKO マウスの細胞でも、*C. albicans* は正常に細胞内へ取り込まれることが明らかとなった(図)。この結果から、*C. albicans* は、サイトカイン産生を誘導しない分子によって細胞内へ取り込まれることが示唆された。その後、細胞内で Dectin-1 と Dectin-2 によって認識されることでサイトカイン産生が誘導されることが予想される(論文投稿準備中)。

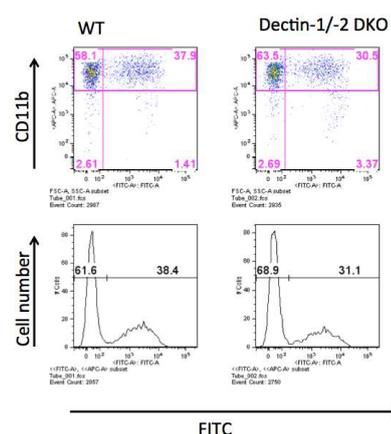


図 *C. albicans* は Dectin-1、Dectin-2 非依存的に宿主細胞に取り込まれる。

### 3. 今後の展開

本研究では、Dectin-1、Dectin-2 の2種類の C 型レクチンで病原真菌によるサイトカイン産生をほぼ完全に担っていることを明らかにした。より包括的な理解をすすめるために、今後は、

病原真菌による炎症反応の惹起と、そこから派生する Th17 細胞分化や好中球の遊走など、一連の炎症反応が、いつ、どの組織のどの細胞でおきるのか、などといった時空的制御機構について明らかにしていくことを目指したい。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

本研究では、Dectin-1 と Dectin-2 による炎症反応を正に制御する機構に関しては一定の成果が得られたと考えている。当初、病原真菌は多種多様な C 型レクチンによって認識され、炎症性サイトカインの産生をはじめとする生物現象が誘導されると予想していたが、実際は細胞内へ取り込まれた病原真菌による炎症反応は Dectin-1 と Dectin-2 の2種類の分子によってほぼ完全に担われていることを見いだした。また、これらの分子は IL-10 産生を介して炎症を負に制御していることを見いだした。一方で、個々の現象をつないだ正の制御機構と負の制御機構の時空的制御機構については、不十分であると言わざるを得ない。今後は、より生理的な条件で炎症を誘導すること、レポーターマウスなどを取り入れて、解析を続けていきたい。本領域のアドバイザーおよび研究員との交流を通じて、研究計画に一定の進展があったことは非常に有意義であり、今後の研究に活かしていきたいと考えている。研究途上の成果については、早急に解析を進め、論文として発表していく予定である。

##### (2) 研究総括評価(公開項目)

C 型レクチンファミリー分子である Dectin-1 と Dectin-2 が、それぞれ  $\beta$  グルカンと  $\alpha$  マンナンの機能的レセプターであることを明らかにするとともに、細胞内へ取り込まれた病原真菌による炎症反応は Dectin-1 と Dectin-2 の2種類の分子によってほぼ完全に担われていることを見出した。また、これらの分子は IL-10 産生を介して炎症を負に制御していることを見出しており、国内外を通じてこの分野における先導的な研究を行っている点で、その成果のインパクトは大きいと評価される。しかしながら、これら C 型レクチンファミリー分子による炎症反応の制御が実験系によって一定しておらず、その機構についての解析も、まだ道半ばである。今後は、この複雑な制御機構の詳細解明を期待する。また、未発表の研究成果も多く、早期の論文文化が望まれる。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Saijo S, and Iwakura Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol* 23: 467-472, 2011.
2. 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.
3. 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.
4. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, and Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34: 149-162, 2011.

5. 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

(2)特許出願

なし

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 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.
2. Saijo S. C-type lectins : Their roles in innate and acquired immunity. JSICR-MMCB, Osaka Japan, May 25-27, 2011.