

結核菌表層の病原性脂質による自然免疫応答の制御機構

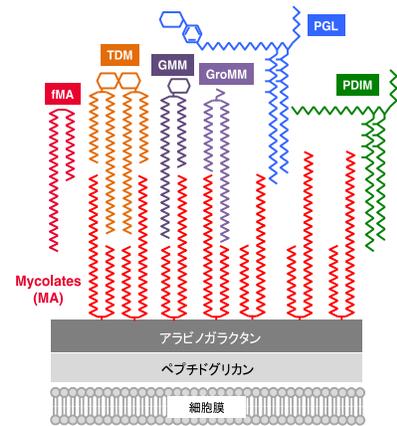
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科感染防御学講座免疫学分野

原 博満

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

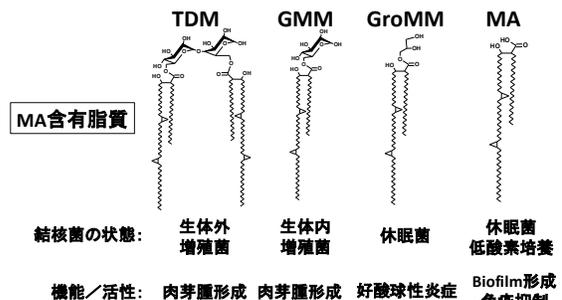
世界中で年間5千万人が新たに結核を発症し、2-3百万人もの命が失われている。日本の結核罹患率(16.1)は欧米に比べ依然として高く(米国の5.2倍、ドイツの3.3倍)、毎年2万人以上の患者が発生し、死者は2千人を超える(平成25年厚労省年報)。多剤耐性菌の出現とともに人口の高齢化に伴う再燃や非結核性抗酸菌症例の増加も問題となっている。新規抗結核薬や効果的なワクチンを開発する上で、宿主免疫系による抗酸菌の認識と応答機構の理解は不可欠である。抗酸菌は多量の脂質を含有した疎水性の高い細胞壁をもち、様々な物理化学的環境や薬剤に対する耐性を菌に賦与すると共に、免疫の活性化あるいは抑制に働く生理活性脂質が存在していることが古くから知られ(図1)、その構造や機能が盛んに研究されてきた。中でも抗酸菌特有の脂肪酸であるミコール酸(Mycolic acid: MA)は極めて長鎖(C₇₀₋₉₀)の分岐アシル鎖を有する抗酸菌特有の脂肪酸であり、菌種によって多彩な構造を持ち、細胞壁骨格(CWS)を形成するとともに、糖と結合した糖脂質(MA糖脂質)の状態

図1 結核菌細胞壁を構成する脂質



状態で細胞壁の表層に発現する。その構成は菌の生育環境や活性化状態によってダイナミックに変容し、宿主の免疫応答にも影響を及ぼす(図2)。MA糖脂質であるTDMやGMMは活動性結核菌に多く、強い免疫刺激活性を持ち、肉芽腫形成を誘導する。一方、非糖化MAであるGroMMや遊離ミコール酸(free MA: fMA)は休眠(潜伏性)結核菌に多い。また、fMAはバイオフィルムの主成分となり、薬剤耐性やマクロファージ(Mφ)活性化の抑制にも働く。

図2 結核菌のMA含有脂質の変容と免疫応答



Phenolic glycolipid (PGL) や類似体の Phthiocerol dimycocerosate (PDIM) は高病原性結核菌北京株の病原因子として同定された脂質であり、菌の最表層に発現することでTLR2のリガンドをマスクし、iNOS陽性Mφの発現を抑制して菌の増殖に“許容的な”Mφを局所に動員する(図1)。しかし、これらの脂質の生理活性を媒介する機構や宿主側の受容体はよく判っていなかった。

近年、Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM)を介して活性化シグナルを伝達する多くのC型レクチン型受容体(CLR)やIgスーパーファミリー受容体(IgSFR)が自然免疫のパターン認識受容体(pattern-recognition receptors: PRRs)として働くことが判ってきた。Caspase recruitment domain(CARD)ファミリー蛋白のアダプター分子であるCARD9は、これらITAM共役パターン認識受容体のシグナル伝達を担う分子であることを我々は明らかにした

(Hara *et al. Nat Immunol.* 2007)。Dorhoi らは、CARD9欠損マウスは結核菌感染に著しく高感受性になることを報告し(Dorhoi *et al. J Exp Med.* 2010)、ITAM共役型受容体が結核菌のパターン認識と防御免疫に重要な役割を演じていることを示唆した。その後、FcR γ 会合型CLRであるMincleやMCLがTDMを認識すること(Ishikawa *et al. J Exp Med.* 2009; Miyake *et al. Immunity* 2013)、Dectin-2がMannose-capped lipoarabinomannann (Man-LAM)を認識する受容体であることが明らかにされた(Yoneyama *et al. Immunity* 2013)。

我々は結核菌を認識する新規骨髄系ITAM共役受容体を探索した結果、DAP12会合型ITAM受容体であるTrem2を同定した。Trem2が認識する結核菌成分の探索の結果、Trem2はMAを認識することを我々は明らかにした。さらに我々は、PGLを認識する新規ITAM受容体も同定した(PGLRと命名)。本研究では、これらの脂質認識型自然免疫受容体のリガンド特異性を解析すると共に、結核菌自然免疫応答における役割を明らかにすることを旨とする。

2. 方法

(1) 結核菌自然免疫応答におけるTrem2の役割の解析

- Trem2、MincleのMA含有脂質に対する特異性の解析

MincleはMA糖脂質であるTDMを認識する。一方、Trem2もfMAやTDMを認識することを我々は見出した。そこで、構造の異なる様々なMA含有脂質(fMA、GroMM、GMM、TDM: 図2)に対するMincle、Trem2の特異性の違いをMincle及びTrem2発現NFAT-GFPレポーター細胞(43.1)を用いて調べた。また、MA含有脂質によるM ϕ 活性化におけるこれらの受容体の役割を、野生型(Wt)、Mincle^{-/-}、Trem2^{-/-}マウス由来のM ϕ をMA含有脂質で刺激後のTNF、MCP-1産生を指標に解析した。

- In vivo自然免疫応答

MA含有脂質をマウスの腹腔内に投与し、これにより誘導される細胞浸潤やサイトカイン産生をWt、Mincle^{-/-}、Trem2^{-/-}マウス間で比較解析した。

- BCG感染試験

Trem2^{-/-}マウスを用いたBCG菌の肺感染実験を実施し、サイトカイン産生や菌数をWtマウスと比較した。

(2) 結核菌自然免疫応答におけるPGLRの役割の解析

- In vitroマクロファージ刺激試験

PGLによるM ϕ 活性化におけるPGLRの役割を調べるため、Wt、PGLR^{-/-}マウス由来の腹腔M ϕ をPGLやその類似体であるPDIMで刺激し、TNF、MCP-1産生を指標に解析した。

3. 結果 研究成果

(1) 結核菌自然免疫応答におけるTrem2の役割の解析

レポーター細胞を用いた解析により、MincleはMA糖脂質(TDM、GMM)、Trem2は非糖化MA脂質(GroMM、fMA)に対する特異性が高く、さらに、Mincle^{-/-}、Trem2^{-/-} M ϕ を用いた解析により、それぞれ、これらの脂質に対するM ϕ 応答に必須の役割を演じていることが明らかとなった(図3)。

また、Trem2^{-/-} M ϕ はMincleリガンド刺激後のMCP-1、TNF産生が上昇し、これに一致して、Trem2^{-/-}マウスはWtマウスに比べTDM腹腔投与後の炎症応答の増悪が見られた(図4)。このことから、Trem2はMincleを介した自然免疫応答を抑制していることが示唆された。実際、Trem2^{-/-}マウスはWtマウスに比べBCG菌の排除応答が亢進することも判った(Data not shown)。

図3 TREM2, Mincle欠損MφのMA含有脂質に対する応答性

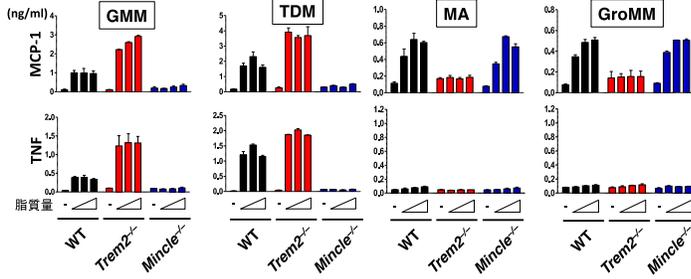
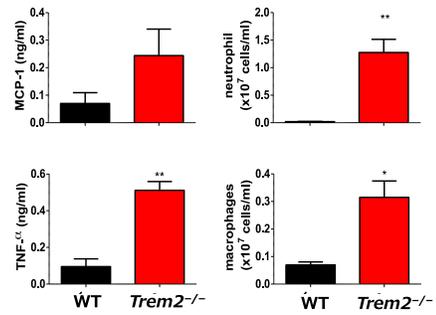


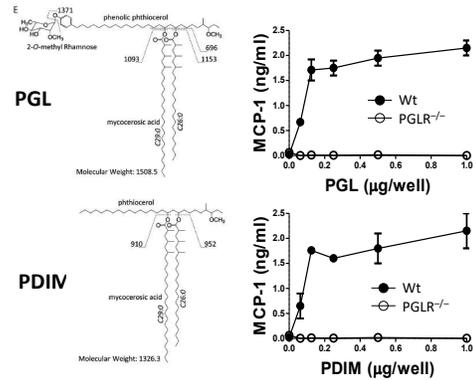
図4 Trem2欠損マウスはTDM腹腔投与後の腹腔炎が悪化する



(2) 結核菌自然免疫応答におけるPGLRの役割の解析

PGLR^{-/-}Mφは、in vitroにおけるPGL及びPDIM刺激後のMCP-1産生がほぼ完全に消失した(図5)。ことから、PGLRによるPGL認識には糖部分は必要なく、PGLRがPGLやPDIMによるMφ活性化に必須の役割を演じていることが分かった。

図5 PGLRはPGL、PDIM刺激後のMφによるMCP-1産生に必須



4. 考察 まとめ

MA糖脂質(TDM, GMM)によるMφ活性化は、Mφの局所動員に必須のMCP-1とともに、結核防御に必須のTNFを誘導するが、非糖化MA脂質(GroMM, fMA)による刺激はTNF産生を誘導せず、MCP-1産生のみを誘導することを我々は見出した。また、Trem2はMincleを介したMφ応答を抑制していることも見出した。休眠結核菌ではMincleリガンドとなるMA糖脂質が消失し、Trem2リガンドである非糖化MA脂質が増加するという報告(Bacon *et al. PLOS One*, 2014)から、Trem2を介したMφ応答が病原性結核菌や休眠結核菌の免疫回避に関与している可能性が考えられた。

PGLはMCP-1受容体であるCCR2依存的に菌増殖のリザーバーとなる“許容的Mφ”を感染局所に動員することから、PGLRがPGLの病原活性を媒介する受容体である可能性が考えられた。

5. 発表論文
特になし