

154. 真菌感染現象における抑制性受容体の分子基盤

矢部 力朗

千葉大学 真菌医学研究センター 感染免疫分野

Key words : 真菌, C型レクチン受容体, 自然免疫, 獲得免疫, IL-17

緒言

皮膚糸状菌症は、世界規模で見られる感染症のひとつで、標準的な抗真菌薬による完治が難しい症状を示す¹⁾。皮膚糸状菌症を引き起こす真菌はこれまで約30種類が確認され、なかでも、白癬菌 *Trichophyton rubrum* が最も頻度高く検出される病原体である。*T. rubrum* は、皮膚組織に感染し、角質層にあるケラチンを栄養することで生存する。

通常健常者では、*T. rubrum* による感染は、皮膚組織バリアーによる物理的障害や免疫応答の誘導によって抑制されているため脅威とはならない。しかし、免疫が低下した際、感染が発症するとされている。最近、ヒトGWAS解析により、免疫関連遺伝子の変異が関連していることが報告されている。

C型レクチン受容体 (CLR) は、細胞外に糖鎖認識ドメイン (CRD) を有し、細胞質内に特有の領域をもつ膜貫通型受容体である。自然免疫細胞上に発現する CLR は CRD を介して真菌を認識し、細胞質の特定領域を通してサイトカイン・ケモカイン産生および貪食を促進する。また、獲得免疫、とくに Th17 型免疫応答を誘導し、好中球の遊走や抗菌ペプチドの分泌を促進させ真菌の排除に重要な役割を果たす^{2,3)}。

これまで我々は、CLRファミリーに属する Dectin-1 および Dectin-2 が、様々な真菌を感知し細胞質内に活性化シグナルを伝え、Card9、NF- κ B を介して IL-17 を介した抗真菌免疫応答を誘導することを明らかにしてきた。今回我々は、*T. rubrum* 感染における Dectin-1 および Dectin-2 の生理機能、T細胞を介した免疫誘導機構、IL-17 の役割を解明した¹⁾。

方法および結果

1. Dectin-1 および Dectin-2 は *T. rubrum* を認識する

Dectin-1 および Dectin-2 が *T. rubrum* を認識するか調べた。可溶性 Dectin-1 (Dectin-1-Fc) および Dectin-2 (Dectin-2-Fc) を蛍光標識化し、*T. rubrum* に対する結合能をフローサイトメトリーで確認した。その結果、Dectin-1-Fc および Dectin-2-Fc は *T. rubrum* に対して強い結合を示した (図1)。

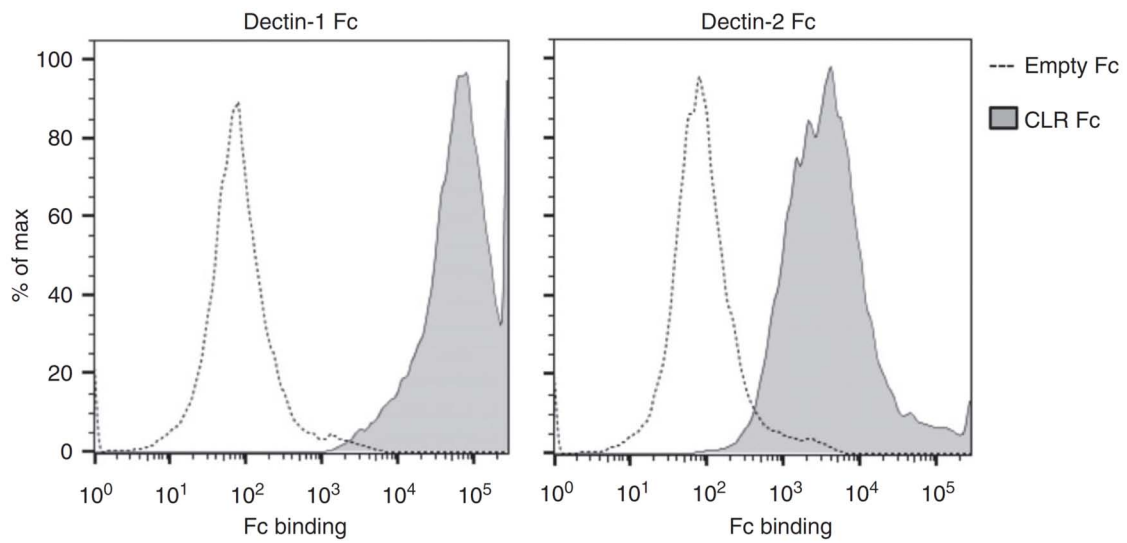


図1. *T. rubrum* に対する可溶型 Dectin-1 および Dectin-2 の結合性
T. rubrum を Dectin-1-Fc-PE-抗 Fc 抗体および Dectin-2-Fc-PE-抗 Fc 抗体で染色後、
その蛍光強度をフローサイトメトリーで測定した。

2. Dectin-1 および Dectin-2 は *T. rubrum* 感染の際、樹状細胞からのサイトカイン産生に促進する

野生型、Dectin-1 欠損および Dectin-2 欠損マウスからの骨髄細胞を GM-CSF 存在下により骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を調製した。これら細胞を *T. rubrum* と共培養し、培養上清中のサイトカイン産生量を測定した。野生型 BMDC に比べ、Dectin-1 欠損および Dectin-2 欠損 BMDC では炎症性サイトカイン TNF、IL-6、IL-1 β および抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生量が著しく低下していた (図2)。

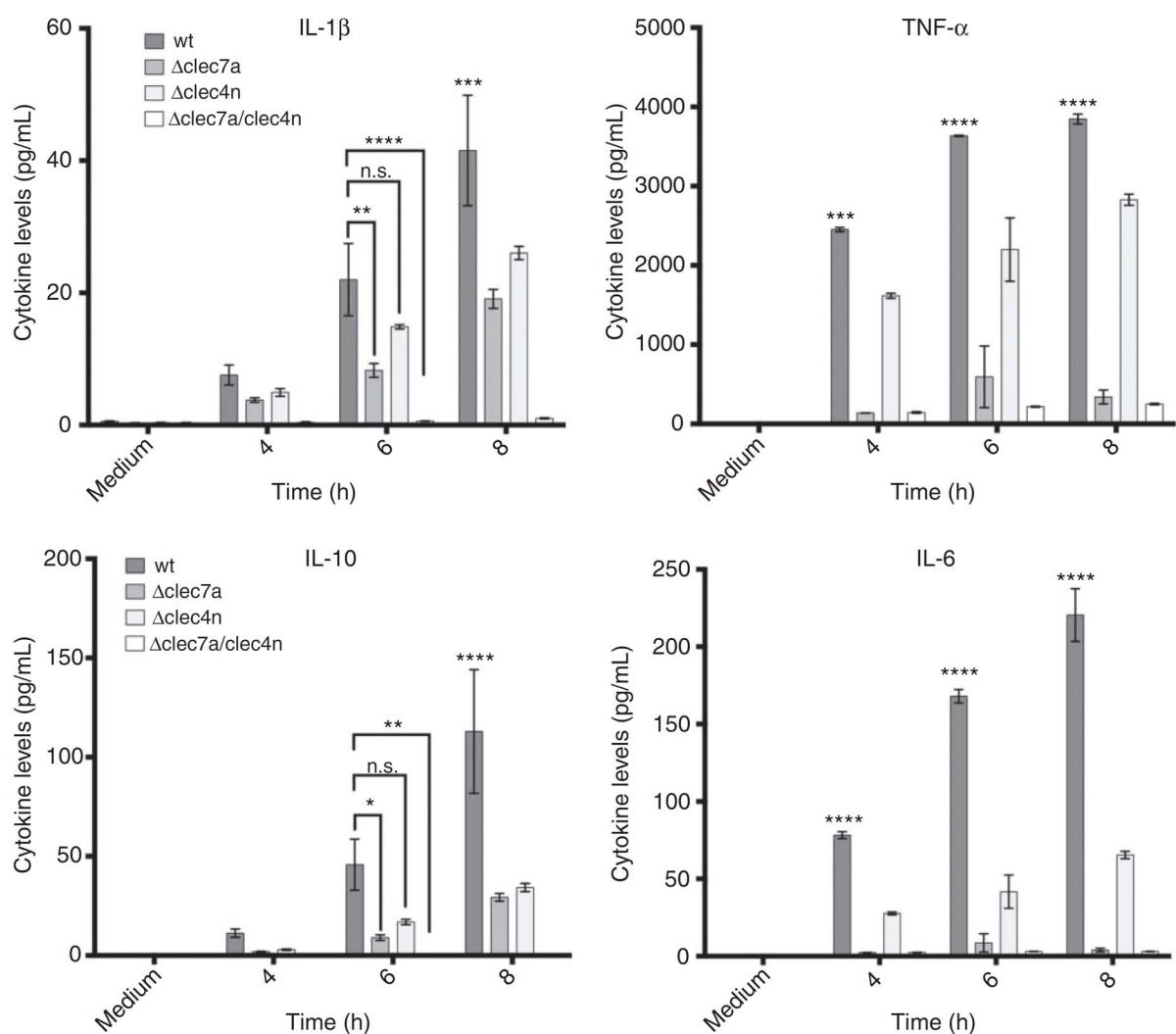


図2. *T. rubrum* 感染における野生型、Dectin-1 欠損および Dectin-2 欠損 BMDC からのサイトカイン産生能
 野生型 (wt)、Dectin-1 欠損 (Δ clec7a)、Dectin-2 欠損 (Δ clec4n)、Dectin-1/Dectin-2 二重欠損 (Δ clec7a/ Δ clec4n) BMDC を *T. rubrum* と 2、4 および 8 時間培養した。培養上清中のサイトカイン産生量を測定した。平均値 \pm SEM。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; n.s. not significant (Two-way ANOVA and Sidak's multiple comparison test) .

3. Dectin-1 および Dectin-2 は *T. rubrum* 感染制御に重要である

Dectin-1 および Dectin-2 の生理的な役割を調べるため、野生型、Dectin-1 欠損および Dectin-2 欠損マウスに *T. rubrum* を投与し、脾臓におけるコロニー形成ユニット (CFU) を調べた。野生型マウス由来の脾臓では CFU が 1 週目に比べ 2 週間目で低下しているのに対し、Dectin-1 欠損および Dectin-2 欠損マウスでは CFU 値の減少がみられなかった (図 3A)。また、TNF および IL-1 β の産生量が両遺伝子欠損マウスのそれぞれで低下し、易感染性になることが明らかになった (図 3B)。

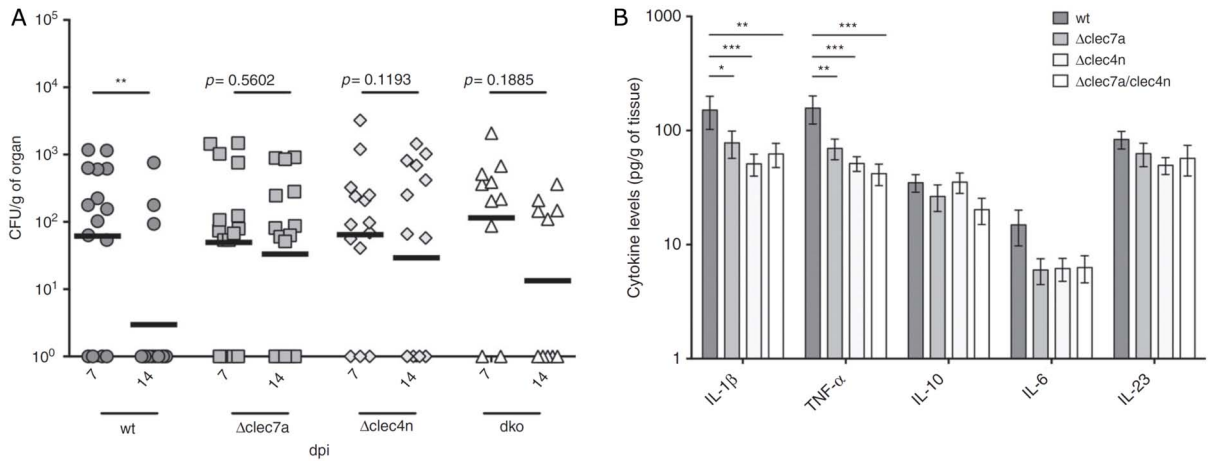


図3. *T. rubrum* 感染後の野生型、Dectin-1 欠損および Dectin-2 欠損マウスの菌体排除能
 (A) 野生型 (wt)、Dectin-1 欠損 (Δ clec7a)、Dectin-2 欠損 (Δ clec4n)、Dectin-1/Dectin-2 二重欠損 (Δ clec7a/ Δ clec4n) マウスに *T. rubrum* を感染させ、7、14 日後の脾臓における菌体形成数を測定した。黒線は平均値。** $P < 0.01$ (Student's t-test) . (B) 感染 7 日目の脾臓におけるサイトカイン量を測定した。平均値 \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test) .

4. IL-17 シグナルおよび T 細胞を介した免疫応答は *T. rubrum* 感染には不必要である

最後に、T 細胞を介した免疫応答および IL-17 シグナルを介した免疫応答が重要か調べるため、Rag2 欠損マウス (T および B 細胞欠損マウス) および IL-17A/IL-17F 二重欠損マウス (IL-17 シグナルが欠失したマウス) に *T. rubrum* を感染させ、脾臓における CFU を測定した。野生型マウスと同様に、Rag2 欠損マウスおよび IL-17A/IL-17F 二重欠損マウスは 2 週間目で CFU 値の低下を示した (図4)。また、Rag2 欠損マウスおよび IL-17A/IL-17F 二重欠損マウスは、野生型マウスと同等のサイトカイン産生量を示した。

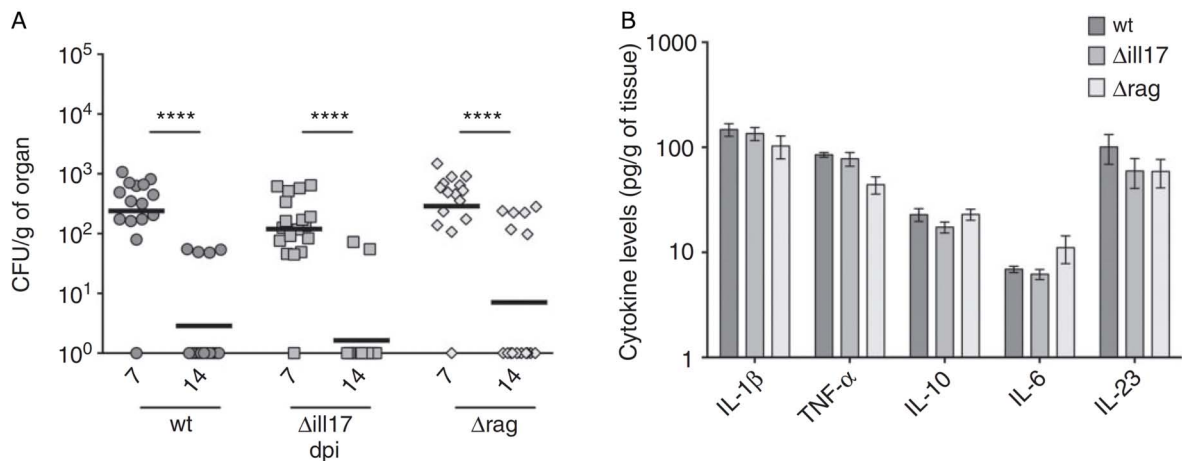


図4. *T. rubrum* 感染後の野生型、IL-17A/IL-17F 二重欠損および Rag2 欠損マウスの菌体排除能
 (A) 野生型 (wt)、IL-17A/IL-17F 二重欠損 (Δ il17) および Rag2 欠損 (Δ rag) マウスに *T. rubrum* を感染させ、7、14 日後の脾臓における菌体形成数を測定した。黒線は平均値。**** $P < 0.0001$ (Student's t-test) . (B) 感染 7 日目の脾臓におけるサイトカイン量を測定した。平均値 \pm SEM. Two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test.

考 察

T. rubrum 感染における CLR の役割はこれまで未解明のままであった。今回我々は、Dectin-1 および Dectin-2 が *T. rubrum* 感染制御に重要な役割を果たすことを明らかにした¹⁾。これまでの真菌感染免疫機構の報告と同様に、Dectin-1 および Dectin-2 は、*T. rubrum* 菌体自身を直接認識し、樹状細胞からのサイトカイン (TNF、IL-6、IL-1 β 、IL-10) の産生を促進することが示唆された。これら自然免疫応答の促進に関与することと一致して、Dectin-1 および Dectin-2 は *T. rubrum* 感染の生体防御機構に重要な役割を果たすことが明らかになった。

これまで、真菌の排除には T 細胞を介した獲得免疫や IL-17 シグナルを介した免疫応答が極めて重要であることが示されている³⁾。しかしながら、Rag2 欠損マウスおよび IL-17A/IL-17F 二重欠損マウスは野生型マウスと同様に、*T. rubrum* を排除することから、これら免疫応答は *T. rubrum* の排除に関与しないことが示唆された。 γ δ T 細胞や自然リンパ球による自然免疫誘導機構による菌体の排除あるいは、IFN- γ を介した I 型免疫応答が重要な役割を果たすことが示唆される。本研究により、*T. rubrum* 感染に対する自然免疫応答の重要性が明らかにすることが示唆された。今後の新たな治療法の開発が期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、サンパウロ大学の Yoshikawa Fabio 研究員、de Almeida Sandro Rogerio 教授、東京理科大学の岩倉洋一郎教授、千葉大学の西城忍准教授である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Yoshikawa FS, Yabe R, Iwakura Y, de Almeida SR, Saijo S. Dectin-1 and Dectin-2 promote control of the fungal pathogen *Trichophyton rubrum* independently of IL-17 and adaptive immunity in experimental deep dermatophytosis. *Innate Immun.* 2016 Jul;22(5):316-24. doi: 10.1177/1753425916645392. PMID: 27189427.
- 2) Yabe, R. & Saijo, S. : Dectin-2 in Antimicrobial Immunity and Homeostasis. *In C-Type Lectin Receptors in Immunity*, ed. by Yamasaki, S., Springer., Tokyo, pp 3-13, 2016.
- 3) Yabe, R., Iwakura, Y. & Saijo, S. : The Role of C-type Lectin Receptors in the Host Defense against Microbial Pathogens. *In Glycoscience: Biology and Medicine*, ed. by Endo, T., Seeberger, P. H., Hart, G. W., Wong, C. H. & Taniguchi, N., Springer., Tokyo, pp 1-10, 2014.