

62. 脂質パターン認識受容体を介した結核菌の免疫回避機構

原 博満

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

Key words : 結核, ITAM 共役受容体, 自然免疫

緒 言

結核は世界人口の約 1/3 が罹患し、毎年 150 万人以上が命を落とす最大の細菌感染症である。超多剤耐性結核菌の出現とともに、人口の高齢化に伴う再燃の増加、さらに近年は、非結核性抗酸菌症の増加も国内で問題となってきた。しかし、未だ成人肺結核に有効なワクチンは存在しない。結核の多くは、潜伏感染の再燃による発症であり、休眠結核菌は宿主免疫系による攻撃を逃れ、抗結核薬にも耐性を示す。結核の新規治療法および予防法を確立する上で、宿主免疫系による抗酸菌の認識と応答の機構を理解することは極めて重要である。抗酸菌は、宿主免疫とのインターフェースとなる細胞壁に多量の脂質を有しており、これらの中には強い免疫賦活活性を有するものや、逆に宿主免疫応答を制御して感染性や病原性に関わるものが存在することが知られ (図 1)、その構造や機能が盛んに研究されてきた。また、これらの表層脂質は休眠菌と活動菌とで大きく構成が異なることから、その変化とそれを認識する宿主免疫受容体との平衡が「休眠」と「再燃」を制御している可能性がある。しかし、肝心な宿主側の受容体や、それを介した免疫応答の性質は未だ十分に明らかにされていない。

抗酸菌の細胞壁を構築する主成分であるミコール酸 (Mycolic acid : MA) (図 1) は、極めて長鎖 ($C_{70\sim 90}$) の分岐アシル鎖を有する抗酸菌特有の脂肪酸である。MA は様々な形態で細胞壁に発現し、その構成は菌の状態によってダイナミックに変容して宿主の免疫応答に影響を及ぼす (図 1、2)。MA 含有脂質のうち、TDM (Treharose di-mycolate) は古くからコード因子と呼ばれ、肉芽腫誘導能などの強い自然免疫刺激活性を持つことが知られる。同様の活性が GMM (Glucose mono-mycolate) にも報告されており、これらの糖脂質は活動性 (増殖性) 結核菌の細胞壁に豊富に発現する。一方、休眠結核菌ではこれら糖脂質の合成が減少し、非糖化 MA 脂質である GroMM (Glycerol mono-mycolate) や遊離ミコール酸 (free MA : fMA) が優位となる。fMA は、ある種の高病原性結核菌において弱毒株の 10 倍以上多く産生され、Biofilm の主成分となって薬剤耐性に寄与するとともに、マクロファージ ($M\phi$) のサイトカイン産生を抑制する。また、GroMM は好酸球を主体とした 2 型の免疫応答を誘導することが報告されており、この応答は抗酸菌防御に働く 1 型免疫応答に拮抗する。

単球系自然免疫細胞 ($M\phi$ や樹状細胞) が発現する C 型レクチン (CLR) ファミリー、TREM ファミリー、CD300 ファミリーなどの受容体は、Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM) を介して活性化シグナルを伝達する ITAM 共役型受容体として知られる (図 3)。これらの受容体は、ITAM を持つアダプター分子である FcR γ 、DAP12 と会合するか、自身の細胞質領域に ITAM 様配列 (HemITAM) を有している。リガンドが結合すると、ITAM 内のチロシン残基がリン酸化され、ここにチロシンキナーゼ Syk がリクルートされることで下流にシグナルが伝達される。我々は、これら骨髄系細胞の ITAM 共役受容体を介した NF- κ B 活性化に必須のシグナル伝達分子としてアダプター分子 CARD9 を報告した (図 3) [1]。

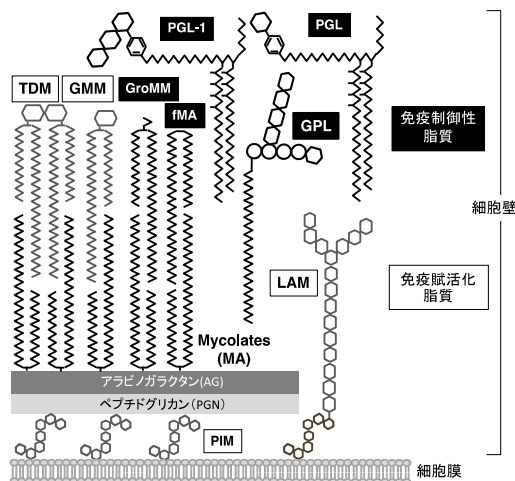


図1. 免疫反応を制御する抗酸菌細胞壁の脂質成分

TDM : treharose-di-mycolate, GMM : glucose mono-mycolate, GroMM : glycerol mono-mycolate, fMA : free mycolate, PGL : phenolic glycolipid, PGL-1 : phenolic glycolipid-1, Man-LAM : mannose-capped lipoarabinomannan, GPL : glycopeptidolipids, PIM : phosphatidylinositol mannoside

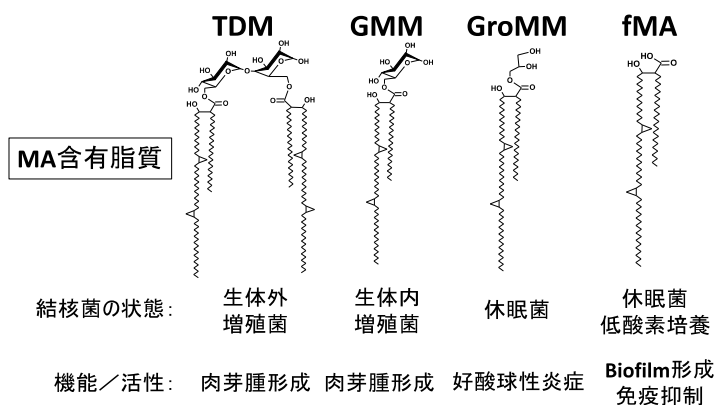


図2. 抗酸菌のMA含有脂質の変容と関連する免疫応答

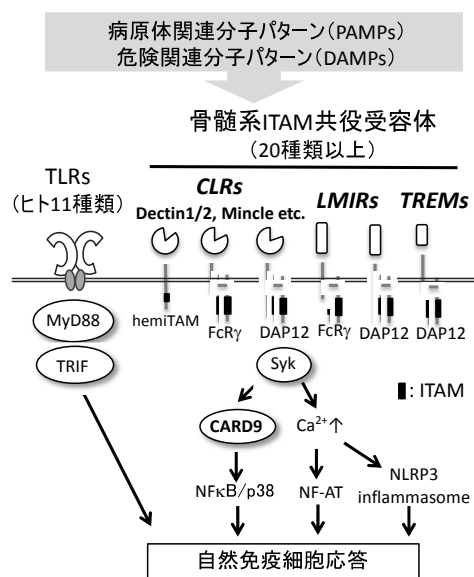


図3. パターン認識受容体として働くITAM共役受容体とそのシグナリング

近年の研究で、これらの受容体が TLR や NLR のリガンドとは異なる構造の病原体関連分子パターン (PAMPs) や危険関連分子パターン (DAMPs) を認識し、自然免疫のパターン認識受容体として働くことが CLR の研究を中心に次々と明らかになってきた。抗酸菌の PAMPs の認識に関しては、FcR γ に会合する CLR である Mincle が TDM の受容体であることがまず明らかにされ [2]、その後、別の細胞壁糖脂質である LAM 及び PIM (図 1) が、Mincle とは別の FcR γ 会合型 CLR である Dectin-2 及び DCAR によってそれぞれ認識されることが報告された。したがって、免疫賦活活性を持つ糖脂質成分は FcR γ に会合する CLR によって認識され、CARD9 シグナルを活性化することで肉芽腫形成や Th1 誘導などの抗酸菌防御応答を惹起することが明らかになってきた。一方で、別の ITAM 含有アダプター分子である DAP12 の欠損は、BCG 菌や結核菌感染後の肉芽腫形成や菌の排除が促進されることが報告されている。このことは、抗酸菌の免疫回避に働く DAP12 会合型の ITAM 共役受容体の存在を示唆していると言える。しかし、この受容体やそのリガンドは同定されてはいなかった。

我々は、免疫制御性の非糖化 MA 含有脂質である GroMM や fMA が、DAP12 会合型の ITAM 共役受容体である TREM2 によって認識されることを見出した。本研究では、宿主自然免疫系による抗酸菌認識と応答における TREM2 の機能を解析し、抗酸菌症の病態形成における脂質パターン認識受容体の役割について考察を行った。

方 法

1. *In vitro* マクロファージ刺激試験

野生型 (C57BL/6)、Mincle $^{-/-}$ 、TREM2 $^{-/-}$ 、DAP12 $^{-/-}$ 、FcR γ $^{-/-}$ 、CARD9 $^{-/-}$ マウスの腹腔にチオグリコレートを接種し、接種後 3 日目の腹腔滲出液より M ϕ を調製した。また、これらマウスの骨髄細胞を M-CSF 存在下で 5 日間培養することで骨髄由来 M ϕ (BMDM) を調製した。これら TGMF および BMDM を、プレートに固相化した fMA、GroMM、GMM、TDM で 24 時間刺激し、培養液中の TNF および MCP-1 の産生量を ELISA で測定した。

2. ミコール酸含有脂質による *in vivo* 自然免疫応答の解析

fMA あるいは TDM エマルジョンを野生型および TREM2 $^{-/-}$ マウスの腹腔内に接種し、腹腔内に誘導された M ϕ の iNOS、CD38 発現をフローサイトメーターで解析した。また、腹腔滲出液中の MCP-1 および TNF の産生量を ELISA 法で測定した。また、TDM エマルジョンを静脈内に接種し、7 日後の肺および胸腺を採取して重量を測定し、Lung weight index (肺重量/体重) と胸腺萎縮を解析した。肺組織の一部はホルマリン固定し、HE 染色を行って病理解析を行った。また、肺組織をホモジナイズし、ホモジネート中の TNF、MCP-1 を測定した。また、組織の一部から RNA を調製し、Nos2 の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法で解析した。

3. マウス BCG 感染試験

Mycobacterium bovis BCGtokyo 株を野生型および TREM2 $^{-/-}$ マウスの腹腔内に接種し、感染 3 日後の腹腔内の菌数、浸潤細胞数、MCP-1 の産生を野生型マウスと比較した。

結果および考察

1. TREM2 は非糖化 MA 脂質を認識して許容的 M ϕ を誘導する

*In vitro*において野生型 (C57BL/6)、Mincle $^{-/-}$ 、TREM2 $^{-/-}$ 、DAP12 $^{-/-}$ 、FcR γ $^{-/-}$ 、CARD9 $^{-/-}$ マウス由来の腹腔 M ϕ および BMDM を fMA、GroMM、GMM、TDM で刺激した結果、GMM や TDM 刺激は M ϕ に MCP-1 と TNF の両方を産生させ、この応答は、Mincle $^{-/-}$ 、FcR γ $^{-/-}$ 、CARD9 $^{-/-}$ 由来 M ϕ でほぼ完全に消失した (図 4)。一方、fMA や GroMM 刺激は M ϕ に TNF を産生させず、MCP-1 のみを産生させ、この応答は TREM2 $^{-/-}$ 、DAP12 $^{-/-}$ 由来 M ϕ でほぼ完全に消失したが、CARD9 欠損はこれに影響を与えなかった (図 4)。この応答を *in vivo* でも確認するため、fMA および TDM のエマルジョンを作製し、これを野生型および TREM2 $^{-/-}$ マウスの腹腔内に接種後、腹腔中のサイトカイン産生および浸潤 M ϕ の解析を行った。その結果、TDM 接種後の腹腔内には TNF と MCP-1 が検出されたのに対し、fMA 接種では MCP-1 のみしか検出されなかった。この MCP-1 産生は TREM2 $^{-/-}$ マウスでほぼ完全に消失した。また、TDM 接種が CD38^{hi}iNOS 陽性の M1 様 M ϕ を誘導したのに対し、fMA 接種は CD38^{lo}iNOS 陰性の

Mφを誘導し、このMφ誘導もTREM2欠損で著しく減少した。

これらの結果から、MA糖脂質はMincleによって認識され、FcRγ-CARD9経路を活性化して炎症性サイトカインやNOを産生するM1型のMφを誘導する一方、非糖化MA脂質はTREM2によって認識され、DAP12経路を活性化してCARD9非依存的にMCP-1を産生させ、iNOS陰性の許容的Mφを誘導することが判った。

2. TREM2はMincleの応答を抑制し、抗酸菌の免疫回避に働く

我々は、*TREM2*^{-/-}、*DAP12*^{-/-}Mφでは、GMMやTDMに対する応答が著しく増強されることを見出した(図4)。すなわちこれは、TREM2-DAP12シグナルがMincle-FcRγシグナルを抑制していることを示唆していた。このデータに一致して、*TREM2*^{-/-}マウスでは、野生型マウスに比べ、TDMエマルジョンの静脈内投与によって誘導される肺炎症(肺浮腫および肉芽腫)や胸腺萎縮が著しく促進され、TNFやMCP-1産生、iNOS遺伝子の発現量も著しく高まること判った。さらに、BCG菌の感染試験を実施した結果、*TREM2*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べ有意に菌の排除が促進されることが判った。これらの結果から、抗酸菌は、非糖化MAの産生を介してTREM2-DAP12シグナルを活性化し、iNOS陰性の許容的Mφを誘導して増殖ニッチを増やすとともに、Mincle FcRγシグナルを抑制することで肉芽腫形成や殺菌的iNOS陽性Mφの誘導を阻止し、宿主免疫を回避している可能性が示唆された。

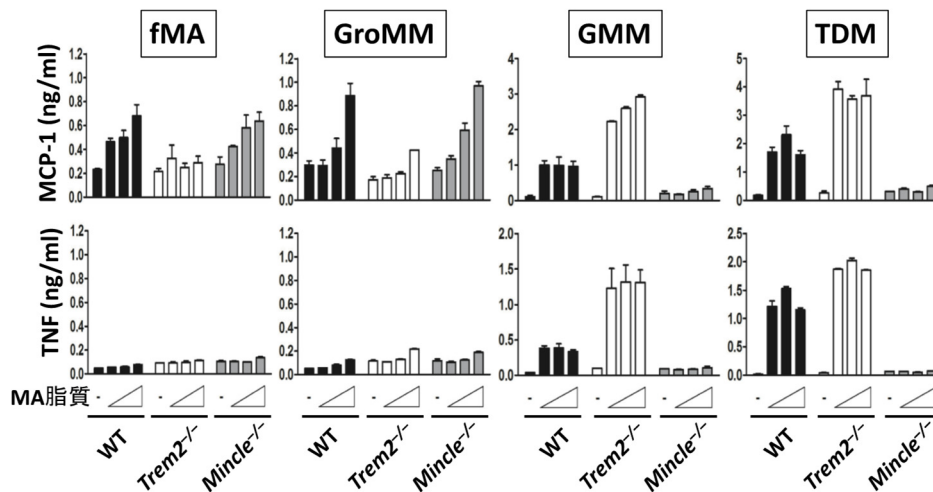


図4. MA含有糖脂質(GMM、TDM)はMincle、非糖化MA脂質(fMA、GroMM)はTREM2によって認識される

共同研究者・謝辞

本研究は、飯笹英一博士(鹿児島大学)、矢野郁也博士(大阪市立大学名誉教授)、山崎晶教授(大阪大学)、松崎吾朗教授、梅村正幸博士(琉球大学)、杉田昌彦教授(京都大学)、植松崇之博士(北里研究所)、清原秀泰博士、中馬康志博士(日本BCG研究所)、吉田裕樹教授(佐賀大学)らのご助力を得て実施された。この場を借りて、深く感謝の意を表す。

文献

- 1) Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, Imanishi T, Xue L, Morris SW, Inui M, Takai T, Shibuya A, Saijo S, Iwakura Y, Ohno N, Koseki H, Yoshida H, Penninger JM, Saito T. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2007 Jun;8(6):619-29. Epub 2007 May 7. PMID: 17486093
- 2) Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, Toyonaga K, Yamada H, Takeuchi O, Kinoshita T, Akira S, Yoshikai Y, Yamasaki S. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med.* 2009 Dec 21;206(13):2879-88. doi: 10.1084/jem.20091750. Epub 2009 Dec 14. PMID: 20008526