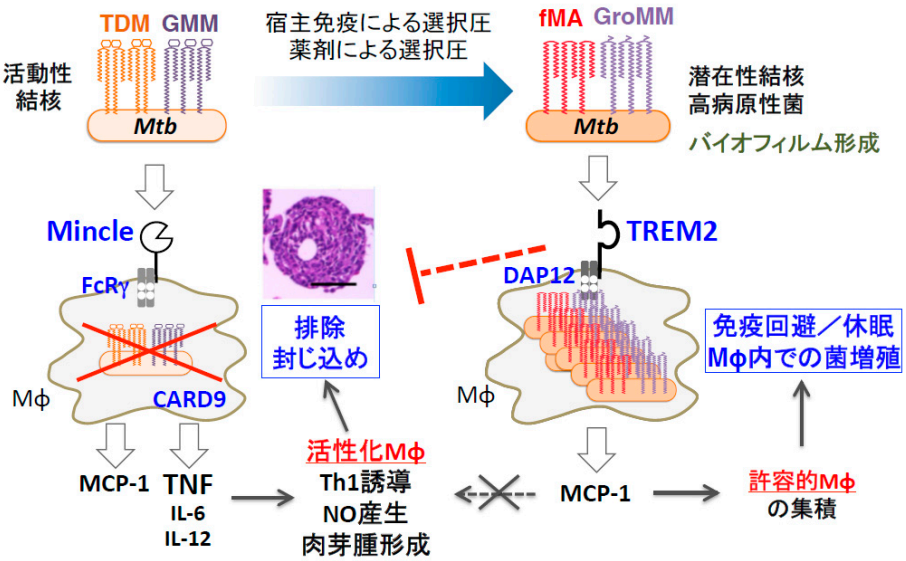
62　脂質パターン認識受容体を介した結核菌の免疫回避機構	原　博満

【目的】結核菌細胞壁の主成分であるミコール酸（Mycolate：MA）は、細胞壁骨格を形成するとともに様々な遊離形態で細胞壁表層に発現する。その構成は菌の生活環や外部環境に依存して大きく変容し、宿主免疫系の応答に影響を及ぼす。活動性結核菌は、肉芽腫形成などの免疫賦活能を有する MA 含有糖脂質（TDM や GMM）を表層に発現する。一方、休眠結核菌では糖脂質の発現が減少し、非糖化 MA 脂質である遊離ミコール酸（free MA：fMA）や GroMM の発現が優位となる。fMA はバイオフィルム成分となって薬剤耐性に寄与し、ある種の高病原性株では弱毒株の 10 倍以上産生され、マクロファージ（Mϕ）の活性化を抑制する。GroMM は Th1 に拮抗する 2 型の免疫応答を誘導する。これまで、FcRγ 会合型の C 型レクチン受容体 Mincle が TDM を認識し、結核菌防御的な免疫応答を惹起することが知られていたが、TDM 以外の MA 脂質の受容体は不明であった。我々は結核菌を認識する新規宿主受容体を探索した結果、DAP12 会合型の ITAM 共役受容体 TREM2 が MA 含有脂質を認識することを見出した。そこで、本研究では TREM2 の機能解析を試みた。

【方法】1. Mincle$^{-/-}$、TREM2$^{-/-}$、DAP12$^{-/-}$、FcRγ$^{-/-}$、CARD9$^{-/-}$マウスから腹腔 Mϕ または骨髄由来 Mϕ を調製し、各種ミコール酸含有脂質に対する応答を野生型マウス由来のそれと比較した。2. Mincle あるいは TREM2 のリガンドとなるミコール酸含有脂質を野生型および TREM2$^{-/-}$マウス腹腔内に接種した際に誘導される Mϕの表現型および腹腔滲出液中の MCP-1 および TNF の産生量を比較した。3. TREM2$^{-/-}$マウスに BCG を腹腔内感染させ、臓器内菌数や炎症メディエーターの産生を野生型マウスと比較した。

【結果】以上の実験の結果次のことが明らかになった。糖が付加した MA 糖脂質（TDM、GMM）は Mincle によって認識され、糖付加のない MA 脂質（GroMM、fMA）は TREM2 よって認識される。Mincle を介した刺激は、炎症性サイトカインを産生する iNOS 陽性の殺菌的 Mϕ を誘導する。一方、TREM2 を介した刺激は iNOS 陰性の許容的 Mϕ を誘導する。TREM2／DAP12 シグナルは、Mincle-FcRγ-CARD9 シグナルを介した Mϕ 活性化および肉芽腫形成などの防御的免疫応答を抑制する。*TERM2* 欠損マウスは、感染初期の BCG 菌の排除が促進される。

TREM2 を介した MA 脂質応答による結核菌の免疫回避仮説



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ている。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（$C_{70\sim90}$）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（Mϕ）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（Mϕ 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 FcRγ、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-κB 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]。

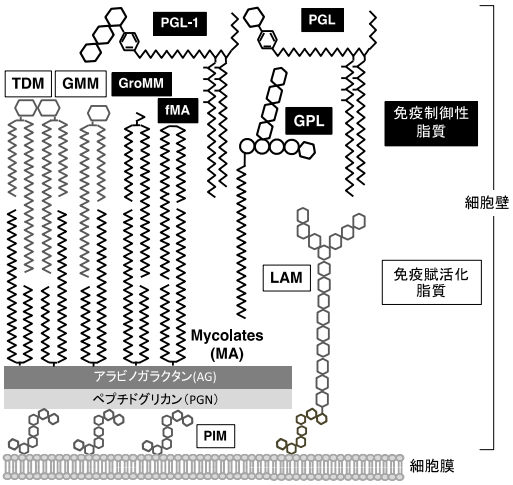


図 1. 免疫反応を制御する抗酸菌細胞壁の脂質成分

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

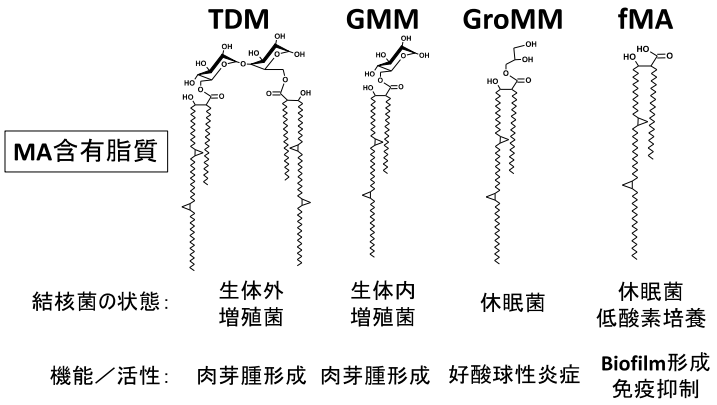


図 2. 抗酸菌の MA 含有脂質の変容と関連する免疫応答

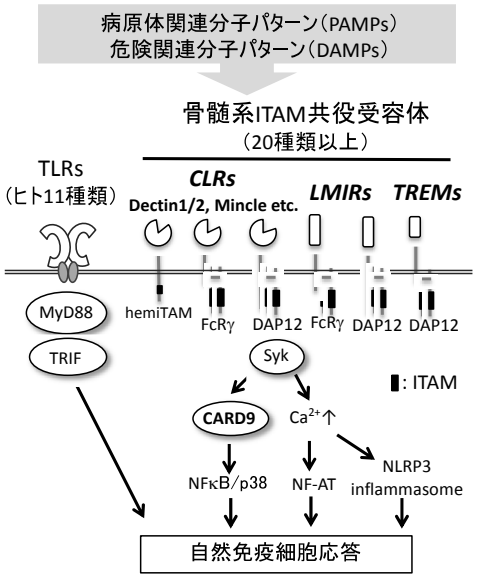


図 3. パターン認識受容体として働く ITAM 共役受容体とそのシグナリング

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、FcRγ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FcRγ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FcRγ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*$^{-/-}$、*FcRγ*$^{-/-}$、*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Mφ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Mφ（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Mφ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 BCG tokyo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Mφを誘導する

*In vitro*において野生型（C57BL/6）、*Mincle*$^{-/-}$、*TREM2*$^{-/-}$、*DAP12*$^{-/-}$、*FcRγ*$^{-/-}$、*CARD9*$^{-/-}$マウス由来の腹腔MφおよびBMDMをfMA、GroMM、GMM、TDMで刺激した結果、GMMやTDM刺激はMφにMCP-1とTNFの両方を産生させ、この応答は、*Mincle*$^{-/-}$、*FcRγ*$^{-/-}$、*CARD9*$^{-/-}$由来Mφでほぼ完全に消失した（図4）。一方、fMAやGroMM刺激はMφ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Mφ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Mφ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Mφを誘導したのに対し、fMA接種はCD38^{low}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が判った。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。

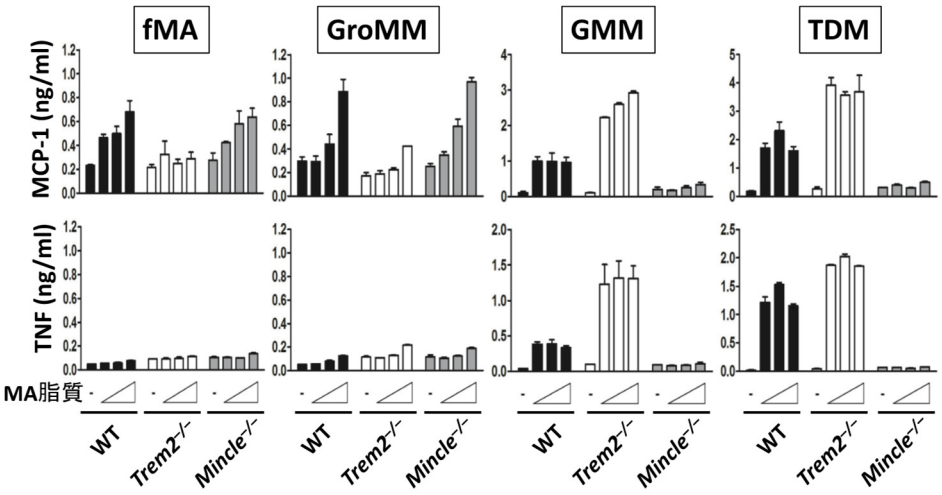


図4. MA含有糖脂質（GMM、TDM）はMincle、非糖化MA脂質（fMA、GroMM）はTREM2によって認識される

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る。

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