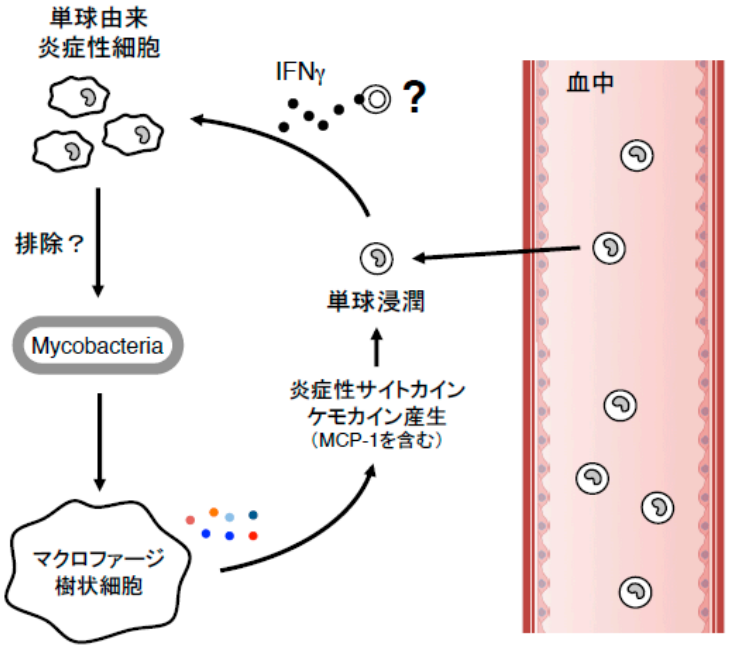
146　炎症性単球の浸潤・分化におけるCARD9の機能解析	豊永　憲司

【目的】マクロファージや樹状細胞などに発現している ITAM（immunoreceptor tyrosine-based activating motif）共役型受容体のシグナル伝達に必須の役割を担う *CARD9* 欠損マウスは、結核菌感染において、生存率の低下や菌の排除遅延など、抵抗性の著しい減弱が報告されている。ところが、*CARD9* 欠損マウスにおいても、感染後の抗原特異的 T 細胞応答は野生型マウスと同等に誘導されることから、CARD9 は特に感染初期の宿主防御に重要な分子と推察されているが、CARD9 を介した初期感染制御機構についてはよく解っていない。そこで、本研究では、結核ワクチン株である *Mycobacterium bovis* BCG（*M. bovis* BCG）を用いたマウス感染実験を行い、抗酸菌感染初期における CARD9 の役割解明を試みた。

【方法】*M. bovis* BCG Tokyo 株 0.5〜1.0×10^7 CFU を、野生型（C57BL/6）および *CARD9* 欠損マウスの腹腔内に摂取し、感染 7 日後のマウスを解析した。

【結果】*M. bovis* BCG を用いたマウス腹腔内感染においては、感染局所への Ly6C 陽性の炎症性単球の浸潤に CARD9 は重要な役割を担っていることが明らかとなった。*CARD9* 欠損マウスでは、これら炎症性単球の感染局所への浸潤減少に加え、抗結核応答に特に重要と考えられている IFNγ 産生も低下しており、腹腔内菌数も上昇していた。

M. bovis BCG 感染初期に誘導される宿主防御応答の概略



146. 炎症性単球の浸潤・分化における CARD9 の機能解析

豊永　憲司

大阪大学 微生物病研究所 分子免疫制御分野

Key words：CARD9，自然免疫，*Mycobacterium bovis* BCG，炎症性単球

緒　言

自然免疫応答において中心的な役割を担うマクロファージや樹状細胞に発現している Mincle や Dectin-2 などの ITAM（immunoreceptor tyrosine-based activation motif）共役型 C 型レクチン受容体は、結核菌や真菌に存在する糖含有成分をリガンドとして認識し、炎症性サイトカイン・ケモカインの産生や補助刺激分子の発現上昇を誘導することで宿主防御応答に寄与する［1，2］。これらの ITAM 共役型 C 型レクチンの下流には、CARD9 と呼ばれるアダプター分子が存在し、細胞内の活性化シグナル伝達に必須の役割を果たすことが報告されている［3］。*CARD9* 欠損マウスでは、個々の C 型レクチン受容体遺伝子欠損マウスよりも感染に対する抵抗性が著しく減弱すること［1，4］、また、ヒトにおいては、*CARD9* の遺伝子変異がカンジダ症の発症や重症化を促すという疫学的証拠から［5］、CARD9 を介した自然免疫活性化は宿主防御に極めて重要と考えられる。しかし、CARD9 上流の ITAM 共役型受容体のリガンドが次々と同定され、細胞活性化機構が明らかになってきている一方で、実際の感染において CARD9 の寄与する宿主防御応答の詳細ついては未だ十分に解析されていない。そこで、結核ワクチン株である *Mycobacterium bovis* BCG（*M. bovis* BCG）を用いたマウス感染実験を行い、抗酸菌感染初期における CARD9 の役割解明を試みた。

方法および結果

抗酸菌感染初期において、CARD9 がどのような宿主防御応答に寄与しているかを明らかにするために、*M. bovis* BCG Tokyo 株を用いたマウス感染実験を行った。*M. bovis* BCG Tokyo 株 0.5～1.0×10^7 CFU を、野生型（C57BL/6）および *CARD9* 欠損マウスの腹腔内に摂取し、感染 7 日後に解析したところ、*CARD9* 欠損マウスにおいて腹腔内菌数の有意な上昇を認めた（図 1A）。この時、野生型マウスの腹腔では、感染に伴って Ly6C 陽性の炎症性単球の浸潤が認められたが、*CARD9* 欠損マウスでは、この細胞浸潤が有意に減少していた（図 1B）。浸潤してきたこれらの炎症性単球は、ケモカインレセプターである CCR2 を発現していることが知られており、感染局所において、そのリガンドであるケモカイン MCP-1 が産生されることで浸潤してくると考えられている。そこで、腹腔内の MCP-1 量を解析したところ、*CARD9* 欠損マウスでは、その産生がほとんど認められなかった（図 1C）。さらに、この時の腹腔内における炎症性サイトカイン・ケモカイン量を解析したところ、野生型マウスでは、抗結核応答に特に重要と考えられている IFNγ の産生が認められたのに対し、*CARD9* 欠損マウスではこの産生も低下していた（図 1D）。

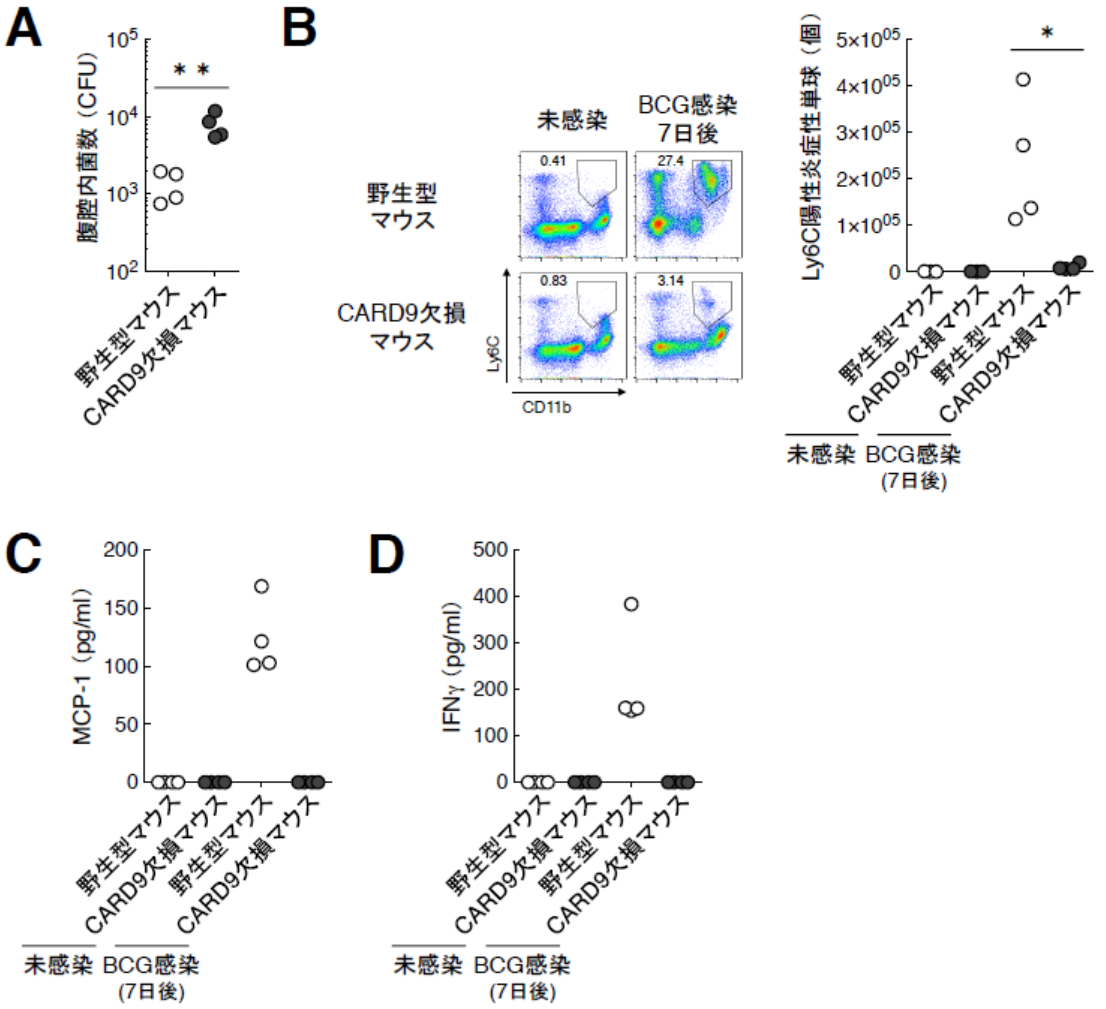


図 1. *CARD9* 欠損マウスでは *M. bovis* BCG 腹腔内感染において菌の排除が遅れる

A) *M. bovis* BCG Tokyo 株 0.5～1.0×10^7CFU を、野生型（C57BL/6）および *CARD9* 欠損マウスの腹腔内に摂取し、感染 7 日後の腹腔内菌数を測定した。

B) 感染 7 日後の腹腔内浸潤細胞をフローサイトメーターで解析し(左)、その結果をグラフ化した(右)。

C) 感染 7 日後の腹腔内 MCP-1 を ELISA 法で解析した。

D) 感染 7 日後の腹腔内 IFNγ を ELISA 法で解析した。

t-test、*p＜0.05、**p＜0.01。

考　察

以上の結果より、*M. bovis* BCG を用いたマウス腹腔内感染においては、感染局所への Ly6C 陽性の炎症性単球の浸潤に CARD9 は重要な役割を担っていることが明らかとなった。菌の排除には、IFNγによるマクロファージや炎症性単球の活性化が重要であることは広く知られているが［6］、*CARD9* 欠損マウスでは、炎症性単球の感染局所への浸潤減少に加え、感染局所における IFNγ量の低下によってこれらの細胞の活性化も減弱するため、菌の排除が遅れる可能性が考えられた。今後は、主要な感染経路と考えられている経気道感染モデルでも解析を行い、感染早期の IFNγ産生を担う細胞や、この時期に産生される IFNγが実際に菌の排除において重要であるかを明らかにしていきたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科免疫学分野の原博満教授、大阪大学微生物病研究所分子免疫制御分野の山﨑晶教授である。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) Ishikawa E, Mori D, Yamasaki S. Recognition of Mycobacterial Lipids by Immune Receptors. Trends Immunol. 2017;38(1):66-76. doi: 10.1016/j.it.2016.10.009. PubMed PMID: 27889398.

2) Sancho D, Reis e Sousa C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. Annu Rev Immunol. 2012;30:491-529. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101352. PubMed PMID: 22224766; PubMed Central PMCID: PMCPMC4480235.

3) Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, Imanishi T, Xue L, Morris SW, et al. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. Nat Immunol. 2007;8(6):619-29. doi: 10.1038/ni1466. PubMed PMID: 17486093.

4) Dorhoi A, Desel C, Yeremeev V, Pradl L, Brinkmann V, Mollenkopf HJ, et al. The adaptor molecule CARD9 is essential for tuberculosis control. J Exp Med. 2010;207(4):777-92. doi: 10.1084/jem.20090067. PubMed PMID: 20351059; PubMed Central PMCID: PMCPMC2856020.

5) Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, Schaffer AA, Woellner C, Salzer U, et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. N Engl J Med. 2009;361(18):1727-35. doi: 10.1056/NEJMoa0810719. PubMed PMID: 19864672; PubMed Central PMCID: PMCPMC2793117.

6) Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. Annu Rev Immunol. 2009;27:393-422. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132703. PubMed PMID: 19302046; PubMed Central PMCID: PMCPMC4298253.