

【第52回 小島三郎記念文化賞】

結核菌受容体群の発見と宿主免疫賦活化機構の解明

Identification of clustered immune receptors for mycobacteria

やま さき しょう
山 崎 晶
Sho YAMASAKI

はじめに

この度は伝統ある小島三郎記念文化賞を賜り、大変光栄に思うと共に、身の引き締まる思いであります。推薦くださった中別府雄作所長、選考委員長の豊島久真男先生をはじめ選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。50回を超える本賞の過去の受賞者は、大きなライフワークを成し遂げられた高名な先生方ばかりであり、はじめは驚きと共に躊躇する思いが少なからずありました。しかし、受賞対象となった研究成果は、一緒に研究してきた若い研究者や学生たちが中心となって行い、新しい発見を積み上げてくれたものです。本賞は、こうした若い研究者たちへの評価であり、エールであると理解し、その成果を紹介させていただきたいと思います。

研究の経緯

三菱化学で村松実博士にT細胞の扱い方を教わり、さきがけの岩島牧夫先生、千葉大学・理化学研究所で斉藤隆先生に師事した私は、主にT細胞受容体(TCR)による自己・非自己認識機構に関する研究に従事していました。特に、TCRがリガンドの質を見分けて異なった応答を誘導できる点に興味を持ち、その変換機構の普遍的原理を探るべく研究を続けていましたが、なかなか手がかりは掴めませんでした。その頃、マスト細胞のFcεRIにもそのようなリガンドの差異により異なる応答が惹起されることが分かり^{1,2)}、骨髄由来マスト細胞をモデルシステムとして用いて研究を続けました。その結果、

同一受容体を介して異なる応答が誘導される分子機序として、少なくとも受容体シグナルの「強さ」と「持続時間」が重要な決定因子であることを見出しました³⁾。

その頃、TLRをはじめとしたパターン認識受容体の研究が飛躍的に進み、病原体が持つ特有の分子パターンに対する宿主受容体が次々に明らかにされていきました。マスト細胞でも、TLR2リガンドのzymosanで刺激すると脱顆粒を起こすという論文が報告されました⁴⁾。zymosanはTLR2、Dectin-1のリガンドとして知られていましたが、骨髄由来マスト細胞にはDectin-1の発現は検出できませんでした。脱顆粒はPLCγ-Ca²⁺経路が動かなければ起こらないはずなので、何かしらのITAM共役アダプターとリンクしていることを示唆しているのではないかと考えました。最初はTLRの中にFcRγやDAP12を使って活性化シグナルを伝えるものはないかと思って配列のサーチや結合実験を試しましたが、全てネガティブでした。その後、TLRで発現が誘導され、ITAMと会合するような遺伝子がないかという観点で、microarray解析を行いました。その結果、マスト細胞でzymosan刺激で誘導される遺伝子のトップに、Mincle (Macrophage inducible C-type lectin) という分子がヒットしました。Mincleは1999年に審良静男先生らのグループが初めてクローニングに成功し⁵⁾、NF-IL-6 (CEBP/β) 依存的に誘導される遺伝子であることが明らかになっていましたが、そのリガンドや機能は不明でした。Mincleの膜貫通領域には荷電アミノ酸が保存されており、われわれは他のITAM受容体の解析の経験から、何か

九州大学生体防御医学研究所感染ネットワーク研究センター
免疫制御学分野 教授
〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1
(平成29年2月1日より 大阪大学微生物病研究所
分子免疫制御学分野 教授を兼任)

Division of Molecular Immunology,
Research Center for Infectious Diseases, Medical Institute of
Bioregulation, Kyushu University
(3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka)

しらの ITAM アダプターと会合するのではないかと考えました。実際、Mincle は $\text{Fc}\gamma$ と共沈することが明らかになり、 $\text{Fc}\gamma$ を介する活性化受容体であることが分かりました⁶⁾。ところが、この分子は何度試しても zymosan を認識することではなく、当初の作業仮説を満たす分子ではありませんでした。その後、Mincle が死細胞を認識すること⁶⁾、病原性真菌を認識すること⁷⁾を見出しましたが、結核菌受容体であることを発見したのは九州大学に移ってからであり、2つの偶然が重なりました。1つは異動直前の iFReC のセミナーでお話しする機会があった際、当時木下タロウ先生の研究室で糖脂質を研究されていた森田康裕先生が、「結核菌は認識しますか？」と質問されたことです。私も全く別の観点から（後に私の観点は全く的外れであったことが判明しましたが）結核菌を認識する可能性を考えていたので、すぐに菌を頂いて試してみました。森田先生は *M. smegmatis* のリポアラビノマンナン (LAM) 変異体、フォスファチジルイノシトールマンノシド (PIM) 変異体を多く作成しておられ、これらの糖脂質が Mincle リガンドとして機能しているのではないかとこの予測のもと、野生型、並びにいくつもの変異型を供与くださいました。これらを試したところ、驚くべきことに、野生型と共培養するとレポーター活性の強い活性化が認められ、この強い活性はどの変異型でも同様でした。つまり、LAM, PIM ではなさそうだが、*M. smegmatis* の何かを認識する受容体であることが分かりました。異動した九州大学生体防御医学研究所の当時の所長は結核菌研究の権威であり、第 47 回小島三郎記念文化賞受賞者でもある吉開泰信先生でした。早速、*M. tuberculosis* H37 Rv などのさまざまな強毒株を試させていただき、Mincle が結核菌に普遍的な成分を認識することが明らかになりました。結核菌の何を認識しているのかを調べるために、さまざまな溶媒で *M. smegmatis* を処理し、処理後の菌体、抽出液の活性を調べていきました。その結果、クロロフォルム：メタノールで処理した時のみ菌体の活性が全く消失し、逆に活性がクロロフォルム：メタノール画分に抽出されてくることが分かりました。リガンドはかなり脂溶性の高い成分であることが予想され、薄相クロマトグラフィーを用いて分離を行いました。これをさらに分画してそれぞれの脂質を再抽出して活性を調べた

結果、強いシングルピークが現れ、そのピークはトレハロースジミコール酸と同一であることが判明しました。TDM は山村雄一先生、東市郎先生が強いアジュバント活性を見出され、完全フロイントアジュバントの主要な因子としても知られていましたが、受容体は 60 年以上不明でした。Mincle が TDM の受容体であることが初めて明らかになりました⁸⁾。では Mincle は TDM 応答に必須の受容体なのでしょう。当時 Mincle 欠損マウスの報告はありませんでした。ノックアウトコンストラクトを作ってから、一応、クローニングされた審良先生に聞いてみようと思って恐る恐る伺ってみたところ、未発表のノックアウトマウスを供与して良いと言ってくださり、genetical な実験が行えることになりました。実際、Mincle ノックアウトマウスでは TDM 静注による血中サイトカイン産生、肺肉芽腫形成、*in vitro* マクロファージ活性化などの応答が全て消失し、これらを中心となって行った石川助教、大学院生の石川の努力によって、TDM の作用を担う必要不可欠な受容体であることが世界で初めて明らかになりました。後に分かりましたがこの仕事は実は熾烈な国際競争にあり、翌年ほとんど同じ内容がドイツのグループから報告されました⁹⁾。研究室立ち上げ直後で人数も少ない中、頑張ってくれたラボメンバーと素晴らしい共同研究者のおかげだと思っています。

TDM は古くからアジュバントとしても知られています。山村雄一先生、東市郎先生らの研究に代表されるように、TDM を抗原と共に投与すると、強い抗原特異的抗体産生が促される事が知られていました¹⁰⁾。実際、TDM を OVA と共にマウスに免疫すると、OVA 特異的抗体産生が認められましたが、Mincle ノックアウトマウス、また、そのシグナルサブユニットである $\text{Fc}\gamma$ ノックアウトマウスでは、これらの抗体産生が全く起こらないことも明らかとなりました。以上から、Mincle は、TDM が有する全ての生理作用を担う必須の受容体であることが明らかになりました。

ゲノム上で Mincle の周囲には、類似のレクチン受容体が存在し、クラスターを形成していることが知られていました。Mincle のすぐ隣には、MCL (Macrophage C-type lectin) と呼ばれる Mincle に良く似た受容体があり、Mincle と違って恒常的に発現することも報告されてきました。Mincle と異

なり MCL の transmembrane 領域には正電荷を持つアミノ酸がないため、助教の三宅、大学院生の豊永、森が中心となって解析を進めた結果、MCL も FcR γ と会合することを見出しました。また、MCL をノックアウトすると TDM に対する応答性が激減することも明らかになりました¹¹⁾。Mincle ノックアウトで完全に応答がなくなるのに、MCL ノックアウトでも激減する理由は不明でしたが、その後の研究により、Mincle は MCL とヘテロダイマーを形成し、お互いのタンパク発現、細胞表面発現を安定化させていることが判明しました¹²⁾。MCL は、パターン認識受容体のような構造をしています、他の受容体の発現を調節するような機能も持ち合わせていることが明らかになりました。以上から、古くから知られていた TDM の強い活性は、Mincle、MCL という 2 つの異なるレクチン受容体が協調して働いているためであったと考えられました。

結核菌の細胞壁には他にも特徴的な成分があることが知られています。その中の 1 つ、最も抱負なりポグリカンとして、リポアラビノマンナン (LAM) が知られています。大学院生の米川は、LAM がアジュバントとして働くか、つまり、完全フロイントアジュバント (CFA) の代わりに使って実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) が起こせるかを調べたところ、LAM を投与した全てのマウスで EAE を発症することが分かりました。興味深いことにこの系を FcR γ ノックアウトマウスで行ったところ、EAE、また所属リンパ節の抗原特異的 T 細胞応答は完全に消失することが分かりました。何かしらの FcR γ 共役受容体が LAM の受容体として機能していることを示唆します。比較ゲノム解析から、MCL、並びにその隣に位置する Dectin-2 は、有胎盤類以降から、Mincle からの遺伝子重複によって生じてきた可能性が高いことも分かりました¹³⁾。Mincle、MCL が共に結核菌を認識することから、Dectin-2 も同様の認識能を持つ可能性を考え、レポーター細胞を作ったところ、やはり結核菌に応答して強く活性化されることが分かりました。同様に脂溶性、水溶性溶媒で活性画分の分離を試みると、Dectin-2 の活性は水溶性画分に抽出され、水溶性リポグリカンとして知られる LAM の性質と一致しました。最終的に、精製 LAM を使って実験したところ、LAM は Dectin-2 のリガンドとして機能することが明らかに

なりました¹³⁾。

Mincle, MCL, Dectin-2 はゲノム上で隣り合って存在していますが、その周囲にも多くの類似遺伝子が存在します。その 1 つ、DCAR は 1993 年に、京都大学のグループから、FcR γ と会合して活性化受容体として働く可能性が示唆されていました¹⁴⁾。大学院生の豊永が DCAR を FcR γ と共にレポーター細胞に発現させると、抗体刺激でレポーターの活性化が誘導されたことから、この細胞を用いてリガンド探索を進めました。その結果、やはり結核菌存在下で活性が上昇し、DCAR も結核菌受容体として機能することが明らかとなりました。同様に溶媒を用いた活性の抽出を行ったところ、TDM と同じクロロフォルム：メタノール画分に濃縮されるものの、その移動度は TDM とは全く異なることが分かりました。二次元電気泳動で本活性を示すスポットは *M. bovis* BCG に比較的多く含まれることから、矢野郁也先生、BCG 研究所のご協力により大量の BCG を供与いただき、カラムクロマトグラフィーを用いて大量精製を行い、構造決定を試みました。九大薬学部の宮本先生のご尽力のお陰で、最終的にリガンドは phosphatidylinositol mannoside (PIM) であることが判明しました。PIM はさまざまなアシル化フォームが知られていますが、トリアシル型 (AcPIM2)、テトラアシル型 (Ac₄PIM2) が強い活性を有する事も判明しました。さらに、森田先生に供与いただいた *M. smegmatis* の PIM 合成酵素欠損株を用いた解析から、マンノースがさらに付加した極性の高い PIM (PIM4、PIM6) もまた DCAR リガンドとして機能することも判明しました。次に、DCAR 発現細胞を同定するため、DCAR 欠損マウスに DCAR 発現細胞を免疫することで特異的モノクローナル抗体を樹立しました。この抗体でさまざまな組織の細胞を染色したところ、DCAR は、単球由来炎症性マクロファージに特異的に発現していることが分かりました。この細胞は腹腔や脾臓、肺などに存在しますが、いずれも DCAR を恒常的に発現していました。結核菌感染に伴ってこの細胞は増加しますが、DCAR 欠損マウスではその増加が見られなかったことから、DCAR を介するケモカインによって単球が動員されることが重要であることが分かりました。獲得免疫応答における DCAR の影響を調べたところ、感染後の抗原特異的 Th1 応答が DCAR 欠損マウス

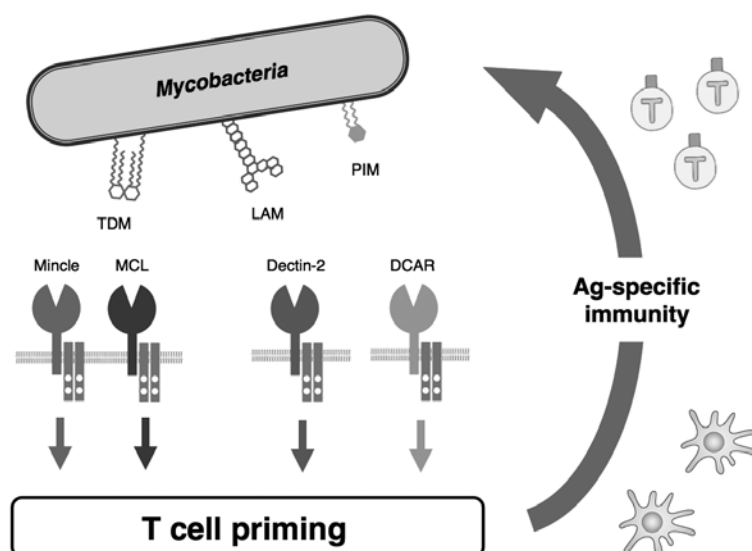


図 結核菌糖脂質を認識するレクチン受容体群と宿主免疫賦活化機構

で顕著に低下しており、また結核菌の排除も欠損マウスで障害されることが判明しました。以上の結果より、DCARはPIMをリガンドとして認識する新たな結核菌受容体であり、Th1応答を誘導する役割を持つ事が明らかとなりました¹⁵⁾。

以上の研究から、これまで長年不明であった結核菌細胞壁因子の免疫賦活活性が分子レベルで明らかになってきました。中でもC型レクチン受容体は特殊な糖脂質を認識する重要な受容体群という新しい概念を提唱することができました(図)。現在用いられているBCGワクチン株にはTDM、LAM、PIMは全て豊富に含まれており、BCGワクチンの作用機序を説明する分子機構を解明したとも考えられます。今後、これらのアジュバント糖脂質と抗原を組み合わせたコンポーネントワクチンは、結核のみならず他の感染症、また、がんに対する次世代ワクチンとして大いに期待されます。

謝 辞

以上の一連の研究を振り返ると、至る所に、これまで薫陶を受けたさまざまな先生方のエッセンスが少しずつ混じり合っているような気がします。京都大学の榎倉辰一郎先生、伏木亨先生、三菱化学総合研究所の村松実博士、三菱化成生命研の篠原信賢先生、さきがけの岩島牧夫先生、千葉大学・理化学研究所の齊藤隆先生、それぞれの先生から得たものの深さを実感し、

改めて感謝の意を強くしています。また、実際に最前線で実験を行い、研究の進展に直接貢献してくれた研究室の仲間たち、いろいろな形で研究を支えてくださった全ての方々に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Asai, K., Kitaura, J., Kawakami, Y., Yamagata, N., Tsai, M., Carbone, D. P., Liu, F. T., Galli, S. J., and Kawakami, T. Regulation of mast cell survival by IgE. *Immunity* 2001 ; 14 : 791-800.
- 2) Kalesnikoff, J., Huber, M., Lam, V., Damen, J. E., Zhang, J., Siraganian, R. P., and Krystal, G. Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* 2001 ; 14 : 801-811.
- 3) Yamasaki, S., Ishikawa, E., Kohno, M., and Saito, T. The quantity and duration of FcRgamma signals determine mast cell degranulation and survival. *Blood* 2004 ; 103 : 3093-3101.
- 4) Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *The Journal of clinical investigation* 2002 ; 109 : 1351-1359.
- 5) Matsumoto, M., Tanaka, T., Kaisho, T., Sanjo, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., and Akira, S. A novel LPS-inducible C-type lectin is a transcriptional target of NF-IL6 in macrophages. *Journal of immunology* 1999 ; 163 : 5039-5048.
- 6) Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Hara, H., Ogata, K., and Saito, T. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nature immunology*

- 2008 ; **9** : 1179-1188.
- 7) Yamasaki, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Matsuzawa, T., Ishikawa, E., Sakuma, M., Tateno, H., Uno, J., Hirabayashi, J., Mikami, Y., Takeda, K., Akira, S., and Saito, T. C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009 ; **106** : 1897-1902.
 - 8) Ishikawa, E., Ishikawa, T., Morita, Y. S., Toyonaga, K., Yamada, H., Takeuchi, O., Kinoshita, T., Akira, S., Yoshikai, Y., and Yamasaki, S. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *The Journal of experimental medicine* 2009 ; **206** : 2879-2888.
 - 9) Schoenen, H., Bodendorfer, B., Hitchens, K., Manzanero, S., Werninghaus, K., Nimmerjahn, F., Agger, E. M., Stenger, S., Andersen, P., Ruland, J., Brown, G. D., Wells, C., and Lang, R. Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *Journal of immunology* 2010 ; **184** : 2756-2760.
 - 10) Saito, R., Tanaka, A., Sugiyama, K., Azuma, I., and Yamamura, Y. Adjuvant effect of cord factor, a mycobacterial lipid. *Infection and immunity* 1976 ; **13** : 776-781.
 - 11) Miyake, Y., Toyonaga, K., Mori, D., Kakuta, S., Hoshino, Y., Oyamada, A., Yamada, H., Ono, K., Suyama, M., Iwakura, Y., Yoshikai, Y., and Yamasaki, S. C-type lectin MCL is an FcRgamma-coupled receptor that mediates the adjuvanticity of mycobacterial cord factor. *Immunity* 2013 ; **38** : 1050-1062.
 - 12) Miyake, Y., Masatsugu, O. H., and Yamasaki, S. C-Type Lectin Receptor MCL Facilitates Mincle Expression and Signaling through Complex Formation. *Journal of immunology* 2015 ; **194** : 5366-5374.
 - 13) Yonekawa, A., Saijo, S., Hoshino, Y., Miyake, Y., Ishikawa, E., Suzukawa, M., Inoue, H., Tanaka, M., Yoneyama, M., Oh-Hora, M., Akashi, K., and Yamasaki, S. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity* 2014 ; **41** : 402-413.
 - 14) Kanazawa, N., Tashiro, K., Inaba, K., and Miyachi, Y. Dendritic cell immunoactivating receptor, a novel C-type lectin immunoreceptor, acts as an activating receptor through association with Fc receptor gamma chain. *The Journal of biological chemistry* 2003 ; **278** : 32645-32652.
 - 15) Toyonaga, K., Torigoe, S., Motomura, Y., Kamichi, T., Hayashi, J. M., Morita, Y. S., Noguchi, N., Chuma, Y., Kiyohara, H., Matsuo, K., Tanaka, H., Nakagawa, Y., Sakuma, T., Ohmuraya, M., Yamamoto, T., Umemura, M., Matsuzaki, G., Yoshikai, Y., Yano, I., Miyamoto, T., and Yamasaki, S. C-Type Lectin Receptor DCAR Recognizes Mycobacterial Phosphatidyl-Inositol Mannosides to Promote a Th1 Response during Infection. *Immunity* 2016 ; **45** : 1245-1257.