

【アジュバントワークショップ 講演②】

「Cタイプレクチンを介する結核菌アジュバント作用機序」

九州大学生体防御医学研究所分子免疫学生分野教授 山崎晶

石井先生、ご紹介ありがとうございます。

九州大学の山崎でございます。本日はこのような機会を与えていただきまして、どうもありがとうございます。

本日、私は、Cタイプレクチンを介する結核菌アジュバントの作用機序について、最近わかってきたことを幾つかご紹介してまいりたいと思います。

免疫受容体は一般に、獲得免疫受容体、それから自然免疫受容体、大きく2つに分けられます。

このうち、獲得免疫にかかわる受容体はリガンドの質を見分けて、異なった細胞応答を惹起することができるという能力を持つことが知られています。こうした能力を付与すると考えられているのが、細胞内に存在しているチロシンをベースとしたモチーフ、ITAMというモチーフであります。

ところが、近年、Cタイプレクチンの中にも、このITAMを使ってシグナルを伝達するものが幾つか見つかってまいりました。ところが、そのリガンドや機能に関しては、まだまだ不明な点が多くありました。

Mincleはそもそも、マクロファージにinduceされてくるCタイプレクチンとして、99年に審良先生らのグループによって、初めてクローニングされた分子です。実際、モノクロをつくって調べてみますと、確かにLPSを初めとしたさまざまなストレスで、非常に強くinduceされてくることがわかりました。ところが、機能については全くよくわかっておりませんでした。

我々は、このMincleのトランスメンブレンにチャージを持つようなアルギニンが保存されているということを見出したことから、ひょっとすると、これらはITAMを持つようなアダプターと会合するのではないかと考えました。なぜなら、これらはその反対側のネガティブチャージをトランスメンブレンに持っているからであります。

実際、このMincleはFcRγと呼ばれるアダプターと特異的に会合することがわかりました。先ほどのアルギニンをチャージを持たないイソロイシンにかえてやりますと、この会合は全くなくなってしまうことから、確かにこの会合はチャージを介したものであるということも明らかになりました。

そこで、我々はこのMincleの細胞外に対する抗体を幾つかつくりました、このようなリガンドをミミックしたプレートコートの形で、マクロファージを刺激してみました。そうしますと、MIP-2やTNF、IL-6といった炎症性サイトカインが大量に産生されてくるということがわかりました。ところが、これはFc γ ノックアウトマウスでは完全になくなる。ですが、MyD88には依存しないということもわかりました。

このことから、MincleはFc γ とカップルした活性化受容体であり、Toll-like receptorsは使わないということがわかってきたわけであります。

リガンドがまだ全くわかっておりませんでしたので、このリガンドを探していくために、インジケータ細胞を作製してみました。Toll-like receptorsを発現していないような細胞にMincle、Fc γ 、そしてITAM特異的なリポーターとしてNFT-GFTを導入してみました。実際、リガンドをミミックした抗体刺激を行いますと、このようにGFTが強く光って来ることから、リガンド探索に有効ではなかろうかと考えられます。

この細胞を用いて、我々は最近、Mincleが死細胞、いわゆるDAMPsを認識するというところを見出してまいりました。また、相次いで病原性真菌、いわゆるPAMPsであります。こういったものも認識する、そういうレセプターであるということを見出してまいりました。

すなわち、Mincleは自己、非自己、双方に起因する、いわゆる生体の危機というようなものを感知するセンサーではなかろうかということがわかってきたわけであります。

ところが、実際にどのような分子メカニズムでこのリガンド認識が行われているのか、そのリガンドの詳細な分子メカニズムがまだわかっておりませんでしたので調べていたところ、近年、バクテリアのスタディーから幾つかヒントが見つかってきました。

それは結核菌であります。我々はまず、このスメグマティスというLab strain、これをこの細胞にかけてみますと、非常に強くGFTが誘導されることがわかりました。そこで、BCG strain、それから強毒株でありますVirulent strain、H37Rvというものを吉開（泰信）先生より供与いただいて調べたところ、どのstrainでも非常に強くMincleに認識されるということがわかりました。この活性化は、Mincleに対する抗体で、一応きれいにブロックがかかることから、確かにスペシフィックなものであろうと考えら

れます。

では、実際、結核菌はさまざまなコンポーネントを持っていますので、何がリガンドになっているのか、どういうコンポーネントが実際にMincleのリガンドになっているのかということ調べるために、このホールバクテリアをさまざまな溶媒で処理しました。ソリュブルエキストラクトとインソリュブルなフラクション、それぞれのリガンド活性を追跡していくことにしました。

まず、インソリュブルなフラクションに注目しました。非常に興味深いことに、クロロホルム、メタノールという溶媒で処理したときだけ、活性が抜けるということがわかりました。すなわち、このフラクションが怪しいということになります。

ソリュブルなフラクションのほうはプレートにコートして、レポーターアッセイを行うという形で活性を見ていくことにしました。今度はこのフラクションにのみ活性が認められました。このフラクションは、1回目はクロロホルム、メタノール、2回目もクロロホルム、メタノール、すなわちここに相当します。すなわち、活性画分というのは、最も脂溶性のフラクションに抽出されてきたということになるわけです。ということは、何らかのリピッドがリガンドではなかろうかということが強く示唆されます。

そこで、この画分をさらにTLCで分けまして、それらをフラクションーションして、その活性を見てみました。そうしますと、シングルピークはこのあたりに出てきました。ちょうどこれに相当するスポットは、オルシノール染色という糖を検出するようなステイニングで紫色に光ることがわかりましたので、このスポットはシュガーを、何らかの糖を持っている、かつリピッドであると。すなわち、糖脂質であろうということが強く示唆されました。

結核菌が持っている糖脂質の中でRFバリアがこの程度のものということから推測しますに、TDM（トレハロースダイマイコレート）という分子が一つの候補と考えられました。実際、市販のTDMを流してみますと、非常に似たような挙動を示すことから、活性を見てみました。最終的に我々は、TDMがMincleのリガンドであるということを見つけた。

TDMというのはどういう分子かということですが、もともと結核菌特有の、このようなユニークな糖脂質であります。細胞壁の一番外側に存在しておりまして、この長い疎水性のチェーンによって、彼らは我々の体の中でも生存が可能になっているというふうに考えられています。

また、もともと古くからコードファクターと呼ばれる非常に強い免疫賦活剤であることがわかっていました。50年以上前、1955年、当時の山村（雄一）先生が、このBCGのオイルエキストラクトをウサギに投与すると、このような結核特有の空洞ができるということを初めて見出されました。この画分はコードファクターと呼ばれ、後にTDMであるということが明らかになりました。

また、CFAのメジャーなアジュバントコンポーネントとしても知られておりますが、そのレセプターはこれまで知られておりませんでした。Mincleは初めてのレセプターの報告ということになります。

ところが、これまで我々のシステムは、単純にレポーターシステム、レポーター細胞系にのみ依存しておりますので、これが本当に直接のレセプターなのか、あるいは単に抗レセプターなのかということを知るために、Mincle-IGというフュージョンプロテインをつくりまして、バイオケミカルに調べてみました。実際、Mincle-IGはTDMに非常に強くバインドする、こちらはコントロールであります。ということがわかってきました。この会合は、anti-Mincleで確かに抑えられますし、EDTAでも抑えられるということがわかりました。恐らくカルシウムが必要ということだと考えられます。このことはCタイプレクチンのgeneralなdefinitionとも非常によく合います。

ところが、トレハロース単独、これは大量に入れましても、全くブロックしないということもわかりました。このことから、恐らく結合に必須なミニマムなリクワイアメントというのは、トレハロースとこの脂質との間のエステル結合、このあたりまで必要なのであろうということが一つあります。

すなわち、Mincleは直接のレセプターであるということがわかりましたが、それではノックアウトマウスはどうなるかということで、このMincleノックアウトマウスは実は審良先生らのグループは、以前に作製されておりましたので、これを供与いただきましてアッセイをしてみました。

TDMはマクロファージに関してNO産生やiNOS-expression、それからTNF、MIP-2産生といった活性化を促してまいります。ところが、これらはすべて、Mincleノックアウトマウスでは完全に失われるということがわかりました。すなわち、少なくともインビトロにおいては、Mincleはエッセンシャルなレセプターであるということでもあります。

では、インビボではどうかということではありますが、TDMをi. v. しますと、このような全身炎症が起こることが知られています。例えば、Day 1で血中サイトカインがこのように上がってまいります。

ところが、これはMincleノックアウトマウス、またそのレセプターサブユニットでありますFcRγチェーン、これのノックアウトマウスでは全く抑えられるということがわかりました。

また、MyD88では変わらないということから、これまでToll-like receptorsがTDMを認識するのではないかという報告も幾つかありましたが、どうもその可能性は非常に低そうだとすることも示唆されました。

また、TDMをi. v. しますと、Day 7あたりになりますと、このような肺全体に強い炎症が起こってまいります。よく見てみますと、無数のグラニューローマが形成されてきます。もう少し寄ってみますと、このような典型的なグラニューローマができてまいります。

ところが、これはMincleノックアウトマウスでは全く見られないということがわかりました。数を数えてみましても、やはりTDMによるグラニューローマ形成というものは、Mincle、そしてまたそのレセプターサブユニットでありますFcRγチェーンに完全に依存するということがわかりました。

このことから、Mincleはユニークなグラニューローマを形成するようなレセプターということもわかってまいりました。

TDMはこのように非常に強い活性を持ちますけれども、何分非常に長いミコール酸などを持ちますので、なかなか合成していくのは難しい。また、扱いても難しいといった点がありますので、幾つか合成アナログも既につくられています。

そのうちの 하나가、このTDBと呼ばれるミコール酸ではなくて、ベヘン酸という、Cが21個の炭素鎖を持っているこの小さな分子であります。このTDBによる作用も、果たしてMincleを介するのかということ調べてやりました。

このTDBも同様に、マクロファージにおいてTNF産生、それからMIP-2産生というものを促してまいります。これらもやはりMincleノックアウトマウスで完全にとまるということから、TDBもやはりMincleを介して作用しているということがわかりました。

また、TDB以外にも、我々は最近、幾つか異なった骨格の化合物をMincle

c1eリガンドの候補として探しておりました。実際、幾つか全く異なった骨格のリガンドを見出しつつあります。こういった化合物は、また新たなアジュバントの候補にもなり得るのではないかと考えております。

以上から、結核菌と宿主との進化的な攻防というものを少し考えてみたいと思います。

感染に伴って、Minc1eは恐らくTDMを認識して、自然免疫を活性化します。ところが、非常におもしろいことに、京大の杉田（昌彦）先生らのグループは、結核菌は感染に伴って、外側のTDMをGMM（グルコースモノマイコレート）ですが、ちょうどこの半分の大きさです。GMMという糖脂質にコンバートすることを見つけられました。さらにおもしろいことには、我々の免疫系は、このGMMをCD1にプレゼントして、T細胞に提示することができる。そして、獲得免疫を惹起することができるということもわかっています。

そこでクエスチョンとしましては、このコンバージョンというのが、まずMinc1eからのエスケープであるのではないかと考えました。このことを調べるために、結核菌が行っているMycoly1-transfereaseによるコンバージョンというのをインビトロで再現することを試みました。このトレハレースという酵素を使ってやりますと、全く同じプロダクトを得ることができます。

TDMによる活性化というものは、このトレハレース処理によって顕著に傷害を受けるということがわかったことから、このバクテリアにコンバージョンというのは、恐らくはMinc1eからのエスケープであろうということが、非常に強く示唆されました。

ところが、TDMはこれまでも歴史的にも強いアジュバントとして、非常に有名であります。そういうことを考えますと、そのレセプターであるMinc1eというのは、T細胞獲得免疫をプライミングするという、彼らへの対抗策として非常に重要な役割を担っているのではないかと考えまして、現在、この分子メカニズムに注力して調べているところであります。

以上の研究は、我々のグループと阪大の木下（タロウ）先生のグループ、特に森田（康裕）先生、また結核菌に関しては、吉開（泰信）先生のグループ、またFCRγノックアウトマウスは理研の斉藤（隆）先生、Minc1eノックアウトマウスは大阪大学の審良先生に供与いただきました。この場をおかりして、御礼申し上げます。

以上です。どうもありがとうございました。（拍手）