

## 2020 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	<b>病原性抗酸菌による抗原提示抑制機構の解明</b> —スフィンゴ糖脂質代謝網に着目した 抗原提示抑制メカニズム—
キーワード	①抗酸菌、②スフィンゴ脂質代謝、③抗原提示

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ハナフサ ケイ 花房 慶	所属等	順天堂大学 大学院医学研究科 環境医学研究所 ポスト・ドクター
プロフィール	2014 年東海大学工学部生命化学科卒業。在学期間中に同大糖鎖科学研究所にて糖鎖と免疫に関する研究を行った。2019 年東京工業大学生命理工学院 博士後期課程、文部科学省 博士課程教育リーディングプログラム 情報生命博士教育院 (ACLS) を修了。在学期間中に ACLS のプログラムを利用してマサチューセッツ工科大学に短期留学した。2019 年より、順天堂大環境医学研究所において博士研究員として抗原提示細胞における病原性抗酸菌とスフィンゴ脂質の関連性について研究を進めている。その他にもグルコースが結合した脂質の生体内における機能やその生理学的な役割についての研究も進めている。		

### 1. 研究の概要

スフィンゴ脂質代謝網が食食と食胞成熟過程に関与することが明らかとなっている。しかしながら、スフィンゴ脂質代謝産物やその関連酵素が具体的にどのような様にして食胞成熟・抗原提示に関与しているかは不明である。病原性抗酸菌と非病原性抗酸菌では抗原提示細胞であるマクロファージの食胞成熟機構が異なっており、病原性抗酸菌は食胞成熟に必要なタンパク質の局在を阻害するなどして食胞成熟を遅延させる。さらに、病原性抗酸菌はマクロファージの抗原提示を抑制する。ヒト好中球の抗酸菌の食食や食胞成熟には極長鎖脂肪酸鎖を有するラクトシルセラミド (C24-LacCer) が必須である。そこで本研究では、抗酸菌の病原性に着目して、マクロファージの食食・殺菌・抗原提示過程における C24-セラミドを生合成する酵素であるセラミド合成酵素 2 (CerS2) の役割を明らかにすることを旨とした。CerS2 をノックアウトした細胞株を作成して II 型インターフェロンである IFN- $\gamma$  によって増強される食食能を解析した。その結果、CerS2 をノックアウトした細胞株は IFN- $\gamma$  による食食能の増強が起こらなかった。現在、RNA-Seq 解析により CerS2 のノックアウトがマクロファージの食食から抗原提示に関わる遺伝子発現にどのような変化をもたらしているか調べている。今後、解析結果を踏まえて病原性抗酸菌による食胞成熟の阻害について詳細に調べてスフィンゴ脂質代謝網によるマクロファージの食食・殺菌・抗原提示制御機構を明らかにする予定である。

### 2. 研究の動機、目的

結核は世界で死者の最も多い感染症の一つであり、2019 年には 1000 万人の罹患、140 万人の死亡が報告されている。死亡率の高さに影響する多剤耐性結核の拡大が課題となっているなど、結核の世界的なパンデミックは未だ収束していない。一方、非結核性抗酸菌感染症 (NMT 症) が日本において急増しており、日本における女性の NMT 症死者数は結核を上回っている。また、本来環境菌による感染と考えられていた NTM 症がヒト-ヒト感染する変異株も出現し始めている。現在、NTM 症に対する有効な治療法は少なく、新たな治療法の開発が喫緊の課題となっている。

好中球やマクロファージ、樹状細胞のような食食細胞は生体に侵入した微生物を食食して、細胞内に食胞を形成する。菌が内包される食胞は、分解酵素が含まれるリソソームのような細胞内小器官と融合して食胞成熟する過程で、内包した菌を消化・殺菌する。そして、マクロファージや樹状細胞は侵入した異物の情報として消化した菌の断片を CD4 陽性 T 細胞に抗原として提示する。

これまでに病原性抗酸菌のヒト好中球への感染機構における C24-GSL の役割について調べられており、ヒト好中球の細胞膜上では、中性スフィンゴ糖脂質である C24-LacCer が豊富に含まれたドメインが形成され、そのドメインと抗酸菌の細胞壁成分であるリポアラビノマンナン (LAM) が結合することで貪食シグナルを伝えることが明らかとなっている (Nakayama H, *et al.*, *Sci Signal.* 9(449):ra101. 2016)。さらに、病原性抗酸菌特有のマンノースキャップ型 LAM (ManLaM) が食胞膜において LacCer のドメインの再構成を阻止することで食胞成熟を回避して殺菌を逃れる。結核や NMT 症の発症・活動期において殺菌を回避した病原性抗酸菌の好中球のネクロシス誘導が惹起する過剰な炎症応答が病態の増悪に繋がると考えられている。結核菌や病原性抗酸菌はマクロファージや樹状細胞においても、殺菌を回避して細胞内に寄生する。さらに、抗原提示細胞が結核菌や病原性抗酸菌を貪食すると抗原提示が抑制される (Sakai S, *et al.*, *Curr Opin Immunol.* 29:137-42. 2014)。好中球や抗原提示細胞における貪食や食胞成熟にはスフィンゴ脂質の代謝産物がシグナル伝達因子として関与していることが示唆されている。特にセラミドキナーゼ、スフィンゴシンキナーゼによる代謝産物であるセラミド-1-リン酸やスフィンゴシン-1-リン酸は食胞成熟への関与が示され始めている (Custódio R, *et al.* *Mol Microbiol.* 102(6):1004-1019. 2016, Hinkovska-Galcheva V, *et al.* *Biol Chem.* Jul 15;280(28):26612-21. 2005)。

そこで本研究では、病原性抗酸菌と非病原性抗酸菌によってマクロファージの食胞成熟機構が異なることに着目し、スフィンゴ脂質代謝網のどの部分が貪食・殺菌・抗原提示機構に関与するかを明らかにする動機へと繋がった。

### 3. 研究の結果

マクロファージのスフィンゴ脂質の発現パターンを薄層クロマトグラフィーにより調べた結果、C24 脂肪酸鎖を含むスフィンゴ脂質が多いことがわかった。そこで、ヒト単球性白血病細胞株である THP-1 を CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法により、C24-セラミドを生合成する酵素であるセラミド合成酵素 2 (CerS2) をノックアウトした THP-1 (CerS2KOTHP-1) を作成した。

マクロファージは II 型インターフェロンである IFN- $\gamma$  によって活性化され、細菌由来成分の貪食能が増強される。THP-1 を Phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA) によりマクロファージ系に分化誘導させ、さらに IFN- $\gamma$  で活性化した条件で Zymosan を貪食させると、貪食能は IFN- $\gamma$  によって有意に増強される。しかしながら、CerS2KOTHP-1 は IFN- $\gamma$  によって貪食能の活性化が見られなかった。Zymosan は  $\beta$ -グルカンによって構成されており、CD11b や C-type lectin (CTL) である Dectin-1 が受容体として機能する。そのため、THP-1 の細胞表面に発現している受容体をフローサイトメトリーにより解析したところ THP-1 には Dectin-1 のような CTL の発現が認められず、CD11b のみが発現していることがわかった。以上の結果から、THP-1 において Zymosan の貪食は CD11b に依存しており、CerS2 により生合成される C24-スフィンゴ脂質は CD11b 依存的な Zymosan の貪食に関与していることが示唆された。

### 4. 研究者としてのこれからの展望

本研究結果より、スフィンゴ脂質がマクロファージの貪食やその活性化に関わっていることが示唆された。しかしながら、スフィンゴ脂質代謝網と食胞成熟から抗原提示に至る機構の関係性については調べ始めたばかりであり、詳細を明らかにするための研究を今後展開する予定である。また、解析した結果、THP-1 細胞はヒト単球とは受容体の発現パターンが同じではなかったため、ヒト単核球由来マクロファージについても検討を始めており、siRNA を用いた遺伝子干渉法による CerS2 の発現抑制を行うことでヒトマクロファージにおける解析を進めることにしている。ヒト貪食細胞はスフィンゴ脂質を利用した自然免疫応答が発達していることから、本研究課題により得られる結果や、そのための手法開発は、他の感染症の新たな創薬研究に向けたシーズの発見にも活用できると考えられる。研究者として、将来スフィンゴ糖脂質の研究分野の世界で活躍できるようになることや、その成果を基に教育者になることを目指して研究を進めている。

## 5. 社会（寄付者）に対するメッセージ

この度は本研究課題に対して、若手研究者奨励金を授与していただき、誠にありがとうございました。ご理解、ご期待を頂きましたと共に、奨励金を賜りましたことに心より感謝申し上げます。将来的に有効性が想定される多剤耐性を獲得させないような病原性抗酸菌感染症の治療や予防に役立つ成果を上げて社会への還元が一日でも早くできますよう研究を邁進していきたいと存じます。