

「申請研究題目」

結核菌の許容的マクロファージの誘導と持続感染機構の解明

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科感染防御学講座 教授

原 博満

要旨

マクロファージは細胞内寄生菌に対する防御免疫の中心となるが、結核菌はマクロファージ内で増殖し、持続感染する。結核菌は細胞壁に宿主免疫を制御する特有の脂質成分を発現する。高病原性結核菌 W 北京株の病原性因子として知られるフェノール糖脂質 (PGL) は、菌増殖のニッチとなる許容的マクロファージを誘導することで病原性を発揮するとされているが、その分子メカニズムは不明である。我々は PGL を認識するマクロファージ受容体として PGLR を同定した。PGLR は PGL の脂質骨格コアである PDIM を認識し、その欠損により PGLR に応答したマクロファージの MCP-1 産生は完全に消失した。PGLR 欠損マウスを用いた W 北京株感染試験を実施した結果、PGLR 欠損マウスでは結核菌の排除が障害されることを見出した。この結果から、PGLR による PGL 認識が W 北京株に対する防御免疫応答に寄与することが示唆された。そこで、PGLR 欠損が許容的マクロファージをはじめとする感染局所の免疫細胞集団の形成にどのような影響を与えるかを調べるため、感染臓器のシングルセル RNAseq 解析を実施した。

背景・目的

結核は結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) による感染症であり、世界人口の約 1/4 におよぶ 20 億人が結核菌を保有し、毎年 150 万人以上が結核で命を奪われている。マクロファージは、結核菌などの細胞内寄生細菌に対する細胞性免疫の主体となる細胞であるが、結核菌はマクロファージの殺菌を逃れる様々な免疫回避機構を有しており、マクロファージの食胞内をニッチとして増殖し、潜伏・持続感染する。Th1 細胞が産生する IFN $\gamma$  や TNF によるマクロファージの活性化によって食胞内で産生される一酸化窒素 (NO) が、結核菌の封じ込めに重要な役割を演じることが知られているが、結核菌は NO 合成酵素 (iNOS) や炎症性サイトカイン遺伝子の発現が低い「許容的マクロファージ」と呼ばれる特殊なマクロファージを誘導し、その中で潜伏するとされている。しかし、許容的マクロファージの実体に関してはまだ不明な点が多い。

抗酸菌の細胞壁には、宿主免疫を賦活化する脂質 (TDM, GMM, Man-LAM, PIM など) や抑制する脂質 (PGL, SL-1, fMA など) (図 1) が含まれることが知られている。結核菌 W 北京株は世界中でしばしばアウトブレイクを引き起こす高病原性株である。W 北京株の病原性因子として同定されたフェノール糖脂質 (Phenolic glycolipid: PGL) は、菌

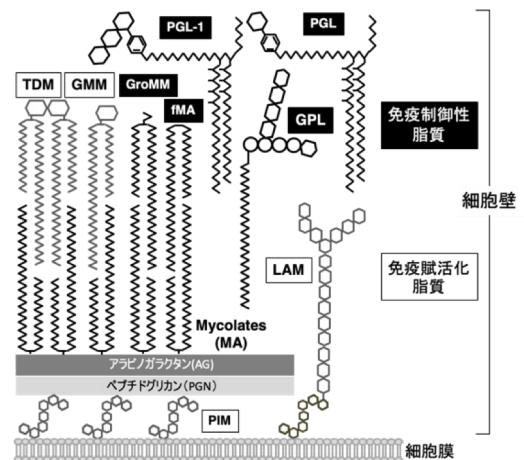
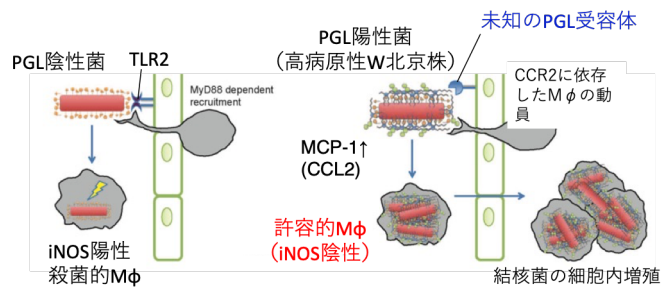


図1 免疫反応を制御する抗酸菌細胞壁の脂質成分  
 TDM, trehalose-di-mycolate; GMM, glucose mono-mycolate; GroMM, glycerol mono-mycolate; fMA, free mycolate; PGL, phenolic glycolipid; PGL, phenolic glycolipid-1; Man-LAM, mannose-capped lipoarabinomannan; GPL, glycopeptidolipids; PIM, phosphatidylinositol mannose

の細胞壁の最表層に発現することで TLR のリガンドをマスクし、これにより iNOS 陽性の殺菌性マクロファージの誘導が抑制され、ケモカイン CCL2 (MCP-1) の産生誘導を介して iNOS 陰性の許容的マクロファージを動員することで病原性を発揮すると報告されている [1] (図 2)。ワシントン大学の Ramakrishnan らのグループは、ゼブラフィッシュの抗酸菌感染系を用いて、PGL による許容的マクロファージの動員が細胞内 DNA センサー STING に依存すると報告した [2]。しかし、STING 本来のリガンドである環状ヌクレオチドと PGL との間に構造相関性は見当たらず、哺乳類の STING が同様な働きを有するかは不明である。

哺乳類の自然免疫を担うマクロファージは、病原体を認識する様々なパターン認識受容体を発現している。Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を介してシグナルを活性化するパターン認識受容体 (CLR、TREM、LIMIR ファミリー受容体など) は、TLR や NLR とは異なるパターンの微生物成分を認識し、自然免疫の活性化や抑制に関わることが明らかになってきている。特にこれらの受容体群は、FcRγ 鎖に会合する C 型レクチン (Mincle、MCL、Dectin-2、DCAR) や、DAP12 に会合する TREM2 など、抗酸菌の細胞壁脂質を認識する受容体が複数同定されている [3, 4]。そこで今回我々は、PGL を認識する ITAM 共役型パターン認識受容体の探索を試みた。



Cambier et al. Nature, 505:218 (2014)より引用。一部改変。

図 2 PGLはMCP-1産生を介して結核菌の増殖ニッチとなる許容的Mφの動員を促す

## 方法

### 受容体の PGL 結合試験

PGL コートした 96-well 平底プレートに、骨髄系細胞が発現する各種 DAP12 会合型受容体の細胞外ドメインと human IgG1 の Fc 領域を融合させた Ig 融合蛋白質 (ITAMR-Ig) を加えてインキュベート、洗浄後、二次抗体 anti-human IgG HRP と TMB 試薬により発色させ、OD450nm にて比色定量を行なった。

### マクロファージの応答解析

野生型 C57BL/6、PGLR-KO、DAP12-KO、FcRγ-KO、STING-KO マウスの骨髄細胞を M-CSF 存在下で 5 日間培養し、骨髄由来マクロファージ (BMDM) を調製した。PGL 産生株である *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 株からクロロフォルム：メタノール (2:1) で処理して総脂質 (BCL-TL) を抽出し、これよりシリカゲルクロマトグラフィーを用いて PGL、PDIM の分画精製を行なった。96-well 平底プレートに BCL-TL、PGL あるいは PDIM をコートし、 $1 \times 10^5$ /well の BMDM を加え、一晚培養を行なった後、培養上清と細胞を回収し、ELISA 法を用いて培養上清中の IL-6、TNF、IL-10、MCP-1 (CCL2) の濃度を測定した。

### 結核菌感染試験

結核菌のマウス感染試験には、*M. tuberculosis* H37Hv (PGL 陰性株) と、*M. tuberculosis* HN878 (PGL 陽性 W 北京株) を使用した。各々の結核菌 500 CFU を経気道感染させ、感染 8 週間後の肺、肝臓、脾臓を採取して CFU の測定を行った。また、北京株 HN878 の感染試験では、感染肺から浸潤細胞を調製し、FCS 解析により免疫細胞集団の解析を行った。

#### シングルセル RNAseq 解析

HN878 感染後 2 ヶ月目の感染肺から調製した CD45 陽性細胞を、10X genomics の GEM-X Flex Gene Expressionm のプロトコールに従って固定、透過処理し、Barcode oligonucleotide 標識 Anti-LAM 抗体で細胞内の結核菌をラベルした。この細胞を二次固定後、KOTAI バイオ社への外注にて GEM 生成、ライブラリー構築、シーケンスデータの取得を行なった。

## 結果

### 1. PGL 刺激はマクロファージの許容的活性化を誘導する

PGL に対するマクロファージの応答性を調べるため、野生型マウスから調製した BMDM を BCG-TL と PGL で刺激し、IL-6、TNF、IL-10、MCP-1 の産生量を調べた。その結果、BCG-TL の刺激では、これら全てのサイトカインの産生が検出された一方、PGL 刺激では MCP-1 の産生のみが検出された。また、PGL 刺激は iNOS 産生を誘導しないことも見出した。従って、PGL による刺激は、許容的マクロファージの特徴をもつ低殺菌性のマクロファージを誘導することが示唆された。

### 2. マクロファージの PGL 受容体の同定

ITAM 共役型受容体が、PGL 刺激によるマクロファージの MCP-1 産生に関与するかを調べるため、ITAM 含有アダプターである DAP12、FcR $\gamma$  を欠損した BMDM を用いて、その応答性を調べた。その結果、FcR $\gamma$  欠損は PGL 刺激後の MCP-1 応答性に全く影響を与えなかったが、DAP12 欠損はこの応答をほぼ完全に消失させることが明らかとなった。このデータから、DAP12 に会合する受容体が PGL を認識すると考え、マクロファージに発現が報告されている 9 種類の DAP12 会合型受容

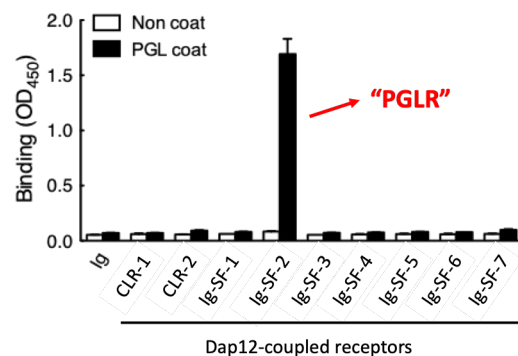


図3 PGLに結合するDAP12会合型受容体のスクリーニング

体の細胞外ドメインと、ヒト IgG1 の Fc 領域のリコンビナントとの融合蛋白を作成し、ELISA 法を用いて PGL に対する結合性を調べた。その結果、Ig スーパーファミリーに属する一つの受容体が PGL に強い結合性を示すことを見出した (図3)。以下、この受容体を PGLR と称する。我々は、市販の抗 PGLR 抗体を用いることで、マウスの BMDM やチオグリコレート誘導マクロファージの細胞表面に PGLR が発現することを確認し、この発現が DAP12 欠損マクロファージでは完全に消失することを見出した。

そこで、PGLR が PGL に対するマクロファージ応答に実際に寄与するかを調べるため、PGLR 欠損マウスを作成し、このマウスから調製した BMDM の応答性を野生型および DAP12 欠損マウス由来のものと比較した。その結果、PGL 欠損 BMDM は、DAP12 欠損 BMDM と同様に、PGL 刺激後の MCP-

1 産生がほぼ完全に消失することを見出した (図 4 a)。

PGL は一部の抗酸菌種が特異的に産生する脂質であり、共通の脂質コア構造である Phthiocerol dimycocerosate (PDIM) の末端に、フェノールリングと種特異的な糖鎖構造が付加された構造を有する (図 5)。最近、大阪大学の石塚らのグループは、FcRγ 会合性の C 型レクチン Mincle が、らい菌細胞壁に存在する希少脂質である PGL-III を認識することを見出した。Mincle は PGL-III の脂質コアと末端糖鎖構造の両方を認識することで受容体同士を架橋し、強いマクロファージ活性化を誘導する[5]。そこで我々

は、PGLR による PGL の認識に糖部分が必要であるかを調べるため、PGL の脂質部分を構成する PDIM に対するマクロファージ応答と、その PGLR 依存性を検証した。その結果、PDIM による刺激は、PGL と同様に、TNF や IL-6 などの炎症性サイトカイン産生をマクロファージに誘導せず、MCP-1 産生のみを誘導することを見出した。さらに、この MCP-1 産生応答は PGLR 欠損によってほぼ完全に消失した。このデータより、PGLR は PGL の脂質コア部分 (PDIM) を認識することが示唆された (図 4 b)。

「背景・目的」に示したように、Ramakrishnan らのグループは、ゼブラフィッシュの抗酸菌感染系を用いた研究により、PGL による許容的マクロファージの動員が細胞内 DNA センサー STING に依存すると報告している[2]。そこで、哺乳類のマクロファージの PGL 応答が STING に依存するかを調べるため、STING 欠損マウスより BMDM を調製し、PGL 応答性を野生型および PGLR 欠損マウス由来のものと比較した。その結果、STING 欠損は PGL 刺激後の MCP-1 産生に全く影響しないことがわかった。従って、哺乳類のマクロファージでは、PGLR が PGL に対する応答を担うことが示唆された。

### 3. PGLR 欠損は PGL 陽性結核菌の排除を障害する

PGLR の結核感染防御における役割を解析するため、PGL 陽性高病原性結核菌である W 北京株 (*M. tuberculosis* H878) を用いたマウス結核菌感染試験を実施した。野生型マウス、PGLR 欠損マウスに H878 (500 CFU) を経気道感染し、感染 4 週間後、8 週間後における、脾臓、肺の CFU を測定した。感染試験は 2 回実施し、その結果、1 回目の感染試験では感染 8 週後の肺において有意に PGLR 欠損マウスで CFU の上昇が観察された (図 6)。2 回目の感染試験においては、肺における CFU に有意差は見出せなかったが、脾臓における CFU が PGLR 欠損マウスで有意に上昇した。感染肺に浸潤する免疫細胞の FCM 解析を行なったところ、1 回目、2 回目の感染試験のどちらにおいても、PGLR 欠損マウスにおいて浸潤細胞の増加傾向が観察された。

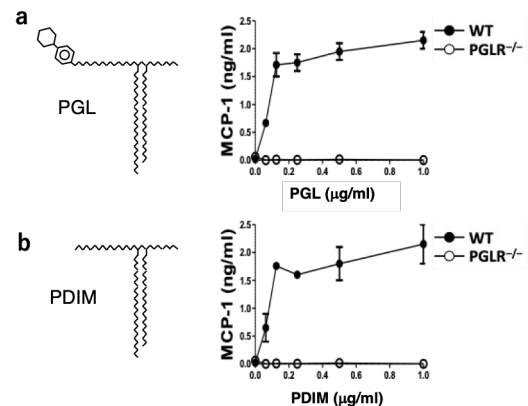


図 4 PGLRはPGLのPDIM脂質コアを認識する

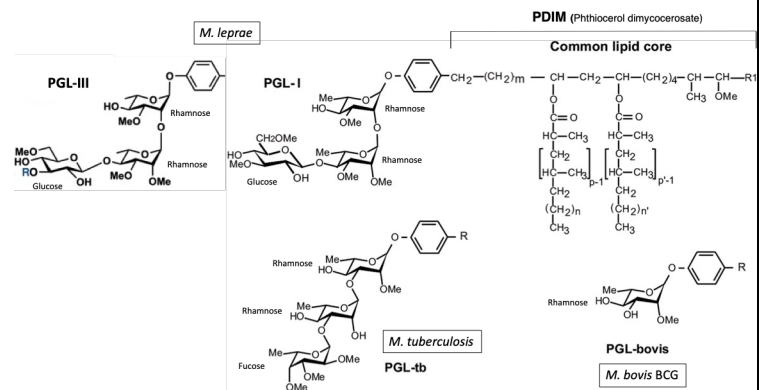


図 5 抗酸菌PGLの構造 (Diaz Acosta et al. PLoS Pathog 14(7), 2018を改変)

次に、PGLR 欠損の結核防御への影響が、菌の PGL 発現と関連するかを調べるため、PGL 陰性株である *M. tuberculosis* H37Rv を用いて同様に感染試験を実施し、感染 8 週後の肺、脾臓、肝臓の CFU を測定した。その結果、いずれの感染臓器においても、野生型マウスと PGL 欠損マウスとの間で CFU に有意な差を見出すことはできなかった。

以上の結果から、PGLR は PGL 陽性結核菌の防御的免疫応答を促進することが示唆された。そこで、PGLR 欠損が、結核感染局所における許容的マクロファージの分化や免疫細胞集団の構成にどの様に影響するかを調べるため、我々は

H878 感染 8 週後の肺に浸潤する免疫細胞のシングルセル RNAseq 解析を試みた。まず我々は、許容的マクロファージの実体を捉えるため、細胞内に潜伏感染する結核菌を scRNAseq で検出・定量する方法を検討した。10X genomics 社が提供する GEM-X Flex Gene Expression は、固定した細胞の細胞内蛋白を Barcode oligonucleotide 標識抗体で標識し、その発現量を scRNAseq 解析で定量できるように設計されたシステムである。我々は、マクロファージのエンドソーム内に潜伏する結核菌を検出可能な抗体があれば、このシステムを用いて一細胞内の結核菌量を定量可能であると考えた。そこで、結核菌の細胞表面抗原を認識するいくつかの市販の抗体を探索した結果、抗酸菌に特異的な細胞壁脂質であるリポアラビノマンナン (LAM) を認識する抗体を用いることで、固定したマクロファージ細胞内の結核菌を検出可能であることを見出した。北京株 HN878 感染後 8 週目の野生型および TREM2 欠損マウスから CD45 陽性細胞を単離し、Barcode oligonucleotide 標識 Anti-LAM 抗体を用いて細胞内の結核菌を染色した後、シングルセル RNA シーケンス解析を実施した。現在、このデータの詳細な解析を進めている。

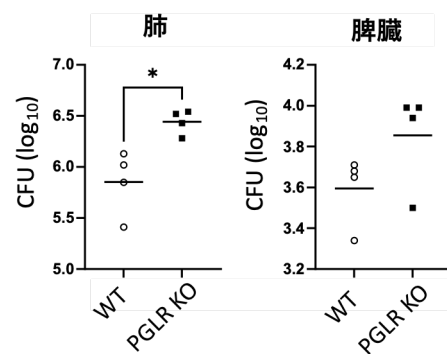


図 6 PGLR 欠損は結核菌 W 北京株の排除を障害する

## 考察

我々は今回、結核菌 W 北京株の PGL を認識する宿主受容体の探索を行い、DAP12 会合型の ITAM 共役型受容体である PGLR を同定した。PGL による感染局所への許容的マクロファージの誘導には、MCP-1 産生が必要と報告されている[1]。我々は、PGL によって活性化したマクロファージは、炎症性サイトカインや NO を産生せず、MCP-1 のみを産生するという「許容的マクロファージ」の特徴を示し、さらに、この MCP-1 産生が PGLR に依存することを見出した。PGLR のシグナルを媒介する DAP12 の欠損は、結核菌や排除が促進されるとの過去報告があることから[6]、我々は、PGL による PGLR-DAP12 シグナルの活性化が、許容的マクロファージの誘導を介して PGL の病原性を媒介するとの仮説を立てた。この仮説が正しければ、PGLR の欠損は、マウス感染試験において W 北京株の排除を促進すると予測した。しかし、予想に反して、感染試験では PGLR 欠損により菌の排除が障害されるという逆の結果を得ることに至った。すなわち、PGLR-DAP12 シグナルの活性化は、むしろ W 北京株の排除免疫応答を促進することが示唆された。PGLR 欠損マウスでは、感染局所における浸潤細胞の増加が見られたことから、PGLR は過剰な炎症を抑制することで結核菌の排除を促す可能性が考えられたが、詳細なメカニズムは不明である。今後、現在進行中の scRNAseq 解析などにより、その原因を究明する。また、今回の感染試験では、肺に浸潤する免疫細胞の解析のみを行なったが、脾臓においても有意に菌数の増加が見られたことから、他の臓器の免疫細胞集団の解析も必要であると考えられる。

本研究では、BCG 菌から調製した PGL (PGL-bovis) を用いて、マクロファージの活性化能、PGLR

の同定および機能解析を行った。しかし、実際に W 北京株が産生する PGL (PGL-tb) と PGL-bovis は末端の糖鎖構造が異なっており (図 5)、異なる生理活性や異なる宿主受容体によって認識される可能性もまだ残されている。そのため、PGL-tb を用いて本実験と同様の検討を実施する必要があると考える。

今回のマウス感染試験では、感染 1 ヶ月と 2 ヶ月の感染臓器の解析を実施し、PGLR 欠損マウスは感染後 1 ヶ月目の臓器菌数は野生型コントロールマウスと同等であったが、2 ヶ月目の臓器において有意な増加を認めた。我々は、PGLR の刺激がマクロファージの生存を促すことを見出していることから、PGLR が結核菌の感染持続性に関与する可能性を考えている。そのため、さらなる長期間の感染臓器のモニタリングや、休眠モデルの実施なども今後検討していく必要があると考える。

結核菌は世界の公衆衛生の最大の懸念の一つである。成人肺結核に有効なワクチンは未だ存在せず、高多剤耐性菌の出現も問題になっており、新たなコンセプトでの抗結核薬やワクチンの開発が求められている。そのためには、結核菌と宿主免疫の相互作用のメカニズムを理解することは不可欠である。本研究は、実際にアウトブレイクを引き起こした高病原性結核菌に着目し、その病原性因子の宿主自然免疫による認識と活性化について探究したものであり、これによって得られる知見は、結核攻略の新たな理論的基盤になると考える。

## 共同研究者

阿戸学	国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター
宮本友司	国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター
梅村正幸	琉球大学 熱帯生物圏研究センター
笠松純	鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科免疫学分野
飯笹英一	鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科心身内科学分野
豊永憲司	福岡歯科大学 口腔歯学部機能生物化学講座感染生物学分野
中岡博史	鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科データサイエンス分野

## 引用論文

- [1] Cambier CJ, Takaki KK, Larson RP, Hernandez RE, Tobin DM, Urdahl KB, Cosma CL, Ramakrishnan L. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature*. 2014. 505:218-222.
- [2] Cambier CJ, O'Leary SM, O'Sullivan MP, Keane J, Ramakrishnan. Phenolic Glycolipid Facilitates Mycobacterial Escape from Microbicidal Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*. 2017. 47:552-565.
- [3] Reis e Sousa C, Yamasaki S, Brown GD. Myeloid C-type lectin receptors in innate immune recognition. *Immunity*. 2024. 57:700-717.
- [4] Iizasa E, Chuma Y, Uematsu T, Kubota M, Kawaguchi H, Umemura M, Toyonaga K, Kiyohara H, Yano I, Colonna M, Sugita M, Matsuzaki G, Yamasaki S, Yoshida H, Hara H. TREM2 is a receptor for non-glycosylated mycolic acids of mycobacteria that limits anti-mycobacterial macrophage activation. *Nat Commun*. 2021. 12:2299.
- [5] Ishizuka S, van Dijk JHM, Kawakita T, Miyamoto Y, Maeda Y, Goto M, et al. PGL-III, a Rare Intermediate of Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid Biosynthesis, Is a Potent Mincle Ligand.

ACS Cent Sci. 2023. 9:1388–99.

[6] Jeyanathan M, McCormick S, Lai R, Afkhami S, Shaler CR, Horvath CN, Damjanovic D, Zganiacz A, Barra N, Ashkar A, Jordana M, Aoki N, Xing Z. Pulmonary M. tuberculosis infection delays Th1 immunity via immunoadaptor DAP12-regulated IRAK-M and IL-10 expression in antigen-presenting cells. *Mucosal Immunol.* 2014. 7:670-83.

#### 助成研究に関連した発表論文

1. 原博満：結核菌による宿主自然免疫応答の制御 *生化学* 95(5):1-5 (2023).