

DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF CELL REGULATION

The universe of antigens recognized by T lymphocytes has recently been expanded to include not only protein antigens but also lipid antigens. Unlike conventional MHC molecules that present protein-derived peptide antigens, molecules of the human group 1 CD1 family (CD1a, CD1b, CD1c) mediate presentation of lipid antigens to specific T lymphocytes. By taking lipid chemical and immunological approaches and by developing appropriate animal models, we aim at determining how CD1 functions crucially in host defense against microbial infection (mycobacteria and retroviruses). Further, inappropriate immune responses to lipids may result in induction of allergy (contact dermatitis) and autoimmune diseases (Guillain-Barre syndrome). These critical aspects of the newly appreciated lipid-specific immunity have now been addressed in our laboratory.

- 1) Adaptive regulation of glycolipid biosynthesis and its recognition by the host immunity: I. MATSUNAGA, T. NAKA¹, R.S. TALEKAR², M.J. McCONNELL², K. KATOH, H. NAKAO, A. OTSUKA, S.M. BEHAR², I. YANO¹, D.B. MOODY² and M. SUGITA**
(¹Japan BCG Laboratory, ²Harvard Medical School.)

Trehalose dimycolate (TDM), also known as cord factor, is a major surface glycolipid of the cell wall of mycobacteria. Because of its potent biological functions in models of infection, adjuvancy, and immunotherapy, it is important to determine how its biosynthesis is regulated. We have shown that glucose, a host-derived product that is not readily available in the environment, causes *Mycobacterium avium* to down-regulate TDM expression while up-regulating production of another major glycolipid with immunological roles in CD1b-restricted T cell activation, glucose monomycolate (GMM). *In vitro*, the mechanism of reciprocal regulation of TDM and GMM involves competitive substrate selection by antigen 85A, a mycolyltransferase encoded by the *fbpA* gene. The switch from TDM to GMM biosynthesis occurs near the physiological concentration of glucose present in mammalian host. We have further demonstrated that GMM is produced *in vivo* by mycobacteria growing in mouse lung. These results establish an enzymatic pathway for GMM production. More generally, these observations provide a specific enzymatic mechanism for dynamic alterations of cell wall glycolipid remodeling in response to the transition from non-cellular to cellular growth environments, including factors that are monitored by the host immune system. (*J. Biol. Chem.* 283: 28835, 2008)

- 2) A novel form of delayed-type hypersensitivity to glycolipids induced by mycobacterial infection: A. OTSUKA, I. MATSUNAGA, T. KOMORI, K. TOMITA, Y. TODA¹, T.**

MANABE¹, Y. MIYACHI¹ and M. SUGITA (¹Graduate School of Medicine, Kyoto University)

Delayed-type hypersensitivity represents high levels of protein antigen-specific adaptive immunity induced by mycobacterial infection, and can be monitored in the antigen-challenged skin. Besides proteins antigens, recent evidence has suggested that a substantial immunity directed against glycolipid antigens is also elicited in response to mycobacterial infection, but skin hypersensitivity to this class of antigens has not been fully assessed. To address this issue directly, glycolipid-specific skin reactions were evaluated in guinea pigs infected with *Mycobacterium avium* complex (MAC). Significant skin indurations were observed in MAC-infected, but not mock-infected, guinea pigs, following intradermal administration of a mixture of MAC-derived glycolipids. Surprisingly, this glycolipid-specific skin response involved up-regulated expression of IL-5 mRNA *in situ* and marked local infiltration of eosinophils. Challenge experiments with individual glycolipid components detected an outstanding capability for trehalose dimycolate (TDM), but not a structurally related glycolipid, glucose monomycolate, to elicit the skin response. T lymphocytes derived from the spleen of MAC-infected, but not uninfected, guinea pigs specifically responded to TDM *in vitro* by up-regulating IL-5 transcription, and this response was not blocked by antibodies that reacted to the known guinea pig group 1 CD1 proteins. Finally, the eosinophilic skin hypersensitivity to TDM was also elicited in guinea pigs vaccinated with bacillus Calmette-Guerin (BCG), which contrasted sharply with the classical delayed-type hypersensitivity response to the purified protein derivative (PPD) detected in the tuberculin skin test. Therefore, the TDM-elicited eosinophilic response defines a new form of hypersensitivity in mycobacterial infection, which may account for local infiltration of eosinophils often observed at the site of infection. (*J. Immunol.* 181: 8528, 2008)

3) Antibody responses to the biosynthetic precursor of glycopeptidolipids in *Mycobacterium avium* infection: I. MATSUNAGA, T. KOMORI, A. OCHI, N. MORI¹ and M. SUGITA (¹Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

Glycopeptidolipids (GPLs) comprise a major surface glycolipid of *Mycobacterium avium* complex (MAC), and their unique oligosaccharide extensions are known to define MAC serotypes. Besides the mature form of “serotype-specific” GPLs (ssGPLs), biosynthetic GPL precursors that share the backbone structure but lack the oligosaccharide extensions exist as abundantly in all MAC serotypes, but the presumption was that antibody responses might not be directed to these “serotype-nonspecific” GPLs (nsGPLs) due to the lack of the sugar chain epitope. We have now showed that IgG responses to nsGPLs indeed occur in MAC-infected guinea pigs. The pool of anti-nsGPL antibodies was distinct from that of anti-ssGPL antibodies in terms of requirements for

the oligosaccharide and acetylation for their target recognition. Because nsGPLs are shared in virtually all MAC strains, but totally absent in *Mycobacterium tuberculosis*, this study suggests that detecting serum anti-nsGPL antibodies can potentially be useful for differential diagnosis of MAC infection and tuberculosis. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 165, 2008)

4) Allergic contact dermatitis with mite-derived lipids: N. MORI¹, I. MATSUNAGA, A. OTSUKA, D. MORITA and M. SUGITA (¹Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

It is clear that lipid-specific immune responses are a critical component for efficient host defense. On the other hand, undesirable immune responses to lipids may result in tissue damage and autoimmunity. In collaboration with Dr. Naoki Mori, who previously identified α -acaridial [2(E)-(4-methyl-3-pentenyl)butendial] as a female sex pheromone from the house dust mite *Tyrophagus putrescentiae*, we addressed the possibility that this mite-derived lipid might function as a haptenic allergen that induced allergic contact dermatitis. Mice sensitized with α -acaridial were challenged by the same antigen on the ear skin. After 2 days, significant ear swelling with a prominent infiltration of CD4⁺ T lymphocytes was observed. *In vitro*, α -acaridial exhibited an outstanding ability to quickly interact with and chemically modify a reference protein. Virtually all cysteine residues and a sizable fraction of lysine residues were found to be selectively modified, suggesting that α -acaridial could potentially interact with any proteins. Previously, numerous mite-derived proteinaceous allergens have been associated with contact dermatitis. This study now emphasizes that small lipidic compounds released from mites comprise a new class of mite allergens, and therefore, is of significant medical implications. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375: 336, 2008)

5) Guillain-Barre syndrome-associated IgG responses to gangliosides: Y. MATSUMOTO¹, N. YUKI¹ and M. SUGITA (¹Dokkyo Medical University School of Medicine)

CD1 molecules present a variety of microbial glycolipids and self-glycolipids to T cells, but their potential role in humoral responses to glycolipid antigens remains to be established. To address this issue directly, we used GM1/GD1a-deficient mice, which, upon immunization with heat-killed *Campylobacter jejuni*, develop Guillain-Barre syndrome-associated IgG antibodies against the GM1/GD1a sugar chain epitopes of bacterial lipo-oligosaccharides (LOS). We showed that anti-ganglioside antibodies of the IgG1, IgG2b, and IgG3 isotypes were produced in the absence of human group 2 CD1 (CD1d) expression. Unlike mouse and human group 2 CD1 molecules that specifically bound LOS, none of the group 1 CD1 molecules were capable of interacting with LOS. Thus, these observations indicated CD1-independent pathways for

anti-ganglioside antibody production. (*J. Immunol.* 180: 39-43, 2008)

6) Genes, proteins and function of monkey group 1 CD1: D. MORITA, K. KATOH, I. MATSUNAGA, T. MIURA¹, T. IGARASHI¹ and M. SUGITA (¹Laboratory of Primate Model, IVR)

Despite crucial importance of non-human primates as a model of human infectious diseases, group 1 CD1 genes and proteins have been poorly characterized in these species. We have now isolated *CD1A*, *CD1B*, and *CD1C* cDNAs from rhesus macaque lymph nodes that encoded full-length CD1 proteins recognized specifically by monoclonal antibodies to human CD1a, CD1b, and CD1c molecules, respectively. The monkey group 1 CD1 isoforms contained amino acid residues and motifs known to be critical for intramolecular disulfide bond formation, N-linked glycosylation, and endosomal trafficking as in human group 1 CD1 molecules. Notably, monkey CD1b molecules were capable of presenting a mycobacterial glycolipid to human CD1b-restricted T cells, providing direct evidence for their antigen presentation function. This also detects for the first time a trans-species crossreaction mediated by group 1 CD1 molecules. Taken together, these results underscore substantial conservation of the group 1 CD1 system between humans and rhesus macaque monkeys. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 889, 2008)

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Viral Oncology

Laboratory of Cell Regulation

- Matsumoto Y, Yuki N, Van Kaer L, Furukawa K, Hirata K, Sugita M. Guillain-Barre syndrome-associated IgG responses to gangliosides are generated independently of CD1 function in mice. *J. Immunol.* 180: 39-43, 2008.
- Sasai T, Hirano Y, Maeda S, Matsunaga I, Otsuka A, Morita D, Nishida R, Nakayama H, Kuwahara Y, Sugita M, Mori N. Induction of allergic contact dermatitis by astigmatid mite-derived monoterpene, α -acaridial. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375: 336-340, 2008.
- Hava DL, van der Wel N, Cohen N, Dascher CC, Houben D, Leon L, Agarwal S, Sugita M, van Zon M, Kent SC, Shams H, Peters PJ, Brenner MB. Evasion of peptide, but not lipid antigen presentation, through pathogen-induced dendritic cell maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 11281-11286, 2008.
- Matsunaga I, Naka T, Talekar RS, McConnell MJ, Katoh K, Nakao H, Otsuka A, Behar SM, Yano I, Moody DB, Sugita M. Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 283: 28835-28841, 2008.

- Matsunaga I, Komori T, Ochi A, Mori N, Sugita M. Identification of antibody responses to the serotype-nonspecific molecular species of glycopeptidolipids in *Mycobacterium avium* infection. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 377: 165-169, 2008.
- Morita D, Katoh K, Harada T, Nakagawa Y, Matsunaga I, Miura T, Adachi A, Igarashi T, Sugita M. Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 377: 889-893, 2008.
- Otsuka A, Matsunaga I, Komori T, Tomita K, Toda Y, Manabe T, Miyachi Y, Sugita M. Trehalose dimycolate elicits eosinophilic skin hypersensitivity in mycobacteria-infected guinea pigs. *J. Immunol.* 181: 8528-8533, 2008.
-

- 大塚篤司、松永勇、小森崇矢、富田和沙、戸田好信、真鍋俊明、宮地良樹、杉田昌彦
Eosinophilic DTH：脂質を標的とした新しい皮膚アレルギー応答 第 11 回京都免疫ワークショップ 京都 平成 20 年 3 月 22 日
- Otsuka A, Matsunaga I, Komori T, Tomita K, Toda Y, Manabe T, Miyachi Y, Sugita M. :
Eosinophilic skin reactions to glycolipids in mycobacterial infection represent a novel form of delayed-type hypersensitivity. *The International Investigative Dermatology* 2008. Kyoto, May 17-19, 2008.
- Sugita M. : Eosinophilic skin hypersensitivity to glycolipids in mycobacteria-infected guinea pigs. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference. Baltimore, USA, July 8-10, 2008.
- Otsuka A, Matsunaga I, Miyachi Y, Sugita M. : Eosinophilic skin reactions to glycolipids define a novel form of hypersensitivity in mycobacterial infection. 第 38 回日本免疫学会総会 京都 平成 20 年 12 月 1-3 日
- 松永勇、中崇、加藤久美子、中尾瞳、大塚篤司、矢野郁也、杉田昌彦：ミコール酸転移酵素による脂質 T 細胞抗原の生合成 第 81 回日本生化学会総会 神戸 平成 20 年 12 月 9-12 日

脂質生化学と免疫学の有機的連携をもとに、「脂質免疫」という新しい生体応答システムの全容解明を目指した研究を展開している。松永勇助教とともにセットアップを進めてきた新しい研究室は早4年が経過し、新たな研究の取り組みもようやくその方向性を見だしつつある。その過程で所属学生も大きく成長し、第一期生の森田大輔君（D1）、第二期生の小森崇矢君（D2、編入学）を中心に、研究室を引っ張ってくれている。第二期生の修士2年、加藤久美子さん、時岡温子さん、中尾瞳さんもそれぞれに独自の研究を展開し、論文投稿あるいは投稿準備の段階にあることは、頼もしい限りである。さらに、サル免疫研究の観点から当研究所霊長類モデル研究領域の五十嵐教授、三浦准教授と、また有機合成や構造解析の観点から農学研究科の森准教授と close かつ productive な共同研究をさせていただき、多くの新しいことを学ぶ機会に恵まれたことは、大変意義深いことであった。

生体内環境に適応した抗酸菌糖脂質代謝と免疫認識

結核菌細胞壁表層を構築する糖脂質群は宿主環境との接点に存在することから、宿主との相互作用の結果としてダイナミックに変容し、感染病態の形成に深く関わると考えられる。細胞内寄生細菌として年余にわたり宿主環境に暴露されるがゆえに、人工培地で培養した結核菌では解明し得ない糖脂質代謝とそれに対する宿主応答の存在が想定される。私たちは、通常の人工培地に比して生体内環境では高濃度のグルコースが存在することに着目し、グルコース依存的に誘起されるミコール酸含有糖脂質の変化を追究した。その結果、生体内組織や生体内環境を模倣した人工培地で増殖した菌では、自然免疫刺激活性の強いトレハロースジミコール酸（TDM）が活性の弱いグルコースモノミコール酸（GMM）に置換され、宿主自然免疫系の活性化を抑制していることを見いだした。さらにこの置換反応は、宿主由来のグルコースを基質としたミコール酸転移酵素の触媒作用によることを実証した。一方、感染に伴い新たに生成された GMM は宿主マクロファージや樹状細胞が発現する CD1b 分子を介して T 細胞に提示され、宿主獲得免疫系の標的となることを示した。これらの観察は、宿主免疫系と結核菌が、相互のインターアクションを通して互いを磨いてきたことを示唆している。（*J. Biol. Chem.* 283: 28835, 2008）

脂質を標的とした遅延型アレルギー応答の発見

抗酸菌感染に伴って惹起されるタンパク質抗原特異的遅延型アレルギー反応（DTH）は、感染病態の形成に深く関わっており、臨床的にはツベルクリン反応として検出される。これは Th1 細胞を主体とした応答であり、抗原接種皮膚局所への単核球の浸潤を特徴とする。一方、脂質に対する DTH

の存在はこれまで知られていなかった。*Mycobacterium avium* complex (MAC) や *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) に感染したモルモットの皮膚に脂質を接種すると、2 日目をピークとした典型的な時間経過で DTH が観察された。しかし驚いたことに、この応答は Th2 優位であり組織学的には好酸球を主体とした炎症反応であった。脂質生化学的手法を駆使して脂質の分画を進め、活性のあるフラクションを解析した結果、この DTH 応答の標的脂質は抗酸菌の病原性とも深く関連した細胞壁糖脂質である TDM (上記参照) であることが判った。私たちは、TDM によって惹起されるこの DTH 応答を、eosinophilic DTH と呼ぶことを提案している。感染の成立とともに菌が TDM から GMM への置換反応を促進する理由のひとつは、この eosinophilic DTH を抑制するためと考えられる。(J. Immunol. 181: 8528, 2008)

非結核性抗酸菌特異的脂質に対する新たな液性免疫応答の実証

M. avium の血清型を決定する糖鎖エピトープを欠如したグリコペプチドリピド (血清型非特異的グリコペプチドリピド) は、液性免疫の標的とはならないと考えられてきた。これに対して私たちは、*M. avium* 感染モルモットを用い、この分子種に対する抗体応答を初めて見いだすとともに、そのエピトープを明らかにした。この応答はマウスでは認められないが、ヒトでは検出することが可能である。血清型非特異的グリコペプチドリピドは、すべての血清型の *M. avium* に存在するが結核菌や BCG には存在しないことから、これに対する抗体の実証は、臨床的に重要な *M. avium* 感染症と結核の鑑別診断に有用であると考えられ、臨床研究の展開が期待される。(Biochem. Biophys. Res. Commun. 377: 165, 2008)

ダニ由来脂質によって惹起される接触皮膚炎

共同研究者の森直樹博士 (京大農学研究科) は、ダニ由来の性フェロモンとして α -acaridial を同定した。私たちは、その構造的特徴から、この脂質分子が接触皮膚炎のアレルゲンとして機能するのではないかと考え、その検証を進めた。その結果、感作個体において α -acaridial による特異的皮膚アレルギー反応が誘起できることを、詳細な生化学的データとともに示すことができた。これは、接触性皮膚炎の原因となるダニ由来アレルゲンのうち、非タンパク質抗原として初めて同定されたものである。(Biochem. Biophys. Res. Commun. 375: 336, 2008)

ギランバレー症候群における抗糖脂質抗体産生機序

CD1 分子が糖脂質を標的とした T 細胞応答において重要な役割を果たすことは明らかであるが、糖脂質に対する液性免疫応答にどのように関与するのかは不明である。そこで私たちは、ギランバレー症候群において誘導される抗ガングリオシド抗体に着目し、獨協医科大学、結城伸泰博士、松本幸恵博士とともに、CD1 分子の関与を検証した。*Campylobacter jejuni* の菌体に存在する

lipo-oligosaccharide (LOS)は自己糖脂質である GM1 や GD1a ガングリオシドと糖鎖構造を共有している。したがって、*C. jejuni* 感染に伴って産生される抗 LOS 抗体は神経細胞に発現した GM1/GD1a ガングリオシドと交差反応を示すことにより補体依存性の神経障害が惹起され、ギランバレー症候群を誘発する。私たちは LOS が CD1d 分子と結合することを見出した。しかしながら CD1d ノックアウトマウスにおいても、抗 LOS 抗体の産生は検出されたことから、CD1d 拘束性 NKT 細胞がこの液性免疫応答に関与する可能性は否定的であった。詳細な機序は未だ不明であるが、NK 細胞の関与の可能性も示唆された (*J. Immunol.* 180: 39-43, 2008)。

サルグループ 1CD1 システムの解明

サルはヒト感染症のモデル動物として注目されているが、CD1 依存性脂質免疫応答システムの詳細は不明であった。そこで私たちは、霊長類モデル研究領域の五十嵐教授、三浦准教授との共同研究を展開し、サルグループ 1CD1 遺伝子 (*CD1A*、*CD1B*、*CD1C* cDNA) を単離・同定するとともに、遺伝子産物の発現と機能の解析を行った。その結果、サルグループ 1CD1 システムは、多くの重要な点でヒトと酷似していることが明らかとなった。さらに、サル CD1b 分子は、ヒト T 細胞への抗原提示が可能であることが示され、種を越えたグループ 1CD1 機能が初めて実証された。今後、レトロウイルス感染サルにおける CD1 依存性免疫応答の研究を進めていく予定である。 (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 889, 2008)