

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870334

研究課題名（和文）細菌感染により壊れた抗体を認識する新規活性化レセプターの機能と多様性

研究課題名（英文）Functional and genetic diversity of the activating receptor to recognize microbially cleaved antibody

研究代表者

平安 恒幸（Hirayasu, Kohyuki）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教（常勤）

研究者番号：30585170

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、免疫レセプターと様々な病原体との相互作用を網羅的に調べた。その結果、活性化レセプターLILRA2が病原微生物によって破壊された抗体を認識し病原微生物に対して生体防御を行っていることが明らかとなった。この結果から、病原微生物は宿主の免疫から逃れるために様々な免疫逃避機構を進化させてきた一方で、宿主側は病原微生物による免疫逃避機構を検出し、生体防御に働くように進化して病原微生物に対抗してきたことが考えられる。

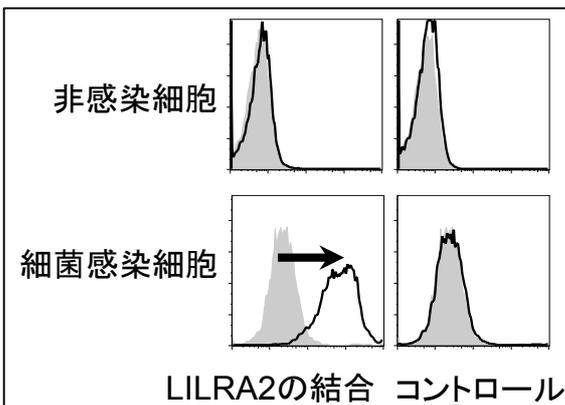
研究成果の概要（英文）：In this study, a comprehensive search for interaction between pathogens and host immune receptors was performed. In this process, it was found that microbial pathogens have evolved to acquire antibody-cleaving proteases in order to escape from the host immune system of antibody recognition. Moreover, it was also found that an orphan activating immune receptor, LILRA2, recognizes these microbially disrupted antibody in order to counteract the microbial immune evasion strategy.

研究分野：免疫遺伝学

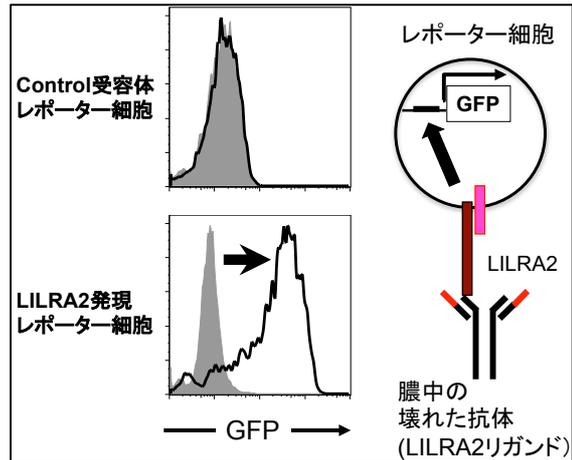
キーワード：細菌感染 Bacteria Immunoglobulin 活性化レセプター プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

未だに感染症は人類にとって脅威でありながら、病原体の感染メカニズムや感染症の重症化要因についてはほとんどわかっていない。その要因として、ヒトに特異的な遺伝子は動物モデルで機能解析を行う事が困難であるため、いまだに多くの遺伝子の機能が明らかとなっていないことが挙げられる。ヒト12番染色体短腕と19番染色体長腕には遺伝的多様性に富む機能未知の免疫受容体が数多く存在している。種間および種内の比較ゲノム解析からこれらのゲノム領域は進化速度が速いことが明らかとなっており、感染症による選択圧を受けた痕跡である事が示唆されている。これまでに我々においても、ヒト19番染色体長腕に存在する *LILRA3* 遺伝子の欠失(非機能型)が有意にアジア人集団に多く、この遺伝子に選択圧が働いた痕跡を見出した(Hirayasu et al., *Hum Genet*, 2006, Hirayasu et al., *Am J Hum Genet*, 2008)。また、*KIR2DL3* と *HLA-C1* の両遺伝子を保有するヒトでは熱帯熱マラリアの重篤な合併症である脳性マラリアに感受性を示す事を明らかにした(Hirayasu et al., *PLoS Pathogens*, 2012)。これらの分子は病原体と相互作用する可能性があるが、国内外で行われてきたこれまでの遺伝疫学的なアプローチでは実際にどのような病原体のどのような分子が免疫受容体と相互作用して感受性を示すのかというところを明らかにするには至らなかった。そこで、我々は研究をさらに発展させるために、機能に影響を与えるような遺伝子多型(欠失、スプライシング、ナンセンス置換等)を有する免疫受容体に注目して、様々な免疫受容体の組換えタンパク質を作製し、様々な病原体(ウイルス・細菌・原虫)との結合性をフローサイトメトリーにより解析し、免疫受容体と相互作用する病原体分子の網羅的な同定を試みた。その過程で、活性化レセプター *LILRA2* が細菌感染細胞に特異的に結合し、細菌感染細胞上に *LILRA2* のリガンドが発現している事を見出した(下図)。 *LILRA2* の組換えタンパク質を用いて免疫沈降(IP)および質量分析によりリガンドの同定を試みたところ、予想に反して細菌由来の分子ではなく切断されたヒトIgM(切断型Ig)であった。この結果から、活性化レセプター *LILRA2* は細菌のタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)によって切断された免疫グロブリン(Ig)を認識する可能性が考えられた。

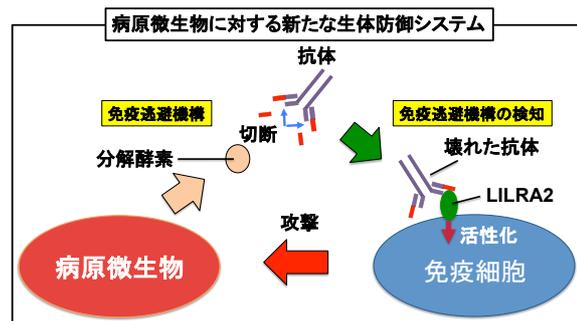


さらに肺炎球菌が原因の中耳炎患者由来の膿汁中のIgMをウェスタンブロッティングにより調べたところ、IgMは壊れていた。また、リガンドに結合するとGFPが発現するような *LILRA2* 発現レポーター細胞と膿汁を共培養すると、*LILRA2* 発現細胞はGFPを発現し活性化することが明らかとなった(下図)。このことから細菌感染局所で *LILRA2* は細菌によって壊された抗体(Ig)を認識し、細菌の侵入を感知して生体防御反応に関わっていることが示唆される。



2. 研究の目的

上記の我々の結果から、宿主は細菌の抗体免疫逃避機構に対抗するために、細菌プロテアーゼによって破壊された抗体を認識する *LILRA2* を獲得して細菌の侵入を感知する新たな生体防御機構を進化させたことが考えられる。そこで本研究では、細菌プロテアーゼによって壊された抗体と *LILRA2* との相互作用による宿主の新たな生体防御機構を解明することで感染症の制御へとつなげることを目的とする(下図)。



3. 研究の方法

我々は、*LILRA2* が単球、マクロファージ、顆粒球に発現していることを確認しているが、*LILRA2* がリガンドを認識する事でどのような免疫応答を引き起こすのかはわかっていない。それを明らかにするために以下の実験を行う。

- まず、リガンドである切断型Igを作製するために、ヒト末梢血B細胞からIgをクローニングして、293T細胞にトランスフェクションしてIgの組換えタンパク質を作製する。細菌プロテ

アーゼにより Ig の組換えタンパク質を切断し、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーによって切断型 Ig を精製する。精製がうまくいかない場合には、初めから切断された Ig の組換えタンパクを作製するなどの工夫を凝らす。

- ▶ 末梢血から分離した LILRA2 発現細胞(単球、マクロファージ、顆粒球)が切断型 Ig に応答する際のサイトカインやケモカインの発現プロファイルを調べる。サイトカインやケモカインの応答が見られない場合には、殺菌に重要な活性酸素の産生を調べるなど、多方面から免疫応答のアウトプットを調べる。末梢血の細胞でうまくアウトプットが見られない場合には、コントロール実験として、LILRA2 を発現している細胞株を最新の遺伝子改変技術である CRISPR-Cas9 システムにより LILRA2 を特異的に欠損させて、免疫応答のアウトプットを比較解析する。

4. 研究成果

活性化レセプター LILRA2 は、抑制化レセプター LILRB1 と細胞外領域のアミノ酸配列の相同性が 80% 以上もあるが、LILRB1 を含めた他の LILR は、病原微生物によって切断された抗体には結合しなかった。LILRA2 は、切断された IgM、IgG3、IgG4 抗体に強く、IgG1 および IgG2 抗体には弱く結合したが、切断された IgA 抗体には結合しなかったため、抗体の切断部位だけでなく定常領域も LILRA2 の認識には重要であることが考えられた。また、単一のヒト B 細胞からクローニングした抗体をマイコプラズマのプロテアーゼで切断すると、その約十数%が LILRA2 によって認識されるタイプであった。さらに、切断された抗体が LILRA2 によって認識されるかどうかは、抗体軽鎖の種類によって決まることが明らかとなった。つまり、病原微生物のプロテアーゼは、すべての抗体を切断するが、切断された抗体のうち約十数%が LILRA2 によって認識される。

LILRA2 は、好中球、単球、マクロファージなどの骨髄球系細胞に発現している。好中球は、切断された抗体を認識することで活性化し、活性酸素やサイトカインを産生するが、LILRA2 をノックアウトもしくはブロッキングすることで、好中球の活性が低下した。また、レジオネラに感染した単球において LILRA2 を活性化させると、細胞内レジオネラの増殖抑制が認められた。以上の結果から、病原微生物は宿主の抗体免疫から逃れるために、抗体を切断するプロテアーゼを進化させた一方で、宿主はこのような病原微生物の抗体免疫逃避に対抗するために、病原微生物によって切断された抗体すなわち抗体の残骸を認識する活性化レセプター LILRA2 を進化させ、生体防御を行っていることが考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H. Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat. Microbiol.* 2016. 1(6):16054. 査読有
DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.54.
- ② Hirayasu K, Arase H. Functional and genetic diversity of leukocyte immunoglobulin-like receptor and implication for disease associations. *J. Hum. Genet.* 2015. 60(11):703-708. 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2015.64.
- ③ Suenaga T, Matsumoto M, Arisawa F, Kohyama M, Hirayasu K, Mori Y, Arase H. Sialic Acids on Varicella-Zoster Virus Glycoprotein B Are Required for Cell-Cell Fusion. *J. Biol. Chem.* 2015. 290(32):19833-19843. 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M114.635508.
- ④ Tanimura K, Jin H, Suenaga T, Morikami S, Arase N, Kishida K, Hirayasu K, Kohyama M, Ebina Y, Yasuda S, Horita T, Takasugi K, Ohmura K, Yamamoto K, Katayama I, Sasazuki T, Lanier LL, Atsumi T, Yamada H, Arase H. β 2-Glycoprotein I/HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2015. 125(18):2835-2844. 査読有
DOI: 10.1182/blood-2014-08-593624.
- ⑤ Kishida K, Kohyama M, Kurashima Y, Kogure Y, Wang J, Hirayasu K, Suenaga T, Kiyono H, Kunisawa J, Arase H. Negative regulation of DSS-induced experimental colitis by PILR α . *Int. Immunol.* 2015. 27(6):307-314. 査読有
DOI: 10.1093/intimm/dxv004.
- ⑥ Suenaga T, Kohyama M, Hirayasu K, Arase H. Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system. *Microbiol. Immunol.* 2014. 58(9):513-522. 査読有
DOI: 10.1111/1348-0421.12180.
- ⑦ Deng M, Lu Z, Zheng J, Wan X, Chen X, Hirayasu K, Sun H, Lam Y, Chen L, Wang Q, Song C, Huang N, Gao GF, Jiang Y, Arase H, Zhang CC. A motif in LILRB2 critical for Angptl2 binding and activation. *Blood.* 2014. 124(6):924-935. 査読有
DOI: 10.1182/blood-2014-01-549162.

[学会発表] (計 16 件)

- ① Kouyuki Hiravasu, Fumiji Saito, Tadahiro Suenaga, Kyoko Shida, Noriko Arase, Keita Oikawa, Toshifumi Yamaoka, Hiroyuki Murota, Hiroji Chibana, Ichiro Nakagawa, Tomoko Kubori, Hiroki Nagai, Yuji Nakamaru, Ichiro Katayama, Marco Colonna, Hisashi Arase, Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2, 第 45 日本免疫学会学術集会, 沖縄コンベンションセンター (沖縄), 2016 年 12 月 7 日
- ② Hui Jin, Noriko Arase, Sumiko Matsuoka, Kouyuki Hiravasu, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Takehiko Sasazuki and Hisashi Arase, Induction of autoantibody by neo-self TSH receptor / MHC class II complexes, 第 45 日本免疫学会学術集会, 沖縄コンベンションセンター (沖縄), 2016 年 12 月 6 日
- ③ 平安恒幸, 細菌の抗体免疫逃避を検出する新たな免疫システム, 第 69 回日本細菌学会関西支部総会・学術講演会, 大阪市立大学 田中記念館 (大阪), 2016 年 11 月 19 日
- ④ 平安 恒幸, 齋藤 史路, 末永 忠広, 信田 京子, 荒瀬 規子, 及川 敬太, 山岡 俊文, 室田 浩之, 知花 博治, 中川 一路, 久堀 智子, 永井 宏樹, 中丸 裕爾, 片山 一朗, Marco Colonna, 荒瀬 尚, HLA クラス I 認識受容体群 LILR の新展開 - 病原微生物によって壊された抗体を認識する生体防御機構 -, 第 25 回日本組織適合性学会大会, 北海道大学 (北海道), 2016 年 10 月 24 日
- ⑤ Hiravasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H, Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2, 16th Annual Meeting of the Society for Natural Immunity, Taormina, Italy, Oct. 3th, 2016.
- ⑥ Hiravasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H, Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2, 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji island, Japan, Sep. 24th, 2016.
- ⑦ Tadahiro Suenaga, Maki Matsumoto, Fuminori Arisawa, Masako Kohyama, Kouyuki Hiravasu, Yasuko Mori, Hisashi Arase, Functional analysis of sialic acid on varicella-zoster virus glycoprotein B, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡国際会議場 (福岡), 2015 年 11 月 23 日
- ⑧ Hiravasu Kouyuki, Saito Fumiji, Suenaga Tadahiro, Shida Kyoko, Arase Noriko, Oikawa Keita, Yamaoka Toshifumi, Murota Hiroyuki, Chibana Hiroji, Nagai Hiroki, Nakamaru Yuji, Katayama Ichiro, Arase Hisashi, DIR is an innate immune sensor for microbially cleaved immunoglobulins, 第 44 日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター (北海道), 2015 年 11 月 20 日
- ⑨ Hiwa Ryosuke, Ohmura Koichiro, Arase Noriko, Jin Hui, Hiravasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Saito Fumiji, Iwatani Hirotsugu, Atsumi Tatsuya, Terao Chikashi, Mimori Tsuneyo, Arase Hisashi. Myeloperoxidase/HLA class II complexes are targets for autoantibodies in ANCA-associated vasculitis. 第 44 日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター (札幌), 2015 年 11 月 18 日
- ⑩ Jin Hui, Arase Noriko, Matsuoka Sumiko, Hiravasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Sasazuki Takehiko, Arase Hisashi. MHC class II molecules expose autoantibody epitopes on autoantigens. 第 44 日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター (札幌), 2015 年 11 月 20 日
- ⑪ 日和良介、大村浩一郎、荒瀬規子、金暉、平安恒幸、香山雅子、末永忠広、齋藤史路、岩谷博次、渥美達也、寺尾知可史、三森経世、荒瀬尚、MPO/HLA class II 複合体は顕微鏡的多発血管炎における自己抗体の標的である、第 43 回日本臨床免疫学会総会、神戸国際会議場 (神戸)、2015 年 10 月 22 日
- ⑫ Hiwa Ryosuke, Ohmura Koichiro, Arase Noriko, Jin Hui, Hiravasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Matsuoka Sumiko, Iwatani Hirotsugu, Atsumi Tatsuya, Terao Chikashi, Mimori Tsuneyo, Arase Hisashi. Myeloperoxidase/HLA class II complexes are targets for autoantibodies in microscopic polyangiitis. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 国立京都国際会館 (京都), 2014 年 12 月 12 日

- ⑬ Jin Hui, Arase Noriko, Matsuoka Sumiko, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Nakamaru Yuji, Imatani Yoshinori, Katayama Ichiro, Arase Hisashi. MHC class II-restricted recognition of self-antigen/MHC class II complexes by autoantibodies. 第43回日本免疫学会学術集会, 国立京都国際会館(京都), 2014年12月10日
- ⑭ Kouyuki Hirayasu, Fumiji Saito, Hiroki Nagai, Kyoko Shida, Noriko Arase, Yasuhiko Horiguchi, Yuji Nakamaru, Ichiro Katayama, Hisashi Arase, Immune sensing system for bacterially degraded immunoglobulin via activating receptor DIR, 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Nara, Japan, Sep. 24th, 2014.
- ⑮ Hui Jin, Noriko Arase, Kouyuki Hirayasu, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Fumiji Saito, Kenji Tanimura, Sumiko Matsuoka, Kosuke Ebina, Kenrin Shi, Shinsuke Yasuda, Tetsuya Horita, Ryosuke Hiwa, Kiyoshi Takasugi, Koichiro Ohmura, Hideki Yoshikawa, Takashi Saito, Tatsuya Atsumi, Takehiko Sasazuki, Ichiro Katayama, Lewis L. Lanier, Hisashi Arase, Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis Specifically Recognize IgG Heavy Chain Complexed with HLA-DR, Which is Strongly Associated with Rheumatoid Arthritis Susceptibility. The 15th Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2014, Paris(France), Jul. 13th, 2014.
- ⑯ 金暉、荒瀬規子、平安恒幸、香山雅子、末永忠広、松岡須美子、齊藤隆、Lewis L. Lanier、荒瀬尚、MHCクラスII分子によって細胞外へ輸送された細胞内ミスfold蛋白質が自己抗体の標的分子である, 第24回 Kyoto T cell Conference, 京都大学(京都), 2014年5月17日

[図書] (計 2 件)

- ① 平安 恒幸, KIR 遺伝子と HLA 遺伝子の共進化, 週刊医学のあゆみ「麻酔と脳障害」, 医歯薬出版株式会社, 2014. 第249巻12号 1275-1277
- ② 平安 恒幸, 微生物による抗体免疫逃避を検出する新たな生体防御機構, 週刊医学のあゆみ「Critical Care Nephrology」, 医歯薬出版株式会社, 2017. 第261巻7号 762-763

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平安 恒幸 (HIRAYASU, Kouyuki)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・

特任助教(常勤)

研究者番号:3058170