

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03468

研究課題名（和文）免疫逃避機構に着目した宿主細菌相互作用の解明

研究課題名（英文）Host-bacteria interactions through immune evasion mechanism

研究代表者

平安 恒幸（Hirayasu, Kouyuki）

金沢大学・先進予防医学研究センター・特任准教授

研究者番号：30585170

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：免疫は、病原体や腫瘍細胞を排除するための生体防御システムである。しかしながら、病原体や腫瘍細胞は、免疫から逃れるために様々な免疫逃避機構を発達させていることがわかってきた。本研究により、新たに免疫抑制化レセプターが特定の細菌を認識すること、このような免疫抑制化レセプターと細菌リガンドが遺伝的多様性を示すことが明らかとなり、免疫抑制化レセプターを介した細菌の免疫逃避機構によって宿主と細菌が共進化している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代では、抗菌薬やワクチンの開発により、様々な細菌感染症に対して治療を行うことができるようになった。しかし、抗菌薬やワクチンがなかった時代では、病原細菌は致死的な感染症を引き起こしていた。本来免疫が細菌を排除する役割を担っているが、なぜ宿主免疫は病原細菌を排除できない場合があるのだろうか。本研究では、免疫を抑制する免疫抑制化レセプターが細菌を認識してしまうことで免疫にブレーキがかかる可能性が示された。

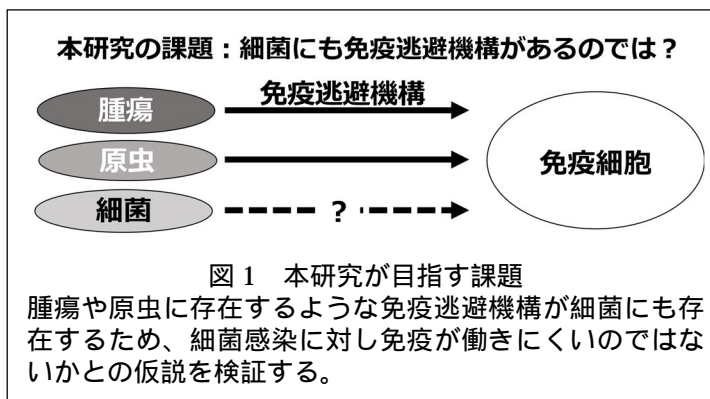
研究成果の概要（英文）：Immune system plays an important role in host defense against pathogens and tumor cells. However, it is known that pathogens and tumor cells have acquired various immune evasion mechanisms to escape from the host immune system. This study revealed that certain immune inhibitory receptors recognize specific bacteria and that both immune inhibitory receptors and their bacterial ligands show genetic diversity. These results suggest that host and bacteria have coevolved through immune inhibitory receptor-mediated bacterial immune evasion mechanisms.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫逃避機構 宿主細菌相互作用 免疫レセプター アリル多様性 LILR

1. 研究開始当初の背景

現代では、抗菌薬やワクチンの開発により、様々な細菌感染症に対して治療を行うことができるようになった。しかし、抗菌薬やワクチンがなかった時代では、溶連菌や髄膜炎菌などの細菌は致死的な感染症を引き起こしていた。このように、なぜ細菌は宿主の免疫を逃れることができるのだろうか、という疑問が本研究課題の学術的「問い」である。免疫は本来、病原体や腫瘍細胞を排除するための生体防御システムである。しかしながら、病原体や腫瘍細胞は、免疫から逃れるために様々な免疫逃避機構を発達させていることがわかってきた。実際、研究代表者らの研究により、病原体がプロテアーゼによって抗体を切断し、宿主の液性免疫から逃れること (Hirayasu et al., Nature Microbiology, 2016)、熱帯熱マラリア原虫が抑制化レセプター LILRB1 を介して免疫から逃れること (Saito, Hirayasu et al. Nature, 2017)、腫瘍細胞が抑制化レセプター LILRB4 を介して免疫から逃れること (Deng et al. Nature, 2018) が明らかとなっている。その一方で、研究代表者らは、液性免疫から逃れた病原体を検知する活性化レセプター LILRA2 を同定した (Hirayasu et al., Nature Microbiology, 2016)。これらの結果から、病原体は免疫から逃れるために抑制化レセプターなどを利用した免疫逃避機構を獲得してきた一方で、宿主はこのような免疫から逃れた病原体を検知する活性化レセプターにより免疫応答システムを進化させてきた可能性が考えられる。本研究課題の学術的「問い」に対して、研究代表者は、免疫レセプターを介した免疫逃避機構が細菌に備わっているため、細菌に対する免疫応答が妨げられているのではないかと考えた(図 1)。



2. 研究の目的

研究代表者らがこれまで研究してきた Leukocyte immunoglobulin-like receptors (LILR) ファミリーは、免疫抑制化レセプターが 5 種類、免疫活性化レセプターが 5 種類、分泌型が 1 種類存在し、そのうちのいくつかは原虫や腫瘍細胞の免疫逃避機構に関わる。そこで本研究では、このような免疫逃避機構に関わる免疫レセプター群として、LILR ファミリーに着目して、宿主細菌相互作用を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1). 免疫レセプターの細菌リガンドの同定

LILR-Fc 融合タンパク質を作製し、様々な細菌に対する結合性をフローサイトメトリーにより解析を行った。LILR リガンドを同定するために、LILR-Fc 融合タンパク質を用いて、細菌のライセトに対し免疫沈降、SDS-PAGE、ウェスタンブロット、質量分析を行った。リガンドの検証を行うために、リガンドの組換えタンパク質を作製し、LILR を発現する細胞への結合性をフローサイトメトリーで解析した。さらに、リガンドと結合すると GFP を発現するレポーター細胞を作製し、レセプターとリガンドとの相互作用を確認した。

(2). 免疫レセプターおよび細菌リガンドの遺伝子解析

日本人の一般集団において LILR の様々なアリルを TA クローニングおよび PCR ダイレクトシーケンシングで遺伝子解析を行った。細菌リガンドの多様性を調べるために、複数の細菌株のリガンドを PCR ダイレクトシーケンシングで遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

LILR ファミリーの中でも LILRB3 と LILRA6 は極めて多様性が高くアミノ酸置換を伴う SNP が多数あり、正の自然選択が働いている可能性が海外から報告されているが、日本人の多様性については明らかとなっていない。LILRB3 および LILRA6 のアリルの違いが細菌との相互作用に影響を及ぼす可能性が考えられるため、本研究ではまず日本人の一般集団において LILRB3 および LILRA6 のアリル多様性を明らかにするために日本人ボランティア 15 名から末梢血単核球を分離し、RNA の抽出、cDNA 合成後、LILRB3 および LILRA6 アリルのクローニングを行った。その結果、日本人においても多数のアミノ酸置換を伴うアリルが複数種類存在することが明らかとなった。これらのアリルは、同義置換よりも非同義置換が有意に多いことが示された。同定したこれらのアリルについて系統樹解析を行ったところ、主に 4 つの系統に分かれた (図 2)。この結果は、これら 4 つの系統間に大きな違いが存在することを示す。さらに、LILRB3 特異的抗体の

アレル間の交差反応性について解析を行ったところ、抗体クローン 222821 は、すべてのアレルに反応性を示したが、抗体クローン MKT5.1 は、LILRB3*JP1 には反応性を示さないことが明らかとなった（図 3）。これらの結果は、タンパク質レベルでアレルの違いが大きいことを示す。

次に、LILR ファミリーと細菌の相互作用を解明

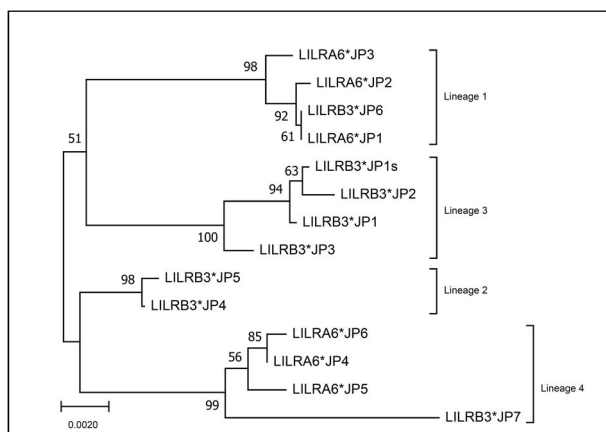


図 2 系統樹解析
日本人で同定した 8 種類の LILRB3 アレルと 6 種類の LILRA6 アレルについて系統樹解析を行った。

するために、アレルの違いを含めて 11 種類の LILR-Fc タンパク質と様々な細菌との結合をフローサイトメトリーにより網羅的に解析したところ、いくつかの LILR がある種の細菌に結合することを見出した。その中でも特に抑制化レセプター LILRB3 は、特定の細菌に強く結合することがわかった。さらに、LILRB3 の中でもアレルによっては結合性が異なり、LILRB3*JP5 は強く結合する一方で LILRB3*JP1 は非常に弱く結合するなどアレル特異的に細菌を認識することが明らかとなった。これらの結果は、特定の細菌に LILRB3*JP5 のリガンドが発現していることを示している。そこで、このような細菌に発現する LILR リガンドの同定を試みるために、LILR の組換えタンパク質を用いて、細菌のライセントに対し免疫沈降、SDS-PAGE、ウェスタンブロットを行ったところ、LILR の組換えタンパク質に特異的に結合するタンパク質が認められた。質量分析を行ったところ、複数の細菌壁タンパク質がリガンド候補として挙がってきた。リガンドの検証を行うために、リガンドの組換えタンパク質を作製し、LILR を発現する細胞への結合を調べたところ、特定の細菌壁タンパク質が LILRB3*JP5 アレルに結合することが明らかとなった。さらに、リガンドと結合すると GFP を発現するレポーター細胞を作製し、レセプターとリガンドとの相互作用を確認したところ、リガンドは LILRB3*JP5 のレポーター細胞は強く活性化させたのに対し、LILRB3*JP1 のレポーター細胞は活性化させなかった。この結果は、LILRB3 はアレル特異的にリガンドを認識することを示す（図 4）。これらの結果から、同定した細胞壁タンパク質が抑制化レセプター LILRB3*JP5 のアレル特異的リガンドであることが考えられる。

LILRB3*JP5 リガンドは、遺伝子レベルで中途終止コドンが入った菌株が存在することが報告されている。そこで、複数の細菌株と LILRB3*JP5 の組換えタンパク質との結合を調べたところ、LILRB3*JP5 リガンドを発現しない細菌株では LILRB3*JP5 の組換えタンパク質は結合しないことが確認された。以上の結果は、抑制化レセプター LILRB3*JP5 を介した細菌の免疫逃避機構によって宿主と細菌が共進化している可能性を示唆する。

一方で、LILR ファミリーは霊長類特異的で、げっ歯類には明確なホモログが存在しないため、動物実験が困難である。動物実験で LILR ファミリーの機能を明らかにするために、トランスジェニックマウスを作製するためのコンストラクトの構築に取り組んだ。ヒトでの発現分布をマウスで再現するために、LILR ファミリーのプロモーターを用いたトランスジェニック用コンストラクトの構築を検討したところ、マウス由来の培養細胞において発現させることができた。

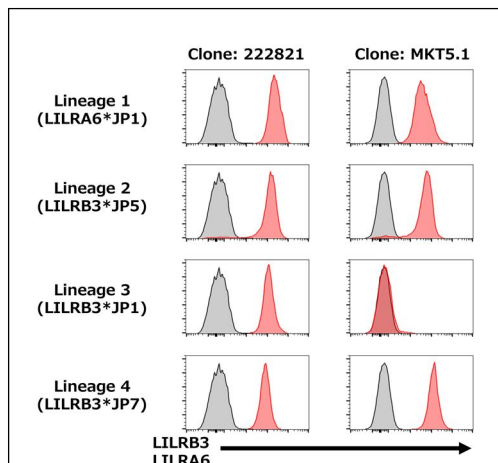


図 3 アレル特異的な抗体反応性
各種 LILRB3 および LILRA6 を発現させた細胞への抗 LILRB3 抗体（クローン：222821, MKT5.1）の反応性をフローサイトメトリーで解析した。

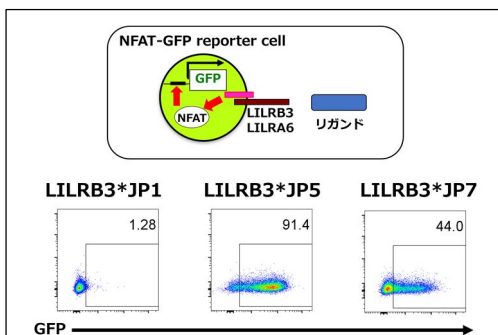


図 4 LILR リガンドによるレポーター細胞の活性化
LILR リガンドと各種 LILRB3 アレルのレポーター細胞を共培養し、フローサイトメトリーで GFP の検出を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Su Mei-Tzu, Inui Masanori, Wong Yi Li, Takahashi Maika, Sugahara-Tobinai Akiko, Ono Karin, Miyamoto Shotaro, Murakami Keiichi, Itoh-Nakadai Ari, Kezuka Dai, Itoi So, Endo Shota, Hirayasu Kouyuki, Arase Hisashi, Takai Toshiyuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Blockade of checkpoint ILT3/LILRB4/gp49B binding to fibronectin ameliorates autoimmune disease in BXSB/ <i>Yaa</i> mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 447 ~ 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirayasu Kouyuki, Sun Jinwen, Hasegawa Gen, Hashikawa Yuko, Hosomichi Kazuyoshi, Tajima Atsushi, Tokunaga Katsushi, Ohashi Jun, Hanayama Rikinarī	4. 巻 66
2. 論文標題 Characterization of LILRB3 and LILRA6 allelic variants in the Japanese population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 739 ~ 748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-00906-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki Rika, Furukawa Atsushi, Hirayasu Kouyuki, Yumoto Kohei, Fukuhara Hideo, Arase Hisashi, Maenaka Katsumi	4. 巻 295
2. 論文標題 Molecular mechanism of the recognition of bacterially cleaved immunoglobulin by the immune regulatory receptor LILRA2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 9531 ~ 9541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.ra120.013354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakoguchi Akihito, Saito Fumiji, Hirayasu Kouyuki, Shida Kyoko, Matsuoka Sumiko, Itagaki Sawako, Nakai Wataru, Kohyama Masako, Suenaga Tadahiro, Iwanaga Shiroh, Horii Toshihiro, Arase Hisashi	4. 巻 548
2. 論文標題 Plasmodium falciparum RIFIN is a novel ligand for inhibitory immune receptor LILRB2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 167 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arase Noriko, Wataya Kaneda Mari, Murota Hiroyuki, Nakagawa Yukinobu, Yamaoka Toshifumi, Itoi Ochi Saori, Hirayasu Kouyuki, Arase Hisashi, Fujimoto Manabu, Katayama Ichiro	4. 巻 47
2. 論文標題 Genotype and phenotype analysis of patients with pediatric cutaneous mastocytosis, especially wild type KIT patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 426 ~ 429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 平安恒幸
2. 発表標題 LILRファミリーにみる遺伝的・機能的多様性
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sun J, Hirayasu K, Hanayama R.
2. 発表標題 Characterization of allelic and functional variations of LILRB3 and LILRA6 in the Japanese population.
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirayasu Kouyuki
2. 発表標題 Genetic and functional diversity of leukocyte immunoglobulin-like receptor family in humans
3. 学会等名 3rd Japan-Germany Symposium on Advanced Preventive Medicine 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平安 恒幸
2. 発表標題 免疫逃避機構からみた宿主と微生物の相互作用
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平安恒幸
2. 発表標題 LILRファミリーにみる免疫・微生物相互作用
3. 学会等名 EKCワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平安恒幸
2. 発表標題 LILRファミリーを介した宿主微生物相互作用
3. 学会等名 第21回日本アデノウイルス研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 孫金文、平安恒幸、華山力成
2. 発表標題 免疫レセプターLILRB3およびLILRA6のアリル多様性と機能
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第39回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirayasu K, Hanayama R
2. 発表標題 Genetic diversity of immune receptors LILRB3 and LILRA6 suggests their interaction with bacteria
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平安恒幸
2. 発表標題 Identification of the bacterial ligand for human immune receptors LILRB3 and LILRA6
3. 学会等名 10th ITAM workshop
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sun J, Hirayasu K, Hanayama R
2. 発表標題 Characterization of allelic and functional variations of LILRB3 and LILRA6 in the Japanese population
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 平安恒幸ほか（北條浩彦 / 編）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 301
3. 書名 リアルタイム・デジタルPCR実験スタンダード	

1. 著者名 平安恒幸ほか(佐藤荘/編)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 211
3. 書名 シン・マクロファージ あらゆる疾患を制御する機能的多様性	

〔産業財産権〕

〔その他〕

科研費 研究成果トピックス https://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/37_topics/data/00178-13301-30585170.pdf
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関