

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390143

研究課題名(和文) ペア型レセプターによる新たな免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) New immune regulatory mechanism by paired receptors

研究代表者

荒瀬 尚 (ARASE HISASHI)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：10261900

研究成果の概要(和文)：

本研究ではペア型レセプターの宿主リガンドおよび病原体リガンドを明らかにし、抑制化レセプターを介した免疫細胞の自己応答性制御機構の解明、抑制化レセプターを介した病原体の免疫逃避機構の解明、活性化レセプターによる病原体に対する攻撃機構の解明を目的として研究を実施した。その結果、ペア型レセプターの一つである PILR が単純ヘルペスウイルスのグライコプロテインと会合し、単純ヘルペスウイルスのエントリーに関わっていることが明らかになった。さらに、PILR とそのリガンドである CD99 やグライコプロテイン B との会合には、特定の O 型糖鎖修飾が重要であることが明らかになった。さらに、新たな PILR リガンドとして神経系に主に発現している PANP を同定し、神経系における免疫制御に関与している可能性が示唆された。これらのことからペア型レセプターは免疫制御に重要な機能を担っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

In this study, we tried to elucidate host and pathogen ligands for paired receptors. By this analysis, we analyzed how immune response to self is regulated via inhibitory receptors and how pathogens evade immune response via inhibitory receptors. In addition, we analyzed how activating receptors is involved in host resistance to pathogens. We extensively analyzed function of PILR, one of paired receptors. We found that PILR associates with glycoprotein B of herpes simplex virus and is involved in entry of herpes simplex virus into cells. Furthermore, we found that specific O-glycans on CD99 and glycoprotein B are essential to associate with PILR. In addition, we identified PANP, a new molecules that is specifically expressed in nerve tissue, as a new ligand for PILR and suggested that PANP might be involved in the immune regulation in nerve tissues. These results suggested that paired receptors play an important role in immune regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医歯薬学・免疫学

キーワード：NK 細胞, 自然免疫, 免疫制御, 炎症, 獲得免疫, 好中球

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞は様々な抑制化レセプターや活性化レセプターを発現することにより、正常細胞と異常細胞を区別している。特に、NK細胞は、ヘルペスウイルス等、持続感染を引き起こすウイルスに対する感染防御に重要な機能を担っており、我々は、NK細胞によるウイルス感染制御に活性化と抑制化レセプターから成るペア型NK細胞レセプターが担っていることを明らかにしてきた(Arase et al. *Science* 2002)。さらに、これらのレセプターは、種々の病原体と共に進化してきたのではないかというウイルスと免疫システムの進化に対する新たな仮説を提唱した(Arase et al. *Microbes infect.* 2002; Arase et al. *Rev. Med. Virol.* 2003)。実際、ウイルスの中にはMHC類似分子を含めて様々な宿主類似分子が存在し、NK細胞レセプター等のリガンドになっている。また、Ly49, KIR, CD94/NKG2, NKR-P1等のNK細胞レセプターばかりでなくSIRP, PIR, CD85(ILT), LAIR, CD200, CD300, Siglec, DCI(A)R等、免疫細胞に広く発現するレセプターも抑制化と活性化レセプターから構成され、広くペア型レセプターとして免疫応答の制御に重要な機能を担っている可能性があるが(Shiratori et al. *J. Immunol.* 2005)、依然としてそれらの宿主リガンドや病原体リガンド明らかでないものが多い。

我々は、このような免疫細胞に広く分布するペア型レセプターについて解析を進めた結果、これらのペア型レセプターが、宿主リンガンドを認識して自己応答性を抑制したり、病原体がそのリガンドを発現し免疫逃避に利用されたりするばかりでなく、それらのリガンド自体の機能制御にも深く関わっていることが明らかになった。例えば、新たなペア型レセプターとして同定したPILRは、ほとんど全ての哺乳動物に保存されており、樹状細胞やマクロファージ等の機能を制御していると考えられる。(Shiratori et al. *J. Exp. Med.* 2004)。さらに、抑制化PILRの認識と病原体との関連を解析したところ**単純ヘルペスウイルス**のエンベロープ分子Glycoprotein BがPILRと特異的に会合し、免疫応答を抑制するばかりでなく、PILRが単純ヘルペスウイルスのエントリーレセプターとして感染時の膜融合に関与していた(Satoh et al., *Cell* 2008)。つまり、ウイルス等の病原体は抑制化レセプターを用いて免疫応答を制御するばかりでなく、宿主細

胞への感染そのものにも利用されている。しかし、数あるペア型レセプターのうち宿主リガンドや病原体リガンドが明らかなものはごく一部のみで、依然としてほとんど明らかでなく、リガンドおよびその機能解明がペア型レセプターの免疫制御機構の解明に重要である。

2. 研究の目的

前述のように、今までの研究により、ペア型レセプターは免疫応答の制御に関与する一方、感染症の制御に重要な機能を担っている可能性が考えられた。しかし、依然として多くのペア型レセプターの機能が明らかでない。そこで、本研究ではペア型レセプターの宿主リガンドおよび病原体リガンドを明らかにし、下記の3点の免疫制御機構を重点的に解明する。

1. 抑制化レセプターを介した免疫細胞の自己応答性制御機構の解明。
2. 抑制化レセプターを介した病原体の免疫逃避機構の解明。
3. 活性化レセプターによる病原体に対する攻撃機構の解明。

上記の3項目の解明により、ペア型レセプターの宿主リガンドによって免疫応答がどのように制御されているか、さらに、免疫システムが、どのように病原体に対する抵抗性を獲得してきたかを解明し、ペア型レセプターによる新たな免疫制御機構を解明する。

本研究は、抑制化レセプターが免疫制御に重要な機能を担っている一方、種々の病原体に免疫逃避のために利用されるようになったのに対し、活性化レセプターは、病原体等の異物を攻撃するために免疫システムが獲得したのではないかという申請者の独自の仮説に基づき、ペア型レセプターによる新たな免疫制御機構を解明するのが特徴である。

現在までに、宿主リガンドや病原体リガンドが同定されているペア型レセプターは一部しかないので、本仮説を証明するためには、さらに多くのペア型レセプターの宿主リガンドおよび病原体リガンドを明らかにすることが必須である。従って、本研究により、ペア型レセプターの普遍的な機能、進化過程、存在意義が明らかになるばかりでなく、新たな免疫制御や感染・癌免疫制御のための標的分子を解明できると思われる。

また、将来的には、ペア型レセプターには、KIRやCD85(ILT)のように、個人間の多様性が高いものが多いことから、ペア型レセプタ

一のリガンド認識が SNP によってどのような影響を受けるかを解析することにより、免疫疾患や感染抵抗性等の免疫応答に対する個人差をペア型レセプターの特異性によって説明できるようになる可能性が考えられる。

3. 研究の方法

平成20年度にリガンドが明らかになっていないペア型レセプターの宿主リガンドおよび病原体リガンドの同定およびPILRの機能解析を行った。平成21年度以降には、新たに同定したリガンドの免疫学的、微生物学的な機能解析を行い、PILRに関しては、機能制御法の開発を行う。研究体制として、分担研究者の専門分野を活かして、ペア型レセプターの宿主リガンドの解析を進めることで、多角的にペア型レセプターの免疫制御機構を解明した。

4. 研究成果

ペア型レセプターの一つであるPILRの認識と機能について解析を行った。その結果、PILRのリガンドの認識には、リガンド分子上の特定のO形糖鎖修飾が重要であることが明らかになった(Wang et al. *J. Immunol.* 2008)。また、PILRは単純ヘルペスウイルスのgBとも会合することを明らかにしたが(Satoh et al. *Cell* 2008)、PILRとgBとの相互作用にも、特定のO型糖鎖修飾が必要であることを解明した(Wang et al. *J. Virol.* 2009)。また、PILRはCD99と会合するが、CD99陰性細胞にもPILRが認識する細胞を見いだした。そこで、未知のPILRリガンド発現細胞から、cDNAライブラリーを作製して、PILRのリガンドの同定を試みたところ、新規分子PANP見つけた(Kogure et al. *BBRC* 2011)。

さらに、PILRの機能に関して、PILR欠損マウス等を用いて解析したが、まだ未発表であるため、現段階での公表は差し控える。

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 17 件)

- ① Kogure, A., Shiratori, I., Wang, J., L. Lanier, L., Arase, H. PANP is a novel O-glycosylated PILR α ligand expressed in neural tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有, (2011) 405:428-433.
- ② Arii, J., Goto, H., Suenaga, T., Oyama, M., Kozika-Hata, H., Imai, T., Minowa, A., Akashi, H., Arase, H., Kawaoka, Y.,

and Kawaguchi, Y. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* 査読有, (2010) 467:859-862.

- ③ Arii, J., Wang, J., Morimoto, T., Suenaga, T., Akashi, H., Arase, H., and Kawaguchi, Y. A Single Amino Acid Substitution in Herpes simplex virus 1 Envelope Glycoprotein B at a Site Required for Binding to the Paired Immunoglobulin-like Type 2 Receptor α (PILR α) Abrogates PILR α -dependent Viral Entry and Reduces Pathogenesis. *J. Virol.* 査読有, (2010) 84:10773-10783.
- ④ Suenaga, T., Satoh, T., Somboonthum, P., Kawaguchi, Y., Mori, Y., and Arase, H. Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 査読有, (2010), 107:866-871.
- ⑤ Li, L., Fang, C. J., Ryan, J. C., Niemi, E. C., Lebron, J. A., Bjorkman, P. J., Arase, H., Torti, F. M., Torti, S. V., Nakamura, M. C., Seaman, W. E. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 査読有, (2010), 107:3505-3510.
- ⑥ Wang, J., Fan, Q., Satoh, T., Arii, J., Lanier, L. L., Spear, P. G., Kawaguchi, Y., Arase, H. Binding of herpes simplex virus glycoprotein B (gB) to PILR α depends on specific sialylated O-linked glycans on gB. *J. Virol.* 査読有, (2009), 83:13042-13045.
- ⑦ Arase, H., and Seino, K. I. The study of regulatory T cells and NKT cells in Japan: a historical perspective. *Int. Immunol,* 査読有, (2009), 21:1101-1103.
- ⑧ Arii, J., Uema, M., Morimoto, T., Sagara, H., Akashi, H., Ono, E., Arase, H., and Kawaguchi, Y. Entry of herpes simplex virus 1 and other alphaherpesviruses via the paired immunoglobulin-like type 2 receptor α . *J. Virol.* 査読有, (2009), 83:4520-4527.
- ⑨ Fan, Q., Lin, E., Satoh, T., Arase, H., and Spear, P. G. Differential effects on cell fusion activity of mutations in herpes simplex virus 1 glycoprotein B (gB) dependent on whether a gD receptor or a gB receptor is overexpressed. *J. Virol.*, 査読有, (2009), 83:7384-7390.
- ⑩ Kato, A., Arii, J., Shiratori, I., Akashi, H., Arase, H., and Kawaguchi, Y. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface. *J. Virol.* 査読有, (2009), 83:250-261.
- ⑪ Orr, M. T., Sun, J. C., Hesslein, D. G., Arase, H., Phillips, J. H., Takai, T., and Lanier, L. L. Ly49H signaling through DAP10 is essential for optimal natural killer cell responses to mouse

- cytomegalovirus infection. *J. Exp. Med.* 査読有, (2009), 206:807-817.
- ⑫ Toma-Hirano, M., Namiki, S., Shibata, Y., Ishida, K., Arase, H., Miyatake, S., Arai, K., and Kamogawa-Schifter, Y. Ly49Q ligand expressed by activated B cells induces plasmacytoid DC maturation. *Eur. J. Immunol.* 査読有, (2009), 39:1344-1352.
- ⑬ Liang, S., Ristich, V., Arase, H., Dausset, J., Carosella, E. D. and Horuzsko, A. Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6-STAT3 signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 査読有, (2008), 105:8357-8362.
- ⑭ Mizui, M., Shikina, T., Arase, H., Suzuki, K., Yasui, T., Rennert, P. D., Kumanogoh, A., and Kikutani, H. Bimodal regulation of T cell-mediated immune responses by TIM-4. *Int. Immunol.* 査読有, (2008), 20:695-708.
- ⑮ Satoh, T., Arii, J., Suenaga, T., Wang, J., Kogure, A., Uehori, J., Arase, N., Shiratori, I., Tanaka, S., Kawaguchi, Y., Spear, P. G., Lanier, L. L. and Arase, H. PILR α is a herpes simplex virus-1 entry co-receptor that associates with glycoprotein B. *Cell* 査読有, (2008), 132:935-944.
- ⑯ Tabata, S., Kuroki, K., Wang, J., Kajikawa, M., Shiratori, I., Kohda, D., Arase, H. and Maenaka, K. Biophysical characterization of O-glycosylated CD99 recognition by paired Ig-like type 2 receptors (PILR). *J. Biol. Chem.* 査読有, (2008), 283: 8893-8901.
- ⑰ Wang, J., Shiratori, I., Satoh, T., Lanier, L. L., and Arase, H. An essential role of sialylated O-linked sugar chains in the recognition of mouse CD99 by paired immunoglobulin-like type 2 receptor (PILR). *J. Immunol.* 査読有, (2008), 180:1686-1693.
- [学会発表] (計 20 件)
- ① 末永忠広 荒瀬尚、神経組織指向性 α ヘルペスウイルスのエントリーレセプター、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010. 11. 9、徳島県郷土文化会館(徳島市)
- ② Hisashi Arase, Crucial Role of Sialic Acid Binding Receptors in Herpes Virus Infection. Annual Conference of the Society for Glycobiology, 2010.11.8, St. Pete Beach, FL (USA)
- ③ Hisashi Arase, Regulation of herpesvirus infection by paired receptors, The CSI-IFReC Joint Symposium on Immunology, 2010.11.3, Hangzhou (China)
- ④ Tadahiro Suenaga, Interaction between Siglec and Varicella-Zoster Virus (VZV) 14th International Congress of Immunology, 2010. 8. 24, 神戸国際展示場(神戸市)
- ⑤ Tadahiro Suenaga, Myelin-Associated Glycoprotein Associates with gB and is Involved in Membrane Fusion during Neurotropic Herpesvirus Infection, 35th International Herpesvirus Workshop, 2010.7.25, Salt Lake City, Utah (USA)
- ⑥ Hisashi Arase, Crucial role of glycan binding receptors in herpesvirus infection. 1st Asia Pacific Workshop, 2010. 7. 16, Seoul, (Korea)
- ⑦ 末永忠広、荒瀬尚、新規神経指向性ヘルペスウイルスレセプターの同定と解析、第 51 回日本神経学会総会、2010. 5. 21、東京国際フォーラム(東京)
- ⑧ 荒瀬尚、ペア型レセプターを介したヘルペスウイルス感染制御機構、日本食品免疫学会次世代シンポジウム、2010. 1. 8、東京
- ⑨ 荒瀬尚、Regulation of herpesvirus infection by paired receptors、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009. 12. 2、大阪市
- ⑩ ARASE Hisashi、Molecular basis for recognition of Paired Immunoglobulin Like type2 Receptor (PILR) α to glycoprotein B (gB) of herpes simplex virus-1 (HSV-1)、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009. 12. 2、大阪市
- ⑪ Tadahiro Suenaga, Hisashi Arase, Immune Evasion of Varicella-Zoster Virus (VZV) via Siglec-7、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009. 12. 2、大阪市
- ⑫ 荒瀬尚、PILR-L2 is a novel PILR α ligand expressed in the brain、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009. 12. 2、大阪市
- ⑬ 末永忠広 荒瀬尚、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の新規エントリーレセプター、第 57 回日本ウイルス学会、2009. 10. 26、東京
- ⑭ 荒瀬尚、Hemopexin による新たなインフルエンザ感染防御機構、第 57 回日本ウイルス学会、2009. 10. 26、東京
- ⑮ 荒瀬尚、Paired Immunoglobulin (Ig) Like type 2 Receptor (PILR) α による Glycoprotein B (gB) 認識機構の解明、第 57 回日本ウイルス学会、2009. 10. 26、東京
- ⑯ Tadahiro Suenaga, Hisashi Arase, A Varicella-Zoster Virus entry receptor that mediates membrane fusion and infection. 14th International Conference on Immunobiology and

Prophylaxis of Human Herpesvirus,
2009. 10. 6, Kobe

- ⑰ Hisashi Arase, Regulation of herpesvirus infection by paired receptors, The Viruses and Cells Gordon Conference, 2009. 6. 9,
- ⑱ 荒瀬尚、ペア型レセプターPILR を介した単純ヘルペスウイルス感染機構、日本分子生物学会シンポジウム、2008.12.12、神戸
- ⑲ 荒瀬尚、単純ヘルペスウイルス感染におけるエンベロープのO型糖鎖修飾の機能、日本糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、2008.12.4、東京
- ⑳ 荒瀬尚、抑制化レセプターPILR を介した単純ヘルペスウイルス感染機構、日本生体防御学会学術総会シンポジウム、2008.7.10、札幌

[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

荒瀬 尚 (ARASE HISASHI)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：10261900

(2) 研究分担者

末永 忠広 (SUENAGA TADAHIRO)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20396675

上堀 淳二 (UEHORI JUNJI)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20432429