

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659223

研究課題名（和文）黄色ブドウ球菌による抑制化レセプターを介した新たな免疫逃避機構の探索

研究課題名（英文）Study on immune evasion mechanism by *Staphylococcus aureus* via immune inhibitory 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）：

細菌感染の制御には宿主免疫応答が非常に重要な役割を担っている。一方で、種々の細菌、特に持続感染する細菌には様々な免疫制御機構が存在すると考えられている。そこで、本研究では、細菌による抑制化レセプターを介した新たな免疫逃避機構を研究した。その結果、抑制化レセプターの一つである PILR のリガンドが一部の黄色ブドウ球菌に発現していることが明らかになった。さらに、抑制化レセプターと高い相同性を示す活性化レセプターの中に細菌を認識するレセプターが存在することが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Host immune response plays an important role in the regulation of bacterial infection. On the other hand, some bacteria seem to have certain immune regulatory mechanism. In the present study, we have analyzed mechanism of immune evasion via inhibitory immune receptors. We found that *Staphylococcus aureus* expresses a certain ligand for inhibitory PILR $\alpha$ , one of immune inhibitory receptors. Furthermore, we found that there are certain bacteria that express the ligand of activating receptors that have high homology to inhibitory receptors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：黄色ブドウ球菌、抑制化レセプター、免疫逃避、病原性

## 1. 研究開始当初の背景

細菌は依然として非常に多くの人々の生命を脅かす重大な感染症を引き起こす病原体の一つである。従って、細菌感染による病態を明らかにするためには、細菌がどのように進化し、宿主免疫機構から逃れる手法を獲得してきたかを解明することは、非常に重要である。我々は、ウイルス等の病原体がどのように免疫機構から逃れてきたか、一方、免疫システムがどのようにそ

のような病原体に対して、どのように抵抗性を獲得してきたかについて研究してきた。特に、免疫細胞の発現する抑制化レセプターを介してウイルスが免疫応答を抑制したり、免疫細胞に侵入したりする分子機構を解明してきた(Arase et al. *Science* 2002; Satoh et al. *Cell* 2008; Suenaga et al. *PNAS* 2010)。黄色ブドウ球菌の様な常在菌は持続感染しているが、持続感染するウイルスと同様に、細菌が宿主免疫を制御する分子機構については不明な点が多

い。

## 2. 研究の目的

細菌感染の制御には宿主免疫応答が非常に重要な役割を担っている。一方で、種々の細菌、特に持続感染する細菌には様々な免疫制御機構が存在すると考えられている。一方、我々は、ヘルペスウイルス等の持続感染するウイルスには抑制化レセプターを介した免疫逃避機構が存在することを明らかにしてきた。しかし、ウイルスと同様に宿主免疫機構と密接な相互作用をする細菌に同様な分子機構が存在するかどうかは明らかになっていない。そこで、本研究では、細菌による抑制化レセプターを介した新たな免疫逃避機構を研究する。

## 3. 研究の方法

### ① 細菌表面上における抑制化レセプターリガンドの発現解析

抑制化レセプターの Fc 融合蛋白を作製し、細菌に対する結合をフローサイトメトリーで解析する。黄色ブドウ球菌には、実験株およびいくつかの臨床分離株を用いる。また、抑制化レセプターとしては、我々の解析してきた PILR の他、KIR、CD85、OX2 等いまままでに知られている全ての抑制化レセプターについて解析した。

### ② 抑制化レセプターリガンド陽性細菌の精製

細菌の実験株は *in vitro* での長期培養の結果、免疫を制御するための抑制化レセプターのリガンドが欠落している可能性が考えられる。そこで、磁気ビーズやソーティングを用いることにより、抑制化レセプターリガンドを発現している黄色ブドウ球菌を採取し、解析を行った。

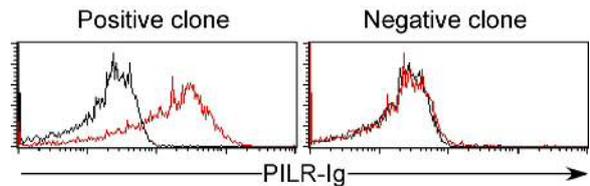
### ③ NFAT-GFP レポーター細胞を用いた抑制化レセプターリガンドの検出

抑制化レセプターの Ig 融合タンパクより生理的な条件で細胞表面のリガンド分子の機能を調べるために抑制化レセプターを発現するレポーター細胞を用いて解析した。申請者らは NFAT-GFP レポーター遺伝子を用いることにより、高感度でリガンド分子を検出する方法を開発している (Ohtsuka et al. *PNAS* 2004)。

### ④ 細菌の抑制化レセプターのリガンド分子の同定

抑制化レセプターの Fc 融合蛋白を用いてリガンド分子の affinity chromatography を行い、リガンド分子を精製後、質量分析機にて同定を試みた。また、リガンド分子を同定できた場合は、その分子を発現させ、抑制化レセプターが会合するかどうかを解析し、抑制化レセプターのリガンド分子であることの確認をする予定を立てた。

## 黄色ブドウ球菌における抑制化PILRリガンドの発現



## 4. 研究成果

### ① 黄色ブドウ球菌における抑制化レセプターリガンドの発現

いくつかの抑制化レセプターの Ig キメラ分子を作成して、それらが黄色ブドウ球菌に結合するかどうかをフローサイトメトリーを用いて解析したところ、抑制化レセプターの一つである PILR が黄色ブドウ球菌を認識することが明らかになった (下図)。しかし、黄色ブドウ球菌のクローンを解析すると下図のように、全ての黄色ブドウ球菌が抑制化 PILR に認識されなかったことから、黄色ブドウ球菌の株によって異なることが考えられた。また、メチシリン感受性の黄色ブドウ球菌とメチシリン抵抗性の黄色ブドウ球菌の間では、抑制化 PILR による認識の違いは認められなかった。

### ② NFAT-GFP レポーター細胞を用いた抑制化レセプターリガンドの検出

抑制化 PILR を発現させた NFAT-GFP レセプターのレポーター細胞を用いて、PILR のリガンドを発現させた黄色暴動球菌との共培養を行った。共培養を行うため、黄色ブドウ球菌を予めパラホルムアルデヒドで固定化して行った。しかし、抑制化 PILR リガンドを発現している黄色ブドウ球菌と共培養しても、NFAT-GFP レポーター細胞における有意な GFP の発現は認められなかった。一般に Ig キメラ分子の結合より NFAT-GFP レポーター細胞の方が感度が悪いと、黄色ブドウ球菌に発現している PILR リガンドのアフィニティーは、レポーター細胞を活性化するのに十分な程高くない可能性が考えられた。また、固定化した黄色ブドウ球菌を用いたが、細菌の固

定がレポーター細胞の活性化に影響を与えた可能性は完全に否定できず、今後さらに解析が必要と考えられた。

③ 細菌の抑制化レセプターのリガンド分子の同定

黄色ブドウ球菌の発現している抑制化 PILR リガンドを同定するために、抑制化 PILR リガンドを発現している黄色ブドウ球菌を可溶化し、PILR-Igを用いてリガンド分子を免疫沈降し、そのリガンドの同定を質量分析で試みた。その結果いくつかの候補分子を得ることができたが、それらの分子を哺乳動物細胞に発現させても、PILR が認識することは認められなかった。従って、現在のところ、黄色ブドウ球菌の発現する PILR のリガンドの同定までは成功に至っていない。今後、免疫沈降の方法を改良する等によって、リガンド分子の同定を行う予定である。

④ 活性化レセプターによる細菌の認識

抑制化レセプターは一般的に、活性化レセプターとペアになって存在する。抑制化レセプターと活性化レセプターはアミノ酸の相同性も80-90%と非常に高いため共通のリガンドを認識する場合もある。そこで、抑制化レセプターばかりでなく、活性化レセプターのリガンドが細菌に発現しているかを解析したところ、予想外にも、PILR 以外の活性化レセプターの中に、細菌を認識するものが存在することが判明した。本研究では、リガンド分子の同定までは成功しなかったが、今後は、リガンド分子の同定、および、抑制化レセプター、活性化レセプターとの相互作用が、細菌に対する免疫応答にどのような影響を担っているかを明らかにする予定である。本研究成果は、種々の細菌の病原性を解析する上で、これらの抑制化レセプターや活性化レセプターのリガンドの発現を解析することが重要であることが明らかになった。

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 4 件)

- ① Wang, J., Shiratori, I., Uehori, J., Ikawa, M., Arase, H. Neutrophil infiltration during inflammation is regulated by PILR $\alpha$  via modulation of integrin activation. *Nat.*

*Immunol.* 14:34-40, 査読有 (2012)  
doi:10.1038/ni.2456.

- ② Ihara, S., Kida, H., Arase, H., Tripathi, L.P., Chen, Y.A., Kimura, T., Yoshida, M., Kashiwa, Y., Hirata, H., Fukamizu, R., Inoue, R., Hasegawa, K., Goya, S., Takahashi, R., Minami, T., Tsujino, K., Suzuki, M., Kohmo, S., Inoue, K., Nagatomo, I., Takeda, Y., Kijima, T., Mizuguchi, K., Tachibana, I., Kumanogoh, A. Inhibitory Roles of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Antitumor Immunity during Carcinogen-Induced Lung Tumorigenesis. *Cancer Res.* 72:2990-2999, 査読有 (2012)  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4062
- ③ Hirayasu, K., Ohashi, J., Kashiwase, K., Hananantachai, H., Naka, I., Ogawa, A., Takanashi, M., Satake, M., Nakajima, K., Parham, P., Arase, H., Tokunaga, K., Patarapotikul, J., Yabe, T. Significant Association of KIR2DL3-HLA-C1 Combination with Cerebral Malaria and Implications for Co-evolution of KIR and HLA. *PLoS Pathog.* 8:e1002565, 査読有 (2012)  
doi:10.1371/journal.ppat.1002565
- ④ Yamaji, O., Nagaishi, T., Totsuka, T., Onizawa, M., Suzuki, M., Tsuge, N., Hasegawa, A., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Arase, H., Kanai, T., Watanabe, M. The Development of Colitogenic CD4<sup>+</sup> T Cells Is Regulated by IL-7 in Collaboration with NK Cell Function in a Murine Model of Colitis. *J. Immunol.* 188:2524-2536, 査読有 (2012)  
doi:10.4049/jimmunol.1100371.

[学会発表](計 6 件)

- ① 荒瀬尚、ペア型レセプター-PILR のリガンド認識における糖鎖修飾の機能、第12回日本蛋白質科学会年会(招待講演)、2012年6月21日、名古屋国際会議場、(愛知県)
- ② 谷村憲司、小嶋伸恵、荒瀬尚、山田秀人、妊娠中の水痘初感染により子宮内胎児死亡に至った1例、第27回ヘルペスウイルス研究会、2012年6月7日、あいち健康プラザ健康宿泊館プラザホール(愛知県)
- ③ 末永忠広、松本麻紀、有澤 史倫、森康

子、荒瀬尚、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の膜融合におけるシアル酸の役割、第 27 回ヘルペスウイルス研究会、2012 年 6 月 7 日、あいち健康プラザ健康宿泊館プラザホール(愛知県)

- ④ T.Suenaga, M.Matsumoto, Y.Mori, H.Arase, A Varicella-Zoster Virus entry receptor that expresses on hematopoietic cells, 15th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, 2011 年 10 月 13 日、San Servolo, Venice (Italy)
- ⑤ Tadahiro Suenaga, Fuminori Arisawa, Yasuko Mori, Hisashi Arase, Newly Identified Varicella-Zoster Virus (VZV) Entry Receptor Expressed in Hematopoietic Cells, International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, 2011 年 9 月 12 日、札幌コンベンションセンター(北海道)
- ⑥ 末永忠広、松本麻紀、森康子、荒瀬尚、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の膜融合機序の解析、第 26 回ヘルペスウイルス研究会、2011 年 6 月 4 日、大阪アカデミア(大阪府)

[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