

研究課題別評価

1 研究課題名:

ウイルス感染を制御する特異的レセプター群の解明と新制御法の開発

2 研究者氏名: 荒瀬 尚

研究員: 白鳥 行大 (研究期間 H.15.4.1~H.16.3.31)

研究員: 荒瀬 規子 (研究期間 H.16.4.1~H.18.3.31)

技術員: 坂元 亜矢子 (研究期間 H.14.12.1~H.16.3.31)

技術員: 廣畑 糧子 (研究期間 H.16.4.1~H.18.3.31)

技術員: 松本 麻紀 (研究期間 H.16.5.1~H.18.3.31)

3 研究のねらい:

本研究では、NK細胞やマクロファージ等の自然免疫細胞が発現する抑制化と活性化レセプターから成るいわゆるペア型レセプターに関して、それらがウイルス等の病原体と共に進化してきたのではないかとする新たな仮説を立て、それに基づいた病原体の認識機構の解明を目指してきた。特に、ペア型レセプターによる病原体認識を明らかにすることによって、病原体に対する宿主の感染抵抗性決定機構や病原体の宿主免疫逃避機構を明らかにし、感染症の制御方法の開発を目的とした。

4 研究成果:

① ペア型レセプターPILRとリガンドの解析

病原体の認識に関与する新たなペア型レセプターを同定する目的で、NK細胞のcDNAライブラリーより、私どもの開発したFlag-trap法を用いて、新たな活性化ペア型レセプターPILRをクローニングした。さらに、そのリガンドとして、新規分子PILR-L1をクローニングした。PILRとPILR-L1の機能について解析を進めた結果、活性化PILRのリガンドとしてクローニングしたPILR-L1は抑制化PILRによっても強く認識されること、また、細胞によって、活性化および抑制化PILRの発現パターンが異なることを明らかにした。さらに、活性化PILRはNK細胞ばかりでなく樹状細胞の活性化制御に関与しており、新たな免疫制御分子として重要であると考えられた(Shiratori et al. *J. Exp. Med.* 2004)。

PILRのリガンドは、正常細胞では主にT細胞に発現していることが判明したが、ヒトのT細胞やマウス一部のT細胞ではPILR-L1が発現していなくても、可溶性PILRに認識された。このことから、PILR-L1以外のリガンドがT細胞に発現している可能性が考えられた。そこで、cDNAライブラリーを用いた発現クローニングや可溶性PILRに会合する分子を精製し、質量分析によりその分子を同定することにより新たなリガンドPILR-L2、L3、L4をクローニングした。

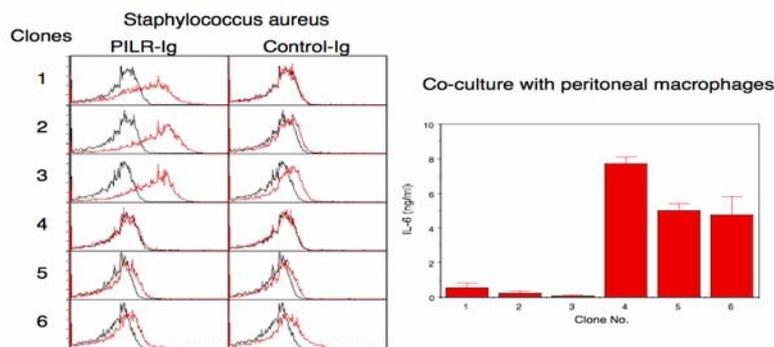
以上のようにPILRは4種類の分子を認識するが、それらにアミノ酸の相同性は全く認められなかった。さらに、いずれもO型の糖鎖修飾を受ける分子であることから、PILRのリガンド認識における糖鎖の機能を調べるために、O型糖鎖修飾阻害剤でリガンド発現細胞を処理すると、可溶性PILRに全く認識されなくなることが明らかになった。さらに、O型糖鎖修飾に関与する糖転移酵素について調べると、ある種の糖転移酵素存在下では全くPILRに認識されなくなった。実際悪性度の高い腫瘍細胞ではこの糖転移酵素の活性が低いことが知られており、PILRのリガンド認識には腫瘍細胞等に発現が認められる不完全な糖鎖構造が関与している可能性が考えられた。つまり、腫瘍細胞では、ある種の糖転移酵素を欠失することにより、PILRリガンドを発現させ免疫応答を抑制する腫瘍細胞による新たな免疫逃避機構の存在が考えられた。

② PILRによる細菌の認識

上記のように、PILRの認識に糖鎖が重要な機能を担っていることが判明した。一方、PILRがペア型レセプターであり、私どもの仮説により病原体の認識に関与している可能性が考えられた。そこで、PILRが細菌を認識するかどうかについて可溶性PILRを用いて検討した。その結果、黄色ブドウ球菌やリステリア菌が可溶性PILRによって認識されることが判明した。一方、大腸菌は可溶性PILRによって全く認識されなかった。さらに、黄色ブドウ球菌の種々のクローンを解析すると、その中に可溶性PILRに非常に良く認識されるクローンと認識され

ないクローンが存在することが明らかになった(右図)。そこで、抑制化 PILR を発現しているマクロファージと共培養すると、PILR リガンドを発現していない黄色ブドウ球菌は、マクロファージを活性化して IL-6 の産生を誘導するのに対し、PILR リガンドを発現している黄色ブドウ球菌は、ほとんどマクロファージを活性化しないことが明らかになった。以上より、ウイルスばかりでなく、ある種の細菌も、抑制化レセプターのリガンドを獲得することにより、免疫細胞の応答を制御しているという今までに知られていない細菌による全く新たな免疫制御機構が存在すると考えられた。

黄色ブドウ球菌におけるPILRリガンドの発現



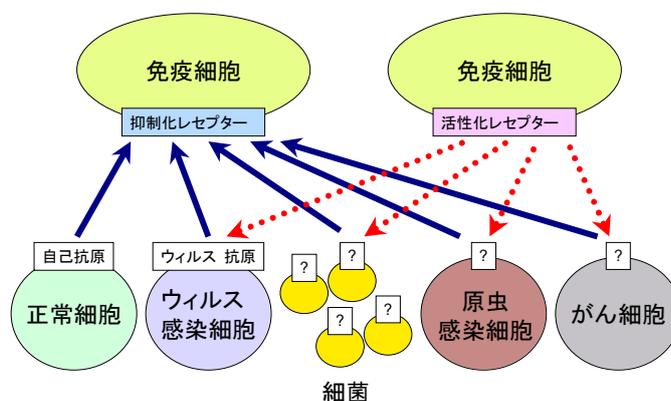
③ マラリア原虫によるペア型レセプターを介した新たな免疫逃避機構

ペア型レセプターがウイルス感染を制御する重要な分子であると言う当初の仮説に基づくと、ウイルスばかりでなく、原虫等の病原体も、免疫細胞の発現するペア型抑制化レセプターに対するリガンドを発現し、免疫応答を制御している可能性が考えられる。そこで、この仮説をウイルス以外の病原体に広げられるかどうかを検証するために、既存の 30 種類以上のペア型レセプターについて可溶性レセプターを作製し、それらのリガンドがマラリア原虫感染赤血球上に発現しているかどうかを解析した。その結果、そのうちの一つの可溶性抑制化レセプターでマラリア原虫感染赤血球が認識されることを明らかにした。さらに、細胞レベルで、抑制化レセプターが感染赤血球を認識できるかどうかを解析するために、抑制化レセプターの NFAT-GFP レポーター細胞を作製して、感染赤血球と共培養すると、レポーター細胞が活性化され GFP を発現することが明らかになった。以上より、ウイルスばかりでなく、原虫等の病原体もペア型レセプターのリガンドを獲得し、免疫応答を制御している可能性を初めて明らかにした。

5 自己評価:

本研究は、当初ウイルスを標的に研究を進め、新たなウイルスの免疫逃避機構等を解明したが(Shiratori et al. J. Immunol. 2005)、ウイルスばかりでなく、細菌や原虫そして癌細胞も、ペア型レセプターのリガンドを獲得することにより、病原体に対する免疫応答を制御している可能性が初めて明らかになった(下図)。本研究期間内に、これらの細菌や原虫の発現するリガンドの機能を解明することはできなかったが、それらの解明は、病原体に対する免疫応答を制御する上で重要な鍵となると考えられる。また、ペア型活性化レセプターに関しても、病原体を認識する活性化レセプターが、感染防御に重要な機能を担うかについて、今後明らかにする予定である。これらの研究により、ペア型レセプターとその病原体リガンドとの相互作用を制御することによる新たな感染防御法の開発が可能になると思われる。

ペア型レセプターによる病原体 認識



6 研究総括の見解:

本研究はNK細胞やマクロファージ等の自然免疫細胞が発現するペア型レセプターによる病原体認識を明らかにすることにより、病原体に対する宿主の感染抵抗性決定機構や病原体の宿主免疫逃避機構を明らかにすることを目的として行われた。その結果、まず新たなペア型レセプターとそのリガンド4種類をクローニングすることに成功した。さらにこれらレセプターとリガンドの解析により、黄色ブドウ球菌とマラリア原虫のペア型レセプター認識機構を明らかにした。これらの成果は当初の研究計画以上のものであり、関連研究領域に大きいインパクトを与えるものである。

7 主な論文等:

主要論文リスト(合計7件、*付論文は責任著者)

- 1.* Shiratori I, Yamaguchi M, Suzukawa M, Yamamoto K, Lanier LL, Saito T, Arase H. (2005) Down-Regulation of Basophil Function by Human CD200 and Human Herpesvirus-8 CD200. *J Immunol.* 175; 4441-4449.
2. Arase N, Takeuchi A, Unno M, Hirano S, Yokosuka T, Arase H, Saito T. (2005) Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8⁺ T cells. *Int Immunol.* 17; 1227-1237.
- 3.* Shiratori, I., Ogasawara, K., Saito, T., Lanier, L. L. and Arase, H. (2004) Activation of natural killer cells upon recognition of a novel CD99-like ligand by paired immunoglobulin-like type 2 receptor. *J. Exp. Med.* 199; 525-533.
4. Ohtsuka, M., Arase, H., Takeuchi, A., Yamasaki, S., Shiina, R., Suenaga, T., Sakurai, D., Yokosuka, T., Arase, N., Iwashima, M., Kitamura, T., Moriya, H., Saito, T. (2004) NFAM1, an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing molecule that regulates B cell development and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101; 8126-8131 (First two authors equally contributed).
- 5.* Ishikawa, S., Arase, N., Suenaga, T., Saito, Y., Noda, M., Kuriyama, T., Arase, H., Saito, T. (2004) Involvement of FcR γ in signal transduction of osteoclast-associated receptor (OSCAR). *Int. Immunol.* 16; 1019-1025.

招待講演(合計8回)

1. 荒瀬 尚 「NK細胞レセプターと微生物応答」生体防御学会シンポジウム 2003年7月
2. 荒瀬 尚 「自然免疫によるウイルス感染細胞認識機構」WAKO ワークショップ 2003年12月
3. 荒瀬 尚 「ペア型レセプターPILRによる自然免疫の活性化制御機構」炎症学会シンポジウム 2004年3月
4. Hisashi Arase 「Recognition of virus-infected cells by paired immune receptors」5th Awaji international forum on infection and immunity 2004年9月
5. 荒瀬 尚 「ペア型レセプターによる感染防御機構」阿蘇シンポジウム 2005年7月