

22. 細菌感染における損傷抗体の免疫認識機構

荒瀬 尚

大阪大学 微生物病研究所 免疫化学分野

Key words : 細菌感染, 免疫逃避, プロテアーゼ, 生体防御機構

緒言

免疫細胞は自己抗原を認識する様々な抑制化レセプターを発現することによって免疫細胞の自己応答性を抑制している。一方、ほとんどの抑制化レセプターには、非常に相同性の高い活性化レセプターが存在し、ペア型レセプターを形成している。我々は、今まで、PILR α 等の抑制化ペア型レセプターは、免疫応答の制御に重要な機能を担う一方¹⁻⁴⁾、ウイルス等の病原体の免疫逃避機構に利用されることを明らかにしてきた^{5,6)}。一方、ペア型活性化レセプターは自己抗原を認識しないが、それらの中には、ウイルス等の病原体を認識するものがあり、宿主病原体相互作用に重要な機能を担っていると考えられる⁷⁾。また、活性化ペア型レセプターの3'UTには抑制化レセプターの名残として Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) 配列が残存していることから、活性化ペア型レセプターは抑制化レセプターから進化したレセプターであると考えられるが^{8,9)}、多くの活性化ペア型レセプターの機能は明らかになっていない。

抗体は細菌感染防御に非常に重要な役割を担っているため、細菌の中には、抗体を破壊するプロテアーゼを産生することによって抗体から逃れる免疫逃避機構を持っているものがある。しかし、生体防御に重要な機能を担う抗体が破壊されることは、免疫システムにとって非常に危険な状態である。本研究では、活性化ペア型レセプターの一つであり、好中球や単球に発現している LILRA2 という今まで機能やリガンド分子が全く知られていない分子の解析を進めたところ、レジオネラ、肺炎球菌、インフルエンザ菌等の細菌の産生したプロテアーゼによって切断され損傷をうけた抗体を特異的に認識することが判明した。そこで、プロテアーゼによって切断された抗体を特異的に認識する LILRA2 を中心に、切断された抗体の検知システムの研究を行った¹⁰⁾。

方法および結果

細菌プロテアーゼで切断された抗体を認識する活性化ペア型レセプター LILRA2 の生体防御反応における機能を解明するために、LILRA2 の認識機構、感染患者サンプルの解析を行った。

1. 活性化ペア型レセプター LILRA2 による切断型抗体認識機構の解明

活性化レセプター LILRA2 の解析により、LILRA2 はマイコプラズマに感染した B 細胞を認識することが明らかになった。そこで、LILRA2 のリガンド分子を質量分析によって解析したところ、LILRA2 はマイコプラズマが産生するプロテアーゼで N 末が切断された抗体を認識することが明らかになった。さらに、LILRA2 の認識機構を詳細に解析することによって、LILRA2 は抗体重鎖の N 末が切られることによって露出した抗体の軽鎖を認識することが明らかになった。実際、LILRA2 は、全ての軽鎖を認識するのではなく、軽鎖の約 20 % の可変領域が認識されることが明らかになった。また、マイコプラズマだけでなく、レジオネラ、肺炎球菌、カンジダ・アルビカンス等も同様なプロテアーゼによって抗体を切断し、そのような抗体も LILRA2 によって認識されることが判明した。また、レジオネラが産生するプロテアーゼに関しては、HPLC で精製後、質量分析で解析することによって、Msp というプロテアーゼの同定に成功した。実際、Msp 欠損レジオネラでは、抗体が切断されず、LILRA2 にも認識されないことが判明した。

2. リガンドに対する活性化型 LILRA2 の免疫応答の解析

LILRA2 による切断された抗体の認識がどのように生体防御に関与しているかについて解析を進めた。まず、切断型抗体が LILRA2 を介して免疫細胞を活性化するかどうかを調べるために、LILRA2-GFP レポーター細胞の樹立を行った。その結果、切断型抗体は LILRA2 レポーター細胞を特異的に活性化した (図 1)。

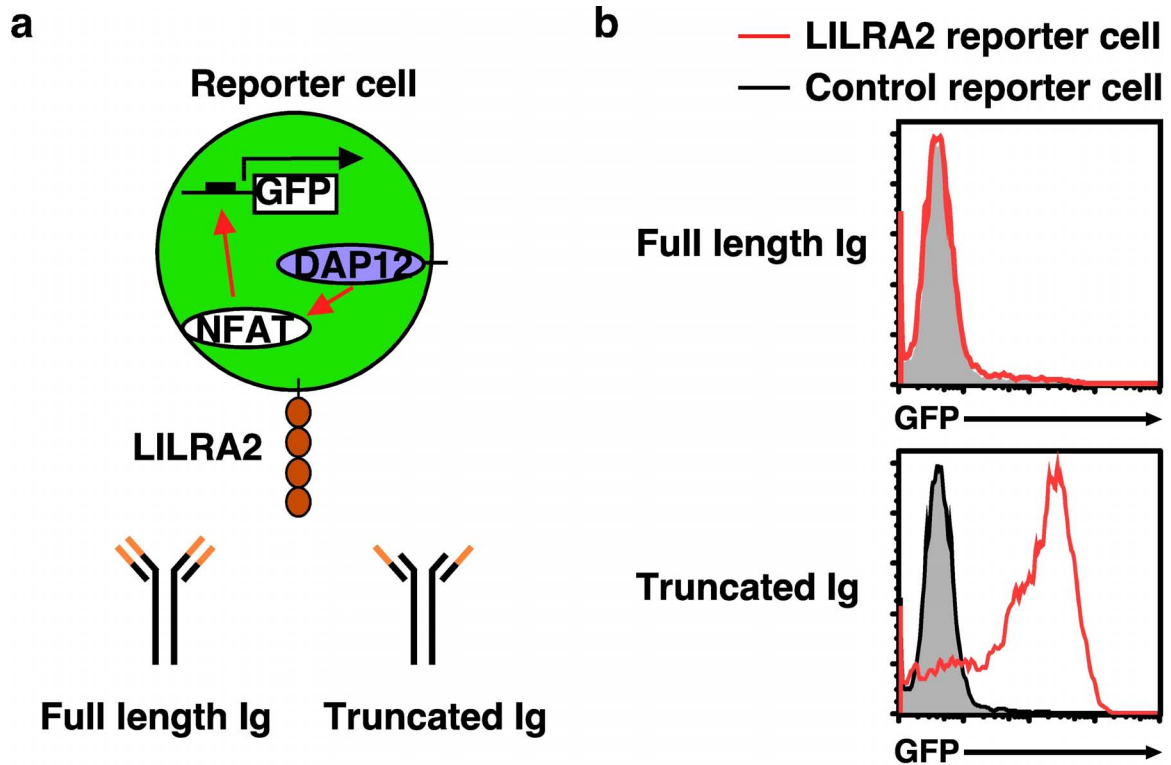


図 1. 切断型抗体による LILRA2 レポーター細胞の活性化

(a) NFAT-GFP レポーター細胞に LILRA2 を発現させ、切断型抗体で刺激し、GFP の発現を調べた。(b) LILRA2 レポーター細胞は、切断型抗体によって活性化され GFP を発現したが、正常の抗体によっては活性化しなかった。

さらに、レジオネラ感染における LILRA2 の機能を解析したところ、LILRA2 刺激によってレジオネラの増殖が顕著に抑制された。実際、マウスにレジオネラを感染させると抗体が切断され、切断された抗体は LILRA2 レポーター細胞を活性化した。以上より、LILRA2 は細菌によって切断された抗体を認識することによって感染防御に関与していると考えられた (図 2)。

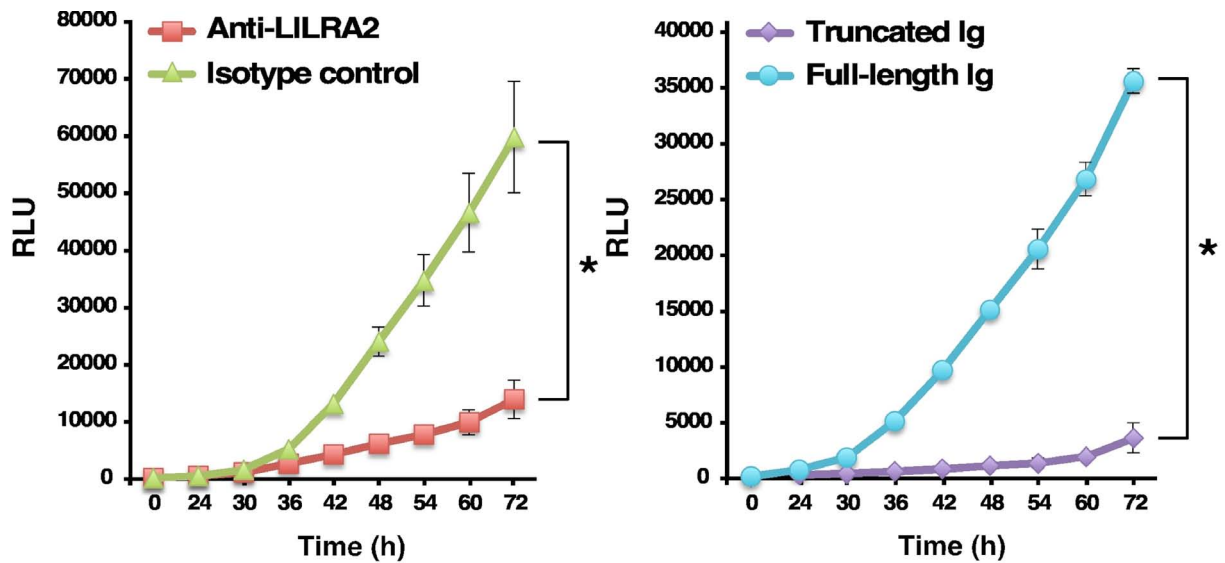


図2. LILRA2 刺激によるレジオネラの増殖抑制

抗 LILRA2 抗体 (左) やプロテアーゼで切断された抗体 (右) で単球を刺激するとレジオネラの増殖が顕著に阻害された (*P < 0.01)。

次に、抗体の切断がヒトの感染患者で認められるかどうかを調べるために、中耳炎や感染性粉瘤の膿汁を解析したところ、膿汁中に切断された抗体が検出された。さらに膿汁中の切断された抗体は、LILRA2 を活性化することが判明した。

考 察

細菌がプロテアーゼを産生して、抗体を破壊するメカニズムは以前から知られている。しかし、細菌のプロテアーゼによって破壊された抗体が、免疫細胞のどのような分子と相互作用し、免疫応答に影響を与えるかは全く知られていなかった。また、今まで報告されている抗体を切断する細菌プロテアーゼは主に抗体のヒンジ領域を切断するのに対し、LILRA2 は抗体の可変領域と定常領域の境目で切断された抗体を認識する。実際、本研究によって同定した Msp は今までに知られていた抗体を切断するプロテアーゼとは異なる部位で抗体を切断することが判明した。このように、LILRA2 は今までに知られていない全く新たな生体防御機構を担っており、本研究により、細菌による新たな免疫逃避機構のメカニズムや細菌に対する新たな生体防御機構が明らかになった (図 3¹⁰⁾。

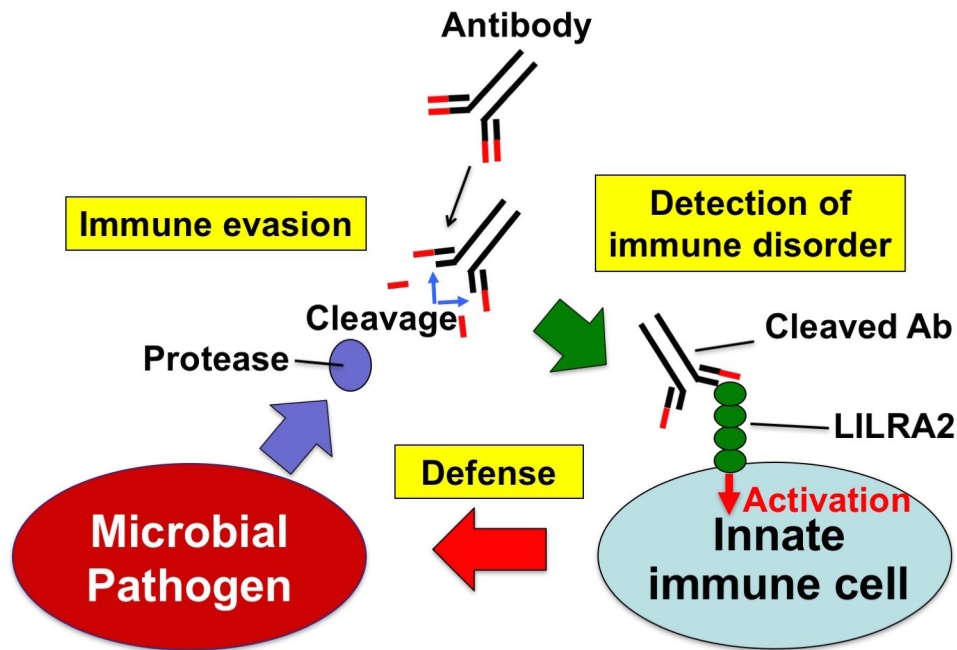


図3. LILRA2による新たな生体防御機構

活性化レセプター LILRA2 は、病原体が産生するプロテアーゼによって分解された抗体を認識することによって感染防御に関わっている。

細菌感染には抗生物質が非常に有用であるが、最近是多剤耐性菌等の抗生物質が無効な細菌感染が臨床的にも問題になっている。そのような細菌は単に抗生物質に対して耐性を獲得したばかりでなく、免疫応答からの逃避機構も獲得している可能性が考えられる。従って、細菌プロテアーゼによる免疫逃避機構や LILRA2 による切断型抗体の認識機構を解明することによって、将来的に抗体を切断する細菌プロテアーゼを阻害する薬剤の開発や細菌感染に対して切断型抗体を用いて LILRA2 を介する免疫細胞を活性化する新たな治療法の開発も可能になると考えられた。

また、LILRA2 には、アミノ酸変異を伴う SNP が認められ、LILRA2 の機能にも影響を与えることが判明した。従って、今後、感染患者における LILRA2 の SNP と感染症の重症度等との関連を解析することによって、ヒトにおける LILRA2 の機能が明らかになると共に、LILRA2 の型に最適な細菌感染の治療法も開発も可能になると考えられた。

文 献

- 1) Wang J, Shiratori I, Uehori J, Ikawa M, Arase H. Neutrophil infiltration during inflammation is regulated by PILR *a* via modulation of integrin activation. *Nat Immunol.* 2013; 14(1):34-40. doi: 10.1038/ni.2456. PMID: 2314277
- 2) Kohyama M, Matsuoka S, Shida K, Sugihara F, Aoshi T, Kishida K, Ishii KJ, Arase H. Monocyte infiltration into obese and fibrilized tissues is regulated by PILR *a*. *Eur J Immunol.* 2016; 46(5):1214-23. doi: 10.1002/eji.201545897. PMID: 26840635
- 3) 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 *a*. *Int Immunol.* 2015 ;27(6): 307-14. doi: 10.1093/intimm/dxv004. PMID: 25710489
- 4) Kuroki K, Wang J, Ose T, Yamaguchi M, Tabata S, Maita N, Nakamura S, Kajikawa M, Kogure A, Satoh T, Arase H, Maenaka K. Structural basis for simultaneous recognition of an O-glycan and its attached peptide of mucin family by immune receptor PILR *a*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 ;111(24):8877-82. doi: 10.1073/pnas.1324105111. PMID: 24889612
- 5) Satoh T, Arai J, Suenaga T, Wang J, Kogure A, Uehori J, Arase N, Shiratori I, Tanaka S, Kawaguchi Y, Spear PG, Lanier LL, Arase H. PILR *a* is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell.* 2008; 132(6):935-44. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.043. PMID: 18358807

- 6) Suenaga T, Satoh T, Somboonthum P, Kawaguchi Y, Mori Y, Arase H. Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(2): 866-71. doi: 10.1073/pnas.0913351107. PMID: 20080767
- 7) Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*. 2002; 296(5571):1323-6. PMID: 11950999
- 8) Arase H, Lanier LL. Specific recognition of virus-infected cells by paired NK receptors. *Rev Med Virol*. 2004; 14(2):83-93. PMID: 15027001
- 9) Hirayasu K, Arase H. Functional and genetic diversity of leukocyte immunoglobulin-like receptor and implication for disease associations. *J Hum Genet*. 2015 ;60(11):703-8. doi: 10.1038/jhg.2015.64. PMID: 26040207
- 10) Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nagai H, Nakamura Y, Katayama I, Colonna M, Arase H. LILRA2 is an innate immune sensor for microbially cleaved immunoglobulins. *Nature Microbiology* 2016 DOI:10.1038/nmicrobiol.2016.54