

200834011A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 反町典子

平成21年3月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 反町典子

平成21年3月

目次

I.	序文	3
II.	班員名簿	4
III.	総括研究報告書	
	HLA 受容体による疾患関連 HLA アリル認識と免疫細胞の機能制御機構の解析	6
	国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部 室長 反町 典子	
IV.	分担研究報告書	
1.	HLA-B27 の構造的分子特性の解析と免疫制御機構の解明	16
	九州大学生体防御医学研究所 順教授 前仲 勝実	
2.	自己免疫疾患および HLA 多型と調節性 T 細胞の分化、機能との関係	20
	国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部 部長 鈴木 春巳	
3.	疾患関連 HLA アリルを発現するヒト化型マウスの作製	24
	国立国際医療センター研究所 地域医療保健研究部 部長 高木 智	
4.	自己免疫疾患患者 HLA と臨床像の関連についての解析	28
	国立国際医療センター膠原病科 医長 伊藤 健司	
V.	研究成果の刊行に関する一覧表	33
VI.	研究成果の刊行物・別刷	36

I. 序文

難治性疾患では、長期化する治療による経済的負担と患者の QOL の低下は深刻な問題であり、その克服は急務です。特に、リウマチ膠原病をはじめとして種々の難病は、治療法が大きく進歩したものの対症療法にとどまり、原因はなお不明なものが多いのが実情です。対症療法でのステロイドの副作用も深刻な問題であり、新しい創薬ターゲットを同定することが新規治療法の開発には必須です。

難治性疾患には、免疫システムの異常が病態に寄与する免疫難病が数多く含まれ、疾患単位を越えた炎症病態の共通性として、ヒトにおける主要組織適合抗原(MHC)である HLA の特定の分子との高い相関が報告されています。これは、免疫難病の病態における HLA 多型の重要性を示すものであり、その分子基盤の解明と病因論の樹立は、疾患横断的な新しい診断、治療法の開発に非常に有益であると考えられます。従来、疾患関連 HLA 分子が結合する自己由来のペプチドを認識する自己反応性 T 細胞によって誘起される自己免疫応答が免疫難病の病因となる可能性が精力的に解析されてきましたが、未だに病因の理解には至っていません。私たちは、これまでの T 細胞によるペプチド認識という従来のドグマとは異なる着眼点からのアプローチが必要であると考え、近年次々と同定されてきた、TCR とは異なる新しい HLA 受容体による新しい免疫制御機構に焦点を当てて本研究を立案・遂行して参りました。HLA 受容体には細胞機能を正または負に制御する多くの分子が存在することから、種々の免疫細胞の機能が、疾患関連 HLA とその受容体によってどのように制御され、免疫難病の病態にどのような役割を果たすかを理解することにより、新しい治療標的候補分子を同定することを目的として研究を遂行しております。ここに研究事業 2 年目の成果をご報告申し上げます。これまでの 2 年間で、細胞機能制御における MHC の新たな機能を明らかにし、疾患関連 HLA の構造異常を明らかにできたことは、HLA 多型が寄与する免疫難病の病因理解に大きな意味をもつものと考えております。

研究遂行に御尽力くださいました分担研究者、研究協力者の先生方、御指導と御尽力をいただきました厚生労働省健康局疾病対策課の方々に深謝いたしますと共に、今後とも皆様の御指導御鞭撻のほどをよろしくお願い申し上げます。

平成 21 年 3 月

難治性疾患克服研究事業 「HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明」

主任研究者 反町 典子

II. 班員名簿

区分	氏名	所属
主任研究者	反町 典子	国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部 消化管疾患研究室
分担研究者	前仲 勝実	九州大学生体防御医学研究所 准教授
	高木 智	国立国際医療センター研究所 地域医療保健研究部
	鈴木 春巳	国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部
	伊藤 健司	国立国際医療センター 膠原病科
協力研究者	三森 明夫	国立国際医療センター 膠原病科
	土肥 多恵子	国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部
	大河内 仁志	国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部
	玉木 毅	国立国際医療センター 皮膚科
	武田 憲夫	国立国際医療センター 眼科
	山本 一彦	東京大学医学部アレルギーリウマチ内科

III. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服事業)

HLA 受容体による疾患関連 HLA アリル認識と免疫細胞の機能制御機構の解析

主任研究者 反町 典子 国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部 室長

研究要旨

難治性疾患には、免疫システムの異常が病態に寄与する免疫難病が数多く含まれ、疾患単位を越えた炎症病態の共通性として、ヒトにおける主要組織適合抗原(MHC)である HLA の特定の分子との高い相関が報告されている。これは、免疫難病の病態における MHC 多型の重要性を示すものであり、その分子基盤の解明と病因論の樹立は、疾患横断的な新しい診断、治療法の開発に非常に有益である。従来、疾患関連 MHC アリルによる自己由来のペプチド結合と自己反応性 T 細胞の活性化によって誘起される自己免疫応答が免疫難病の病因となる可能性が精力的に解析されてきたが、未だに病因の理解に至っていない。本研究では、これまでの T 細胞によるペプチド認識という従来のドグマにはとらわれずに、TCR とは異なる新しい MHC 受容体による免疫細胞の機能制御という視点から病態を解析し、新しい治療標的候補分子を提示することを目的とする。MHC 受容体はシスおよびトランスに MHC と相互作用をすることによって、ナチュラルキラー細胞、T 細胞をはじめ、自然免疫細胞を含む種々の免疫細胞の機能を制御している。本年度は、MHC クラス I がその受容体を介して感染炎症応答制御に重要な役割を果たしていることを明らかにし、実際に強直性脊椎炎に高い相関を示す HLA-B27 においては、その受容体である LILRB2 (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor B2) への結合異常が認められることを明らかにした。また、自己免疫疾患の病態に重要な役割を果たす制御性 T 細胞の分化に HLA 多型が与える影響を解析するための基盤的研究、ヒト疾患関連 HLA を有する免疫造血系細胞の再構築モデルマウスの作出、および自己免疫疾患の一つである重症筋無力症の治療への大量ガンマグロブリン療法の有効性の検討とその作用機序の解析を行った。これらの知見に基づいて、疾患関連 HLA とその受容体の相互作用によって、どのように免疫制御が攪乱され、免疫難病の病態にどのような役割を果たすかを最終年度に向けて明らかにできるものと期待している。また、臨床医との機能的な連携による基盤研究成果の臨床意義への変換を目的として、昨年度着手した自施設通院症例のデータベース化を進めた。これは、関節リウマチの病像、治療効果と副作用、合併症を分析し、そこに HLA 情報を加えることにより、HLA 多型が自己免疫疾患の発症、病態に与える影響を考察する上で有用なデータベースとなる。

分担研究者	前仲 勝実	九州大学生体防御医学研究所	准教授
	高木 智	国立国際医療センター研究所	地域医療保健研究部 部長
	鈴木 春巳	国立国際医療センター研究所	臨床病理研究部 部長
	伊藤 健司	国立国際医療センター	膠原病科 部長

A. 研究目的

難治性疾患は、現在根治的治療法が確立されておらず、長期化する治療による経済的負担と患者のQOLの低下は深刻な問題であり、その克服は急務である。難治性疾患には、免疫システムの異常が病態に寄与する免疫難病が数多く含まれ、その病態形成に、ヒト主要組織適合抗原であるHLAの特定の遺伝子多型が寄与することが、多くのゲノム疫学的解析から明らかにされている。多くの免疫難病には、複数の疾患感受性遺伝子と外的環境要因が関与するものの、疾患横断的に認められるHLA遺伝子との高い相関は、この分子の病態形成における重要性を示すものであり、その分子基盤の解明と病因論の樹立は、疾患横断的な新しい診断、治療法の開発や創薬ターゲットの同定に大変に有益である。

本研究では、免疫学の基盤的研究から得られた最新の知見をもとに、これまで精力的に解析されてきた疾患関連アリルによるペプチド結合とT細胞活性化というHLAの抗原提示機能とは異なる、新しいHLA受容体によるHLA認識を介した細胞制御機能に着目した。炎症応答の主役となる好中球、マクロファージ、樹状細胞、制御性T細胞、さらにはTh17細胞の機能に、HLA多型がどのように関与するかを、モデル動物、培養細胞株、患者末梢血を用いて解析し、免疫制御におけるHLAの新しい機能を見出すと同時に、疾患関連HLA分子の構造解析を通じて、疾患関連HLA分子が免疫応答制御の異常に関わる分子基盤を理解することにより、疾患関連HLA分子が免疫難病の病因病態に寄与するメカニズムを明らかにすることによって、新しい治療標的となりうる候補分子を同定することを目的として行った。

B. 研究方法

(1) MHCクラスIとその受容体による新規感染炎症応答の制御機構の解明

MHCクラスIと相関する疾患に対しては、MHCクラスIがどのような免疫応答制御に関与しているかを明らかにし、その分子機構を理解することが必要である。MHCクラスIによる新規免疫応答制御機構の分子基盤を明らかにするため、炎症性細胞に優先して発現するMHCクラスI受容体Ly49Q欠損マウスおよびその恒常的不活性型を導入したマウスを用いて、MHCクラスI受容体とMHCクラスIによる新規免疫応答制御機構の解明を行った。

Ly49Qは好中球、樹状細胞、マクロファージといった炎症性細胞にのみ発現し、MHCクラスIとシス配位で会合している。MHCクラスIとこのようなシス会合型受容体との相互作用が免疫応答制御にどのような役割を果たすかを明らかにする目的で、Ly49Q欠損マウスを樹立し、免疫応答を解析した。

感染免疫応答の解析には、DOTAPリボソームに取り込んだ非メチル化DNAであるCpGおよびLPS刺激、サイトメガロウイルス感染モデルを用いた。

炎症応答は酵母や大腸菌の死菌を用いた急性炎症モデルを用いてMHCクラスI受容体がどのように炎症制御に関わるかを解析した。

炎症性細胞の細胞応答の解析では、好中球、マクロファージ、樹状細胞、およびマクロファージ細胞株を用いて、サイトカイン産生、シグナル伝達、免疫組織学的解析、形態学的解析、フローサイトメトリーによる細胞表面分子の解析を用いて、MHCクラスI受容体が炎症性細胞の細胞機能を制御する分子機構について詳細な解析を行った。

MHC クラス I による細胞膜ドメインの制御にはコレラトキシン B サブユニットを用いた免疫組織学的解析を用いた。

ヒト HLA クラス I の会合分子の解析には、抗 HLA 抗体を用いた免疫沈降法およびその生化学的解析を、候補分子アプローチとして既知の HLA 受容体に対する抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。

(2) HLA-B27 の構造的分子特性の解析と免疫制御機構の解明

HLA が HLA 受容体を介して抗原提示以外の多くの細胞機能を制御していることが明らかになってきたことから、その制御異常によってさまざまな免疫制御異常が生じる可能性が強く示唆される。疾患関連 HLA において、HLA 受容体との会合に異常が生じる可能性について、強直性脊椎炎(ankylosing spondylitis, AS)において強い相関を示す HLA-B27 に焦点を当て、構造解析に基づく分子特性の理解と、機能解析を進めている。

強直性脊椎炎患者の約 90% が HLA-B27 陽性を示し、さらに HLA-B27 遺伝子導入ラット及びマウスが AS 様症状を示すことから、HLA-B27 が病因遺伝子として強く示唆されてきたが、発症機序の解明には至っていない。HLA クラス I と結合することが報告されている抑制性受容体、LILRB1 および LILRB2 と HLA-B27 の相互作用において、構造と機能の両面から解析を行った。

HLA-B27 ホモ二量体 (B27₂) 組換え蛋白質の調製は、細胞外ドメインを大腸菌で封入体として大量発現させ、希釈法による巻き戻しにより行った。LILR と B27₂ の結合が、提示するペプチド依存性であるのかを検証するために、14

種類の B27₂ ペプチドを用いて巻き戻しを行った。LILR 組換え蛋白質の調製については、LILRB1 および LILRB2 の細胞外ドメインのうち N 末端側 HLA 結合部位である 2 つの Ig 様ドメインを大腸菌で封入体を発現させ、HLA と同様に巻き戻しにより蛋白質を作製した。

B27₂ を認識する LILR 分子の同定および、その結合が B27₂ に提示されるペプチドに依存性であるか否かの検討には、表面プラズマ共鳴 (SPR) による分子レベルの相互作用解析を用いた。

(3) HLA 多型と調節性 T 細胞の分化および機能との関連

MHC クラス II と相関する疾患については、T 細胞の分化と機能、特にその細胞数や活性が自己免疫疾患に密接に関連することが報告されており、T 細胞応答を負に制御している制御性 T 細胞(Treg)に焦点を当てて解析を進めている。HLA とその受容体が抗原提示細胞の機能を制御すること、Treg が胸腺内でアゴニスト選択を受けて分化誘導されることから、HLA 多型が Treg の分化に影響を及ぼす可能性が考えられる。Treg 分化における HLA 多型の影響を解析する目的で、Treg の分化、機能制御の分子基盤を解析した。T 細胞分化に重要な役割を果たす RhoH および Treg で発現が抑制される新規遺伝子 ISC4 のノックアウトマウスを用いて、Treg 細胞の分化、増殖、機能について解析を行った。T 細胞の解析は、蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリー解析によって行った。Treg は CD4 および FoxP3 を指標としてフローサイトメトリーによって同定し、Treg の機能は、CSFE 希釈法を用いたコンベンショナル T 細胞の増殖抑制活性として検定した。

(4) 疾患関連 HLA アリルを発見するヒト化型マウスの作製

疾患関連 HLA アリルの病態への寄与を解析する際に、既に疾患を発症している患者および患者検体での解析からは、その分子機構や病態形成初期において標的となる細胞、固体レベルでの免疫系に及ぼす影響等についての検討は非常に困難であるため、疾患関連アリルを有するヒト造血幹細胞を用いてヒト免疫システムを再構築したモデルマウスが必要である。このようなマウスは、発症前および病態形成初期における疾患関連 HLA アリルの免疫応答への影響を、細胞増殖、抗体産生、サイトカイン産生および種々の炎症・感染モデルなどを用いて検討する上で極めて有用である。そのために、ヒト免疫系モデルマウスの開発を進めている。ヒト臍帯血幹細胞を、全てのリンパ球を欠損した免疫不全を呈する RAG2^{lyc} 欠損マウスに移植し、ヒト免疫担当細胞による免疫系の再構築を行った。移植の際のドナー細胞の投与方法、ドナーヒト臍帯血幹細胞への各種遺伝子導入処置の方法と効率、再構築条件とその効率の検討を行った。

(5) 自己免疫疾患患者 HLA と臨床像の関連についての解析

HLA の免疫制御機能という新しい視点で免疫攪乱現象を、自己免疫疾患のモデル動物の 1 つである実験的重症筋無力症マウスを用い、発病期と治療反応期での免疫担当細胞群の機能および動態、サイトカイン産生を解析した。また、重症筋無力症の治療法として有望な大量ガンマグロブリン療法における病理病態と MHC クラス I 受容体との機能的関連を解析した。

また、疾患関連 HLA を保有する自己免疫疾患患者の病態、合併症が疾患関連 HLA を保有

しない患者群と差異を示すかを検討するために必要となるため、当科の関節リウマチ通院者 430 人の詳細な診療データベースを作成した。このデータベースから得られる匿名化された情報は、同施設内の分担研究者と共有され、それぞれの研究結果の解析にも用いられる有用な基礎資料を提供した。

(倫理的配慮)

データベース作成時の患者へのインタビュー、および血液検体収集を含む本研究は、国立国際医療センターの倫理審査委員会で承認された。この申請内容を遵守する。データベースに患者の HLA 情報を追加し、解析を行う本研究は、当センター遺伝子解析倫理審査委員会にて承認された。この申請内容を遵守する。

C. 研究結果

(1) MHC クラス I による新規免疫応答制御機構の解明

MHC クラス I とシス会合する受容体 Ly49Q の欠損マウスを用いて、Ly49Q が TLR9 を介した I 型インターフェロン (IFN) の産生に必須の役割を果たすことを明らかにした。Ly49Q 欠損マウスでは、CpG 刺激、サイトメガロウイルス感染いずれにおいても I 型 IFN と IL-12p40 の産生が著しく減弱し、ウイルス排除の効率も低下することから、MHC クラス I とその受容体の機能が正常に働かないことによって、感染免疫応答が阻害されることが示された。MHC クラス I と Ly49Q が TLR9 の機能に関与することをさらに抗体を用いて証明した。MHC クラス I または Ly49Q に対する抗体を用いることにより、TLR9 によって誘導される I 型 IFN 産生をほぼ完全に抑制できることを報告した。こ

のようなMHCクラスIとLy49QによるTLR9の機能制御は、樹状細胞のみならず、マクロファージにおいても同様に認められた。

MHCクラスIとLy49QによるTLR9の機能制御の分子機序を解析した結果、Ly49QはTLR9とそのリガンドであるCpGとともにエンドソームに共局在し、TLR9/CpGのエンドソームからライソソームへの輸送制御と、TLR9シグナルに重要な役割を果たす管状エンドライソソームの形成、維持に重要であることを見出した。Ly49QはMHCクラスIとともにエンドソーム/ライソソームへと輸送され、その際に細胞膜シグナル伝達ドメインである脂質ラフトの輸送を制御することも明らかにした。MHCクラスIとLy49Qが制御する脂質ラフト上には活性化MAPキナーゼをはじめとして種々のシグナル伝達分子が会合しており、MHCクラスIとLy49Qの相互作用によって、これらのシグナル伝達分子の活性化の時間経過が制御されていることも見出した。さらに、この脂質ラフトの取り込みと輸送は、ITIM依存的なメカニズムで制御されていることを明らかにした。

細胞における脂質ラフトの輸送と再配置は細胞遊走、サイトカイン産生をはじめとした様々な細胞機能に必須の役割を果たすことが報告されている。Ly49Q欠損マウスでは、好中球の炎症部位への遊走、ケモカインに対する細胞極性形成、マクロファージのTLR9によるサイトカイン産生が低下しており、さらに樹状細胞においてTLR刺激後速やかに細胞死が誘導されることを見出した。これらの結果は、MHCクラスIとその受容体が、抗原提示のみならず、細胞機能を多岐にわたって制御していることを示すものである。

ヒトHLA受容体を網羅的に解析するために、HLAに対する抗体で免疫沈降および生化学的解析を行い、細胞表面上でHLAが多くのタンパク質と会合していることを見出し、その同定を試みている。同時に、細胞膜ラフトの制御に関わるヒトHLA受容体を同定するために、候補分子アプローチで同様の局在分布を示す分子の検索を行い、いくつかの候補分子を同定した。これらの分子について、上記で明らかになったHLAの新規免疫制御機能について解析を進めると同時に、疾患関連HLAとコントロールHLAとの間で免疫制御機能の比較を進める。

(2) HLA-B27の構造的分子特性の解析と免疫制御機構の解明

HLA-B27を $\beta 2m$ のない状態で巻き戻した場合、他のHLAと異なり、 $\beta 2m$ フリーのB27₂が優先的に形成されたことから、B27₂形態が分子的に最も安定なものであることが強く示唆された。LILRとB27₂との相互作用を検証した結果、B27₂はLILRB2のみに結合を示し、LILRB1に対しては結合を示さなかった。さらに、B27₂を作成する際に用いたペプチドの種類により結合の強さに数倍程度の差($K_d = 20\mu M \sim 100\mu M$)が見られた。最も強い結合を示したペプチドはEBウイルス由来のもので、自己ペプチドの平均に対して3倍程度強く結合した。この結果は、B27₂がペプチド依存的にLILRB2との結合を調節できることを示唆し、これまでに提唱されてきたウイルスや細菌感染によるAS発症との関わりが非自己ペプチドに由来する可能性が考えられた。他方、LILRB2を固定化した場合、B27₂が非常に強く結合することを確認し、2量体形成によるavidityの増強効果が認められた。これは2量体に独立の

LILRB2 結合部位が存在する可能性を強く示唆するものである。

(3) HLA 多型と調節性 T 細胞の分化および機能との関連

RhoH 欠損マウスでは胸腺細胞の著しい萎縮が認められ、特に CD4 陽性 CD8 陽性の未熟胸腺細胞数が 1/3-1/5 程度まで減少していた。末梢の脾臓、リンパ節においても成熟 CD4 T 細胞、CD8 T 細胞の数は著明に減少していたが、B 細胞の数は変らなかつた。この欠損マウスを用いて正の選択、負の選択、系列運命決定における RhoH の機能を検討した結果、RhoH 欠損マウスではβ選択、正の選択、負の選択のいずれにおいても減弱していることが明らかとなった。しかしながら、末梢および胸腺における Treg の分化は抑制されていなかった。また、Treg と同様にアゴニスト選択を受ける CD8aa 型 IEL においても分化の阻害は見られなかった。従って、RhoH はコンベンショナルな T 細胞の分化には必須であるが、Treg の分化には必要ないことから、コンベンショナル T 細胞と Treg は異なる分化制御を受けていることが明らかとなった。これはアゴニスト選択によって分化する Treg の分化制御を制御する上で、コンベンショナルな T 細胞分化に影響せずに Treg 分化を制御することができる標的分子が存在する可能性を提示した点において、重要な知見である。

ISC4 は近年 Treg において発現が減少する遺伝子であることが報告されたため、ISC4 欠損マウスを用いて Treg 分化を解析した。ISC4 欠損マウスでは Treg の分化が抑制されていた。コンベンショナル T 細胞においても、β選択は影響を受けなかったが、正の選択が著しく阻害されていた。

(4) 疾患関連 HLA アリルを発現するヒト化型マウスの作製

レシピエントへの投与時期及び投与方法によるドナー細胞の生着率の違いを、マウス同種移植系を用いて検討した。骨髄腔内移植群では、ドナー細胞数を 20% 程度まで減らした場合でも選色のないキメラ率が得られ、リンパ球コンパートメントの再構築が達成された。新生仔肝臓内への移入においても十分なキメラ率の達成とリンパ球コンパートメントの再構築が確認された。

ヒト臍帯血由来造血幹細胞を RAG/γc 重複欠損免疫不全マウスへ移植し、どの移植経路及び移植時期を採用することで効率よくヒト細胞による免疫系再構築が達成できるかを検討した。ヒト臍帯血造血幹細胞をトロンボポイエチン (thrombopoietin: TPO)、幹細胞因子 (stem cell factor: SCF)、Flt-3 リガンド存在下に数時間から一晩培養し、低線量の放射線 (350Gy) を照射した RAG2/γc 欠損免疫不全マウスに経静脈的に移入したが、十分なヒト血液系細胞の生着はまだ達成できていない。新生仔肝臓内への移植、成体骨髄腔内への移植について検討を進めているところである。

一方、ヒト臍帯血由来造血幹細胞の生着能力を増強させることにより、高効率にヒト免疫システムを再構築したモデルマウスの作成が可能になると考えられる。造血幹細胞で強く発現し、造血幹細胞の増加や造血能亢進に関わる細胞内アダプター蛋白質 Lnk/SH2B3 のドミナントネガティブ変異体をデザインすることにより、ヒト造血幹細胞の増加および造血能亢進を試みた。また、マウスにおけるヒト造血系のより効率の良い再構築系の樹立を目的として、多量体形成に重要となるアミノ末端側はヒト由来、カルボ

キシル末端側はマウス由来であるキメラ変異体を作製した。これらの変異体発現細胞を免疫不全マウスへ移植し、経時的に末梢血を採取し、ヒト前駆細胞由来の成熟血液細胞の産生をフローサイトメトリ解析により検出し、造血幹細胞の造血能の亢進が誘導できるかどうかについて評価を進めている。

(5) 自己免疫疾患患者 HLA と臨床像の関連についての解析

MHC クラス I による抗体で炎症制御が可能かどうか、また、他の機能抑制型受容体（抑制性レセプター）によって免疫応答を修飾、改変できるかどうかの検討に着手した。自己免疫疾患の一つである重症筋無力症のモデルマウスを用いて、大量免疫グロブリン投与が有効であることを確認し、免疫グロブリンを介した Fc γ RIIB によって MHC クラス I 受容体の機能がどのように修飾されるかについての検討準備を行った。実験的重症筋無力症モデルマウスの治療過程において HLA に対する抗体および抑制性 Fc 受容体による抑制効果を大量免疫グロブリンを投与し、コントロール治療群と比較し、有意な歩行機能の回復を確認した。この実験系を用いて MHC 受容体による免疫制御機構への大量ガンマグロブリン投与の影響を解析する予備実験を開始した。

症例データベース解析では、関節リウマチ症例において、生物製剤の効果と継続率、慢性下気道病変の合併症および非定型抗酸菌症の検出率について集計および考察を行った。今後これらのデータベースを基に、HLA 多型との関連を詳細に解析していく。

D. 考察

本年度の研究で、MHC クラス I とその受容体が、細胞膜のシグナル伝達ドメインである脂質ラフトの輸送に関わることを明らかにした。脂質ラフトは、さまざまな受容体を介したシグナル伝達をはじめとして、細胞遊走や細胞接着、細胞死、貪食など、幅広い細胞機能の制御に関わっていることから、MHC クラス I とその受容体が抗原提示以外で多岐にわたる細胞機能に影響を与えうることが示された。とりわけ MHC クラス I とその受容体が TLR9 の機能を抑制し、サイトカイン産生、感染微生物の生体からの排除に重要な役割を果たしているということは、MHC クラス I とその受容体の機能異常によって、感染応答が遅延し、感染の重篤化につながる可能性が強く示唆され、こうした免疫制御異常による感染炎症応答の慢性化が自己免疫疾患の発症に関与する可能性が考えられた。

強直性脊椎炎と強い相関を示す HLA-B27 が、MHC クラス I 受容体との結合親和性に異常をきたすという知見は、疾患関連 HLA がその多型に起因する構造異常によって受容体との結合親和性に異常をきたし、それによって細胞機能に多岐にわたって影響を及ぼしうることを強く示唆するものであり、このような異常が疾患発症につながる可能性が考えられた。

MHC クラス I とその受容体の機能を阻害することにより、好中球の浸潤や自然免疫細胞のサイトカイン産生が抑制できること、さらには感染応答における TLR シグナルにおいても、MHC クラス I またはその受容体に対する抗体が有効であるという知見は、受容体そのものまたは受容体のシグナル関連分子の中に治療標的としての候補分子が存在する可能性が強く示唆

され、今後の研究に非常に重要な方向性を与えるものである。

今後特定の HLA 多型を有する群とコントロール群の比較、疾患関連 HLA を発現するヒト化型マウスを用いることによって HLA による免疫制御異常の分子機構とそれに関わる機能分子を明らかにできることが期待される。また、疾患関連 HLA を保有する自己免疫疾患患者の病態、合併症が疾患関連 HLA を保有しない患者群と差異を示すかを検討するために有用な、自施設通院症例のデータベースがさらに充実していくことにより、HLA 多型と病態との相関をさらに詳細に解析するために有用な情報の提供が可能になりつつあることは高く評価される。

E. 結論

- ① MHC クラス I とその受容体 Ly49Q の相互作用が、細胞機能の根幹である脂質ラフトの輸送制御を行っていることを見出した。脂質ラフトは細胞のシグナル伝達の場合として、さまざまな細胞機能に関わっており、好中球の炎症組織への浸潤、抗原提示細胞における TLR シグナルの制御とサイトカイン産生、樹状細胞の生存シグナルに MHC クラス I とその受容体が重要な役割を果たすことを明らかにした。これは MHC クラス I の新規免疫制御機構であり、MHC が抗原提示以外で免疫応答制御に多岐にわたって影響を及ぼしていることを示すものである。
- ② MHC クラス I とその受容体 Ly49Q の相互作用を阻害することにより、TLR9 を介したサイトカイン産生を抑制できることから、治療標的としての可能性を見出した。
- ③ 強直性脊椎炎の関連 HLA である HLA-B27 の構造解析によって、この分子が抑制性

HLA 受容体との結合に異常をきたすことを見出した。①の知見と考え合わせ、このような疾患関連 HLA と HLA 受容体との結合異常によって、免疫制御異常が実際に生じうることを実験的に証明し、強直性脊椎炎の病態にどのような役割を果たしているかを今後明らかにしていく。

- ④ コンベンショナル T 細胞と Treg は異なる分化制御を受けていることを明らかにした。コンベンショナルな T 細胞分化に影響せずに Treg 分化を制御することができる標的分子が存在することを示す重要な知見である。
- ⑤ 自施設通院症例のデータベースを作成し、疾患関連 HLA と自己免疫疾患患者の病態および合併症について詳細な再解析を行った。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表を参照

2. 学会発表

1. Yoshizaki M., Tazawa A., Kasumi E., Sasawatari S., Dohi T., Toyama-Sorimachi, N.: A crucial role of Ly49Q in TLR9-triggering cytokine production. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 12 月 1-3 日, 2008, 京都
2. Kasumi E., Tazawa A., Yoshizaki M., Sasawatari S., Dohi T., Toyama-Sorimachi, N.: Regulation of TLR4 signaling by an inhibitory receptor, Ly49Q. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 12 月 1-3 日, 2008, 京都

3. Sasawatari S., Tazawa A., Yoshizaki M., Dohi T., Inaba K., Toyama-Sorimachi, N.: Ly14Q is crucial for regulation of plasmacytoid dendritic cell survival. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 12月1-3日, 2008, 京都
4. Kawashima R., Kawamura Y., Toyama-Sorimachi N., Dohi T.: IL-13 disrupts tight junction in the intestinal epithelial cells by modulating expression of ZO-1, occluding and claudin-2. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 12月1-3日, 2008, 京都

その他それぞれの分担研究者の項目を参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

【特許の取得】

i. 申請中

発明者 白井睦訓、鈴木春巳他 権利者 山口大学「新規T細胞機能遺伝子探索技術の開発とそれを利用した新規T細胞分化遺伝子」

IV. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

(難治性疾患克服事業)

HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明 分担研究報告書

HLA-B27 の構造的分子特性の解析と免疫制御機構の解明

分担研究者 前仲勝実 九州大学生体防御医学研究所 准教授

研究要旨

強直性脊椎炎(ankylosing spondylitis, AS)は、HLA-B27 と非常に高い相関を示し、HLA 関連疾患の代表例である。しかし、その疾患発症の作用機序については諸説あり、未だ解明に至らず、治療に向けた研究開発が進んでいない。我々は、近年明らかにされてきた HLA-B27 分子の特有の性質である、軽鎖の無いホモ 2 量体(B27₂)形成について着目した。軽鎖を含まない HLA 分子については、我々はこれまでに広く免疫系細胞に発現する HLA 受容体 LILR(Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors)群との認識機構について、構造と機能の両面から蛋白質レベルで解析を進めきた。そこで、本年度は B27₂ と LILR 群との相互作用解析を進めた。その結果、B27₂ 分子は抑制型 LILR である LILRB2 に特異的に強く結合し、B27₂ 分子を作製する際に加えるペプチドにより親和性が異なる可能性があることがわかった。この結果は何らかのペプチドが B27₂ 分子の形態を調整し、抗原提示細胞に主に発現する LILRB2 との結合を変えることにより AS の発症に関わる可能性を示唆するものである。

A.研究目的

ヒトHLAは、細菌やウイルス感染の際に、それら微生物由来の外來ペプチドを結合した状態で細胞表面に提示することにより、特異的に認識するT細胞による免疫応答を誘導し、感染を食い止める。他方、自己免疫疾患では、そのHLA分子による調整が崩れ、自己分子を攻撃することになる。このようにHLAは免疫応答の調節に重要な分子であり、疾患に直接関連するものである。数多いHLA関連疾患の中でも、HLA-B27

は疾患との著しく強い相関を示す代表例であり、リウマチ性疾患の一つである強直性脊椎炎(ankylosing spondylitis, AS)患者の約90%がHLA-B27陽性を示す。さらに、HLA-B27遺伝子導入ラット及びマウスがAS様症状を示すことから、HLA-B27が病因遺伝子として強く示唆されてきた。これまでにASの発症機序とB27との関連については精力的な研究が進められてきたが、依然複数の仮説(分子相同性説、関節炎原因ペプチド説、細菌侵入説など)が入り乱れ

ている状況である。HLA-B27はHLAクラスI分子であり、通常は重鎖($\alpha 1\cdot 3$ ドメイン)、軽鎖 $\beta 2$ ミクログロブリン($\beta 2m$)とペプチドからなるヘテロトラимер構造を持つ。しかし、HLA-B27の場合、軽鎖 $\beta 2m$ を伴わずに重鎖同士がフリーのシステイン残基(Cys67)を介してホモ二量体(B27₂)を形成する傾向が強くあり、それが疾患の発症に関与するという説が有力となってきた。実際にASモデル動物・患者検体でB27₂の存在が検出されること、およびCys67に変異を加えると動物モデルではAS様の症状を示さないなどB27₂仮説を支持する有力な知見は得られている。しかし、発症機序の解明には至っていない。

広く免疫系細胞に発現するLILR(Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors)群は10種類程度のメンバーが存在する細胞表面受容体である。LILR群の中でHLAクラスI分子と結合するLILRB1とLILRB2は抑制型受容体であり、正常にHLAを発現している細胞に対しては免疫応答を抑制すると考えられている。これまでに我々はLILR群のHLA認識機構について蛋白質科学的手法を用いて組換え蛋白質を作製し、網羅的に機能・構造解析を進めてきた。その結果、LILRB2はLILRB1が認識しない $\beta 2m$ フリーのクラスIに対して結合することがわかった。LILRB2とHLA-Gとの複合体の結晶構造から、LILRB2はLILRB1と同様にHLAクラスIの $\beta 2m\cdot\alpha 3$ ドメイン両方を認識するが、より $\alpha 3$ ドメインを広く認識しており、この認識の違いが $\beta 2m$ に依存の違いになっていることが示唆された。そこで、HLA-B27の $\beta 2m$ フリーのホモ二量体に対してLILR群がどのような結合特異性を示すのかを解析する。同時にHLA-B27ホモ二量体の形成・安定性を検討することにより、

AS発症メカニズムの解明につなげ、治療への基盤作りを行うことを目的とする。

B.研究方法

HLA-B27ホモ二量体(B27₂)組換え蛋白質の調製は、細胞外ドメインを大腸菌で封入体として大量発現させ、希釈法による巻き戻しにより行った。LILRとB27₂の結合が、提示するペプチド依存性であるのかを検証するために、これまでにHLA-B27に結合するとの報告がある14種類のB27₂ペプチド(自己由来だけではなく、非自己由来ペプチドも含む)を用いて巻き戻しを行った。他方、LILR組換え蛋白質の調製については、LILRB1およびLILRB2の細胞外ドメインのうちN末端側HLA結合部位である2つのIg様ドメインを大腸菌で封入体を発現させ、HLAと同様に巻き戻しにより蛋白質を作製した。いずれの蛋白質もI型膜タンパク質であるので、膜貫通ドメイン側にあたるC末端側にビオチンタグを付加する相互作用解析用コンストラクトも作製した。

上記のように調製した蛋白質を用いてB27₂を認識するLILR分子の同定および、その結合がB27₂に提示されるペプチドに依存性であるか否かの検討を進めるために表面プラズマ共鳴(SPR)による分子レベルの相互作用解析を行った。チップへの固定化にはビオチンタグの付加された組換え蛋白質を用いてステレプトアビジンを用いて行い、これにより、細胞膜表面に存在する状態に近い条件を再現した。

C.研究結果

HLA-B27を軽鎖である $\beta 2m$ のない状態で巻き戻した場合、他のHLAと異なり、 $\beta 2m$ フリーのB27₂が優先的に形成された。おそらく

B27₂ 形態が分子的に最も安定なものであることを強く示唆するものである。

次に、LILR と B27₂ との相互作用を検証するために、B27₂ をチップに固定化し、LILR を流して SPR 解析を行った。その結果、B27₂ は LILRB2 のみに結合を示し、LILRB1 に対しては結合を示さなかった。また、B27₂ を作成する際に用いたペプチドの種類により結合の強さに数倍程度の差 (Kd = 20 μ M~100 μ M) が見られた。最も強い結合を示したペプチドは EB ウイルス由来のもので、自己ペプチドの平均に対して 3 倍程度強く結合した。この結果は、B27₂ がペプチド依存的に LILRB2 との結合を調節できることを示唆し、これまでに提唱されてきたウイルスや細菌感染による AS 発症との関わりが非自己ペプチドに由来する可能性が考えられた。

他方、LILRB2 を固定化した場合、B27₂ が非常に強く結合することを確認し、2 量体形成による avidity 効果 (2 量体に独立した LILRB2 結合部位が存在する) が見られた。 β 2m を会合した状態であるが、同じく 2 量体を形成する HLA-G で見られる avidity 効果と似たものであると考えられる。

D. 考察と今後の方針

B27₂ 分子と LILRB2 との結合がペプチドに依存することはさらなる詳細な実験の検証が必要であるものの、AS 発症機序に新たな視点を加える結果と考えられる。B27₂ 分子と LILRB2 とのペプチド依存的相互作用の分子機構を明らかにすることが AS 発症の真の要因を同定するには重要となる。そこで、今後は多種類のペプチドを用いて巻き戻した B27₂ に対する LILRB2 の分子認識について立体構造情報を得

るために、LILRB2 の ¹⁵N ラベル体を作製し、NMR 解析から B27₂ 結合様式を推定する。この構造基盤を基に B27₂ と LILRB2 との相互作用を阻害できる薬物設計のターゲット部位を同定することを目指す。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Association of LILRA2 (ILT1, LIR7) splice site polymorphism with systemic lupus erythematosus and microscopic polyangiitis. Mamegano K, Kuroki K, Miyashita R, Kusaoi M, Kobayashi S, Matsuta K, Maenaka K, Colonna M, Ozaki S, Hashimoto H, Takasaki Y, Tokunaga K, Tsuchiya N. *Genes Immun.* 2008 Apr;9(3):214-23.

Reciprocal recognition of an HLA-Cw4-restricted HIV-1 gp120 epitope by CD8+ T cells and NK cells. Thananchai H, Makadzange T, Maenaka K, Kuroki K, Peng Y, Conlon C, Rowland-Jones S, Dong T. *AIDS*, 2009 Jan 14;23 (2), 189-193.

Homogeneous sugar modification improves crystallization of measles virus hemagglutinin. Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, Kohda D, Yanagi Y, Maenaka K. *J Virol Methods*, 2008 Apr, 149 (1), 171-174.

Biophysical characterization of O-glycosylated CD99 recognition by paired Ig-like type 2 receptors. Tabata S, Kuroki K, Wang J, Kajikawa M, Shiratori I, Kohda D, Arase H, Maenaka K. *J Biol Chem*,

2008 Apr 4;283 (14), 8893-8901.

Serotriflin, a CRISP family protein with binding affinity for small serum protein-2 in snake serum.

Aoki N, Sakiyama A, Kuroki K, Maenaka K, Kohda D, Deshimaru M, Terada S. **Biochim Biophys Acta**, 2008 Apr, 1784 (4), 621-628

2.学会発表

黒木喜美子、福永裕子、白石充典、廣瀬薫、Kollenberger Simon、Giles Joanna、Bowness Paul、前仲勝実 HLA-B27 ホモ二量体と LILR 群の分子認識機構 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008.12 京都

黒木喜美子、福永裕子、白石充典、廣瀬薫、Kollenberger Simon、Giles Joanna、Bowness Paul、前仲勝実 Molecular basis for disulfide-bonded beta 2 microglobulin-free HLA-B27 homodimer recognition by LILRs 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 2008.12 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他