

200936004A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 反町典子

平成 22 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 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 反町典子

平成 22 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 -----	5
	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 -----	18
	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 -----	22
	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 -----	27
	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 -----	31
	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 -----	36
VI.	研究成果の刊行物・別刷 -----	40

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。対処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 3 年目の成果をご報告申し上げます。これまでの 3 年間で、感染炎症応答における自然免疫細胞の機能制御において、MHC の新たな機能を明らかにすることができ、また疾患関連 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 22 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した。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、そのメカニズムとして細胞におけるシグナル伝達の場の構築を MHC クラス I が制御していることを見出した。また、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見出したことから、その構造的基盤の解明に向けて LILRB2-HLA-B27 複合体の結晶化を試みる一方で、LILRB2 の変異体解析および NMR 解析を進めた。さらに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を引き続き行った。ヒト免疫担当細胞群を再構築したモデルマウス作製は、ヒト細胞間相互作用による個体免疫応答やその破綻機構の解析に大変強力な材料となるが、国際的にも十分なヒト免疫応答を再現するモデル動物実験系の確立にはいたっておらず困難な課題として残されたままである。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、自施設通院症例のデータベース化を進めた。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 情報を加えることで、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ための基礎資料として有用なデータベースが構築されつつある。

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 医長

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。特に自己免疫疾患の治療が、副作用の強いステロイド薬にとどまっていることが、患者のQOLの低下の原因になっている一方、現在の臨床研究の主な関心が、継続投与を要し、かつ高価な生物製剤の開発に向けられていることは、医療経済の問題を引き起こすと危惧される。従って、病因解明に向けた研究の取り組みは、長期的展望においてこれらの問題を解決するための必須の方策である。

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、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、炎症応答の主役となる好中球、マクロファージ、樹状細胞、調節性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、疾患関連HLA分子が免疫応答制御に果たす役割とその分子機序を明らかにすることにより、免疫難病の新しい病因論を樹立し、関与する分子群について、新たな診断・治療法への応用を検討することを目的とした。

B. 研究方法

反町らはMHCによる自然免疫細胞の機能制御機構を、ヒトおよびマウス由来培養細胞、末梢血等の細胞を用いたin vitro実験系およびモデルマウスを用いた免疫機能解析を行った。好中球、マクロファージ、樹状細胞といった自然免疫細胞をケモカイン、TLRリガンドで刺激を行い、細胞遊走能、サイトカイン産生能、貪食能を解析し、合わせてMHCおよびMHC受容体の細胞内局在の免疫組織学的解析とこれらの分子を介したシグナル伝達の生化学的解析を行った。さらに、MHCに対する抗体、MHC受容体の変異体、ベーチェット病関連HLA-B*51がこれらの細胞機能にどのような影響を与えるかについて、トランスフェクタントを中心とした機能解析を行い、マウスモデルと対比させつつMHCによる新規免疫制御機構の分子メカニズムを解析

した。さらに、疾患関連 HLA による免疫制御異常に構造的分子基盤を与えるために、前仲らは、すでに構造解析を終えている HLA-B51 に加え、強直性脊椎炎の関連遺伝子である HLA-B27 について、HLA-B27 蛋白質およびホモ二量体 (B27₂) を調製し、その受容体である LILR との結合様式を分子レベルで明らかにするために、LILRB2-HLA-B27 複合体の結晶化と LILRB2 の ¹⁵N ラベル体を作製し、NMR 解析に取り組んだ。これらの基盤的知見を個体レベルの免疫応答として解析するために、高木らは、ヒト造血幹細胞を免疫不全マウスに移植し、疾患関連アレルを有するヒト免疫システムを再構築したモデルマウスの開発を試みた。また、基盤的知見の臨床情報への還元を目的として、伊藤らは、関節リウマチ (RA) 通院者 450 人の診療記録 (治療薬の副作用と効果、合併症) のデータベースを作成し、全患者を目標に HLA タイピングを行い、HLA 多型と臨床像の関連を解析している。また、実験的重症筋無力症 (EAMG) マウスを用い、EAMG マウスに対する大量免疫グロブリン投与 (IVIG) の効果を *in vivo*、*in vitro* で検討し、治療法としての可能性を検討した。鈴木らは、HLA 多型と調節性 T 細胞 (Treg) の分化、機能発現に相関があるかを検討する目的で、Treg の分化、機能に関わる可能性のある 2 つの新規遺伝子についての機能解析を行った。鈴木らによって独自に単離された新規分子 RhoH および Gasp の欠損マウスを用いて Treg の分化、機能における影響について検討した。

(倫理面への配慮)

研究の対象とする個人の人権の擁護 ; ヒト生体組織の採取および取り扱いについては、当センターの倫理委員会の審査を受け、その基準を厳守した。個人識別情報は、国立国際医療センター病院にて管理され、他の機関には情報の伝達は行われていない。保存される検体試料や研究データの匿名化は、患者に対し独自の ID を付与し、病院での患者 ID、氏名、住所、電話番号を削除する連結可能匿名化にて行った。

被験者に理解を求め同意を得る方法 ; 被験者には十分な研究内容の説明を口頭と文書の両方で伝え、承諾を確認した。特に、解析の対象は限定されており、関連しない他の個人情報については解析しないことを明確に説明し、理解を得た。

研究によって生じる個人の不利益 ; 検体の採取は、血液検査に伴って、十分なインフォームドコンセントのもとに末梢血から行うため、患者自身の治療計画に何ら影響を及ぼすことは無く患者自身の不利益は生じなかった。

動物実験および組換え DNA 実験に関わる配慮 ; 実験動物の使用においては、本研究所の実験動物委員会の審査及び承認を受け、当センターおよび両研究所の倫理基準を厳守した。組換え DNA 実験に関しては、両研究所バイオセーフティー委員会、組換え DNA 実験委員会、文部科学省による審査承認と厳密な指導の下に行った。また、当研究所には P2、P3 レベルの実験施設が完備されており、実験遂行上問題が生じることはなく、これらの施設を利用することによって、遵守すべき法令のもとに安全性を保障したうえで組換え体および感染性微生物を使用した。

C. 研究結果

反町らは MHC クラス I 受容体である Ly49Q が、プラズマ樹状細胞における I 型インターフェロン(IFN I)の産生に重要な役割を果たすことを見出した。この MHC クラス I 受容体を欠損あるいはシグナル伝達が阻害されると、ウイルス感染による IFN I の産生が減弱することを報告し、MHC とその受容体の機能が正常に動作しない場合ウイルス感染が遷延化する可能性を示唆した。さらに、そのメカニズムとして、MHC クラス I と Ly49Q が細胞表面上でシス相互作用を行い、炎症性細胞の細胞表面において、シグナル伝達ドメインである脂質ラフトの構築に必須の役割を果たすことを見出した。特筆すべきは、MHC クラス I とその受容体 Ly49Q の相互作用により、定常状態では脂質ラフトから Src キナーゼが排除される一方で、炎症性刺激が存在すると、速やかに Src が脂質ラフトへと動員されるという、炎症応答の MHC クラス I による新しい制御機構を明らかにしたことである。Ly49Q が欠損またはシグナル伝達に必須である ITIM を欠損すると、Src は恒常的にラフトに局在し、炎症性刺激によるラフトへの動員といった刺激応答性が低下した。これらの結果から反町らは、炎症性細胞は MHC クラス I とその受容体によって炎症層への細胞浸潤およびサイトカイン産生の on-off が制御されており、MHC クラス I とその受容体がスイッチデバイスとしての役割を果たしているという、これまでにない新規かつ独創的な概念を樹立し、報告した。さらに、MHC クラス I と Ly49Q の相互作用は、炎症性刺激後エンドサイトーシスによって取り込まれ、刺激後に継続した Src の活性化を維持することにより、

エンドソーム/ライソゾームの輸送とこれらの輸送小胞におけるシグナル伝達を制御していることを見出した。この制御機構によって、自然免疫応答に必須の役割を果たす Toll like receptor (TLR) 9 のエンドソーム/ライソゾーム依存的なシグナルを制御することにより IFN I の産生制御に関与することを明らかにした。また、ヒト好中球細胞においても、炎症刺激後にヒト MHC クラス I である HLA クラス I の細胞内への輸送と再配置が認められ、ヒトにおいても MHC クラス I による炎症性細胞の機能制御機構が存在することが強く示唆された。これらの結果は、MHC クラス I とその受容体の相互作用の異常が炎症および感染病態に直接影響を与えうることを示している。HLA-B27 が効率的に陽性である脊椎関節炎の多く、特に Reiter 症候群、反応性関節炎は、その発症に細菌感染が関与し、病原菌が異なると臨床像も異なる。また、HLA-B51 を効率的に認めるベーチェット病は、細菌感染時にその病勢も増悪することが知られている。これらの知見は、疾患関連 HLA の存在下で、感染による炎症反応が自己免疫疾患の病態に影響を与えることを示しており、本研究によって提唱される免疫難病における HLA の炎症制御という概念を支持するものである。さらに、MHC クラス I に対する抗体によって感染刺激による樹状細胞からの炎症性サイトカイン産生が抑制できることを見出し、治療標的分子としての可能性を示した。現在、ベーチェット患者末梢血および HLA-B51 導入ヒト好中球を用いてこの制御機構の病態における重要性について検証を進めている。

前仲らは、ベーチェット病関連遺伝子 HLA-B51 の構造決定の成功に引き続き、強直

性脊椎炎の疾患関連遺伝子である HLA-B27 の構造解析に着手し、HLA-B27 と LILRB との会合に違いが生じることを見出した。さらに世界に先駆けて LILRB2-HLA-B27 複合体の大量調製に成功し、PEG を含む条件で針状結晶を得ることに成功し、現在構造解析可能な単結晶の作成のため、条件の最適化に取り組んでいる。LILRB2 の ^{15}N ラベル体の作成にも成功し、HSQC スペクトルで約 80% の主鎖ピークが十分な分離で得られることができた。これから主鎖ピークを各アミノ酸に帰属し、複合体形成による結合領域の同定を進めて行く。さらに、B27₂ について LILRB2 との結合に関する分子動力的解析から結合領域を予測し、新たな結合領域として B27₂ の D122 などに着目した。変異体解析から D122 が結合に関与する可能性を示唆する結果が得られた。前仲らは、HLA の多型によって分子の 3 次元構造が異なり、それによって HLA 受容体との結合に影響が生じることを示唆する結果を得ており、HLA と HLA 受容体による新しい免疫制御機能と考え合わせると、疾患関連 HLA による免疫制御異常が病態に関与する可能性が支持された。

反町、前仲らによるこれらの知見をヒト型化マウスで検証することを最終目的として、高木らは、ヒト造血肝細胞をマウスに移植することにより、ヒト免疫担当細胞を有するマウスの作出を試みた。ヒト臍帯血幹細胞を全てのリンパ球を欠損し免疫不全を呈する RAG2/ γc 欠損マウスに非致死量の放射線照射後に移植し、末梢血中に現れるヒト免疫担当細胞の割合を経時的に測定した。十分な生着が得られなかったため、貪食細胞の受容体多型が発見されヒト細胞の生着性が高い

NOD.scid マウスを用いた。6~8 週をピークとして少量のヒト免疫細胞の産生が確認された。造血幹細胞の機能抑制分子のノックダウンを行うことで生着率の向上がみられることがわかったが、分離精製した細胞の機能解析や個体免疫応答の解析に耐える程の生着は達成できなかった。ヒト免疫担当細胞を有するマウスの作出は、世界的に見ても未だ困難な技術ではあるが、免疫難病の病態解析には非常に有用なツールとなるため、継続して移植条件の検討を行っている。

伊藤らは、HLA 多型と関節リウマチの病態との関連をより詳細に解析する目的で、症例データベースを作成し、解析を進めている。同意の得られた RA 患者 149 例の HLA タイピングを完了し、その結果、疾患関連 HLA-RDB1*0405 を 62 症例 (42.1%) と高率に認めた。今後さらに通院患者全例を目標にタイピングを進める予定であり、このデータベース解析より、メソトレキセートに抵抗性の患者に対して、タクロリムスの少量投与が有効であることを確認した。さらに、抵抗性解除の機序である多剤抵抗遺伝子 MDR-1 の抑制効果に対する疾患関連 HLA の影響を解析中である。また、TNF- α 阻害薬投与中の RA 患者で、ビスホスホネート製剤併用によって関節破壊の抑制効果が認められた。骨破壊が修復される症例も散見されたため、この現象における疾患関連 HLA の関与についても解析を進めている。さらに、重症筋無力症 (EAMG) マウスを用いて、EAMG マウスに対する大量免疫グロブリン投与 (IVIG) の効果を検討した結果、EAMG マウスは IVIG により、コントロール治療群に比べ、有意な歩行機能の回復を示すことを見出した。現在免疫

細胞の機能に与える IVIG の効果の検討を進め、EAMG における IVIG の作用機序の解析を進めている。また、IVIG による抑制性 MHC class I 受容体への影響についても、焦点を当てて検討を進めている。

鈴木らは、独自に発見した新規分子の機能解析を通じて制御性 T 細胞の分化制御に重要な基盤的知見を得ることに成功した。胸腺で優先的に発現する低分子量 G たんぱく質 RhoH の欠損マウスを用いた解析の結果、コンベンショナルな T 細胞の分化には RhoH は必須であるが、制御性 T 細胞をはじめとするアゴニスト選択を受ける T 細胞の分化には必須で無いことが明らかとなった。この結果より、制御性 T 細胞の分化および活性化がコンベンショナルな T 細胞とは異なる、RhoH に依存しないシグナル伝達経路を利用していることが初めて明らかとなった。また、Treg においてその発現が著しく減少する Gasp についても、この分子は制御性 T 細胞の分化および機能に必須ではないことを明らかにした。これらの結果は制御性 T 細胞の分化は通常の T 細胞と異なるシグナル伝達経路を利用している可能性を強く示唆しており、今後免疫難病の病態における制御性 T 細胞の関与を解析する上で、新しい着眼点を提示する重要な知見となった。

D. 考察

MHC クラス I とその受容体による新しい自然免疫制御の解明については、予想以上の成果といえる。とりわけ TLR9 の制御による感染病態、および脂質ラフトの制御を介した炎症細胞の組織浸潤と活性化シグナル制御に、MHC クラス I とその受容体が重要な役割を

果たすという発見は特筆すべきものであり、今後の免疫難病の病態解明に新規かつ重要な視点を導入することができた。さらに MHC クラス I とその受容体関連シグナル分子が炎症制御のための標的分子となりうる可能性も示された。また、強直性脊椎炎関連遺伝子である LILRB2-HLA-B27 複合体の結晶化と LILRB2 の NMR 解析をある程度進めることができたこと、さらに変異体解析から B272 が持つ新たな LILRB2 結合領域を示唆する結果が得られたことは予定以上の成果と言える。免疫不全マウスへのヒト細胞の十分な生着、ヒト免疫系再構築は達成できず、免疫系に及ぼす疾患関連 HLA アレルのインパクトの検討には至らなかった。しかしながら、ヒト細胞の生着を効率化する基盤技術が確立できつつあり、近い将来に有用なモデル動物を提供できるものと考えている。免疫難病における制御性 T 細胞と HLA との相関については、健常人および患者の十分な解析するにいたらなかったが、本研究によって得られた基盤的成果の意義は極めて大きいものがある。症例データベース解析については、HLA タイピングが全通院患者の 1/3 程度までを完了し、さらに年度末までに全例でのタイピングを目標に進行しており、おおむね当初の目的を達成できるものと考えている。EMG マウス解析は、IVIG による現象の確認に留まっておらず、作用機序の詳細な検討を残している。

MHC クラス I とその受容体のシス相互作用による TLR9 の機能制御、および炎症細胞の脂質ラフトの輸送とシグナル制御を通じた炎症細胞機能の制御という概念を樹立したという点について、国際的に高い評価を受けている。また、MHC クラス I とその受容体、

およびそのシグナル関連分子が炎症制御の分子標的となりうる可能性を示したという点においては、免疫難病の病因病態理解において大きな意義をもつ。前仲らの分子構造の理解と合わせて、免疫難病の捉え方に斬新かつ重要な視点を導入するものとなった。引き続き臨床医と連携した研究遂行によって、近い将来にこれらの基盤的研究成果が社会的意義として臨床現場に還元されることが期待できる。強直性脊椎炎 (AS) に著しく相関のある HLA-B27 のホモ二量体形成についても、前仲らはすでに結晶化に成功し、世界に先駆けてその構造解析に成功すると期待され、これは学術的、国際的に極めて重要な新規知見となることに異論がない。LILRB2 との結合を分子レベルで明らかにすることは、AS を克服する薬物作製のために必須の情報であり、この開発に成功すれば、AS を含む多くの難治性自己免疫疾患に同様のストラテジーで薬物開発を進めることができることから、社会的意義が非常に大きい研究である。また、ヒト免疫担当細胞群を再構築したモデルマウス作製は、ヒト細胞間相互作用による個体免疫応答やその破綻機構の解析に有用である。発症前及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検討する大変強力な材料となりうる。国際的にも十分なヒト免疫応答を再現するモデル動物実験系の確立にはいたっておらず困難な課題であるが、様々なアプローチを試みる価値は大きい。また、私たちが構築したデータベースに基づく HLA 多型と疾患の関連については、これまで疾患単位の大まかな報告しかされていなかったことを考えると、新規な試みであり、それによって学術的、国際的にも重要であり、

かつ治療方針の決定に重要となる新規知見が得られた。個々の患者単位での臨床像との関連解析は、症状の基礎となる免疫異常に HLA 多型が与える影響を推測する情報となり、分担研究者らの基礎データとの照合作業で、今後新しい診断・治療法の開発に資する分子の絞り込みが可能になった。EAMG マウス研究は、近年報告が相次ぐ IVIG の作用機序に新しい側面があることを証明し、血液製剤を大量に使用するこの治療法を効率的なものに変えるための基礎研究となる。本研究内容は、Immunity, Journal of Experimental Medicine, Blood, Proc. Natl. Acad. Sci. USA といった国際的に評価が高い学術誌に受理されており、学術的にも社会的にも意義の大きな研究成果を得た。

今回得られた MHC による新規の感染炎症制御機構について、免疫疾患の病態においてさらに検証を続けると同時に、疾患関連 HLA を有する炎症細胞の解析を健常人と比較しながら継続してデータを集積することが重要である。これらの集積データと本研究で得られた新しい知見に基づいて、各種疾患について詳細な症例データベースを作成、照合することにより、免疫難病の治療方針のオーダーメイド化に貢献できる可能性が高い。また、MHC およびその受容体関連分子に対する抗体で病態制御が可能かどうかについて確定的な情報を得ることも重要である。さらに、疾患関連 HLA の構造解析から同定された情報をもとに、リード化合物の検索へと発展させることは研究成果の社会還元にも極めて重要である。とりわけ NMR 解析および変異体解析を中心に、B272 持つ新たな LILRB2 結合領域の正確な同定を行い、これに加えて、

LILRB2-HLA-B27 複合体の結晶構造からリード化合物同定のため、*in silico screening* に取り組むことにより、新規治療候補分子が提示できると確信している。これらの知見をより早期に確実に臨床現場へ還元するために、ヒト造血細胞を有するモデルマウスの安定供給は必要であるが、成体マウスを用いた場合は生着率が低く十分な再構築が得られていない。新生仔肝臓内への移植、さらに加えて造血幹細胞自体の生着を増強する方法の併用を考慮する必要があると考える。NOD/RAG2/ γ c (NRG)マウス等新規に開発された免疫不全マウスの使用も検討すべき課題である。HLA 多型と臨床情報の解析を進展させるためには、さらなるデータベースの拡大が必要である。当院通院患者に加え、多施設、特にHLA 多型に関する情報収集を行っている施設との共同研究が望まれる。また、その際にはRA に比べ症例数の少ない他疾患への展開も行いたい。

これまでに蓄積した知見と経験に加え、研究員らの卓越した連携により、培養細胞、モデル動物、遺伝子導入細胞、末梢血など種々の材料に渡って、分子生物学、細胞生物学、生化学の広範な実験技術を駆使して非常に効率的かつ生産的にMHCによる新規感染炎症制御のメカニズムを解明することができた。ベーチェット病患者末梢血の解析に遅延が生じているが、現在引き続き効率化に勤めている。構造解析については、複数の物理化学的手法を駆使できる利点を生かして、多角的にB27の分子レベルでの解析を進めることができるので、薬物開発に向かって順調に進めることができている。また、ヒト造血細胞を再構築する移植実験では、長い観察期間を要す

るため実験計画は十分に検討し効率化に務めた。研究班に参加する研究者間で解析分担を行う段階までは至らなかったが、研究の効率性について大きな問題はなかった。臨床医との連携という点から見ても、当施設は900床規模の病院と、研究所の総合施設であり、いわゆるベンチとベッドサイドの距離が近いという利点を最大限利用し、臨床で得られた情報と基礎データとをつきあわせたディスカッションや、臨床材料の提供は可能な限り効率的に行われた。全体として、血液試料の入手のための倫理審査に予想以上に手間取り、ヒトを用いた研究に遅延が生じたという点で研究の遂行過程に多少の問題はあった。しかしながら、基礎的研究としてはレベルの高い成果が得られ、効率および生産性の高い研究であった。

E. 結論

本研究により、MHC クラス I とその受容体のシス相互作用が、自然免疫細胞の機能制御に根幹的な役割を果たしており、この制御機構の異常が感染の遷延化や炎症反応の経過に大きな影響を与えることが明らかとなった。さらに疾患関連 HLA は、その受容体とのシス結合に異常をきたすことが構造解析から裏付けられ、疾患関連 HLA と受容体とのシス結合の異常による炎症細胞の機能制御異常が免疫難病の病因病態に関わる可能性が示唆された。こうした基盤的知見に立脚した上での、疾患関連 HLA の構造解析に基づくリード化合物の検索は、アプローチとして有益であり、今後大きな社会的意義をもつ重要な成果に直結することが強く期待される。また、今回、遺伝子情報に基づいた詳細な症例データベー

スの解析が、治療方針の決定に重要な情報を提供することが明らかとなり、今後このような症例データベースの充実が治療のオーダーメイド化に貢献する可能性を示した。これらの取り組みをさらに継続して発展させることにより、免疫難病の克服に必要な知見とリード化合物が早期に提示可能になるものと期待される。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表	13 件
原著論文による発表	1 件
それ以外(レビュー等)の発表	2 件

そのうち主なもの

論文発表

1. 反町典子; 抑制性レセプターLy49QによるTLR9シグナルの新規制御機構 臨床免疫・アレルギー科 2009
- 2.
3. 高木 智. Sh2b3/Lnkアダプター群による免疫系制御機構. 日本臨床免疫学会誌. 2008 31(6):440-7.

学会発表

1. Sasawatari S, Yoshizaki M., Dohi T., Inaba K., Toyama-Sorimachi N.: A crucial role of Ly49Q-mediated dynamic regulation of lipid rafts in neutrophils. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 12 月 2-4 日, 2009, 大阪
2. Yoshizaki M., Sasawatari S, Dohi T., Inaba K., Toyama-Sorimachi N.: An inflammatory cell-specific regulatory mechanism of lipid rafts mediated by Ly49Q and MHC class I. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 12 月 2-4 日, 2009, 大阪
3. 前仲勝実 BmNPV バクミドを用いたヒト膜タンパク質受容体のカイコ個体での生産、日本生物工学会・シンポジウム、招

待講演 '2009.9 名古屋

4. 前仲勝実 HIV と宿主蛋白質との相互作用、日本蛋白質科学会・ワークショップ、招待講演 2009.5 熊本
5. 山口宗親、黒木喜美子、田畑栄一、真板宣夫、梶川瑞穂、尾瀬農之、中村聖子、王静、佐藤毅史、荒瀬尚、前仲勝実 Paired Immunoglobulin (Ig) Like type 2 Receptor (PILR) α による Glycoprotein B (gB) 認識機構の解明 口演、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009.10 東京
6. SAKO Miyuki, KAJIKAWA Mizuho, HASHIGUCHI Takao, YANAGI Yusuke, MAENAKA Katsumi The molecular interaction of dog signaling lymphocyte activation molecule (dSLAM) with hemagglutinin of canine distemper virus (CDV-H) 第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会 2009.12 大阪
7. 山口宗親、黒木喜美子、田畑栄一、真板宣夫、梶川瑞穂、尾瀬農之、中村聖子、王静、佐藤毅史、荒瀬尚、前仲勝実 PILR α による gB 認識機構の解明/ Molecular basis for recognition of Paired Immunoglobulin Like type 2 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 大阪
8. Kimiko Kuroki, Yuko Fukunaga, Jun Kamisikiryo, Toyoyuki Ose, Kaoru Hirose, Hathairat Thananchai, Tariro Makadzange, Sarah Rowland-Jones, Tao Dong, Katsumi Maenaka; Molecular basis for KIR2DL1-mediated immune evasion by HIV-derived peptide variant. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 2009 年 12 月 2 日~4 日大阪
9. Harumi Suzuki, Michael S. Patrick, Hiroyo Oda Gasp (Themis) is a novel protein essential for positive selection but not for negative selection nor for peripheral activation. 第 39 回日本免疫学会学術集会 2009.12 大阪 (英語シンポジウム)
10. Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Kunihiro Hayakawa, Yoshinori Sato, Koji Eshima, Mutsunori Shirai, Harumi Suzuki. A novel Grb2 associating protein Gasp is critically required for positive selection of thymocytes. 第 39 回日本免疫学会学術集会 2009.12 大阪
11. Koyama J, Iwasaki Y, Katayama H, Hamamichi R, Iseki M, Takaki S. Regulation of dendritic cell production and function by Lnk/SH2B3, a negative regulator of lymphohematopoiesis. 第 39 回日本免疫学会学術集会. 大阪. 2009 年 12 月.
12. Katayama H, Iseki M, Iwasaki Y, Ikutani M, Hamamichi R, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S. An adopter protein Lnk/Sh2B3, negative regulator of lymphohematopoiesis, contributes to the maintenance of gut-associated lymphoid

tissue. 第 39 回 日本免疫学会学術集会.
大阪. 2009 年 12 月.

13. 國松淳和, 山下裕之, 高橋裕子, 清水亜理
紗, 江里俊樹, 伊藤健司, 三森明夫: リウ
マチ性多発筋痛症の鑑別診断; 初診例の集
計. 第 53 回日本リウマチ学会総会, 東京,
2009 年 4 月

2) 国外

口 頭 発 表 5 件

原著論文による発表 19 件

それ以外(レビュー等)の発表 0 件

そのうち主なもの

論文発表

- 1) Sasawatari, S, Yoshizaki, M, Taya C., Furuyama-Tanaka K., Yonekawa H., Dohi T., Makriganis A P, Sasazuki T., Inaba K., Toyama-Sorimachi N. Ly49Q plays a crucial role in neutrophil polarization and migration by regulating raft trafficking. *Immunity* 32:200-213, 2010
- 2) Hayashi M, Nakashima T, Kodama T, Makriganis AP, Toyama-Sorimachi N, Takayanagi H. Ly49Q, an ITIM-bearing NK receptor, positively regulates osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 393:432-438, 2010
- 3) Yoshizaki M., Tazawa A., Kasumi E., Sasawatari S., Itoh K., Dohi T., Sasazuki T., Inaba K., Makriganis A.P. and Toyama-Sorimachi, N. Spatiotemporal regulation of intracellular trafficking of TLR9 by an inhibitory receptor, Ly49Q. *BLOOD* 114:1518-27, 2009
- 4) Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Kunihiro Hayakawa, Yoshinori Sato, Koji Eshima, Teruo Kirikae, Shun-ichiro Iemjura, Mutsunori Shirai, Takaya Abe, Tohru Natsume, Takehiko Sasazuki and Harumi Suzuki Gasp, a Grb2 associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2009) 106: 16345-16350
- 5) Yoshinori Sato, Hiroyo Oda, Michael S. Patrick, Yukari Baba, Ahmed A. Rus'd, Yoshinao Azuma, Takaya Abe, Mutsunori Shirai and Harumi Suzuki Rac GTPases are involved in development, survival and homeostatic proliferation of T cells *Immunol. Let.* (2009) 124:27-34
- 6) Hiroyo Oda, Manabu Fujimoto, Michael S. Patrick, Dai Chida, Yoshinori Sato, Hiroki Aoki, Yoshinao Azuma, Takaya Abe, Harumi Suzuki* and Mutsunori Shirai
*[Corresponding author] RhoH plays critical roles in FcεR1-dependent signal transduction of mast cells *J. Immunol.* (2009) 182: 957-962
- 7) Dai Chida; Tsuyoshi Sato; Yoshinori Sato; Mitsumasa Kubo; Tetsuya Yoda; Harumi Suzuki; Yoichiro Iwakura Characterization of mice deficient in Melanocortin 2 receptor on a B6/Balbc mix background *Mol Cell Endocrinol.* (2009) 300: 32-36
- 8) パトリックマイケル, 鈴木春巳 胸腺内の正の選択に必須な新規分子Gasp(Themis)の発見, 感染・炎症・免疫 40 (2010) 印刷中
- 9) Okada J, Maruyama T, Motomura M, Kuroki K, Maenaka K, Sakono M, Goto M, (2009). Enzyme-mediated protein refolding. *Chem. Commun.* 7197-7199..
- 10) Nakamura S, Kuroki K, Ohki I, Sasaki K, Kajikawa M, Maruyama T, Ito M, Kameda Y, Ikura M, Yamamoto K, Matsumoto K, Maenaka K* (2009). Molecular basis for E-cadherin recognition by killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). *J Biol Chem.* 284, 27327-27335.
- 11) Sasaki K, Kajikawa M, Kuroki K, Motohashi T, Shimojima T, Park EY, Kondo S, Yagi H, Kato K, Maenaka K* (2009). Silkworm expression and sugar profiling of human immune cell surface receptor, KIR2DL1. *BBRC* 387, 575-580.
- 12) Ose T, Kuroki K, Matsushima M, Maenaka K*, Kumagai I* (2009). Importance of the hydrogen bonding network including Asp52 for catalysis, as revealed by Asn59 mutant hen egg-white lysozymes. *J Biochem.* 146, 651-657.
- 13) Kajikawa M, Sasaki K, Wakimoto Y, Toyooka M, Motohashi T, Shimojima T, Takeda S, Park EY, Maenaka K* (2009). Efficient silkworm expression of human GPCR (nociceptin receptor) by a Bm bacmid DNA system. *BBRC* 385, 375-379.
- 14) Shiroishi M, Maenaka K* (2009). Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of the Low-Affinity Complex between Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) and Leukocyte Ig-Like Receptor B2 (LILRB2). *Protein Pept. Lett.* 16, 447-449.
- 15) Thananchai H, Makadzange T, Maenaka K, Kuroki K, Peng Y, Conlon C, Rowland-Jones S, Dong T (2009). Reciprocal recognition of an HLA-Cw4 restricted HIV-1 gp120 epitope by CD8+ T cells and NK cells. *AIDS* 23, 189-193.
- 16) Kwon SM, Suzuki T, Kawamoto A, Ii M, Eguchi M, Akimaru H, Wada M, Matsumoto T, Masuda H, Nakagawa Y, Nishimura H, Kawai K, Takaki S, Asahara T. Pivotal role of Lnk adaptor protein in endothelial progenitor cell biology for vascular regeneration. *Circulation Research.* 104: 969-977, 2009.
- 17) Kamei N, Kwon SM, Alev C, Ishikawa M, Yokoyama A, Nakanishi K, Yamada K, Horii M, Nishimura H, Takaki S, Kawamoto A, Ii M, Akimaru H, Tanaka N, Nishikawa SI, Ochi M, Asahara T. Lnk deletion reinforces the function of bone marrow progenitors in promoting neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury. *Stem Cells.* 28: 365-375, 2010.
- 18) Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A,

Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, *Takaki S, *Eto K. (*corresponding author) Lnk/Sh2b3 regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus in vivo. The Journal of Clinical Investigation. 120: 179-190, 2010.

- 19) Takahashi Y, Mizoue T, Suzuki A, Yamashita H, Kunimatsu J, Itoh K, Mimori A, Time of initial appearance of renal symptoms in the course of systemic lupus erythematosus as a prognostic factor for lupus nephritis. Mod Rheumatol. 19:293-301, 2009

学会発表

1. Yoshizaki M., Tazawa A., Kasumi E., Sasawatari S., Itoh K., Dohi T, Sasazuki T., Inaba K., Makrigiannis A, P., Toyama-Sorimachi, N.; Spatiotemporal regulation of intracellular trafficking of TLR9 by an inhibitory receptor, Ly49Q. The First International Kishimoto Foundation Symposium "Immune Regulation: Present and Future" May 25-27, 2009, Osaka, Japan
2. Patrick M S., Oda H, Sato Y, Aizawa S, Natusme T and Suzuki H. A novel gene ISC4 is critically required for positive selection of thymocytes 5th International Congress of Kyoto T Cell Conference, 2009.6 Kyoto, Japan
3. Suzuki H, Oda H. and Patrick M S, A novel thymus specific gene ISC4 plays a critical role in positive selection in the thymus, The 2009 Midwinter Conference of Immunologist, 2009.1 Asilomar, USA

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定も含む）

1) 特許取得

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」

申請準備中

- ・ 発明者 白井睦訓、鈴木春巳他 権利者 山口大学「サイトカインを利用した新規造血・免疫系幹細胞の分化技術と人工血液医療への応用」

2) 実用新案登録；なし

3) その他；なし

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

HLA-B27 は、強直性脊椎炎(ankylosing spondylitis、AS)と著しく相関のある 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未だ決定的な結論は得られておらず、臨床へと有効な薬物の開発など治療に向けた有効な道筋は見えていない。これまでに我々は、HLA-B27 分子が特異的に有するフリーのシステイン残基を介した軽鎖の無いホモ 2 量体(B27₂)が AS 発症へと結びつくとの報告について着目し、その分子形成機構と免疫系受容体群との分子認識について解析を進めてきた。具体的には、広く免疫系細胞に発現する HLA 受容体 LILR(Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors)群と B27₂との認識について、構造と機能の両面から蛋白質レベルで解析を行ってきた。昨年度は、相互作用解析から B27₂分子は抑制型 LILRB2 に特異的に強く結合し、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。本年度はさらに進めて、変異体解析から B27₂持つ新たな LILRB2 結合領域を示唆する結果が得られ、さらに NMR 解析により構造基盤を明らかにする準備も整ってきた。B27₂分子と LILRB2 との結合を阻害することによる AS を克服する薬物作製の開発を進めたい。

A.研究目的

ヒトHLAは、細菌やウイルスなどの微生物感染の際に、それら由来の蛋白質が分解された外来ペプチドを結合し、細胞表面に提示する。これにより、特異的に認識するT細胞による免疫応答を誘導し、微生物を特異的に排除すること

により感染を食い止めることができる。他方、自己免疫疾患では、反対にHLA分子による免疫応答の調整が崩れ、誤って自己分子を攻撃することになる。そのため、HLAは免疫応答の調節にとって主要な細胞表面分子であり、多くの疾患に直接関連する。数多いHLA関連疾患の中で

も、HLA-B27は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%が陽性を示す特別に疾患との相関の高い代表例である。実験的な検証から、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、諸説(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分子の一つであり、通常は重鎖($\alpha 1\cdot 3$ ドメイン)、軽鎖 $\beta 2$ ミクロglobulin ($\beta 2m$)と主に8-10アミノ酸からなるペプチドからなるヘテロ三量体構造を持つ。しかし、HLA-B27の場合、通常のHLA分子と異なり、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る。これが疾患の発症に関与するという説が現在有力となってきた。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仮説を支持する知見は得られている。しかし、発症機序の決定的な証拠を得るには至っていない。

免疫系細胞に広く発現し、制御を行う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、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。昨年度から、HLA-B27の $\beta 2m$ フリーのホモ二量体に対してLILR群の結合特異性に関して相互作用解析を進めている。本年度は、さらにより詳細な認識機構を明らかにするために、変異体解析と構造解析の基盤作りを進め、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)がLILRB2と結合する様式が通常のペプチドを結合した状態のHLA-B27蛋白質と異なるのかどうかを検証するために、我々がすでに決定済みのLILRB2-HLA-G複合体の結晶構造を基に結合部位に変異を加えたものを作製し、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う。

HLA-B27蛋白質およびホモ二量体(B27₂)を調製し、LILRとの結合様式を分子レベルで明らかにするために、LILRB2-HLA-B27複合体の結晶化とLILRB2の¹⁵Nラベル体を作製し、NMR解析を行う。具体的には、ペプチドを結合させたHLA-B27分子を通常の希釈法により作製し、同様にLILRB2の細胞外のN末端ドメインも作製する。これらを適切な比で混合し、複合体を形成させ、結晶化を行う。他方、LILRB2の¹⁵Nラベル体の作製に関しては、結晶化サンプル作製法と同じ手法で行うが、培養