

令和元年5月21日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0117

研究課題名(和文)HLA提示抗原ペプチドのカタログ化

研究課題名(英文)Development of HLA-peptide binding analysis

研究代表者

宮寺 浩子 (Miyadera, Hiroko)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：40361464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：HLA(human leukocyte antigens:ヒト白血球抗原)遺伝子は、さまざまな免疫系疾患の感受性遺伝子であり、自己免疫疾患、感染症、腫瘍免疫、薬剤副作用(薬疹)等と強く関連する。HLAは自己・非自己ペプチドを提示し獲得免疫応答に関わり、遺伝子多型の多くがペプチド結合溝に見られることから、HLAが提示する抗原ペプチドの同定・予測手法の確立により個々の疾患機序の解明が大きく進展し、HLA遺伝子型に基づいた個別化医療開発が進展すると期待される。そこで本研究では定量性、再現性に優れたHLAクラスII-ペプチド結合測定系の開発を行うこととした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個人が持つHLA遺伝子型によって自己免疫疾患や感染症の罹りやすさが大きく異なることは1970年代から知られており多数の免疫学的研究が行われているが、なぜ特定のHLA遺伝子型を持つと疾患発症リスクが上昇するのか、その機序は十分に解明されていない。各HLAが提示する抗原ペプチドを明らかにできれば、それに基づいた予防、治療法開発が進展すると期待される。例えば感染症、がん等に対するワクチン設計にはHLA遺伝子型と提示ペプチドの情報が必要である。そこで本研究では、信頼性が高く標準化された方法でHLA提示抗原同定を網羅的に行うことを目的として手法開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Polymorphisms in human leukocyte antigens (HLA) are associated strongly with a variety of immunological disorders including autoimmunity, infection, cancer, and adverse drug reactions. With an aim to develop a means to treat these diseases based on individual's HLA genotypes, it would be essential to collect and integrate the knowledge on functional differences and commonality among diverse HLA allele products. One of the main functional diversity among HLA alleles are the binding specificity for peptides. In this study we developed a new method to analyze an interaction of HLA class II with peptides that would outperform currently available methodologies in terms of sensitivity and reproducibility and would be suitable for a large-scale analysis.

研究分野：生化学、免疫学

キーワード：HLA MHC

1. 研究開始当初の背景

HLA (human leukocyte antigens: ヒト白血球抗原) 遺伝子は、さまざまな免疫系疾患の感受性遺伝子であり、自己免疫疾患、感染症、腫瘍免疫、薬剤副作用 (薬疹) との強い関連が確立されている。HLA 遺伝子型に基づいた個別化医療を実現するためには、HLA と疾患との関連の機序解明、そして、治療法開発の基盤となる要素技術の開発を効率的に推し進めるための基盤整備が必要であり、特に各 HLA アリル産物が提示する抗原ペプチドの同定が不可欠である。しかし従来法での HLA-ペプチド結合測定は再現性、定量性に乏しく、疎水性ペプチド、合成困難な配列を持つペプチドは解析対象外である。また、研究グループ間での違いが大きいなどの課題がある。

2. 研究の目的

申請者は細胞株を用いた HLA 発現系を応用することによって、HLA クラス II-ペプチド結合解析を行えることを見出した (Miyadera et al. (2015) *J Clin Invest*)。本手法は定量性、再現性が高く、疎水性が高いペプチドも解析可能であるため、HLA 結合ペプチドを探索するための標準的手法として適していると考えられる。そこで本研究では、主要な HLA が提示する抗原ペプチドを大規模に探索し各 HLA が提示する抗原ペプチドをカタログ化するための測定・解析技術を確立することとした。

3. 研究の方法

HLA へのペプチドの結合を、細胞表面 HLA 発現系 (Miyadera et al. (2015) *J Clin Invest*) を応用することにより測定する。従来の HLA-ペプチド相互作用測定系は、精製 HLA タンパク質への標識ペプチドの結合を ELISA で検出する。これに対して、本研究の測定法は、HLA とペプチドが相互作用すると HLA-ペプチド複合体が安定化し、細胞表面発現量が上昇するという特性を利用する。まず、HLA α 鎖安定発現株を作製する (NIH3T3 細胞を使用)。ここに β 鎖発現ベクター (ウイルス液) を発現させる。 β 鎖のシグナル配列と mature 配列との間に、ペプチドをコードする配列を挿入することで、HLA をペプチドとの融合タンパク質として発現する。細胞表面 HLA 量、細胞質の GFP 量をフローサイトメトリーで測定し、GFP 発現量に対する HLA 発現量の増分を求め、この値をペプチドの結合の強さを示す指標とする。日本人集団において高頻度に認められる HLA クラス II アリル (> 30 アリル)、様々な外来抗原、自己抗原を対象として結合解析を行った。

4. 研究成果

HLA クラス II (HLA-DR1, DR3/4/5, DQ, DP) (> 30 アリル) を対象として、網羅的な結合解析を実施し、その結果を docking simulation での結合予測、アルゴリズムによる結合予測結果と比較し、各手法間での相関をアリル毎に比較した。測定系の高速化を目的として、フローサイトメトリー以外の検出方法を検討したが、現状ではフローサイトメトリーによる解析が最も精度が高いことを確認した。今後さらに多検体での結合解析を行うためには全処理工程の自動化などの手法開発を引き続き行う必要がある。手法開発および各抗原タンパク質についての測定データセットは現在、論文投稿準備中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Li Q, Bu W, Gabriel E, Aguilar F, Hoshino Y, Miyadera H, Hess C, Hornung RL, Roy A, Cohen, JI. HLA-DQ β 1 alleles associated with Epstein-Barr virus (EBV) infectivity and EBV gp42 binding to cells. *JCI Insight* (査読有), 2017, 2(4):e85687.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.85687>.

2. 宮寺浩子、野口恵美子、溝上雅史、徳永勝士「HLA クラス II 結合ペプチドの探索・同定法の開発」臨床免疫学会会誌 (査読無), 2017, 40(1) 35-39

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 宮寺浩子、徳永勝士、溝上雅史「HLA-DP が提示する HBs 抗原領域の探索」第 54 日本肝臓学会総会, 口頭, 2018/6/14-15
2. 宮寺浩子、杉山真也、西田奈央、徳永勝士、溝上雅史「HLA クラス II と B 型肝炎ウイルス表面抗原(肝臓関連 HBs 変異部位)との結合解析」口頭, 第 26 回 日本組織適合性学会大会 2018/9/21-23
3. 宮寺浩子、杉山真也、西田奈央、徳永勝士、溝上雅史「HLA II と抗原ペプチド (HBV 表面抗原) の結合解析: 肝臓関連ウイルス変異の影響」ポスター, 日本人類遺伝学会第 63 回大会 2018/10/11-14
4. 宮寺浩子、吉山崇、永井英明、徳永勝士、星野仁彦「結核菌抗原(CFP-10、ESAT-6) T 細胞エピトープ領域の HLA クラス II 結合解析」ポスター, 第 45 回 日本臨床免疫学会総会 2017/9/28-30
5. 宮寺浩子、野口恵美子、徳永勝士、溝上雅史「HLA クラス II 結合ペプチドの網羅的解析法の開発」ポスター, 日本人類遺伝学会第 62 回大会 2017/11/15-18
6. 宮寺浩子、徳永勝士、吉山崇、永井英明、星野仁彦「結核菌抗原 T 細胞エピトープ領域と HLA-DR, DQ との網羅的結合解析」口頭, 第 26 回 日本組織適合性学会大会 2017/10/27-29
7. 宮寺浩子、大橋順、徳永勝士「Stability profiling of HLA class II protein for disease association studies」ポスター, The 13th International Congress of Human Genetics, 2016/4/5
8. 宮寺浩子、岡部由紀、Cindy Chia-Jung Chen、徳永勝士、溝上雅史「A large scale screening of HLA-class II-binding peptides from HBs and HBc peptide libraries」ポスター, The American Association of Immunologist (AAI) annual meeting, 2016/5/16
9. 宮寺浩子、岡部由紀、Cindy Chia-Jung Chen、徳永勝士、溝上雅史「HLA-DP 提示 HBs、HBc 抗原領域の探索」口頭, 第 52 回 日本肝臓学会総会, 2016/5/19

10. 宮寺浩子, 大橋順, 徳永勝士 「HLA class II protein stability and disease susceptibility」ポスター,
16th International Congress of Immunology, 2016/8/26

11. 宮寺浩子, 徳永勝士, 野口恵美子「HLA 結合ペプチドの大規模探索法の開発」ポスター, 第
44 回 日本臨床免疫学会総会, 2016/9/9

12. 宮寺浩子, 岡部由紀, Cindy Chia-Jung Chen, 徳永勝士, 溝上雅史「HLA クラス II 提示 B 型肝炎
ウイルス抗原領域の探索」口頭, 第 25 回 日本組織適合性学会大会, 2016/10/24

"

13. 宮寺浩子, 岡部由紀, Cindy Chia-Jung Chen, 徳永勝士, 溝上雅史「Large scale analysis of
HLA-peptide interactions」ポスター, 66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics,
2016/10/19

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：江 年

ローマ字氏名：(Jiang NIAN)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。