

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06073

研究課題名(和文) HLA-G2を中心とした多様なリガンド群の免疫制御受容体との分子認識機構の解明

研究課題名(英文) Molecular recognition of immune inhibitory receptor, LILRB2, with HLA-G2 and various ligands

研究代表者

黒木 喜美子 (Kuroki, Kimiko)

北海道大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：90553313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HLA-G2を含むLILRB2リガンド蛋白質と受容体LILRB2結合部位同定に向けて、まず、HLA-G1との結合競合性を調べた。次に、LILRB2のすべてのリジン残基を修飾すると、HLA-G2に結合しなくなることを利用した結合領域同定法を確立した。同時に、HLA-G2がLILRB2と配列相同性の高いLILRB1には結合しないことを利用し、分子表面のアミノ酸をLILRB1型に広域に置換したLILRB2変異体を多数作製し、リガンドとの相互作用解析による結合領域同定を目指した。最後に、LILRB2を介するシグナル制御可能な抗体および中分子・低分子化合物の初期スクリーニング実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLA-G2は、胎盤で胎児が母体から免疫的に拒絶されずに妊娠が成立するために重要な生体内免疫抑制分子HLA-Gの種類のひとつであり、免疫抑制能を発揮するバイオ医薬品としての開発を目指している。一方で、HLA-G2の受容体LILRB2は他にも多種のリガンドと相互作用し、多様なシグナル伝達に寄与しているため、それぞれのリガンドとの相互作用メカニズムや細胞内に伝わるシグナルを詳細に理解することが臨床応用に向けて必須である。本研究では、それぞれのリガンドのLILRB2結合部位の同定、およびLILRB2シグナルを制御する免疫制御候補分子のスクリーニング法を確立、創薬応用につながる基礎データを得た。

研究成果の概要(英文)：To identify the binding site of the receptor LILRB2 to the LILRB2 ligand proteins containing HLA-G2, I examined the binding competitiveness with HLA-G1. Next, I established a method for identifying critical region using the result that LILRB2 modified at all Lysine residues cannot bind to HLA-G2. Furthermore, I prepared a series of LILRB2 mutants extensively replaced with LILRB1-type amino acids to identify HLA-G2 binding sites on LILRB2 because HLA-G2 does not bind to LILRB1. Finally, I performed an initial screening of antibodies and small- and medium-molecular compounds to regulate LILRB2 signaling.

研究分野：構造免疫学

キーワード：LILRB2 HLA-G2 ANGPLT2 HLA-G2 相互作用解析 バイオ医薬品 構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HLA-G は、胎盤組織や腫瘍細胞、制御性 T 細胞が発現する非古典的 HLA クラス I 分子の一つである。重鎖の $\alpha 2$ ドメインを欠損する HLA-G2 は、主要な HLA-G1 アイソフォーム欠損者において機能を補完しており、生体内で十分な免疫抑制効果を持つことが示唆されていた。これまでに、HLA-G2 の分子構造や機能の解明を目的として、大腸菌封入体の巻き戻し法による大量調製法を確立し、HLA-G2 がホモ二量体を形成することや、表面プラズモン共鳴法を用いた解析により、抑制性受容体 LILRB2 に遅い解離形式で、親和性の高い結合をすることを明らかにしてきた。さらに、生体内での機能を調べるために、炎症性モデルマウスに HLA-G2 を投与し、抗炎症効果を示し、HLA-G2 が LILRB2 (マウスではオーソログである PIR-B) を介して免疫抑制機能を発揮することを明らかにしてきた。一方、受容体である LILRB2 は多様なリガンドと相互作用する。具体的には、通常型 HLA クラス I に結合し、自己細胞に対する自己寛容を誘導している。強直性脊椎炎患者の 90%以上が保持する HLA-B27 重鎖と結合すると、自己免疫様症状誘起に関与すると示唆されている。非 HLA リガンドとして近年同定された ANGPTL2 との結合では慢性炎症を引き起こす。しかし、これらのうち、LILRB2 におけるリガンド結合部位が明らかになっているのは、申請者が X 線結晶構造解析により複合体構造を明らかにした HLA クラス I のみであり、~ のように性質の異なる生体内応答が誘導される点について、その相関関係や分子認識機構は十分に解明されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、LILRB2 を介してシグナルを伝達する異なるリガンド群の LILRB2 結合様式を構造的に理解するとともに、リガンド特異的な LILRB2 シグナル制御法を確立するための初期スクリーニングを実施することである。

そのために、まず、多様なリガンド組換え蛋白質調製法を確立し、LILRB2 との相互作用解析を実施すること、免疫抑制能を有する HLA-G2 蛋白質単独および HLA-G2 を含むリガンド群と LILRB2 との複合体構造解析を実施すること、リガンド特異的な LILRB2 シグナル制御可能な阻害剤初期スクリーニングの実施することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 安定な HLA-B27 重鎖、ANGPTL2、HLA-G2 組換え蛋白質調製法の確立

これまでに全て大腸菌封入体の希釈法による巻き戻し法を用いて調製してきたが、HLA-B27 重鎖、HLA-G2 については、分子構造のゆらぎが大きく、安定性が低かった。構造解析に向けて、結晶性も低かったため、タンパク質発現コンストラクトの見直しを行なった。

(2) リガンド群と LILRB2 の相互作用解析

LILRB2 に対して HLA-B27、ANGPTL2、HLA-G2 の結合部位についてはまだ同定されていないため、LILRB2 変異体を多数作製し、結合領域の同定を目指した。

(3) リガンド群と LILRB2 との複合体の立体構造解析

(2) 変異体解析による結合領域同定と同時に、複合体結晶構造解析による結合様式の決定を試みた。

(4) LILRB2 を介するシグナル制御可能な抗体および中分子・低分子化合物の初期スクリーニング実施

LILRB2 を標的とした抗体によるシグナル制御を目指し、初期スクリーニングを実施した。また、低分子～中分子を用いたシグナル制御を目的とした創薬スクリーニング系を確立した。

4. 研究成果

(1) 安定な HLA-B27 重鎖、ANGPTL2、HLA-G2 組換え蛋白質調製法の確立

HLA-B27 重鎖、HLA-G2 組換え蛋白質調製法を再検討し、融合蛋白質として哺乳類細胞発現系を用いて発現したり、精製後に結合活性を維持する部位に特異的に修飾を加えたりすることで安定性を向上させることに成功した。修飾型組換え蛋白質については、表面プラズモン共鳴法による相互作用解析にて解離定数が維持されていること、炎症性疾患モデルマウスを用いて *in vivo* での抗炎症効果が発揮されることを明らかにした。

(2) リガンド群と LILRB2 の相互作用解析

LILRB2 と主要なリガンドである HLA-G1 分子は、2 か所の比較的広い領域で相互作用することが X 線結晶構造解析より明らかになっている。まず、HLA-G2 アイソフォームが HLA-G1 と競合的

に結合するか否かについて、表面プラズモン共鳴法を用いた競合実験を行なった。その結果、HLA-G2が多価効果により強くLILRB2に結合した状態(図1B)では、HLA-G2が結合していない状態のLILRB2(図1A)に比べ、固定化したLILRB2に対するHLA-G1結合量が低下する(図1)ことから、HLA-G2はHLA-G1と共通した領域に結合することが示唆された。

HLA-G1とLILRB2結合は、結合領域が広いいため、点変異導入によって明確な結合活性の低下が認められないことが明らかとなっていたため、本研究ではLILRB2分子表面に点在するリジン残基特異的分子修飾を行ない、結合候補領域を同定することとした。すべてのリジン残基を修飾した場合、HLA-G2に対する結合活性が完全に失われることから、各リジン残基を置換し、修飾部位を減らすことによって結合活性が復帰するか否かを指標とする系を確立し、リガンド群との相互作用解析を進行中である。また、同時に、HLA-G2(およびHLA-B27重鎖、ANGPTL2)がLILRB2と配列相同性の高いLILRB1には結合しないことを利用した、分子表面のアミノ酸をLILRB1型に広域に置換したLILRB2変異体を多数作製し、リガンドとの相互作用解析による結合領域同定を目指した相互作用解析を網羅的に実施した。多数の変異を導入することにより、蛋白質調製が困難な変異体も存在することから、両方の手法で得られた結果を総合的に理解することにより、より正確な相互作用領域、さらに直接相互作用に寄与するアミノ酸残基同定が可能であると考えている。

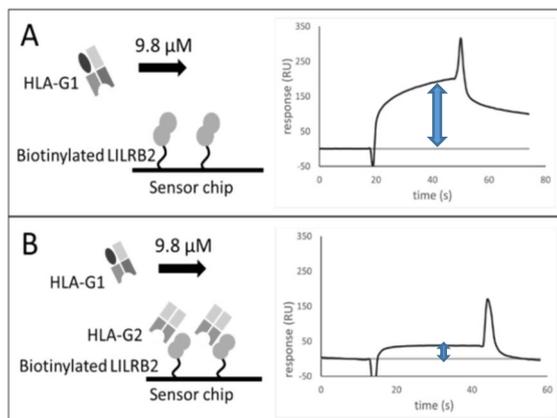


図1 .HLA-G2 と HLA-G1 との競合性 SPR 結合実験の結果

(3) リガンド群とLILRB2との複合体の立体構造解析

安定性の向上に成功した各リガンド蛋白質とLILRB2の複合体結晶化を目指したが、いずれのリガンドも二量体以上を形成することによりLILRB2に強く結合する性質を持つリガンドであり、1:1結合は非常に低い親和性であるため、複合体としての蛋白質結晶を得られなかった。クロスリンクによる複合体安定化処理の効果も明確に認められなかったため、今後(2)で得られる相互作用部位の情報も利用しつつ条件検討を進める予定である。

(4) LILRB2を介するシグナル制御可能な抗体および中分子・低分子化合物の初期スクリーニング実施

LILRB2を標的とした抗体によるシグナル制御を目指し、初期スクリーニングを実施した。また、低分子~中分子を用いたシグナル制御を目的とした創薬スクリーニング系を確立した。創薬の標的として、LILRB2はLILRB1と非常に相同性が高く、広域のHLAクラスI分子を共通してリガンドとしている。そのため、LILRB2特異的であり、且つLILRB2に結合する各リガンド特異的に阻害する抗体または低分子~中分子を同定することが重要であると考えている。まず、LILRB2特異的に結合可能な抗体を含む分子をスクリーニングにて同定したため、引き続きリガンドの阻害能を含む候補分子の機能解析を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Hiroshi, Kuroki Kimiko, Yamada Chisato, Saburi Yukari, Maeda Naoyoshi, Maenaka Katsumi	4. 巻 81
2. 論文標題 Therapeutic effects of soluble human leukocyte antigen G2 isoform in lupus-prone MRL/lpr mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Immunology	6. 最初と最後の頁 186 ~ 190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.humimm.2019.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuroki Kimiko, Matsubara Haruki, Kanda Ryo, Miyashita Naoyuki, Shiroishi Mitsunori, Fukunaga Yuko, Kamishikiryo Jun, Fukunaga Atsushi, Fukuhara Hideo, Hirose Kaoru, Hunt Joan S., Sugita Yuji, Kita Shunsuke, Ose Toyoyuki, Maenaka Katsumi	4. 巻 203
2. 論文標題 Structural and Functional Basis for LILRB Immune Checkpoint Receptor Recognition of HLA-G Isoforms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3386 ~ 3394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900562	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Furukawa Atsushi, Meguro Manami, Yamazaki Rika, Watanabe Hiroshi, Takahashi Ami, Kuroki Kimiko, Maenaka Katsumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Evaluation of the Reactivity and Receptor Competition of HLA-G Isoforms toward Available Antibodies: Implications of Structural Characteristics of HLA-G Isoforms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5947 ~ 5947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20235947	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroshi Watanabe, Kimiko Kuroki, Chisato Yamada, Yukari Saburi, Naoyoshi Maeda, Katsumi Maenaka
2. 発表標題 Immunosuppressive function of HLA-G2 protein in vivo
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒木喜美子
2. 発表標題 多様な免疫抑制タンパク質HLA-Gの機能・構造解析
3. 学会等名 日本組織適合性学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------