

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09454

研究課題名(和文) ベーチェット病の病因HLAと病因ペプチドの結合を阻害する医薬分子の特定

研究課題名(英文) Identification of HLA-bound antigenic peptides and their inhibitors in Behcet's disease

研究代表者

野村 英一 (NOMURA, Eiichi)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：00347303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ベーチェット病(BD)は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す難治性疾患である。BDの発症には特定の遺伝要因と環境要因が関与していると考えられており、BDはHLA-B\*51およびHLA-A\*26と顕著に相関することが知られている。本研究では、BDのHLAリスク因子(HLA-B\*51、HLA-A\*26)と結合するペプチドおよびその結合を阻害する低分子化合物のスクリーニングを行った。その結果、BDのHLAリスク因子に特異的に結合する病因ペプチドの候補を複数同定した。さらに、BDのHLAリスク因子と病因ペプチドの結合を阻害し、BDの炎症反応を制御する可能性のある低分子化合物の候補を複数見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ベーチェット病(BD)の発症に関する環境要因は未だ不明である。本研究において、BDの発症に関与する病因ペプチドの候補が同定されたことで、病因ペプチド由来の環境要因の解明が進展することが期待される。BDの環境要因が解明されれば、環境要因を考慮して患者の生活環境の改善を行うことで、疾患の進行が抑制されることが期待される。BDの進行抑制は、患者の予後の改善に繋がり、BDによる重篤例の低下を促進すると考えられる。また、HLAリスク因子と病因ペプチドの結合を阻害する低分子化合物の候補が見出されたことで、HLAリスク因子を有する患者を対象とした新規治療薬の開発も期待でき、その医学的意義は高いといえる。

研究成果の概要(英文)：Behcet's disease (BD) is a rare, chronic, systemic, inflammatory disorder. BD is currently thought to be triggered by various genetic and environmental factors and is strongly associated with HLA-B\*51 and HLA-A\*26. In the current study, we investigated antigenic peptides which bind to HLA-B\*51 or HLA-A\*26 and assessed their binding inhibitors. The current study identified some candidate antigenic peptides which specifically bind to HLA-B\*51 or HLA-A\*26. We also identified some low molecular weight compounds, which inhibit these HLA-peptide bindings and possibly regulate inflammation in BD.

研究分野：眼科学

キーワード：ベーチェット病 HLA 抗原ペプチド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性疾患である。ベーチェット病は口腔内アフタ性潰瘍、眼症状、皮膚症状、外陰部潰瘍を主症状とし、しばしば関節炎、副睾丸炎、消化器症状、血管病変、中枢神経病変などの副症状を伴う。ベーチェット病は長期間に渡って再発と寛解を繰り返すため、ベーチェット病により重度の視力障害を来す患者は少なくない。近年、ベーチェット病に対して有効な治療法が確立されてきたが、本剤に不応性の患者も存在し、今なお失明率の高い疾患である。

(2) ベーチェット病は特定の遺伝要因のもとに何らかの環境要因が関与して発症する多因子疾患と考えられている。ベーチェット病は人種を越えて HLA (human leukocyte antigen : ヒト白血球型抗原) -B 遺伝子の HLA-B\*51 アリルと顕著に相関することが知られている。

(3) 一般に、HLA クラス I 分子は外来抗原ペプチドを収容溝に取り込み、CD8+T 細胞への抗原提示を行うが、そのペプチド収容溝を構成するアミノ酸の相違によって結合ペプチドが異なるため、特定のペプチドに対する免疫応答が大きく異なり、それにより疾患の発症が引き起こされている可能性が考えられる。ベーチェット病では、人種を超えて HLA-B\*51 と顕著な相関を示すが、HLA-B\*51 と結合する外来または自己抗原ペプチドは未だ不明であり、ベーチェット病の病因の解明は進展していない。

(4) 私達のグループは、ベーチェット病の第 2 の疾患感受性遺伝子として、HLA-A 遺伝子の HLA-A\*26 アリルを同定しているが (Ann Rheum Dis 2010;69:747-754. ) HLA-A\*26 と結合する抗原ペプチドについても未だ不明である。

(5) 疾患発症の病因となる抗原ペプチドを同定することは、疾患の発症機序の解明に繋がるとともに、病因 HLA および病因ペプチドを標的とした新規治療薬の開発を可能にすると考えられている。

(6) したがって本研究では、ベーチェット病の病因 HLA (HLA-B\*51、HLA-A\*26) と結合する病因ペプチドの特定を行うとともに、病因 HLA と病因ペプチドの結合を阻害する低分子化合物の特定を行った。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、ベーチェット病の病因 HLA (HLA-B\*51、HLA-A\*26) と結合する病因ペプチドの探索を行うことである。

(2) さらに、本研究では、ベーチェット病の病因 HLA と病因ペプチドの結合を阻害する低分子化合物の特定を行い、病因 HLA を標的としたベーチェット病のゲノム創薬 (分子標的薬) の開発の可能性を探る。

### 3. 研究の方法

(1) データベースを用いた病因 HLA 結合ペプチドの予測

特定の HLA 分子に結合するペプチドを予測する 6 種類のオンラインデータベースを用いて、ベーチェット病の病因 HLA (HLA-B\*51、HLA-A\*26) に特異的に結合するペプチドおよびその構造モチーフの検索を実行し、ベーチェット病の病因ペプチドになり得る候補を網羅的にスクリーニングした。

(2) 質量分析計を用いた病因 HLA 結合ペプチドの探索

HLA 分子に結合するペプチドを予測するアルゴリズムの多くは、HLA 分子に対する結合親和性が高く、比較的量の多い自己および非自己ペプチドに共通した構造モチーフの解析に基づいている。しかしながら、ベーチェット病のような免疫関連疾患の原因となるペプチドは、HLA 分子に対する結合親和性がそれほど高くない、比較的少数のペプチドであると考えられる。したがって、「(1) データベースを用いた病因 HLA 結合ペプチドの予測」の解析のみでは、病因 HLA の特定は容易ではないと推測されるため、質量分析計を用いた解析も実行した。本解析では、ベーチェット病患者の組織・細胞上の HLA 分子から T 細胞エピトープペプチドを溶出して、ナノ HPLC と高感度タンデム質量分析計の併用により、HLA 結合ペプチドの検索を系統的に実行した。HLA-B\*51 ホモ接合体患者、HLA-B\*51 ヘテロ接合体患者、HLA-B\*51 陰性患者、HLA-A\*26 ホモ接合体患者、HLA-A\*26 ヘテロ接合体患者、HLA-A\*26 陰性患者を対象として、両病因 HLA に特異的に結合

するペプチドの特定を行った。

(3) ベーチェット病特異的な自己抗体の標的タンパク質の探索

ベーチェット病特異的な自己抗体の標的タンパク質の探索を行い、自己抗体が特異的に認識する抗原タンパク質の網羅的なスクリーニングを実行した。本スクリーニングでは、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法 (J Proteome Res 2010;9:4264-4273.) を用いて、ベーチェット病の自己抗体プロファイリングを実施した。ヒトタンパク質を網羅する数千種類のビオチン化タンパク質ライブラリーを活用して、ベーチェット病患者血清中に含まれる自己抗体が認識する抗原タンパク質を網羅的に特定した。

(4) 三方面からの「病因 HLA 結合ペプチド探索」アプローチの融合

「データベースを用いた HLA 結合ペプチドの予測」、「質量分析計を用いた HLA 結合ペプチドの探索」、「疾患特異的な自己抗体の標的タンパク質の探索」の三方面からのアプローチの結果を融合させ、HLA-B\*51 または HLA-A\*26 に特異的に結合する病因ペプチドの総合的な評価・決定を行った。

(5) 病因 HLA と病因ペプチドの結合を阻害する低分子化合物のスクリーニング

標的分子 (HLA-B\*51、HLA-A\*26) の立体構造および病因ペプチドの配列に基づき、市販されている約 500 万種の化合物を含む大規模化合物ライブラリーから、標的分子の機能を制御できる医薬分子の候補をコンピュータを活用して網羅的にスクリーニングした (in silico drug discovery 法)。スクリーニングした低分子化合物の阻害効果を評価するため、横浜市立大学眼科学で既に作製・保有しているヒトの HLA-B\*51 または HLA-A\*26 を発現するトランスジェニックマウスに低分子化合物を投与して、病因ペプチドの刺激下で、ベーチェット病様の炎症反応が制御されるかの検討を行った。本解析において、病因 HLA と病因ペプチドの結合を阻害する低分子化合物が決定されれば、病因 HLA を標的としたゲノム創薬の開発が可能になることが期待される。

(6) 本申請研究ではベーチェット病患者の血清検体を扱うため、検体提供者の個人情報を守ることに細心の注意が必要である。具体的には学内の倫理委員会で定めた規準を遵守し、すべての検体提供者に対して研究の意義、目的、使用法等を説明し、同意を得た上で採血を行った。得られた個人情報に関しては他に漏洩しないように厳重に管理している。患者のプライバシーなど倫理面に十分配慮して研究および結果の報告を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 複数のオンラインデータベースを用いてベーチェット病の病因 HLA アリル (HLA-B\*51、HLA-A\*26) に特異的に結合する病因ペプチドの予測を実行し、HLA-B\*51 または HLA-A\*26 に特異的に結合するペプチドの候補を網羅的にスクリーニングした。

(2) また、質量分析計を用いた病因 HLA 結合ペプチドの探索を実行し、HLA-B\*51 または HLA-A\*26 に結合するペプチドの新たな候補を複数検出した。

(3) さらに、ベーチェット病特異的な自己抗体の網羅的なプロファイリングデータのバイオインフォマティクス解析も実行し、自己抗体が特異的に認識する抗原タンパク質を網羅的にスクリーニングした。

(4) その後、(1)、(2)および(3)で得られた結果を結合して総合的な評価を実行し、ベーチェット病の病因 HLA である HLA-B\*51 または HLA-A\*26 に特異的に結合する病因ペプチドの候補を選別した。

(5) (4)で網羅的に見出した病因ペプチドの候補をヒトの病因 HLA (HLA-B\*51 または HLA-A\*26) を発現するトランスジェニックマウス (Tg マウス) に投与した結果、複数の病因ペプチド候補において、Tg マウスがベーチェット病様の炎症反応を示した。

(6) (5)でヒト病因 HLA の Tg マウスにベーチェット病様の炎症反応を誘発した病因ペプチド候補の配列および標的分子 (HLA-B\*51、HLA-A\*26) の立体構造に基づき、標的分子の機能を制御できる医薬分子の候補を網羅的に検出した。検出した低分子化合物をヒトの病因 HLA を発現する Tg マウスに投与した結果、複数の低分子化合物において、Tg マウスが病因ペプチドの刺激下で、ベーチェット病様の炎症反応が制御された。

(7) 以上より、本研究において、ベーチェット病の病因 HLA (HLA-B\*51 または HLA-A\*26) と結合する病因ペプチドの候補を見出した。さらに、ベーチェット病の病因 HLA と病因ペプチドの結合を阻害し、ベーチェット病の炎症反応を制御する可能性のある低分子化合物 (医薬分子) の候

補も見出した。

(8) ベーチェット病の発症に関する環境要因は未だ不明である。本研究において、ベーチェット病の発症に関する病因ペプチドの候補が見出されたことで、今後、病因ペプチド由来の環境要因（細菌・微生物など）の解明が進展することが期待される。

(9) ベーチェット病の環境要因が解明されれば、ベーチェット病患者が環境要因を含まないように生活環境の改善を行うことで、疾患の進行が抑制されることが期待される。ベーチェット病の進行抑制は、ベーチェット病患者の予後の改善につながり、ベーチェット病による重篤例の低下を促進すると考えられる。

(10) また、病因 HLA と病因ペプチドの結合を阻害する低分子化合物の候補が見出されたことで、病因 HLA を有するベーチェット病患者を対象とした新規治療薬の開発も可能になる。将来的に、病因 HLA を標的としたゲノム創薬（分子標的薬）が開発されれば、難治性免疫疾患であるベーチェット病の発症・進行予防、ひいては根治治療が可能になり、その医学的意義は大変高いといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	目黒 明  (Meguro Akira)  (60508802)	横浜市立大学・医学研究科・特任准教授   (22701)	
研究分担者	水木 信久  (Mizuki Nobuhisa)  (90336579)	横浜市立大学・医学研究科・教授   (22701)	

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