

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22133009

研究課題名(和文)HLA-DP5-DR53関連疾病のゲノム・免疫学的解析

研究課題名(英文)Genetic and immunological analysis for HLA-DP5 and HLA-DR53 related diseases.

研究代表者

笹月 健彦(Sasazuki, Takehiko)

九州大学・生体防御医学研究所・特別主幹教授

研究者番号：50014121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 191,500,000円

研究成果の概要(和文)：グレーブス病発症に特異的な感受性アレルとして、HLA-DR14:03とDPB1*05:01を同定した。さらにHLA-DRB1*13:02、DRB1*15:02、B*07:02がグレーブス病発症を防御することを明らかにし、抵抗性アレルが感受性アレルに対して上位で機能することを明らかにした。ゲノムワイドでの相関解析により、橋本病感受性遺伝子VAV3遺伝子を世界で初めて同定した。領域内共同研究により、スギ花粉症アレルゲンCriJ-1ペプチドとHLA-DP5分子複合体の立体構造を世界で初めて解明した。

研究成果の概要(英文)：We identified Graves disease-specific susceptible HLA alleles, HLA-DR14:03 and DPB1*05:01, and protective alleles, HLA-DRB1*13:02, DRB1*15:02 and B*07:02 by association analysis for HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 and DPB1 loci. In addition, we elucidated the epistatic role of protective HLA-DRB1*13:02 allele to susceptible HLA alleles in the incidence of Graves disease. We revealed a crystal structure of the CryJ-1-derived peptide, a major allergen of cedar pollinosis, and HLA-DP5 complex, which would contribute to development of a chemical compound capable of regulating the allergic reaction.

研究分野：免疫遺伝学・人類遺伝学

キーワード：HLA-DP5 HLA-DR53 グレーブス病 橋本病 スギ花粉症 HLA立体構造 エピスタシス ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

これまでに世界中から 100 を超す免疫関連疾患と HLA との強い相関が報告され、原因不詳のこれら難治性疾患の病因の解明と、それに立脚した治療法開発への大きな期待が寄せられた。しかし、HLA の他に類をみない遺伝学的特徴(多重遺伝子族、高度の多型性、強い連鎖不平衡)に加え、ゲノム解析とタンパク解析の技術的限界のため、疾病と相関する HLA の中で、どれが真の病因 HLA なのか、病因 HLA と結合する病因ペプチドは何なのかなど、根源的な課題が未解決のまま残されてきた。一方、最近のゲノム解析、タンパク解析に関する革新的技術開発が、この難問に挑戦することを可能とし、HLA 研究が再び激しい国際競争の時代を迎えようとしている。

申請者らは、スギ花粉症の病因 HLA は HLA-DP5 であり、これと結合する病因ペプチドは日本スギ (*Cryptomeria japonicum*) 花粉の CriJ-1 タンパク由来であることをすでに証明した (Hori et al. Tissue Antigen 1996)。さらに自己免疫性甲状腺炎 (グレープス病と橋本病) がスギ花粉症と同じく HLA-DP5 と強く相関することを見出した (Dong et al. Hum Immunol 1992)。しかもグレープス病患者がスギ花粉症を併発すると、グレープス病が急性増悪を示すこと (Takeoka et al. Int Arch Allergy Immunol 2003) から、両疾患の間には HLA-DP5 を介した交互作用が存在することを推測させ、HLA と疾病の相関の機序解明に絶好のモデルを提供している。

これらのことから、スギ花粉症、グレープス病、橋本病を本計画研究課題の対象疾患とし、これらの疾患を対象として病因における HLA の意味の解明と、これを標的とした疾病克服への道を拓くことを目指した。

2. 研究の目的

(1) 質の高い臨床情報が付与された、グレープス病、橋本病、スギ花粉症患者を、各々約 500 名を目標に登録する。

(2) 上記症例を用い、同じ甲状腺を舞台とする自己免疫性疾患で、片や機能亢進、片や機能低下を示すグレープス病と橋本病について、疾病原因 HLA 遺伝子、非 HLA 遺伝子を解明する。

(3) 上記症例について、自己抗体価やスギ花粉特異的 IgE 抗体価の経時変化を追跡し、疾患関連 HLA 遺伝子型との関連を解明する。

(4) 領域内連携により、HLA-DP5 と CriJ-1 ペプチド複合体の高次構造を解明し、CriJ-1 ペプチドに対して免疫応答を阻止する低分子化合物の同定を目指す。

(5) 結合モチーフ情報、甲状腺特異的に発現する遺伝子情報、自己抗体情報をもとに、グレープス病、橋本病の病因 HLA に結合する病因ペプチドの同定を目指す。さらに、それぞれの病因 HLA と結合するそれぞれの病因ペプチド複合体の構造解析と低分子化合物の同

定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 患者登録と臨床データの収集

最初の 4 年間で目標をグレープス病、橋本病、スギ花粉症、それぞれ 1,000 人に設定し、臨床情報を付与した患者登録を開始する。花粉症による甲状腺機能変化を検討する試料として、スギ花粉症およびカモガヤ花粉症非飛散期 (11 月)、スギ花粉症ピーク時 (2-3 月)、カモガヤ花粉症ピーク時 (6 月) に採血して血清を保存する。また、初回採血時にゲノム DNA を抽出しゲノム解析に供する。グレープス病、橋本病については、岡村 (建) 研究分担者および野田研究分担者、伊藤・吉村研究協力者が担当する。また、花粉症については森研究分担者、岸川研究分担者が担当する。収集された血清を用い、共通の計測手法を用いて以下の項目のデータを取得する。[甲状腺機能関連] 甲状腺刺激ホルモン受容体、甲状腺ペルオキシダーゼ、サイログロブリンに対する自己抗体レベル、および甲状腺関連ホルモンのレベル。[花粉症関連] スギ花粉抗原、カモガヤ花粉抗原に対する特異的 IgE 抗体レベル。

(2) 患者登録管理

検査データならびに臨床情報は、各施設で匿名化の後、笹月研究代表者のもとに送付される。ID カードによる認識機能を付属した高セキュリティの格納書棚にデータを管理し、研究代表者のもとで電子化する。

(3) グレープス病、橋本病における病因 HLA 遺伝子の同定

これまでに収集しているグレープス病、橋本病検体に新たに収集される検体を加え、HLA-A、B、C、DRB1、DQB1、DPB1 遺伝子座病因 HLA アレルを確定する。解析は、笹月が A01 山本と連携して行う。

(4) 非 HLA 病因遺伝子の解明

グレープス病、橋本病を対象として、A01 山本と連携し、各疾患に特異的な病因非 HLA 遺伝子をゲノムワイド解析にて特定する。

(5) HLA-DP5 と CriJ-1 ペプチド複合体の高次構造解明

A02 横山との共同研究により HLA-DP5・CriJ-1 ペプチド複合体の立体構造を解明する。

(6) HLA-DR53、DP5 トランスジェニックマウスの作成

岡村 (匡史) 研究分担者が in vivo での免疫応答解析に必須である上記トランスジェニックマウスを作成し、吉開研究分担者、田中研究分担者らが、笹月とともに免疫応答解析を行う。

(7) CriJ-1 ペプチドと HLA-DP5 の結合を阻止する低分子化合物の同定

A02 横山、西村との共同研究により、HLA-DP5 と CriJ-1 ペプチド複合体の高次構造情報に基づき、CriJ-1 と HLA-DP5 との結合を阻止する低分子化合物を in silico およびケミカルライブラリーのスクリーニングで同定する。

(8) CriJ-1 ペプチドに対して免疫応答を阻止する低分子化合物の同定

結合阻止分子を対象として、田中研究分担者が、T細胞免疫応答阻止能をヒト *in vitro* 実験系において検証する。*in vitro* にて有効な化合物について、HLA-DP5 トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 実験系での検証を行う。

(9) グレーブス病、橋本病の病因 HLA に結合する病因ペプチドの同定

それぞれの疾患の病因 HLA と結合するペプチドを、結合モチーフ情報、甲状腺特異的に発現する遺伝子情報、自己抗体情報をもとに同定する(笹月、田中)。

(10) グレーブス病、橋本病それぞれの病因 HLA と結合するそれぞれの病因ペプチド複合体の構造解析と低分子化合物同定

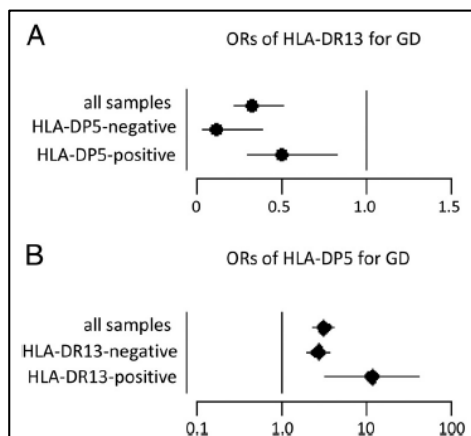
グレーブス病と橋本病について、それぞれの病因 HLA とそれぞれの病因ペプチド複合体の高次構造解析(A02 横山)と結合阻止化合物スクリーニングを行う。以下スギ花粉症と同様に研究を進め、免疫応答阻止低分子化合物を同定する。

以上のプロセスで得た、立体構造情報、結合モチーフ情報、病因ペプチド情報、低分子化合物情報を A01 今西研究分担者が開発する HLA 統合データベースに登録する。

4. 研究成果

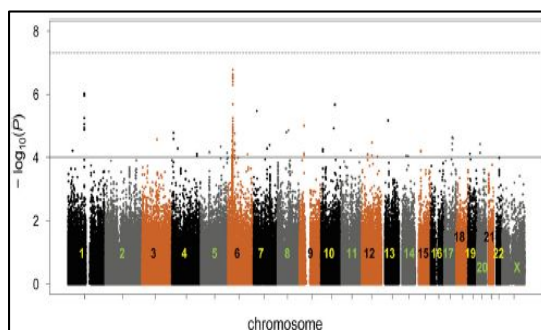
(1) グレーブス病、橋本病の病因となる HLA 対立遺伝子の確定

グレーブス病患者 547 名、橋本病患者 444 名、健常人 481 名について、HLA-A、B、C、DRB1、DQB1、DPB1 遺伝子座を対象に相関解析を行い、グレーブス病は、HLA-DPB1*05:01 が第一の責任 HLA であること、HLA-DQB1*03:02 が第二の責任 HLA であること、HLA-DR14:03 と DPB1*05:01 はグレーブス病に特異的な感受性アレルであること、さらに HLA-DRB1*13:02、DRB1*15:02、B*07:02 がグレーブス病発症を防御することを明らかにした。次に、これら感受性遺伝子と抵抗性遺伝子のエピスティック(上下関係)解析から、抵抗性アレルである DRB1*13:02、DRB1*15:02 が感受性アレルである DPB1*05:01 に対して上位であることを明らかにした。下図 A にあるように、



HLA-DRB1*13:02 存在下では、HLA-DPB1*05:01 を有していても、グレーブス病発症に関するオッズ比は 0.5 程度であり、抵抗性アレルが感受性アレルの機能を抑制していることが明らかとなった。

(2) 橋本病特異的な感受性遺伝子 VAV3 の同定
グレーブス病と橋本病の遺伝要因の差異を解明するために、ゲノムワイドでの相関解析を、グレーブス病 547 名、橋本病 446 名に対して二段階スクリーニングにて実施し、最終的に、 $P = 3.90 \times 10^{-8}$; OR = 1.77; 95%CI = 1.44-2.17 の有意差を示す SNP を VAV3 遺伝子座に同定した (rs7537605)。コントロール群 1363 名との比較から、VAV3 遺伝子座は橋本病に特異的な感受性遺伝子であることを明らかにした。下図にグレーブス病と橋本病の直接比較での全ゲノム相関解析プロットを示す。



このように、グレーブス病と橋本病との間の差異に置いて HLA 領域が際立っており、同 HLA 領域の重要性が理解できる。1 番染色体単腕部に第二のピークが観察され、この領域に位置する VAV3 遺伝子内の SNP が、橋本病に特異的に相関することが、二次解析によって証明された。

(3) HLA-DP5・CriJ-1 ペプチド複合体の立体構造の解明 (A03 横山計画研究代表者との共同研究成果)

HLA-DP5・CriJ-1(9mer) 複合体の立体構造を A02 横山らとの共同研究により解明した。CriJ-1(9mer)は、HLA-DP5 の α 鎖と β 鎖から構成される抗原結合ポケットに収容され、10 組の水素結合と疎水的な相互作用により認識されていた。一方、自己抗原を結合した HLA-DP2 では抗原ペプチドとの間に水素結合を 1 組しか形成せず、殆どが疎水的な相互作用によるものであり、認識機序の違いが明白であった。さらに、HLA-DP5・CriJ-1(13mer) 複合体が示す新たな複合体間相互作用を同定した。すなわち、DP5 分子から外側に伸びたペプチド N 末端が、隣接する DR 分子と相互作用することによって、DR5・ペプチド複合体の直線的な集合体が形成され、さらにそれが DP5 分子で保存されている残基をインターフェースとして互いに結合し、最終的にペプチドを一様に T細胞側に提示する形で平面的に会合することを明らかにした。これは、抗原ペプチドが細胞表面上での HLA 分子の物

理的性状を制御することを示唆し、免疫応答制御機構の新機軸の発見である。HLA-DP5 拘束性 9mer あるいは 13mer 特異的な T 細胞クローンを樹立し、9mer と 13mer ペプチド、ならびにそれらの変異ペプチドを利用して、本研究で発見した立体構造の免疫制御における意義を細胞免疫学の観点から検討しており、これまでに以下の成果を得た。

・20名の HLA-DPB1*05:01(HLA-DP5)陽性スギ花粉患者の末梢血単核球を用いた CFSE アッセイにおいて、CryJ-1 ペプチド(9mer および 13mer)抗原に対する特異的な細胞増殖がみられ、9mer ペプチドよりも 13mer ペプチドに対して強い増殖を示した。

・HLA-DPB1*05:01 陽性のスギ花粉患者 2名の PBMC より HLA-DP5 + 13mer ペプチド抗原特異的な Th2 clone を 7種類得た(Clone名: Su3-2, Su3-3, NKMR-T3, NKMR-T4, NKMR-T5, NKMR-T6, NKMR-T7)。同様に HLA-DP5 + 9mer 特異的な Th2 clone を 1種類得た(NKMR-QT3)。いずれの T cell clone も 13mer 刺激時にはサイミジンアッセイにおいて細胞増殖がみられたが、9mer 刺激時には細胞増殖がみられなかった。NKMR 由来の T cell clones は 9mer および 13mer に対して同等量の Th2 サイトカイン産生がみられた。

・上記 T cell clones TCR を Tg40 細胞に移入し、細胞増殖が得られなかった NKMR-T3 と NKMR-T5 移入 Tg40 を除く 6種類の TCR 移入 Tg40 細胞を用いて、以下の解析を行った。TCR(+)Tg40 細胞に抗原提示細胞において、抗原提示細胞に HLA-DP5(+)PBMC + 13mer ペプチド刺激において、ペプチド濃度依存的に細胞表面活性化マーカー CD137 の発現の上昇がみられた。9mer ペプチド刺激時では発現上昇が見られなかった。構造解析予測に基づいた変異ペプチド(K2067 と K2068、いずれもペプチドを介した HLA-DP5 同士の結合に重要な個所で、変異が入ることでその結合を弱める)と、original 13mer ペプチド群と比較し、Tg40(Su3-3)の CD137 発現上昇が弱いことが観察され、この結果は、構造解析からの予測を支持するものであった。

(4)HLA 遺伝子型と自己抗体価の関連

これまでに収集した約 580名の自己免疫性甲状腺炎患者臨床情報を用い、HLA 遺伝子型と自己抗体価との関連を検討した。その結果、グレープス病において、HLA-DP5 が抗サイログロブリンおよび抗 TPO 自己抗体産生に対して抑制的に作用することを明らかにした。この HLA-DP5 による上記自己抗体産生抑制作用が、グレープス病と橋本病発症にどのような機序で関わるかは、本研究期間中に樹立した、HLA-DP5 トランスジェニックマウスや野生型および変異型 HLA-DP5 分子を発現する細胞株などを用い、今後、分子細胞生物学的検討にて明らかにする予定である。

なお、当初計画時に予定していた、グレープス病と橋本病の病因ペプチド同定、免疫応答阻止分子の開発は、研究期間中に達成し得

なかったが、これは、先に記した、HLA-DP5・CryJ-1(13mer)複合体解析の結果、抗原ペプチドが細胞表面 HLA・抗原ペプチド複合体間の相互作用を制御するという、当初予想し得なかった免疫学上の新たな発見が研究期間通になされたため、これを優先して研究を進めたことによる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

Tochio N, Umehara T, Nakabayashi K, Yoneyama M, Tsuda K, Shirouzu M, Koshiba S, Watanabe S, Kigawa T, Sasazuki T, Shirasawa S, Yokoyama S. Solution structures of the DNA-binding domains of immune-related zinc-finger protein ZFAT. *J Struct Funct Genomics*. 2015 Jun;16(2):55-65.

Tanimura K, Jin H, Suenaga T, Morikami S, Arase N, Kishida K, Hirayasu K, Kohyama M, Ebina Y, Yasuda S, Horita T, Takasugi K, Ohmura K, Yamamoto K, Katayama I, Sasazuki T, Lanier LL, Atsumi T, Yamada H, Arase H. 2-Glycoprotein I/HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2015 Apr 30;125(18):2835-44.

Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Morishima S, Onizuka M, Yabe T, Murata M, Doki N, Eto T, Mori T, Miyamura K, Sao H, Ichinohe T, Saji H, Kato S, Atsuta Y, Kawa K, Koderu Y, Sasazuki T; Japan Marrow Donor Program. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood*. 2015 Feb 12;125(7):1189-97.

Oryoji D, Ueda S, Yamamoto K, Yoshimura Noh J, Okamura K, Noda M, Watanabe N, Yoshihara A, Ito K, Sasazuki T. Identification of a Hashimoto thyroiditis susceptibility locus via a genome-wide comparison with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Feb;100(2):E319-24.

Oryoji D, Hisamatsu T, Tsuchiya K, Umeno J, Ueda S, Yamamoto K, Matsumoto T, Watanabe M, Hibi T, Sasazuki T. Associations of HLA class I alleles in Japanese patients with Crohn's disease. *Genes Immun*. 2015 Jan-Feb;16(1):54-6.

Kusano S, Kukimoto-Niino M, Satta Y, Ohsawa N, Uchikubo-Kamo T, Wakiyama M,

Ikeda M, Terada T, Yamamoto K, Nishimura Y, Shirouzu M, Sasazuki T, Yokoyama S. Structural basis for the specific recognition of the major antigenic peptide from the Japanese cedar pollen allergen Cry j 1 by HLA-DP5. J Mol Biol. 2014 Aug 26;426(17):3016-27.

Jin H, Arase N, Hirayasu K, Kohyama M, Suenaga T, Saito F, Tanimura K, Matsuoka S, Ebina K, Shi K, Toyama-Sorimachi N, Yasuda S, Horita T, Hiwa R, Takasugi K, Ohmura K, Yoshikawa H, Saito T, Atsumi T, Sasazuki T, Katayama I, Lanier LL, Arase H. Autoantibodies to IgG/HLA class II complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Mar 11;111(10):3787-92.

Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Nakamura K, Ono M, Nishiya T, Nakamura S, Takeda Y, Dobashi A, Takahashi A, Endo M, Ito A, Ueda K, Sato N, Higuchi S, Kondo T, Hashimoto S, Watanabe M, Watanabe M, Takahashi T, Sasaki K, Nakamura M, Sasazuki T, Narushima T, Suzuki R, Ogasawara K. NKG2D⁺ IFN- γ ⁺ CD8⁺ T cells are responsible for palladium allergy. PLoS One. 2014 Feb 12;9(2):e86810.

Ueda S, Oryoji D, Yamamoto K, Noh JY, Okamura K, Noda M, Kashiwase K, Kosuga Y, Sekiya K, Inoue K, Yamada H, Oyamada A, Nishimura Y, Yoshikai Y, Ito K, Sasazuki T. Identification of independent susceptible and protective HLA alleles in Japanese autoimmune thyroid disease and their epistasis. J Clin Endocrinol Metab. 2014 Feb;99(2):E379-83.

Doi K, Fujimoto T, Okamura T, Ogawa M, Tanaka Y, Mototani Y, Goto M, Ota T, Matsuzaki H, Kuroki M, Tsunoda T, Sasazuki T, Shirasawa S. ZFAT plays critical roles in peripheral T cell homeostasis and its T cell receptor-mediated response. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Aug 17;425(1):107-12.

〔学会発表〕(計7件)

笹月健彦：尋常性乾癬の免疫遺伝学 - HLA Revisited - .第25回日本乾癬学会、宇部市、2010年9月3日。

笹月健彦：個人化医療(テーラーメイド医療)への期待、平成22年度日本学会議地域振興・東北地区フォーラム、仙台市、2011年1月28日。

笹月健彦：HLA研究への期待。第20回日本組

織適合性学会大会、静岡市、2011年8月29日。

笹月健彦：HLA controls the clinical difference, overlap and conversion between Graves disease and Hashimoto thyroiditis. ICAD Medical Science Forum, Tokyo, April 17, 2012.

Takehiko Sasazuki：Epistatic interaction between protective HLA alleles and susceptible HLA-DP allele in autoimmune thyroid disease. 16th International HLA and Immunogenetics Workshop and Conference. Liverpool, England, May 28-June 3, 2012,

Takehiko Sasazuki：Immunogenetic risk factors for autoimmune thyroid disease (ZFAT, FcRL3 and HLA). 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan, August 22-27, 2012.

Takehiko Sasazuki：Epistatic Interaction between protective HLA alleles and susceptible HLA alleles in Graves Disease. Centennial of Hashimoto Disease International Symposium, Fukuoka, December 1-4, 2012.

〔図書〕(計1件)

上田 彰、山本 健、押領司大助、笹月健彦：橋本病とグレーブス病の発症と HLA, 医薬ジャーナル社、血液フロンティア, 1073-1079, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹月 健彦 (SASAZUKI Takehiko)
九州大学・高等研究院・特別主幹教授
研究者番号：50014121

(2)研究分担者

岡村 匡史 (OKAMURA Tadashi)
独立行政法人国立国際医療研究センター・研究所・室長
研究者番号：00333790

田中 芳彦 (TANAKA Yoshihiko)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：00398083

岸川 禮子 (KISHIKAWA Reiko)
独立行政法人国立病院機構福岡病院(臨床研究部)・アレルギー科・医長
研究者番号：50450945

森 晶夫 (MORI AKIO)

独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨
床研究センター）・先端技術開発研究部・
部長
研究者番号：80251247

岡村 建（OKAMURA Ken）
九州大学・医学研究院・名誉教授
研究者番号：90150432

吉開 泰信（YOSHIKAI Yasunobu）
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：90158402

野田 光彦（NODA Mitsuhiko）
独立行政法人国立国際医療研究センタ
ー・糖尿病研究部・部長
研究者番号：90237850

(3)研究協力者

伊藤 公一（ITO Kouichi）

吉村 弘（YOSHIMURA Hiroshi）