

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02545

研究課題名(和文)ミスフォールド蛋白質/HLAクラスII分子複合体を介した自己免疫疾患発症機構の解明

研究課題名(英文) New mechanism of autoimmune diseases mediated by misfolded protein/MHC class II complex

研究代表者

荒瀬 尚 (Arase, Hisashi)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：10261900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミスフォールド蛋白質・HLAクラスII複合体を用いることで、通常の臨床検査では検出できない自己抗体の検出でき、自己免疫疾患における自己抗体の検出に重要であると考えられた。また、ANCA関連血管炎においてもMPO/HLAクラスII分子複合体が自己抗体の標的として病態に関与していることが判明した。また、関節リウマチで認められるIgG/HLAクラスII分子複合体は、NK細胞の発現するFcγRIII受容体のリガンドとして、関節リウマチにおけるNK細胞の活性化に関与していることが判明した。以上の様に、ミスフォールド蛋白質・HLAクラスII複合体は自己免疫疾患の病態に深く関与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、自己抗原・HLAクラスII複合体を用いると従来方法で検出できなかった抗原特異性の自己抗体が検出できるようになることが判明した。また、自己抗原・HLAクラスII複合体は異所性に発現したHLAクラスII分子によって形成されると考えられる。異所性HLAクラスII発現阻害剤は、サイトカインシグナル全般を抑制するJAK阻害剤等に比べて作用点が限られており、感染症等の副作用の少ない新たなタイプの免疫制御薬となることが期待できることが判明した。これらの成果は、自己免疫疾患の新たな診断法、治療薬の開発に重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that autoantibodies that cannot be detected by general laboratory test can be detected using misfolded protein-HLA class II complex. MPO-HLA class II complex was found to be involved in ANCA-associated vasculitis as a target for autoantibodies. IgG/HLA class II complex generated in rheumatoid arthritis was found to be a ligand for FcγRIII expressed on NK cells, which is involved in the activation of NK cells in rheumatoid arthritis. These studies revealed that misfolded proteins complexed with HLA class II molecules play an important role in the pathogenesis of autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 自己抗体 MHC

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Genome wide association study (GWAS)によって、様々な遺伝子が自己免疫疾患の発症に関与していることが明らかになってきた。しかし、以前から知られていた特定の HLA クラス II アリルが様々な自己免疫疾患の感受性に最も強く関与した遺伝子であることが再確認されている。自己免疫疾患の発症機構を解明するためには、HLA クラス II 遺伝子がどのように疾患感受性を決定するかを解明することが重要である。HLA クラス II 分子は T 細胞にペプチド抗原を提示することから、HLA クラス II 遺伝子が関与する疾患は、T 細胞異常によって引き起こされると考えられてきた。しかし、膨大な研究がなされてきたが、疾患に関与するペプチド抗原を含めて HLA クラス II 遺伝子がどのように疾患感受性に関与するかは明らかになっていない。

我々は、ペア型レセプターのリガンド分子の発現機構の解析から、細胞内のミスフォールド蛋白質 (MF 蛋白質) を細胞外へ輸送する分子として HLA クラス II 分子を同定した。通常細胞内のミスフォールド蛋白質は ERAD 等のメカニズムによって細胞内で速やかに分解される。ところが、細胞内のミスフォールド蛋白質が HLA クラス II 分子の抗原提示部位に会合すると分解されずに HLA クラス II 分子によって細胞外へ輸送されることを発見した。また、HLA クラス II 分子に提示されたミスフォールド蛋白質は、抗原特異的な B 細胞を活性化するという HLA クラス II 分子の新たな機能が明らかになった (Jiang et al. *Int. Immunol.* 2013)。さらに、HLA クラス II 分子と複合体を形成したミスフォールド蛋白質は、関節リウマチ等の多くの自己免疫疾患における自己抗体の標的分子になっていることが判明した (図1)。

HLA クラス II 分子に提示された抗体重鎖に対する自己抗体の結合性は、HLA クラス II アリルによる関節リウマチの感受性と非常に高い相関を示すことが判明した。今まで、HLA クラス II アリルの疾患感受性に関与する分子機構はペプチド抗原を含めて不明であり、IgG 重鎖が HLA クラス II アリルによる関節リウマチ感受性に相関する初めての分子である。従って、ミスフォールド蛋白質/HLA クラス II 分子複合体は、自己抗体の標的分子として自己免疫疾患の発症に直接関与している可能性が考えられた (Jin et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014)。

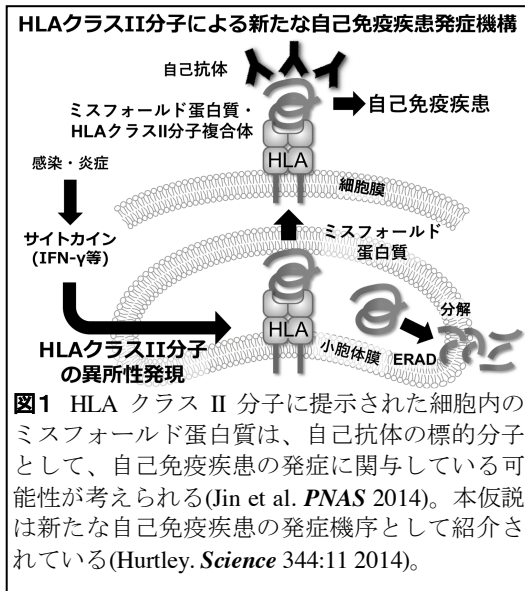


図1 HLA クラス II 分子に提示された細胞内のミスフォールド蛋白質は、自己抗体の標的分子として、自己免疫疾患の発症に関与している可能性が考えられる (Jin et al. *PNAS* 2014)。本仮説は新たな自己免疫疾患の発症機序として紹介されている (Hurtley. *Science* 344:11 2014)。

2. 研究の目的

特定の HLA クラス II アリルは、関節リウマチをはじめ多くの自己免疫疾患の感受性を最も強く左右するが、HLA に提示される抗原を含めてそのメカニズムは依然として明らかでない。これまでの研究よりミスフォールド蛋白質/HLA クラス II 複合体が、自己抗体の標的として自己免疫疾患の発症に関与していると考えられる。そこで、関節リウマチ、SLE 等の自己免疫疾患においてミスフォールド蛋白質/HLA クラス II 複合体が自己抗体の産生や自己免疫疾患の発症にどのように関与しているかを明らかにする。特に、通常は HLA クラス II を発現していない細胞における HLA クラス II 分子の異常発現が自己免疫疾患の原因と考えられるので、異所性の HLA クラス II の発現機構やその阻害法の解明を行う。また、ミスフォールド蛋白質/HLA クラス II 複合体を標的にすることで、今まで通常の抗原のみを用いたアッセイ系では検出できない自己抗体も検出できることが明らかになった (図2、Tanimura et al. *Blood* 2015)。そこで、ミスフォールド蛋白質/HLA クラス II 複合体を用いた新たな自己免疫疾患の診断技術の開発をする。

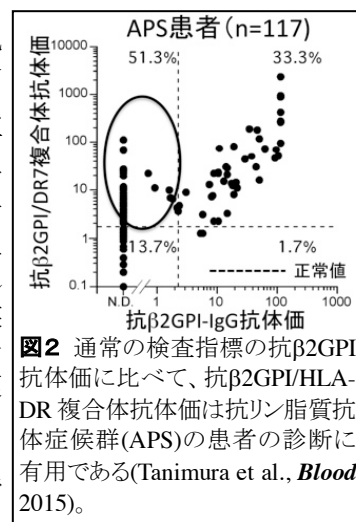


図2 通常の検査指標の抗β2GPI抗体価に比べて、抗β2GPI/HLA-DR 複合体抗体価は抗リン脂質抗体症候群 (APS) の患者の診断に有用である (Tanimura et al., *Blood* 2015)。

3. 研究の方法

いままでの我々の研究により関節リウマチ、抗リン脂質抗体症候群、ANCA 関連血管炎、バセドウ病、肺胞蛋白症等、様々な自己免疫疾患で産生される自己抗体が自己抗原/MHC クラス II 分子複合体を特異的に認識することが判明した。そこで、ミスフォールド蛋白質/MHC クラス II 複合体が自己抗体の産生や自己免疫疾患の発症にどのように関わるかを明らかにする。また、自己免疫疾患において蛋白質/MHC クラス II 複合体が生じるメカニズムを解明し、自己免疫疾患の発症原因を解明とその修復法の探索を実施した。特に下記の点に関して研究を実施した。

1. 自己抗原/MHC クラス II 分子複合体が関与している自己免疫疾患の検索
2. 自己抗原/MHC クラス II 分子複合体を用いた新たな診断法の開発
3. 自己抗原/MHC クラス II 分子複合体による自己抗体の産生誘導機構の解明
4. 自己抗体の病原性における自己抗原/MHC クラス II 分子複合体の機能
5. 自己免疫疾患標的組織における異常 MHC クラス II 発現のメカニズムの解明

4. 研究成果

本研究の結果、ミスフォールド蛋白質 HLA クラス II 複合体を用いることで、通常の臨床検査では検出できない自己抗体の検出が可能となった。特に、抗リン脂質抗体症候群において通常の臨床検査では検出できない自己抗体が $\beta 2$ グライコプロテイン I/HLA クラス II 複合体を用いると検出可能になることが判明した。特に、原因不明の皮膚潰瘍の患者においても、その約 30%において $\beta 2$ グライコプロテイン I/HLA クラス II 複合体に対する抗体が認められ、抗リン脂質抗体症候群が皮膚潰瘍に関与していると考えられた(図 3 *Br. J. Dermatol.* 2018)。

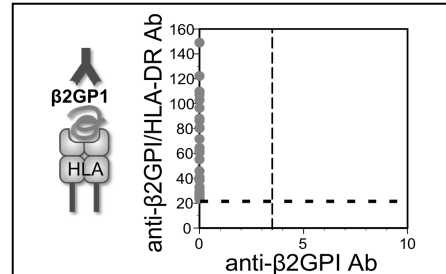


図 3 $\beta 2$ グライコプロテイン I/HLA クラス II 複合体を用いると従来法では検出できない抗リン脂質抗体が検出できるようになることが判明した(*British J. Dermatology* 2018)。

また、ANCA 関連血管炎の自己抗体においても、ミエロペルオキシダーゼ・HLA クラス II 分子複合体を認識することが判明した。同様な特異性が認められた。特に、ミエロペルオキシダーゼ・HLA クラス II 分子複合体に対する自己抗体の結合性は、各 HLA クラス II アリルの ANCA 関連血管炎に対する感受性とも有意に相関することが判明した。特に、疾患感受性のアリルを持つ好中球では、サイトカイン刺激により、ミエロペルオキシダーゼ・HLA クラス II 分子複合体が形成されることが判明した。また、ANCA 関連血管炎の患者さんの自己抗体は、ミエロペルオキシダーゼ・HLA クラス II 分子複合体を介して好中球様細胞を活性化することが明らかになった。これらのことから、ミエロペルオキシダーゼ・HLA クラス II 分子複合体は、ANCA 関連血管炎の病態に関与していると考えられた(図 4 *Arthritis Rheumatol.* 2017)。

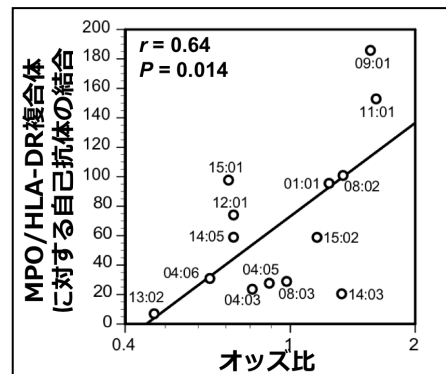


図 4 MPO/HLA-DR 複合体に対する自己抗体の結合能は、HLA-DR の ANCA 関連血管炎の感受性と有意な相関を示す(*Arthritis Rheumatol.* 2017)。

関節リウマチの自己抗体の標的になっている IgG/HLA クラス II 分子複合体の病原性について解析を進めたところ、IgG/HLA クラス II 分子複合体は、NK 細胞等の発現している $Fc\gamma RIII$ に認識され、NK 細胞を活性化し、細胞障害性やサイトカイン産生を誘導することが判明した。関節リウマチの関節では NK 細胞の活性化が認められることから、を活性化することで、炎症の惹起に関与していることが明らかになった。以上より、IgG/HLA クラス II 分子複合体が関節リウマチで認められる炎症応答に関与していると考えられた(*Int. Immunol.* 2019)。

また、MHC クラス I 分子に関しても、ミスフォールド蛋白質の輸送能を解析したところ、強直性脊椎炎と非常に強く関連する HLA-B27 に HLA クラス II 分子と同様な細胞内ミスフォールド蛋白質に対するシャペロン様の機能があることが判明した。今まで、HLA-B27 がどの様に強直性脊椎炎の発症に関与しているかは不明であるが、HLA-B27 に認められるミスフォールド蛋白質に対するシャペロン様の

機能が、疾患発症に関与している可能性が明らかになった(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019)。

以上より、ミスフォールド蛋白質/HLA クラス II 複合体は自己免疫疾患で産生される自己抗体の主要な標的抗原であり、自己免疫疾患の発症にも関与していると考えられた。従って、ミスフォールド蛋白質/HLA クラス II 複合体の形成の制御法が開発が自己免疫疾患の新たな治療標的として重要であると考えられる。また、ミスフォールド蛋白質/HLA クラス II 複合体は、自己免疫疾患で産生される自己抗体の検出にも有用であり、新たな診断薬の開発にも重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- ① Yorifuji H, Arase N, Kohyama M, Hirano T, Suenaga T, Kumanogoh A, Arase H. Transport of cellular misfolded proteins to the cell surface by HLA-B27 free heavy chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019, 511:(4) 862-868, 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.02.120.
- ② Shimizu Y, Kohyama M, Yorifuji H, Jin H, Arase N, Suenaga T, Arase H. FcγRIIIA-mediated activation of NK cells by IgG heavy chain complexed with MHC class II molecules. *Int. Immunol.* 査読有, 2019, in press
DOI: 10.1093/intimm/dxz010.
- ③ Shishido T, Kohyama M, Nakai W, Matsumoto M, Miyata H, Suenaga T, Arase H. Invariant chain p41 mediates production of soluble MHC class II molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019, 509:(1) 216-221, 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.12.106.
- ④ 穴戸達也, 荒瀬 尚: MHC クラス II 分子のミスフォールドタンパク質の提示による自己抗体産生, *炎症と免疫*, 26(6) 478-483 2018, 査読無
- ⑤ Hiwa R, Ohmura K, Arase N, Jin H, Hirayasu K, Kohyama M, Suenaga T, Saito F, Terao C, Atsumi T, Iwatani H, Mimori T, Arase H. Myeloperoxidase/HLA Class II Complexes Recognized by Autoantibodies in Microscopic Polyangiitis. *Arthritis. Rheumatol.* 2017. 69(10):2069-2080. 査読有
DOI: 10.1002/art.40170.
- ⑥ Arase N, Tanimura K, Jin H, Yamaoka T, Kishibe M, Nishioka M, Kiyohara E, Tani M, Matsuoka S, Ohmura K, Takasugi K, Yamamoto T, Murota H, Arase H, Katayama I. Novel autoantibody against the β2-glycoprotein I/human leucocyte antigen-DR complex in patients with refractory cutaneous ulcers. *Br. J. Dermatol.* 2018, 178(1):272-275, 査読有
DOI: 10.1111/bjd.15571.
- ⑦ 末永忠広, 荒瀬 尚: 自己抗体の新たな標的分子: ネオ・セルフ, *リウマチ科*, 58(3) 326-333, 2016, 査読無
- ⑧ 辻英輝, 荒瀬 尚: MHC クラス II の再発見ーネオ・セルフ: ミスフォールドタンパク質/MHC クラス II 分子複合体による新たな自己免疫疾患発症機構ー, *The LUNG*, 25(4) 61-65, 2016, 査読無
- ⑨ Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H. Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat. Microbiol.* 2016. 1(6):16054. 査読有
DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.54.
- ⑩ 日和良介, 荒瀬 尚: HLA 多型と自己免疫疾患, *臨床免疫・アレルギー* 65(1) 72-77, 2016, 査読無
- ⑪ 荒瀬規子, 荒瀬 尚: ミスフォールドタンパク質/主要組織適合抗原複合体による新たな自己免疫疾患, *日本臨床*, 74(2) 359-368, 2016, 査読無

〔学会発表〕(計 20 件)

- ① 荒瀬 尚, ネオ・セルフによる新たな自己免疫疾患発症機構, 第 5 回免疫セミナー, 2019/2/1
- ② 荒瀬 尚, HLA シャペロン様機能を介した新たな自己免疫疾患発症機構, 第 45 回愛媛リウマチ研究会, 2018/9/22
- ③ 荒瀬 尚, MHC クラス II 分子を標的とした免疫疾患の新たな診断法、治療法の開発, 第 3 回バイオ医薬 EXPO, 2018/6/29
- ④ 荒瀬 尚, ネオセルフによる新たな免疫疾患発症機構, 第 107 回日本病理学会総会, 2018/6/21
- ⑤ 荒瀬 尚, HLA を標的とした免疫疾患の新たな治療法へ向けて, 大阪アトピー性皮膚炎談話会, 2018/3/22
- ⑥ 荒瀬 尚, ネオセルフによる新たな自己免疫疾患発症機構, 埼玉関節リウマチセミナー-2018, 2018/3/7
- ⑦ 荒瀬 尚, HLA class II-associated neo-self antigens and autoimmune diseases, 第 42 回日本研究皮膚科学会, 2017/12/16
- ⑧ 荒瀬 尚, 異所性 MHC クラス II 発現によるネオセルフ抗原の生成と自己免疫疾患, 第 67 回日本薬学会近畿支部大会, 2017/10/14
- ⑨ Hisashi Arase, HLA class II-associated neo-self antigens as a target for autoimmune disease, Science Day, 2017/10/10

- ⑩ Hisashi Arase, MHC class II-induced neo-self antigens in autoimmune diseases, RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology, 2017/6/ 23
- ⑪ Hisashi Arase, Cellular misfolded proteins transported to the cell surface by aberrantly expressed MHC class II molecules are major autoantibody targets in autoimmune diseases, AAI2017, 2017/5/ 15
- ⑫ 荒瀬 尚, ネオセルフ化自己抗原による新たな自己免疫疾患発症機構, 第 61 回日本リウマチ学会 総会・学術集会, 2017/4/ 21
- ⑬ 荒瀬 尚, 異所性 MHC クラス II 発現によるネオセルフの生成と自己免疫疾患, 第 3 回病因研究会別府シンポジウム, 2017/3/ 4
- ⑭ 荒瀬 尚, 自己抗原のネオセルフ化による新たな免疫疾患発症機構, SCIENTIFIC EXCHANGE MEETING IN NIIGATA, 2016/11/26
- ⑮ 荒瀬 尚, 自己抗原のネオセルフ化による新たな自己免疫疾患発症機構, 第 16 回難治性免疫疾患先端治療開発研究会, 2016/11/25
- ⑯ 荒瀬 尚, MHC クラス II 分子による自己抗原のネオ・セルフ化と自己免疫疾患, 第 25 回日本組織適合性学会大会, 2016/10/24
- ⑰ 荒瀬 尚, MHC クラス II 分子による自己抗原のネオ・セルフ化を介した新たな自己免疫疾患発症機構, 第 26 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会, 2016/10/22
- ⑱ Hisashi Arase, MHC class II-associated neo-self antigens are novel targets for autoantibodies, IWAA 2016, 2016/10/11
- ⑲ 荒瀬 尚, MHC クラス II 分子による自己抗原のネオ・セルフ化を介した新たな自己免疫疾患発症機構, 第 28 回日本神経免疫学会学術集会, 2016/9/29
- ⑳ Hisashi Arase, Anti- β 2-Glycoprotein-I/HLA class II Complex Antibodies in APS, 15th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, 2016/9/24

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：可溶型 MHC クラス II 分子の産生誘導組成物、可溶型 MHC クラス II 分子の産生誘導キット、可溶型 MHC クラス II 分子の産生細胞、可溶型 MHC クラス II 分子の産生細胞の製造方法および可溶型 MHC クラス II 分子の製造方法

発明者：荒瀬尚、伊勢雅子、宍戸達也 権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許 番号：特願 2018-228986 出願年：2018 年 国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学微生物病研究所免疫化学分野 <http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：末永 忠広

ローマ字氏名：(SUENAGA, Tadahiro)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：微生物病研究所

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：20396675

研究分担者氏名：平安 恒幸

ローマ字氏名：(HIRAYASU, Kouyuki)

所属研究機関名：金沢大学

部局名：先進予防医学研究センター

職名：特任准教授

研究者番号 (8 桁)：30585170

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：伊勢 (香山) 雅子

ローマ字氏名：(ISE(KOHYAMA), Masako)

研究協力者氏名：熊ノ郷 淳

ローマ字氏名：(KUMANOGO, Atsushi)

研究協力者氏名：片山 一朗

ローマ字氏名：(KATAYAMA, Ichiro)