

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：82610

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：22133006

研究課題名(和文)HLAヘテロダイマー分子の多様性

研究課題名(英文)Diversity in HLA heterodimers

研究代表者

宮寺 浩子(Miyadera, Hiroko)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40361464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、HLAクラスIIと関連する疾患のメカニズムを解明することを目的として行い、以下の知見を明らかにした。まず、HLAのタンパク質安定性の測定系を確立し、多数のHLAクラスIIアレル産物についてタンパク質安定性を推定した。その結果、自己免疫疾患(1型糖尿病)感受性と関連するHLA-DQアレルがコードするHLAタンパク質安定性が、他のアレル産物と比較して顕著に低いことを見出した。従来の研究ではHLAと自己免疫疾患との関連は、HLAタンパク質とペプチドとの結合性で説明されている。本研究で得られた知見は、自己免疫疾患発症の過程に、これまでの定説とは異なる発症機序が働いている可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Variations in human leukocyte antigens (HLA) are strongly associated with immune-related disorders including autoimmune diseases and infections, among others. However, underlying mechanism has remained elusive for most of HLA-associated diseases. In this study, we aimed to uncover the mechanism of HLA association with autoimmune and other HLA-associated disorders. We have established a protocol to estimate allelic differences in the protein stability of HLA. Using this method, we analyzed the stability of diverse HLA-DQ allele products and found that HLA-DQ alleles that are associated with susceptibility to type 1 diabetes encoded extremely unstable proteins. Our finding suggests that a novel mechanistic basis might operate in the development of autoimmune diseases.

研究分野：生化学、免疫遺伝学

キーワード：ヒト白血球抗原(HLA) 主要組織適合性抗原(MHC)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト白血球抗原(HLA)は、体の免疫システムが自己・非自己を認識し、病原体などの異物を認識して免疫応答を開始する役割を担う分子である。HLA 遺伝子の多型は1型糖尿病などのさまざまな自己免疫疾患や、感染症など、多様な免疫系疾患感受性と強く関連することが1970年代より報告されており、近年、ゲノムワイド関連解析により、HLA が多くの自己免疫疾患における最も強い遺伝的要因であることが明らかにされた。しかしながら、HLA が疾患感受性に関わる仕組みは十分に解明されていないかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、HLA 多型と疾患の関連メカニズムを明らかにすることを目的として行った。従来の研究では、HLA 遺伝子多型と自己免疫疾患との関連はHLA タンパク質とペプチドとの結合性で説明されているが、実際の発症機序については不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、HLA タンパク質とペプチドとの結合性を解析すると共に、HLA タンパク質の安定性が、疾患感受性に関わる可能性に着目して研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### HLA-ペプチド結合測定系の構築：

1型糖尿病、ナルコレプシーに対する感受性・抵抗性と有意に関連を示すHLA-DR, -DQ アリル、および、関連を示さない中立性アリルcDNAをHLA 標準細胞株よりクローニングし、昆虫細胞株、および哺乳類線維芽細胞株を用いて組換え HLA タンパク質として発現した。これらの組換え HLA タンパク質を、His-tag を介してプレート上に固定し、ピオチン化ペプチドとHLA タンパク質との結合をELISAにより検出した。また、HLA class II  $\beta$  サブユニットのN末端にペプチド配列を融合して発現させ、細胞表面へのHLA タンパク質発現量を定量することで、HLA とペプチドとの相互作用の有無と、その強さを推測した。解析対象としては、1型糖尿病、ナルコレプシーの自己抗原候補である、インスリンペプチド、オレキシンペプチドに由来する合成ペプチドを用い、HLA-DR, -DQ タンパク質との結合を測定した。

#### HLA クラス II タンパク質安定性の解析：

主要なHLA-DQ アリル産物について、哺乳類細胞株において安定発現株を構築し、細胞表面へのHLA タンパク質(DQ $\alpha$ /DQ $\beta$ )ヘテロダイマーの発現量を測定することにより、HLA-DQ タンパク質の安定性を推測した。DQB1-ペプチド融合タンパク質を用いる事などにより、細胞表面発現量がHLA タンパク質

の安定性を反映している事を確認した。この方法を用いて、欧米人、日本人集団において主要なHLA-DQ アリル産物についてタンパク質安定性を推定し、安定性の高さと自己免疫疾患(1型糖尿病)感受性との関連の有無を解析した。

### 4. 研究成果

#### 1型糖尿病に関連する自己ペプチドの探索：

DRB1\*04:05, \*08:02, \*08:01, \*15:01の組換えタンパク質を発現し、ペプチド結合アッセイ系を確立した。ZnT8タンパク質について合成ペプチドライブラリーを作製し、コントロールペプチド(ピオチン標識ペプチド)に対する、非標識ペプチドの競合アッセイを行い、DRB1\*09:01タンパク質に結合する可能性がある領域をZnT8中に見出した。

#### ナルコレプシー感受性のメカニズム：

ナルコレプシー感受性・抵抗性に関連するHLAアリル(DQB1\*06:01, \*06:03(抵抗性)、DQB1\*06:02(感受性)、DQB1\*06:04(中立性))を哺乳類細胞株で発現し、これらのDQ タンパク質に対するオレキシンペプチドの結合性を調べた。オレキシンのシグナルペプチドについて、先行研究と一致する結果(DQB1\*06:02への強い結合)を確認した。また、細胞表面発現系を利用してHLA-ペプチド結合性を推測し、オレキシンタンパク質中に、DQ06タンパク質に、アリル特異的に結合しうる領域を複数箇所見出した。

#### HLA タンパク質安定性と疾患感受性との関連：

欧米人、東アジア(日本人)集団における主要HLA-DQ アリル産物を対象としてタンパク質安定性を解析し、アリル間で安定性が著しく異なることを見出した(図1)。

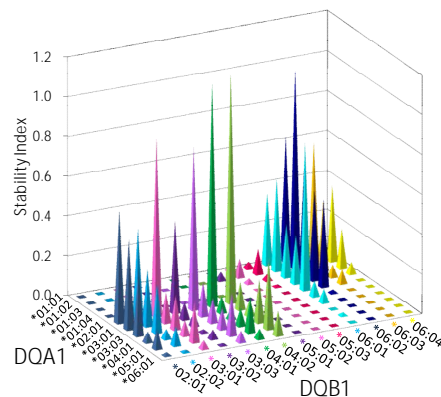


図1 HLA-DQ タンパク質安定性の解析結果  
横軸にDQA1, DQB1 アリルをそれぞれ示し、縦軸(z)に安定性の指標(相対値)を示す。

さらに、HLA-DQ タンパク質安定性の制御に関わるアミノ酸多型を同定した。

また、HLA-DQ タンパク質安定性プロファイルと、欧米人・日本人における1型糖尿病関連解析データを基に、HLA-DQ タンパク質安定性と、1型糖尿病感受性との関連の有無を解析し、1型糖尿病感受性と関連するHLA-DQ アリルが顕著に低安定なタンパク質をコードすることを見出した。これら一連の結果を論文発表した (Miyadera, et al. JCI 2015)。

HLA-DQ タンパク質安定性がアリル間で多様であることは、HLA の分子進化を考察する上でも重要な知見であるため、HLA-DQ ヘテロダイマー安定性のアリル間多様性とHLA-DQ ハプロタイプの進化過程との関係についても解析を行った (投稿準備中)。

#### 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 5 件)

Miyadera H\*, Ohashi J, Lernmark Å, Kitamura T, Tokunaga K.

Cell-surface MHC density profiling reveals instability of autoimmunity-associated HLA. J Clin Invest (2015) 125 (1): 275–291, 査読有 doi:10.1172/JCI74961.

Ueta M\*, Kaniwa N, Sotozono C, Tokunaga K, Saito Y, Sawai H, Miyadera H, Sugiyama E, Maekawa K, Nakamura R, Nagato M, Aihara M, Matsunaga K, Takahashi Y, Furuya H, Muramatsu M, Ikezawa Z, Kinoshita S.

Independent strong association of HLA-A\*02:06 and HLA-B\*44:03 with cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe mucosal involvement.

Sci Rep. (2014) 4: 4862. 査読有 doi:10.1038/srep04862

Isogai H, Miyadera H, Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S, Tokunaga K, and Hirayama N\*.

In silico risk assessment of HLA-A\*02:06-associated Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis (SJS/TEN) caused by cold medicine ingredients. J Toxicol (2013) Article ID 514068, 査読有 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/514068>

Han F, Lin L, Li J, Dong SX, An P, Zhao L, Liu NY, Li QY, Yan H, Gao ZC, Faraco J, Strohl KP, Liu X, Miyadera H, Mignot E\*.

HLA-DQ association and allele competition in Chinese narcolepsy.

Tissue Antigens (2012) 80:328-335. 査読有 DOI: 10.1111/j.1399-0039.2012.01948.x

Miyagawa T\*, Miyadera H, Tanaka S, Kawashima M, Shimada M, Honda Y, Tokunaga K, Honda M\*

Abnormally low serum acylcarnitine levels in narcolepsy patients.

Sleep (2011) 34: 349-353A. 査読有

〔学会発表〕(計 39 件)

宮寺浩子、徳永勝士、他

HLA タンパク質細胞表面発現量測定による HLA-ペプチド相互作用の評価  
第 23 回日本組織適合性学会大会  
2014 年 9 月 14 日 長崎大学 (長崎市)

Azzaya Enkbayar, 宮寺浩子、徳永勝士、他  
Preparation of recombinant HLA-A\*31:01 and mutants to determine the interaction of

carbamazepine with HLA-A

第 23 回日本組織適合性学会大会

2014 年 9 月 14 日 長崎大学 (長崎市)

宮寺浩子、徳永勝士、他

HLA-peptide binding analysis by the cell-surface expression assay

第 40 回米国組織適合性学会

2014 年 10 月 20 日 米国 デンバー

宮寺浩子、徳永勝士

MHC-peptide interaction analysis by the cell-surface expression assay

第 43 回日本免疫学会学術集会

2014 年 12 月 11 日 京都国際会議場 (京都市)

Azzaya Enkbayar, 宮寺浩子、徳永勝士、他  
Preparation of recombinant HLA-A\*31:01 and mutants to determine the interaction of

carbamazepine with HLA-A

第 43 回日本免疫学会学術集会

2014 年 12 月 11 日 京都国際会議場 (京都市)

宮寺浩子、大橋順、徳永勝士

Evolution of HLA class II through diversification in protein stability levels

第 100 回米国免疫学会

2013 年 5 月 2 日 ハワイ国際会議場 (米国 ハワイ)

Chen, Cindy Chia Jung, 宮寺浩子、徳永勝士  
Analysis of HLA-DR protein and peptide

interaction in association to type 1 diabetes in Japanese.

第 100 回米国免疫学会

2013 年 5 月 2 日 ハワイ国際会議場 (米国 ハワイ)

陳 萱蓉、宮寺浩子、徳永勝士

Functional analysis of HLA-DQ protein and

peptide interaction in association to autoimmune

mechanism of Narcolepsy.

第 100 回米国免疫学会

2013 年 5 月 2 日 ハワイ国際会議場(米国 ハワイ)

Azzaya Enkbayar、宮寺浩子、徳永勝士、他  
Expression of recombinant HLA-A\*31:01 and mutant alleles to determine interaction of carbamazepine with HLA-A

第 22 回日本組織適合性学会大会

2013 年 9 月 14 日 ~ 9 月 16 日 こらっせ福島(福島市)

陳 萱蓉、宮寺浩子、徳永勝士

Functional analysis of HLA-DQ protein and peptide interaction to understand autoimmune mechanism of Narcolepsy.

第 22 回日本組織適合性学会大会

2013 年 9 月 14 日 ~ 9 月 16 日 こらっせ福島(福島市)

Chen, Cindy Chia Jung、宮寺浩子、徳永勝士  
Analysis of HLA-DR9 protein and peptide interaction in association to type 1 diabetes in Japanese

第 22 回日本組織適合性学会大会

2013 年 9 月 14 日 ~ 9 月 16 日 こらっせ福島(福島市)

宮寺浩子、大橋順、徳永勝士

HLA class II タンパク質安定性のアレル間多様性と HLA の進化

日本人類遺伝学会第 58 回大会

2013 年 11 月 20 日 ~ 11 月 23 日 江陽グランドホテル(仙台市)

宮寺浩子、徳永勝士

Allelic diversity in HLA class II protein stability shapes HLA evolution and disease association

第 42 回日本免疫学会学術集会

2013 年 12 月 11 日 ~ 12 月 13 日 幕張メッセ(千葉県)

陳 萱蓉、宮寺浩子、徳永勝士

Functional analysis of HLA-DQ protein and peptide interaction to understand autoimmune mechanism of Narcolepsy.

第 42 回日本免疫学会学術集会

2013 年 12 月 11 日 ~ 12 月 13 日 幕張メッセ(千葉県)

Azzaya Enkbayar、宮寺浩子、徳永勝士  
Functional analysis HLA-A\*02:06, the risk allele for Stevens-Johnson syndrome with ocular complication in Japanese

第 42 回日本免疫学会学術集会

2013 年 12 月 11 日 ~ 12 月 13 日 幕張メッセ(千葉県)

宮寺浩子、徳永勝士

HLA-DQ trans heterodimer association to type 1 diabetes in East Asian population

米国免疫学会第 99 回年会

2012 年 5 月 6 日 米国・ボストン

宮寺浩子、徳永勝士

Allelic variation in the protein stability of HLA-DQ shapes genetic predisposition to autoimmunity

第 16 回国際 HLA ワークショップ、第 26 回欧州組織適合性学会合同大会

2012 年 6 月 2 日 英国・リバプール

内田優輝、宮寺浩子、徳永勝士

MHC Class II tetramer (DR04:06) preparation in mammalian expression system

第 16 回国際 HLA ワークショップ、第 26 回欧州組織適合性学会合同大会

2012 年 6 月 2 日 英国・リバプール

宮寺浩子、徳永勝士

HLA-DQ タンパク質安定性と一型糖尿病感受性・抵抗性との関連

第 21 回日本組織適合性学会大会

2012 年 9 月 15 日 明治大学(東京都千代田区)

陳 萱蓉、宮寺浩子、徳永勝士

ナルコレプシー発症の分子機構の解明

第 21 回日本組織適合性学会大会

2012 年 9 月 15 日 明治大学(東京都千代田区)

②1 Cindy Chen、宮寺浩子、徳永勝士

Type 1 diabetes association mechanism among Japanese population

第 21 回日本組織適合性学会大会

2012 年 9 月 15 日 明治大学(東京都千代田区)

②2 内田優輝、宮寺浩子、徳永勝士

哺乳類細胞を用いた MHC クラス (DR04:06) テトラマーの発現と調製

第 21 回日本組織適合性学会大会

2012 年 9 月 16 日 明治大学(東京都千代田区)

②3 宮寺浩子、徳永勝士

Allelic variation in the protein stability of HLA shapes genetic association of HLA with type 1 diabetes

米国人類遺伝学会第 62 回大会

2012 年 10 月 13 日 米国・サンフランシスコ

②4 宮寺浩子、徳永勝士

HLA-DQ タンパク質安定性と一型糖尿病感受性・抵抗性との関連

日本人類遺伝学会第 57 回大会  
2012 年 10 月 25 日 京王プラザホテル (東京都  
新宿区)

②⑤宮寺浩子、徳永勝士  
Allelic variation in the protein stability of HLA  
determines genetic risk for type 1 diabetes  
第 41 回日本免疫学会学術集会  
2012 年 12 月 6 日 神戸国際会議場 (兵庫県神  
戸市)

②⑥宮寺浩子、徳永勝士  
HLA class II (HLA-DQ) protein stability profile  
and disease association  
米国免疫学会第 98 回年会  
2011 年 5 月 15 日  
米国・サンフランシスコ

②⑦宮寺浩子、徳永勝士  
ナルコレプシー感受性、抵抗性と HLA-DQ ト  
ランス型二量体形成  
第 20 回日本組織適合性学会大会  
2011 年 8 月 29 日 ツインメッセ静岡 (静岡県  
静岡市)

②⑧内田優輝、宮寺浩子、徳永勝士  
HLA クラス II テトラマーの調製を目的とし  
た HLA-DRA\*01:01/DRB1\*04:06 の発現  
第 20 回日本組織適合性学会大会  
2011 年 8 月 29 日 ツインメッセ静岡 (静岡県  
静岡市)

②⑨宮寺浩子、徳永勝士  
Mechanisms of HLA-DQ predispositions to type  
1 diabetes in European and East Asian  
populations  
米国人類遺伝学会第 61 回大会  
2011 年 10 月 13 日 カナダ・モントリオール

③⑩宮寺浩子、徳永勝士  
ナルコレプシー感受性・抵抗性と HLA-DQ ト  
ランス型二量体形成  
日本人類遺伝学会第 56 回大会  
2011 年 11 月 10 日 幕張メッセ (千葉県千葉  
市)

③⑪内田優輝、宮寺浩子、徳永勝士  
Preparation of MHC class II tetramer (DR04:06)  
for autoreactive CD4+ T cells detection  
第 34 回日本分子生物学会大会  
2011 年 12 月 14 日 パシフィコ横浜 (神奈川  
県横浜市)

③⑫内田優輝、宮寺浩子、徳永勝士  
Preparation of MHC class II tetramer (DR04:06)  
for autoreactive CD4+ T cells detection  
第 40 回日本免疫学会学術集会  
2011 年 11 月 28 日 幕張メッセ (千葉県千葉

市)

③⑬宮寺浩子、徳永勝士  
1 型糖尿病疾患感受性と HLA-DQ 多型の関連  
メカニズム  
第 40 回日本免疫学会学術集会  
2011 年 11 月 28 日 幕張メッセ (千葉県千葉  
市)

③⑭内田優輝、宮寺浩子、他  
Expression of HLA-DRA\*0101/DRB1\*0406 for  
the preparation of HLA class II tetramer  
第 14 回国際免疫学会  
2010 年 8 月 26 日 神戸ポートピアホテル、神  
戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

③⑮内田優輝、宮寺浩子、他  
HLA クラス II テトラマーの調製を目的とした  
HLA-DRA\*0101/DRB1\*0406 の発現  
第 19 回日本組織適合性学会大会  
2010 年 9 月 18 日 東京大学 (東京都文京区)

③⑯宮寺浩子  
HLA クラス II タンパク質の多様性  
第 19 回日本組織適合性学会大会  
2010 年 9 月 18 日 東京大学 (東京都文京区)

③⑰内田優輝、宮寺浩子、他  
HLA クラス II テトラマーの調製を目的とした  
HLA-DRA\*0101/DRB1\*0406 の発現  
日本人類遺伝学会第 55 回大会  
2010 年 10 月 28 日 大宮ソニックシティ (埼  
玉県さいたま市)

③⑱宮寺浩子、徳永勝士  
HLA クラス II タンパク質のヘテロ二量体形成  
と機能的多様性  
日本人類遺伝学会第 55 回大会  
2010 年 10 月 29 日 大宮ソニックシティ (埼  
玉県さいたま市)

③⑲内田優輝、宮寺浩子、他  
Expression of recombinant  
HLA-DRA\*0101/DRB1\*0406 and preparation of  
HLA class II tetramer  
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本  
生化学会大会 合同大会  
2010 年 12 月 8 日 神戸ポートアイランド (兵  
庫県神戸市)

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

Jon von Rood Award  
第 16 回国際 HLA ワークショップ・第 26 回欧  
州組織適合性学会合同大会  
”HLA-DQ 分子の安定性と自己免疫疾患感受  
性の関連”

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

宮寺 浩子 (MIYADERA, Hiroko)  
国立国際医療研究センター・上級研究員  
研究者番号：40361464

### (2)研究分担者

人見 祐基 (HITOMI, Yuki)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10525819

### (3)連携研究者

該当なし