

令和 2 年 4 月 13 日現在

機関番号：32810

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05840

研究課題名(和文) 東アジア調査に基づくベーチェット病、強皮症の特異的HLAが病態に関わる機序の研究

研究課題名(英文) Susceptibility HLA alleles and the biological contribution of HLA for the pathogenesis of Behcet's disease or Scleroderma in East Asia

研究代表者

竹内 二士夫 (TAKEUCHI, FUJIO)

東京聖栄大学・私立大学の部局等・教授

研究者番号：70154979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：HLAのベーチェット病(BD)や強皮症との相関、病態に関わる機序を検討した。日韓と同様タイBDでもB\*51陰性群でA\*26:01が増加、リンパ球はHSP65PD、B51PD由来ペプチド(PD)で有意な増殖能を示した。GROMACSでのB\*51:01とMICA-TNの結合解析ではN末がアンカーとして働かない可能性も示された。B\*51:01の1,2を大腸菌で発現させHSP65と再構成し回収できた。タイ強皮症でも日韓台と同様DR\*11は少なく、Topo1PD刺激でIFN- $\gamma$ 、IL-2陽性リンパ球が増加した。分子動力学的解析ではTopo1由来Pep6が、強皮症に相関するDRと強く相互作用していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

東アジアのベーチェット病(BD)、強皮症(SSc)で特異的HLAの遺伝的関与、臨床症状との関連が確認された。BDでは特異的HLA陽性者のリンパ球がMICA、HSP65、B\*51由来のペプチド(PD)と強く反応し、親和性を検討した計算化学結果とも概ね一致した。SScでは候補PD刺激でサイトカイン産生が増加し(HLAは検討中)、計算化学による高親和性PDの同定、DR-PD複合体の可溶化(結晶化中)から、エピトープ候補を推定した。本成果は病態へのHLAの役割の解明、新検査・診断法、治療法の開発に繋がり、計算化学的研究法が臨床研究に役立つ可能性を示唆する。更に研究手法が他疾患へ応用できる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：The susceptibility HLA and its contribution to the pathogenesis of Behcet's disease (BD) and Scleroderma (SSc) were examined in East Asia. In Thai BD the allele frequency of A\*26:01 was increased in B\*51X-negative BD ( $P<0.05$ ). The association of B\*51:01 with the posterior uveitis was observed ( $P<0.05$ ). The lymphocytes (Lyn) stimulated by peptides (PD) from HSP65 or HLA-B\*51 showed higher proliferation ( $P<0.001$ ). The analysis of the bind between MICA-TM and B\*51:01 by GROMACS showed the N-terminal did not work as anchor. The alpha-1, 2 domains of B\*51:01 expressed in E-Coli were reconstituted with HSP65. The prevalence of DRB1\*11 was not increased in SSc among countries examined. The stimulation by PD from Topo1 induced significant increase in the IFN- $\gamma$  or IL-2 positive Lyn ( $P<0.001$ ). The Molecular dynamics analysis by MM-PBSA, MM-GBSA and QM/MM-GBSA revealed HLA-DR/Pep6 complexes of anti-Topo1 association exhibited higher protein stability with lower free energy.

研究分野：内科学、リウマチ学、臨床遺伝学

キーワード：ベーチェット病 強皮症 東アジア HLA 抗トポイソメラーゼ1抗体 エピトープ 計算化学 三次元構造

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一般に HLA との相関は古くから多くの疾患で報告されているが、発症、病態形成に関する機序は明らかになっていない。BD は、中東から日本、韓国にわたる地域に比較的高頻度にみられる原因不明の疾患であり、その発症に遺伝因子の関与が考えられている。特に HLA-B\*51:01 との相関は強く、50-60%の患者が HLA-B\*51:01 をもつ事が汎く知られている (Ohno et al: JAMA 240, 1978; Mizuki et al: Am J Ophthalmol 116, 1993; Gonzalez-Escribano et al: Tissue Antigens 52, 1998)。我々は眼病変のある BD 患者では HLA-A\*26:01 が B\*51:01 とは独立して有意に増加し、視力予後に関する事を報告した (Clin Exp Rheumatol 28 (S60), 2010)。HLA-A\*26:01 と BD の相関は Meguro 等も報告している (Ann Rheum Dis 69, 2010)。韓国での検討では A\*26:01 と眼症状に、更に A\*02:07 と皮膚症状に優位な相関を認め (Arth Res Ther 13, 2011)、A\*26:01 と後部ブドウ膜炎の関連も報告されている (Kang et al.: Hum Immunol 74, 2013)。また、タイ、台湾では A\*26:01 頻度が極めて少なく、地域差の要因の一つとしてその分布の違いが考えられる。一方 A\*02:07 は一般日本人集団における頻度が低く日本では優位差を得るのが困難である。我々は A\*02:07 がタイや台湾の正常群で高頻度であり、症例数が少ないが BD 群で増加傾向があることを見出し、東アジアでの検討は意義があると考えている。

一方 SSc は、汎く世界に分布する疾患であり症状や自己抗体の出現に人種差がある事が知られている。そのうち瀰漫性強皮症では抗 Topo1 (DNA Topoisomerase 1) 抗体の陽性率が高く、日本では DRB1\*15:02-B5\*01:02 及び DRB1\*08:02 アリルと相関がある (J Rheum 21, 1994)。韓国でも同様の相関を認めた (J Rheum 28, 2001)。一方白人及び黒人では DRB1\*11:01、\*11:04 アリルとの相関が報告されている (Reveille et al: JCI 90, 1992)。SSc では病型、自己抗体、HLA との間に互いに相関があると考えられる。しかし東アジアでの HLA の関与については人種が入り組んでいる事もあり少数例の研究に限られている (Rheum Int 33, 2013)。一方 HLA-DQ との相関、特に 71TRAELDT77 アミノ酸配列との相関も報告されている (Reveille et al: JCI 90, 1992)。しかし韓国では DQ やそのアミノ酸配列との有意な相関は得られていない。Azzouz 等の報告では前述の DR 上の 67FLEDR71 配列が TRAELEDT よりも抗 Topo1 抗体と強い相関を示し (Azzouz: PLoS One 7, 2012)、DR アリルと抗 Topo1 との関連がより強く示唆されている。HLA-DR が認識し抗原提示するであろうエピトープについては、1990 年代より多くの研究報告があるが (Veeraraghavan et al: ARD 63, 2004; Hu et al: J Autoimm 26, 2006; Simon et al: Int Immun 21, 2009)、特異的 DR に対応するエピトープのコンセンサスは得られていない。

我々はこれまでも基盤研究等でソウル大 Song 先生、台湾大 Hsieh 先生、タイ チェンマイ大 Worawit 先生、マヒドール大 Sanga 先生とリウマチ疾患の遺伝因子について共同研究を行っており、サンプル収集や臨床情報収集等のための協力体制は確立している。

一方近年、計算化学手法の発展は著しく、分担研究者の石川は蛋白結合に関する計算化学を専門としている (Phys Chem Chem Phys 15, 2013)。海外研究協力者の Hannongbua 先生はその手法によりインフルエンザウイルスと抗ウイルス薬の結合機序を明らかにしている (J Mol Graph Model 38, 2012)。またカルバマゼピンによる皮膚過敏症における HLA-A、B の関与 (Illing et al. Cur Opin Immunol 25, 2012)、ラパチニブによる肝障害における DRB1\*07:01 の関与 (Hirasawa et al: PLoS one 10, 2015) も計算化学手法で解明されている。BD に相関した HLA アリルの抗原結合能を調べ候補蛋白、エピトープを推測する事は、その病態を解明する上で有用な事と考えるが、我々も 23-26 年度基盤研究で MICA-TM ペプチドが B\*51:01, A\*26:01 が他のアリルより強く結合する事を報告した (PLoS One 10, 2015)。

本研究では、東アジアでの HLA 調査研究を基に日本では証明困難なものを含めた複数の特異的アリルの情報を用いて、BD 及び抗 Topo1 抗体陽性 SSc に特異的なアリルのペプチドの結合能を計算し、原因となる蛋白、エピトープを推定する。またそれを免疫学的に検証し (Yasuoka et al: A&R 50, 2004)、HLA の役割の解明を試みるが、調査した HLA データはその際にも必要となる。

これらの事はまた、我々が本研究を開始するに至った所以でもある。

### 2. 研究の目的

本研究は日本や東アジアでの HLA 調査結果を基に複数の特異的アリルを見出し、BD 及び Topo1 抗体陽性 SSc の発症や病態形成におけるその役割を明らかにするものである。BD では HLA-A\*26:01 の意義を確定し、日本には少なく証明が困難な A\*02:07 の関与を検討するため、HLA を調査し、疾患感受性アリル、臨床症状との関連、民族差を明らかにしたい。更に、相関するアリルの役割を明らかにするため、計算化学的手法で候補蛋白との結合能を計算し、抗原となる候補蛋白の推定を試みたい。SSc では HLA-DRB1\*15:02-B5\*01:02 や日本に少なく確認が困難な DRB1\*11 等を調査し、抗 Topo1 抗体との関連を検討したい。複数の特異アリル情報から BD と同様の計算手法で、相関アリルに対応する Topo1 上のエピトープを推定したい。その上で BD、SSc のリンパ球を用いて、その候補ペプチドによるサイトカイン産性能やリンパ球増殖能を検討し、BD の病因ペプチドや Topo1 上のエピトープを推定し、発症や病態形成における HLA の役割を明らかにしたい。具体的には、1) サンプルを各国で収集し、2) 臨床データベースを作成する。3) BD では HLA-A、B、SSc では DR を検討する。4) BD では HLA-A\*26:01 や A\*02:07 の病因、病態形成因子としての意義や臨床所見との関連を調べる。5) SSc でも東アジアでの相関アリルを検討する 6) 更に、量子化学法、及び分子動力学法で、特異アリルのペプチドとの結合能

を計算し、BD では病因候補ペプチドを、SSc では Topo1 上のエピトープを推定したい(PLoS One, 2015)。7)調査した HLA データを基に、推定したペプチドを用いて IFN $\gamma$ 、IL2 等のサイトカイン産生能 (de Chambrun et al: Autoim Rev 11, 2012) やリンパ球増殖能を検討したい。8)これらを通じて BD では病因蛋白や HLA の役割を、SSc では Topo1 上のエピトープと HLA の関連を明らかにしたい。

これらの情報を将来の治療や創薬、検査や診断に役立てようというのが、本研究の大きな目標、目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) サンプリングと臨床データベース :

海外共同研究のための体制整備は本研究の目的の一つである。サンプルは、各国で収集し、臨床所見を各国でまとめ、各国でデータベースを保管する事とした。BD の眼科的臨床所見は分担研究者の蕪城を中心に各国と検討してデータベース項目を選択した。

#### (2) HLA の分析 :

タイピングは、INNO-LiPA<sup>TM</sup> HLA-A、B 又は DR Update (INNOGENETICS)を用いて行った。HLA-A\*02、\*26、B\*39、\*51、DRB1\*15 に関しては、詳細な検討を Micro SSP<sup>TM</sup> Allele Specific HLA class I DNA Typing Tray (ONE LAMDA)を用いて行なった。タイ強皮症の HLA-DR タイピングは、外部委託し(ジェノダイブファーマ社) PCR-Luminex 法で行った。

#### (3) 候補ペプチドによるリンパ球増殖能及び IFN $\gamma$ 、IL-2 産生の検討

##### BD 末梢血リンパ球の増殖 :

BD 病との免疫学的関連性が指摘されている様々な抗原 (Baharav E et al: Isr Med Assoc J 14, 2012) のうち、HLA-B\*51 と結合性の高いペプチド配列を配列モチーフ解析 (<http://www.immuneepitope.org>) および 3 次元的分子力学シミュレーション (PLoS One 10: e0135575, 2015.) を用いて推定した。本研究では Heat shock protein65(HSP65)由来のペプチド HSP65PD (SALQNAASI) HLA-B\*51:01 に由来する B51PD(RAYLEGLCV)を検討した。陽性コントロールとして、BD 患者の T リンパ球に対して増殖能を持つ MICA-TM ペプチド (AAAAAIFVI, Yasuoka H et al: Clin Exp Rheumatol 26, 2008) を、陰性コントロール Topo1 に由来するペプチド Topo1PD (DAEADVASL) (Veeraraghavan S et al: Ann Rheum Dis 63, 2004) を用いた。対象患者は、活動性のぶどう膜炎を有する BD 47 例、サルコイドーシス 19 例、Vogt-小柳原田病 17 例、疾患コントロールとしてぶどう膜炎の既往のない SSc 15 例、健康人 17 例。末梢血から Ficoll 遠心法によりリンパ球を分離し、各ペプチドと共に 37 度、5%CO<sub>2</sub> で 4 日間培養した。各ペプチドに対するリンパ球増殖能は Cell Proliferation ELISA BrdU kit (Sigma, USA) を用いて測定した。

##### SSc 末梢血リンパ球の IFN $\gamma$ 、IL-2 産生

タイ SSc 51 サンプルを用い、6 種類の Topo1 由来ペプチドに対するサイトカイン産生能を Intracellular Staining (ICS) 法で検討した。サイトカインは IFN $\gamma$ 、IL-2 を観察した。リンパ球の表面マーカーは、CD3、CD4、CD8 を観察した。

#### (4) BD に相関する HLA-B\*51:01、と B\*52:01 におけるペプチド結合能の計算 :

MICA-TM と HLA-B\*51、B\*52 の複合体に関して分子動力学計算を行った。AMBER を用いた分子動力学計算では、10ns のトラジェクトリーしか得られなかったが、GROMACS を使用することで、100ns のトラジェクトリーを得ることが出来た。複合体モデルに関して、12.0 の厚さの溶媒分子を配置し、周期境界条件下で定温 (300K)、定圧 (1 気圧) の分子動力学計算を実行した。力場には AMBER99SB と TIP3P を使用した。

#### (5) 分子動力学法での相関するアレルの立体構造、ペプチド結合能の検討 :

##### BD に相関する HLA の結合能の検討 :

BD に相関する HLA-A、B と MICA - TM との結合能を報告した AMBER10 を用いた手法(PLoS One 10, 2015)と同様の手法で、HSL65、B51PD の結合能、及び HLA-ペプチド-TCR complex (HLA-TCR)の結合性の検討を開始した。

##### SSc に相関する HLA の結合能の検討 :

SSc に相関する HLA(DRB1\*08:02, \*11:01, \*11:04,DRB5\*01:02)及び DBB1\*01:01 と Topo1 上の配列、RIANFKIEPPGLFRGRGNHP (Pep6)との結合能を AMBER14 (Univ of California, 2014)を用いて分子動力学法で検討した。MD シミュレーションには Verlet Algorithm を用いた。反応の自由エネルギー(FE)計算には MM-PBSA 法、MM-GBSA 法 (PLoS One 10, 2015; Kollman PA: Acc Chem Res 33, 2000), QM/MM-GBSA 法 (Sangpheak: J Mol Graph Model50, 2014) を用い、エントロピー計算には NMODE モデルを用いた。

#### (6) HLA-B51:01 とエピトープペプチド複合体の X 線構造解析 :

##### 1、2、3 ドメインを含む領域 (25-300) と 2MG での検討 :

HLA-B\*51:01 とエピトープペプチドとの複合体の X 線結晶構造解析のため、組換えタンパク

質の調製を行った。HLA は ( 1、 2、 3 ドメインと膜貫通領域 ( TM ) )、<sub>2</sub>-Microglobulin ( <sub>2</sub>MG ) から構成され、 1 と 2 ドメインはエピトープペプチドとの結合に関与し、 3 は <sub>2</sub>MG との結合に関与する。まず、鎖 ( 25-300 ) と <sub>2</sub>MG をそれぞれ発現ベクターに組み込み、それぞれ大腸菌 BL21 ( DE3 ) を用いて大量発現させた。鎖 ( 25-300 ) と鎖は不溶性の封入体として発現するため、変成剤である尿素あるいは塩酸グアニジンで可溶化し、その後、希釈法あるいは透析法によって変成剤を除去することでリフォールディングを行った。その際、エピトープペプチドとして、MICA あるいは HSP65 ペプチドを加え、リフォールディングとともにエピトープペプチド複合体の再構成を試みた。リフォールディングの際、ジスルフィド結合の形成を促進させる目的で、酸化型及び還元型グルタチオンを添加した。ゲルろ過クロマトグラフィーと SDS-PAGE で再構成の成否を評価した。

#### 1 と 2 ドメインのみを含む領域 ( 25-206 ) での検討 :

次に、 1 と 2 ドメインのみを含む領域 ( 25-206 ) を用いて、ペプチドとの複合体の調製を試みた。鎖 ( 25-300 ) を大腸菌で大量発現させ、尿素で可溶化した。その後、エピトープペプチドを添加し、透析法によってリフォールディングとエピトープペプチド複合体の再構成を試みた。

## 4 . 研究成果

### (1) サンプルングと臨床データベース :

眼症状のある BD を 47 検体 ( 既存を含めて総計 200 検体 ) 収集、SSc を 15 検体収集し、臨床データベースを作成した。タイ BD 検体は総計 42 検体、SSc 検体は 51 検体を収集し、タイで臨床データベースを作成した。韓国、台湾とは、各国の既存のデータベースを基に情報交換した。

### (2) HLA の分析と相関 :

#### BD の HLA に関する検討 :

日本人 BD 47 例の検討では、B\*51:01 は 20 例 ( 42.6% ) に、A\*26 は 24 例 ( 51.1% ) に認められ、既報と同様の結果であった ( PLoS One 14: e0222384, 2019 )。タイ BD 42 例の検討では対照群 99 例に比し、\*B51 のアリル頻度 ( AF ) が有意に増加し ( P=0.025 )、A\*26:01 陰性群で B51:01 が ( P=0.024 )、B\*51X ( B\*51:01 及び B\*51:02 ) 陰性群で A\*26:01 が有意に増加していた ( P=0.034 )。B\*51:01 陽性 BD では後部ブドウ膜炎、視力障害と有意に相関していた。A\*02:07 の AF は 15.5% で、有意な増加を認めなかった。タイにおいても、B51 に加えて、A\*26:01 が疾患感受性アリルとして BD に関与している事が示唆された ( Int J Rheum Dis 23, 2020 )。台湾 BD では、小数例 ( 22 症例 ) の検討ではあるが A\*26:01 及び B\*51:01 陰性群で A\*02:07 の AF が 21.1% と、比較対象 ( 9.2% ) に比し高い傾向が見られた。A\*26:01 は BD、正常群でも低頻度であった。症例を増やしての検討が必要である。

#### SSc の HLA に関する検討 :

日本人 SSc 15 例のうち、7 例が DRB1\*15:02 であり、3 例が DRB1\*11:01 であった。既報でも DRB1\*15:02 は症例の 50% に認められ、DR\*11 は症例の 5.6% 程度であり、ほぼ同様の結果が得られた。タイ SSc 51 例の HLA 検討では、DRB1\*15:02 の AF は 29.4% と既報 ( 29.4% ) と同様だった。DRB1\*11:06 の AF は 2.0% であり、DRB1\*11:01、DRB1\*11:04 アリルは観察されなかった。DRB5\*01:08N を認めた。既報でも DRB1\*11:06 の AF は 4.0%、DRB1\*11:01、DRB1\*11:04 は 0% であり、ほぼ同様の結果が得られた。以上から、タイ SSc の疾患感受性遺伝子として DRB1\*15:02 の重要性が再確認され、DR\*11 ( DRB1\*11:01、\*11:04、\*11:06 ) の関与は少ないと考えられる。臨床所見との相関は、検討中である。

### (3) 候補ペプチドによるリンパ球増殖能及びサイトカイン産生の検討

#### BD 末梢血リンパ球の増殖 :

BD 患者由来リンパ球は健常人由来リンパ球と比べて、MICA-TM、HSP65PD および B51PD の各ペプチドの刺激に対して有意に高い増殖を促した ( 各 P<0.0001、P=0.0004、P=0.001、Mann-Whitney's U-test )。それに対し、それらのペプチド刺激はサルコイドーシス、Vogt-小柳-原田病、強皮症患者由来のリンパ球に対しては健常人と比較し有意な増殖を起こさなかった。またベーチェット病患者について HLA-B\*51:01 の有無で比較すると、HLA-B\*51:01 陽性例では陰性例よりも有意に高いリンパ球増殖がみられた ( MICA-TM、HSP65PD、B51PD いずれについても P<0.05 )。今回の検討では HLA-A\*26 陽性例と陰性例の間で有意差はみられなかった ( PLoS One 14: e0222384, 2019 )。配列モチーフ解析および 3 次元的分子力学シミュレーションにより HLA-B\*51 分子と結合性が高いと計算された MICA、HSP65、HLA-B\*51 分子に由来する各ペプチドに対して、BD のリンパ球は健常人のリンパ球と比べて有意な増殖を認めたが、この結果は、HLA と抗原ペプチドの親和性がリンパ球の活性化に直接関与する可能性を示唆するとともに、配列モチーフ解析および 3 次元的分子力学シミュレーションが病原性の抗原エピトープ配列の推定に有用である可能性を示唆すると考えられる。

#### SSc 末梢血リンパ球の IFN- $\gamma$ 、IL-2 産生

IFN- $\gamma$ 、IL-2 産生細胞の割合は、ペプチド mixture 刺激で有意に増加し、その増加は CD4 又は CD8 各陽性分画でも同様に認められた ( 各々 P<0.001 )。個々のペプチドに対する反応と HLA と

の関連、臨床症状とのについては検討中で、結果がまとめ次第報告予定。

#### (4) BDに相関する HLA-B\*51:01、と B\*52:01 におけるペプチド結合能の計算：

GROMACS プログラムを用いた計算では、100ns での HLA-B\*51 及び B\*52 の構造は、AMBER による 10ns の分子動力学計算と異なり、ペプチドがペプチド収容溝から飛び出すことはなかった。これは長時間のトラジェクトリー計算で、より安定な構造で平衡に達した結果であると考えられる。B\*51 の 100ns 時の構造は、ペプチドの N 末端が収容溝の外側を向いた状態になっていた。この結果は、MICA-TM と B\*51 との結合において N 末端がアンカーとして働いていない可能性を示唆している。100ns の単一トラジェクトリーのみから結論を導くことは出来ないが、MICA-TM の BD の抗原エピートープである可能性に関しては、慎重に判断する必要があると考えられる。

#### (5) 分子動力学法での相関するアリルの立体構造、ペプチド結合能の検討：

##### BD に相関する HLA の結合能の検討：

HSL65、B51PD は、BD に相関する HLA で高い結合能を認め、報告の準備中。HLA-TCR の結合性は、引き続き検討中である。

##### SSc に相関する HLA の結合能の検討：

Pep6 と DRB1\*08:02, \*11:01, \*11:04, DRB5\*01:02 との反応での FE は、MM-PBSA 法では各々 -52.7、-47.0、-47.8、-51.2 Kcal/mol であり、相関しない DBB1\*01:01 (-40.9) に比し低値であった。MM-GBSA 法では、各 -53.6、-53.4、-51.1、-57.6、-40.1 で、QM/MM-GBSA 法でも、各 -33.4、-36.5、-33.2、-37.5、-21.2 と同様の結果だった。また、binding cleft の Induced Fit 様の減少が観察された。アミノ酸配列が類似している \*11:10 と \*11:04 の間でも、結合ポケットに閉与するアミノ酸の結合に差が見られ、FLEDR 部分に限らず、鎖の多くのアミノ酸の関与で結合性が決まる事が示され、3 次元構造解析が重要と考えられる。DRB5\*01:02 は他の DRB1 アリルと結合に関わるアミノ酸が異なるが、結果的には似たエネルギー的な関与をする事が示された (Sci Rep 9, 2019)。一方 Topo 1 上の LKRRIM PEDIHNCIS 配列は FE に差がなかった。

#### (6) HLA-B51:01 とエピートープペプチド複合体の X 線構造解析：

##### 1、 2、 3 ドメインを含む領域 (25-300) と $\gamma$ MG での検討：

ゲルろ過クロマトグラフィーの結果、適切な溶出体積でタンパク質の溶出ピークが観測され、その画分を SDS-PAGE に供したところ、鎖 (25-300) と  $\gamma$ MG のバンドが確認でき、鎖と  $\gamma$ MG の複合体 (複合体) が再構成できたと考えられる。エピートープペプチドの分子量が小さいため、SDS-PAGE ではエピートープペプチドを確認することはできなかったが、エピートープペプチド非存在下では、適切な溶出体積で複合体の溶出ピークが確認できなかったことから、エピートープペプチドを結合した複合体を再構成できたと考えられる。リフォールディングと再構成において、MICA ペプチドを用いた場合よりも HSP65 ペプチドを用いた場合の方が複合体の明瞭なピークが見られた。したがって、MICA ペプチドよりも HSP65 ペプチドを用いた方が結晶化に適していると考えられる。しかし、結晶化条件の探索を行うには収量が少ないため、リフォールディングと再構成の条件を最適化する必要がある。

##### 1 と 2 ドメインのみを含む領域 (25-206) での検討：

大腸菌を用いた鎖 (25-206) の大量発現は良好であったが、鎖 (25-300) と同様に不溶性の封入体として発現した。鎖 (25-206) は尿素で可溶化することができた。HSP65 ペプチドを添加し、透析法にてリフォールディングと複合体の再構成を試みた結果、鎖 (25-206) を可溶性画分に回収することが出来た。本法は鎖のみによる新規なエピートープペプチド複合体の再構成の試みである。今後は可溶化条件の最適化とゲル濾過クロマトグラフィーを用いたリフォールディングの評価を行うと共に、質量分析等により HSP65 ペプチドの結合を確認し、結晶化へと進めていきたい。

本研究結果は順次論文にて発表予定である。また本研究の遂行では、研究組織欄の先生方に加えて、東京大学相原一、西愛、自治医科大学川島秀俊、神戸大学竹内真純、熊本大学岡田誠治、雨宮宏美、東京聖栄大学鈴木等、ジェノダイブファーマ猪子英俊、奥平裕子等の諸先生や事務補助者の方等の御助言、御協力を頂きました。

#### < 引用文献 >

Takeuchi F, Nakano K, Yamada H, Hong GH, et al: Association of HLA DR with progressive systemic sclerosis in Japanese. J. Rheumatol. 21:857-863, 1994.

Kongkaew S, Kaburaki T, Noguchi H, Takeuchi F, et al: Molecular dynamics simulation reveals the selective binding of human leukocyte antigen alleles associated with Behcet's disease. PLOS ONE: pone 0135575, 2015. [DOI: 10.1371/journal.pone.0135575]

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計95件（うち査読付論文 81件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Louthrenoo W, Kuwata S, Nishi A, Kaburaki T, Takeuchi F, (他4名、7,9番目)	4. 巻 -
2. 論文標題 Contribution of HLA-B*51:01 and B*26:01 to Behçet's disease and their clinical association in Thai patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.13785	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 Kaburaki T, Fukunaga H, Tanaka R, Nakahara H, Kawashima H, Shirahama S, Izawa H, Komae K, Takamoto M, Soga H, Aihara M	4. 巻 -
2. 論文標題 Retinal vascular inflammatory and occlusive changes in infectious and non-infectious uveitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00717-4	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 H. Yoshida, K. Sato, T. Ishikawa, T. Sakamoto, K. Yamagishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Binding interaction analysis of RNA aptamer-Fc region of human immunoglobulin G using fragment molecular orbital calculation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem. Phys. Lett	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cplett.2019.136854	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 Asami Hishiki, Mamoru Sato, Hiroshi Hashimoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Structure of HIRAN Domain of Human HLTF Bound to Duplex DNA Provides Structural Basis for DNA Unwinding to Initiate Replication Fork Regression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biochem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa008	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 Kodai Hara, Nao Iida, Ryota Tamafune, Eiji Ohashi, Hitomi Sakurai, Yoshinobu Ishikawa, Asami Hishiki, Hiroshi Hashimoto	4. 巻 295
2. 論文標題 Structure of the RAD9-RAD1-HUS1 checkpoint clamp bound to RHINO sheds light on the other side of the DNA clamp	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem	6. 最初と最後の頁 899-904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.AC119.011816	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 Kaburaki T, Nakahara H, Tanaka R, Okinaga K, Kawashima H, Hamasaki Y, Rungrotmongkol T, Hannongbua S, Noguchi H, Aihara M, Takeuchi F	4. 巻 14
2. 論文標題 Lymphocyte proliferation induced by high-affinity peptides for HLA-B*51:01 in Behçet's uveitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0222384	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 該当する

1. 著者名 Nakahara H, Kaburaki T, Tanaka R, Yoshida A, Takamoto M, Kawata M, Fujino Y, Kawashima H, Aihara M	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparisons of Clinical Features in Japanese Patients with Behçet's Uveitis Treated in the 1990s and the 2000s	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ocul Immunol Inflamm	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09273948.2018.1559928	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 Mi-ichi, T. Ishikawa, Vo Kha Tama, S. Deloer, S. Hamano, T. Hamada, H. Yoshida	4. 巻 13
2. 論文標題 Characterization of Entamoeba histolytica adenosine 5'-phosphosulfate (APS) kinase; validation as a target and provision of leads for the development of new drugs against amoebiasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0007633	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 -

1. 著者名 T. Masuya, Y. Tsunematsu, Y. Hirayama, M. Sato, H. Noguchi, T. Nakazawa, K. Watanabe	4. 巻 17
2. 論文標題 Biosynthesis of lagopodins in mushroom involves a complex network of oxidation reactions,	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Org Biomol Chem	6. 最初と最後の頁 234-239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8ob02814a	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 S. Kongkaew, T. Rungrotmongkol, C. Punwong, H. Noguchi, F. Takeuchi, N. Kungwan, P. Wolschann, S. Hannongbua;	4. 巻 9
2. 論文標題 Interactions of HLA-DR and Topoisomerase I Epitope Modulated Genetic Risk for Systemic Sclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 745-756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37038-z	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 該当する

1. 著者名 Muhit Md. Abdul, Kaoru Umehara, Hiroshi Noguchi	4. 巻 145
2. 論文標題 -Keto tetrahydrofuran lignan glucosides from the Bangladeshi medicinal plant Terminalia citrina inhibit estradiol (E2) induced proliferation in cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 161-167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2017.10.011	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 -

〔学会発表〕 計149件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 20件)

1. 発表者名 蕪城 俊克
2. 発表標題 日本眼科学会評議委員会指名講演. 眼内炎症性疾患の病態解明に向けて
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年



1 . 発表者名 Asami Hishiki, Mamoru Sato, Hiroshi Hashimoto
2 . 発表標題 Crystal structure of HLTF HIRAN domain in complex with duplex DNA
3 . 学会等名 ISDSB2019
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Renauer P, Coit P, Hughes T, Oggenovski M, Ergen A, Alpsoy E, Salvarani C, Casali B, Koetter I, Zhernakova A, Wijmenga C, Takeuchi F, Harihara S, Kaburaki T, Song YW, Sawalha AH, 他全30名
2 . 発表標題 Dense Genotyping of Immune Related Loci in a Multi-Ethnic Behçet's Disease Cohort Identifies Genetic Associations in a Long Noncoding RNA Near QSOX2, RASIP1/FUT2, and IL12A-AS1
3 . 学会等名 80th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology
4 . 発表年 2016年

1 . 発表者名 Ishikawa T
2 . 発表標題 Prediction of peptide binding to a major histocompatibility complex class I molecule based on docking simulation
3 . 学会等名 2016年CBI学会
4 . 発表年 2016年

1 . 発表者名 Noguchi H
2 . 発表標題 Green Tea Polyphenol Inhibits Key Enzyme in Cholesterol Biosynthesis
3 . 学会等名 20th World Congress on Clinical Nutrition (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2016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
研究分担者	蕪城 俊克 (KABURAKI Toshikatsu)  (00280941)	東京大学・医学部附属病院・准教授  (12601)	
研究分担者	橋本 博 (HASHIMOTO Hiroshi)  (40336590)	静岡県立大学・薬学部・教授  (23803)	
研究分担者	野口 博司 (NOGUCHI Hiroshi)  (60126141)	日本薬科大学・薬学部・教授  (32425)	
研究分担者	石川 岳志 (ISHIKAWA Takeshi)  (80505909)	鹿児島大学・理工学域工学系・教授  (17701)	
研究分担者	濱崎 洋一郎 (HAMAZAKI Youichirou)  (10180936)	獨協医科大学・医学部・准教授  (32203)	
研究分担者	旗持 淳 (HATAMOCHI Atsushi)  (90172923)	獨協医科大学・医学部・教授  (32203)	
研究協力者	ルースレノ ワラウィット (LOUTHRENOO Worawit)	タイ チェンマイ大学・医学部・教授	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ハノンブア スポット (HANNONGBUA Supot)	タイ チュラロンコン大学・理学部・教授	
研究協力者	パタナキッサクル サンガ (PATTANAKITSAKUL Sa-nga)	タイ マヒドン大学・医学部・准教授	
研究協力者	ブーンナック コブポーン (BOONNAK Kobporn)	タイ マヒドン大学・医学部・准教授	
研究協力者	余 家利 (YU Chia-Li)	台湾 台湾大学・医学部・教授	
研究協力者	宋 永旭 (SONG Yeong Wook)	韓国 ソウル大学・医学部・教授	