

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19507

研究課題名(和文) 広範囲作動抗原による複数HLA刺激システムの解明

研究課題名(英文) Study on multiple HLA stimulation system by shared broad-reactive antigen

研究代表者

森尾 友宏 (Morio, Tomohiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30239628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：>30merのペプチドが、複数のクラスI分子や、クラスIとクラスIIの両者に会合し、ミニスーパー抗原(SBRAと呼称)として働くことを検証することを目的とした。HLA結合領域を予測する公開プログラムからSBRA候補領域の抽出を行い、末梢血単核球で長鎖ペプチドの複数MHCへの会合の実証実験を行った。日本人で高頻度のHLAを発現したK562細胞を樹立し、単一ペプチドが異なるHLA分子に会合したり、クラスIとIIに会合することを検証した。特異的T細胞を10ロット以上確保し、細胞内IFN $\gamma$ 、IL4、IL10、IL2、TNF $\alpha$ 、MIP1bを解析し、CD107a発現(脱顆粒指標)を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により私たちが提唱したSRBAが実際に存在しうることが明らかになった。詳細には明らかに出来なかったが、この長鎖ペプチドは免疫刺激にも抑制にも働くことが明らかになった。これは全く新しい概念である。これを展開することで、長鎖ペプチドによるリンパ球の活性化や比較的安定な免疫作動薬の開発など、新しい技術や治療法の開発に繋がる可能性がある。現在様々な新型コロナウイルス感染症が問題になっている。この際にも様々なペプチドなどを用いて、ウイルス抗原がどのような免疫系を駆動するかを明らかにし、病態を明らかにし、また疾患の重篤度や合併症に関わる重要な知見を与えるものことに寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study is based on a completely novel hypothesis. We tried to prove >30mer peptides could bind to multiple class I MHC molecules as well as both class I and class II molecules, could serve as mini-super antigen. We call the peptide as shared broad-reactive antigen (SRBA). We extracted candidate SBRA regions by using a computational tool for prediction of HLA binding site such as NetMHC4.0 server, and also examined the binding experiment using several long peptides to multiple MHC molecules. To that end, we prepared several K562 model cells that express single HLA molecule that is common in Japanese population. Using the cells, we showed evidence that single peptide can bind to different HLA and that single long peptide binds to both class I and class II molecules. We established more than 10 multiple-virus specific T cells. By using them, we established a method to detect intracellular IFN $\gamma$ , IL4, IL10, IL2, TNF $\alpha$ , and MIP1b, and expression of CD107a (indicator of degranulation).

研究分野：小児科学、免疫学

キーワード：エピトープマッピング HLA 分子模倣 感染症 自己免疫疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

HLA は感染症に対する免疫応答を規定する重要な分子である。また HLA は関節リウマチ、Behcet 病、強直性脊椎炎、1 型糖尿病、多発性硬化症など様々な疾患の発症や感受性と強く連鎖していることが知られている。感染症の後に、自己免疫疾患が発症し、また増悪することもよく知られている。どのような機構で特定の HLA が疾患感受性を規定しているのか、所謂分子模倣は一般的な現象なのか、などなどの疑問が残る中、科学的技術の進歩と共にその一部が詳しくされようとしているが、まだ不明な部分は多い。

通常 HLA class I 分子は 8-10 アミノ酸を、class II 分子は 15-24 アミノ酸を提示し、それぞれ CD8 T 細胞、CD4 T 細胞を刺激するとされてきた。しかし私たちの基礎検討から、より長いペプチドが class I, class II の両者を刺激したり、比較的多くの MHC に会合できたりすることが判明していた。長鎖ペプチドが生成される細胞内プロテアーゼ系についてはよく知られていないが、生体内にはおそらく様々なサイズのペプチドが存在するものと予想される。

## 2. 研究の目的

本研究では全く新しい発想を元に、ウイルスや真菌由来の 30mer 以上のペプチド (の一部) が、複数以上の HLA class I 分子に会合し、また class I と共に class II 分子に会合することを証明し、それが mini-superantigen(active or inhibitory)として働く可能性について検証することを目的とする。

このような「広範囲作動抗原 shared broad-reactive antigen (SBRA)」は、多くの集団に対して強い免疫応答を惹起することを示し、また多種類の候補 SBRA のデータ集積から自己抗原との相同性について検証することも目的とする。

これらは決して炎症惹起性ペプチドであるとは限らない。様々な論文が示すように HLA 拘束性の抑制性エピトープが提示されている可能性がある。むしろ SRBA には疾患抑制的なものも多く含まれていると予想する。このことを明らかにするために、反応する T 細胞の帰属について広範囲に探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) ウイルス及び真菌抗原によって反応する shared broad-reactive antigen (SBRA) 候補の抽出

ウイルス及び真菌の主要抗原のオーバーラッピングペプチド(OLP: 11mer ずつオーバーラップする 15mer ペプチド)を用いてあらかじめ HLA タイピングが行われた末梢血単核球(PBMC)を刺激し、ELISpot アッセイ及び細胞内サイトカイン染色(Flow cytometer)にて IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, IL-10 産生細胞を検出する。pool した OLP を用意して、matrix 法で刺激することにより、ペプチドを特定しマップする。いくつかの領域に亘る候補を抽出し、さらに class I, class II 拘束性予想プログラムを用い、複数 class I にマップされるかを検証する。Class II への共刺激については CD4/CD8 と細胞内サイトカインの染色を同時に行うことにより、CD4 単独、CD8 単独、CD4/CD8 両者拘束のペプチドを抽出する。

### (2) SBRA ペプチドにより反応する T 細胞サブセットの検証

抽出された候補ペプチドを用いて PBMC を刺激し、細胞内 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, IL-10 を検出して、Th1, Th2, Th17, CD4Treg, CD8Treg の指標とする。実際には複数細胞内サイトカイン染色法(MICCS 法)や CD107a などを用いて、多様な亜群を同定する。

### (3) SBRA ペプチドの broad HLA 拘束性の検証

SRBA ペプチドが実際に HLA 拘束性を有するかどうかについては、HLA null である K562 細胞に対応する class I, class II を発現させて、刺激後の特定サイトカイン産生について検証する。

### (4) SBRA ペプチドと自己抗原との相同性探索

SBRA ペプチドの候補リストを抽出すると共に、ペプチドの相同性について protein-protein BLAST (blastp)などを用いて検索する。

### (5) SRBA ペプチドによる T 細胞刺激機構の探索

T 細胞をどのような形で刺激しているのかについては、HLA の outside groove に結合する可能性、HLA に様々な affinity で会合する可能性、同一あるいは異なる細胞の class I と class II を

リンクするなどの可能性が想定される。それぞれを Biacore や共焦点レーザー顕微鏡観察などで検証する。自己抗原ペプチドが、broad な HLA 発現細胞に対して刺激となり、実際に特定の(あるいは複数の) サイトカイン産生に至ることの検証を試みる。

#### 4. 研究成果

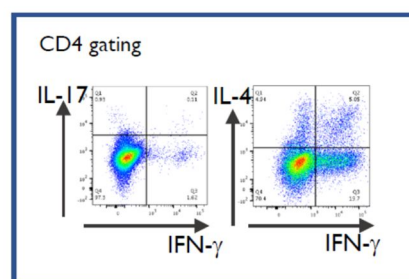
##### (1) 研究成果 1 特異的 T 細胞における複数サイトカイン産生の証明：単一 HLA 発現細胞株の樹立

本研究ではまず、AdV, BKV, CMV, EBV, HHV6 に特異的な T 細胞、および Aspergillus, Candida に特異的な T 細胞を用いて、単一 OLP 刺激後に CD4 細胞を中心に、IFN- $\gamma$ 以外のサイトカインが産生されることを明らかにした。今までの検討からも class I, class II 両者からのシグナルが入っていることが予想される。単一のペプチドが複数の class I あるいは class I, class II の両者に会合する可能性については、モデル系の確立が必要である。そこで、単独の class I、単独の class II (A2402, A3102, B3501, B5101, DR0901, DR0405, DR1502 など、日本人で高頻度の HLA) を発現するモデル K562 細胞株を作成し、HLA 拘束性を証明する系を確立した。この研究は共同研究者である国立感染症研究所の立川愛博士の貢献と助力により達成された。

##### (2) 研究成果 2 サイトカイン検出系の拡大

上記の 2 つの成果を用いて、まず候補ペプチドを抽出する PBMC を刺激し、細胞内 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, IL-10 を検出して、Th1, Th2, Th17, CD4Treg, CD8Treg の指標として解析することが可能になった。さらに異なる HLA を有する特異的 T 細胞は 10 以上のロットを確保した。これらを用いて現在 T 細胞刺激によって、細胞内で IL-2, TNF- $\alpha$ , MIP1 も解析できるようになった。合わせて CD107a の発現検討により脱顆粒の評価が行えるようになっている。

##### ・長鎖ペプチド刺激による細胞内サイトカイン産生



##### (3) 研究成果 3 SRBA ペプチド候補の抽出と自己抗原との相同性探索

SBRA となるペプチド候補は 10 以上上がっているが、この数をさらに増やすことにより、今後の自己抗原との相同性検証等に移行できる段階にまで至った。現時点でのホモロジーサーチでは、自己組織由来ペプチドとのある程度の相動性を示すペプチドを得ているが、それが自己抗原であるとの確証は得られてない。

##### (4) 今後の展望について

萌芽的研究の支援をえて、仮説として立てたものが、実証されるところにまでは至ったが、候補が多くなるにつれて、試行錯誤を繰り返しての研究になった。今後は SRBA ペプチドがどのような機序で HLA と会合するのか、そしてどのように T 細胞などに刺激を入れるのかを明らかにしていく必要がある。本研究に類似した研究は数少なく、国際的にもこの課題に真正面から取り組む論文は見当たらない。解析手段、技術は揃い、着実な検証が行える体制が整備されているが、今までの定説と異なるものであり、解析にはまだ長い時間を要するものと判断している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishiyama-Fujita Y, Kawana-Tachikawa AI, Ono T, Tanaka Y, Kato T, Heslop HE, Morio T, Takahashi S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Generation of multivirus-specific T cells by a single stimulation of peripheral blood mononuclear cells with a peptide mixture using serum-free medium.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytotherapy.	6. 最初と最後の頁 1182-1190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.jcyt.2018.05.009.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田由利子、立川(川名)愛、田中ゆきえ、ヘスロップ ヘレン、加藤節史、岡本圭祐、河野ゆり、辻彩子、草野純、柳町昌克、森尾友宏、高橋聡
2. 発表標題 造血細胞移植後難治性ウイルス感染症に対するHLA 半合致以上血縁ドナー由来複数ウイルス特異的T 細胞療法
3. 学会等名 第41回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野敏明、立川（川名）愛、藤田由利子、高橋聡、森尾友宏
2. 発表標題 網羅的に刺激培養したウイルス特異的T細胞のエピソードマッピング
3. 学会等名 第10回血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立川（川名）愛、高橋聡、森尾友宏
2. 発表標題 単独HLA発現細胞パネルを用いた抗原特異的T細胞応答HLA拘束性の決定
3. 学会等名 第11回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----