

## 論文の内容の要旨

論文題目 MHC class II tetramer preparation for elucidation of autoimmune disease mechanism

(自己免疫疾患の病態解明に向けた MHC クラス II テトラマーの調製)

氏名 内田 優輝

### 【背景および研究目的】

主要組織適合抗原 (Major histocompatibility complex; MHC) クラス II は、外来微生物の断片 (ペプチド) を CD4 陽性 T 細胞に提示し、免疫反応を開始する役割を持つ。MHC クラス II は  $\alpha \cdot \beta$  の 2 つのサブユニットが会合した膜結合型の糖タンパク質であり、 $\alpha \cdot \beta$  サブユニットの細胞外領域がペプチド結合溝を形成している。MHC クラス II 遺伝子の特徴は高度の多形性を有することである。この多型はペプチド結合溝に集中しているため、特定のペプチドは特定の MHC クラス II に対する結合特異性を示す。その結果、CD4 陽性 T 細胞に提示されるペプチドは個体が持つ MHC クラス II に制約され、個体間での免疫応答の差異が生じる 1 つの原因となっている。

ヒトの MHC はヒト白血球抗原 (Human leukocyte antigen; HLA) と呼ばれる。HLA クラス II 遺伝子は *DR*・*DQ*・*DP* の遺伝子座からなり、個々の遺伝子座は多型に富んでいる。近年、大規模遺伝子解析により、特定の HLA クラス II アリルが自己免疫疾患への感受性に関連することが明らかにされた。この結果から、疾患感受性 HLA クラス II が自己抗原ペプチドを結合し、自己反応性 CD4 陽性 T 細胞に提示すると考えられている。したがって、疾患感受性 HLA クラス II/自己抗原ペプチド複合体を特異的プローブとし、自己反応性 CD4 陽性 T 細胞を同定・解析することは、自己免疫疾患の発症機序を解明するうえで重要である。

MHC テトラマー法は、抗原特異的 T 細胞を同定する有効な方法である。MHC クラス II の細胞外領域をビオチン・アビジン結合を利用して四量体化し、T 細胞受容体 (TCR) への親和性を増加させることにより、抗原特異的 T 細胞を直接的に同定することが可能となる。この手法を用いて、自己抗原を含む様々な抗原特異的 T 細胞が現在までに同定されている。基礎研究に加えて、MHC テトラマーを自己免疫疾患である 1 型糖尿病モデルマウスに投与することで、その発症を抑制できることから、治療薬としての応用も期待されている。

しかし、MHC クラス II テトラマーは MHC クラス I テトラマーと比較してその利用が限られている。その理由として、可溶型組換え MHC クラス II タンパク質を安定化する方法や、組換え MHC クラス II タンパク質の発現系が標準化されていないことが挙げられる。こうした背景から、MHC クラス II テトラマーを用いた研究は主に欧米に限られている。したがって、アジア系集団で頻度の高い HLA クラス II アリル産物をテトラマーとして調製し、アジア系集団における自己免疫疾患の発症機序を解明することが必要である。また、MHC クラス II テトラマーは、通常昆虫細胞発現系を用いて調製される。しかし、昆虫細胞発現系においては組換えタンパク質のタグが分解されることや、哺乳類細胞と糖鎖修飾が異なることが知られている。組換え MHC クラス II タンパク質の糖鎖修飾の変化により、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の反応性が変化することが報告されているほか、糖鎖修飾の変化はヒトに対して新たな免疫原性を生じる可能性がある。

これらの問題を克服するため、本研究では MHC クラス II テトラマーを哺乳類細胞発現系を用いて調製しようと試みた。発現させる HLA クラス II アリルとして、HLA-DRA\*01:01/DRB1\*04:06 (DR04:06) を選択した。DRB1\*04:06 はインスリン自己免疫症候群 (IAS) の発症と非常に強く関連することが知られている。また、他の自己免疫疾患と異なり、DR04:06 タンパク質に結合し、IAS の発症に関与する自己抗原ペプチド (ヒトインスリン $\alpha$ 鎖; InsA) が既に同定されている。これらの理由から、哺乳類細胞を用いて調製した MHC クラス II テトラマーの機能を評価するうえで、DR04:06 テトラマーは有効なモデルになると考えた。

## 【方法】

昆虫細胞 DR04:06 発現ベクターを改変し、DR04:06 レトロウイルス発現ベクターを作製した (pMXs-puro/DRA\*01:01/AZ/AviTag および pMXs-neo/DRB1\*04:06/BZ/10 $\times$ His)。これらのベクターをパッケージング細胞 (Plat-E 細胞) にトランスフェクションして組換えレトロウイルスを得た後、組換え DR04:06 遺伝子をマウス線維芽細胞 (NIH3T3 細胞) に導入した。可溶型組換え DR04:06 タンパク質の発現および培養上清への分泌を、フローサイトメトリーおよびドットブロット法で確認した。樹立した安定発現株 (NIH-DR0406 細胞) を酪酸ナトリウムおよびデキサメタゾンで処理することにより、レトロウイルスプロモーターを活性化し、DR04:06 タンパク質の発現を増強した。この条件下で、NIH-DR0406 細胞を高密度細胞培養システムを用いて培養することにより、DR04:06 タンパク質を大量発現した。Co<sup>2+</sup> および抗 His タグ抗体アフィニティークロマトグラフィーを用いて、培養上清に分泌された DR04:06 タンパク質を精製し、精製度を ELISA により評価した。その後、ビオチン化酵素

BirA を用いて、精製した DR04:06 タンパク質にビオチンを付加した。また、NIH-DR0406 および NIH-DR0405 細胞ライセートと InsA<sub>8-17</sub> ペプチド (KKTSICSLYQLE) を、pH 7.0 および pH 5.4 の条件下で 37°C、24 時間インキュベーションし、InsA<sub>8-17</sub> ペプチドの DR04:06 タンパク質への特異的な結合を評価した。

### 【結果】

レトロウイルス発現系および NIH3T3 細胞を用いて、可溶性組換え DR04:06 タンパク質安定発現株 (NIH-DR0406 細胞) を樹立した。DR04:06 タンパク質の発現量を増加させるため、レトロウイルスプロモーターを活性化することが知られている酪酸ナトリウムおよびデキサメタゾンで NIH-DR0406 細胞を処理した。その結果、NIH-DR0406 細胞を 10 mM 酪酸ナトリウムおよび 1  $\mu$ M デキサメタゾンで 72 時間処理したとき、未処理の細胞と比較して DR04:06 タンパク質の分泌量が約 31 - 45 倍増加した。

この条件下で、高密度細胞培養システムを用いて NIH-DR0406 細胞を培養した。培養上清から DR04:06 タンパク質を精製し、DR04:06 タンパク質量を ELISA により定量した。その結果、NIH-DR0406 細胞は昆虫細胞発現系と同等量の DR04:06 タンパク質 (1.8 mg/l) を分泌することが示された。また、抗 His タグ抗体アフィニティークロマトグラフィーにより、89  $\mu$ g の DR04:06 タンパク質を~70%の精製度で得ることができた。

精製した DR04:06 タンパク質は、BirA 酵素を用いることにより、C 末端に位置するビオチン化タグ (AviTag) にビオチンを付加できることが示された。また、InsA<sub>8-17</sub> ペプチドを 5%  $\beta$ -メルカプトエタノールを含むジメチルホルムアミドで溶解した場合、pH 7.0 で DR04:06 タンパク質に特異的に結合することが確認できた (50%結合濃度は約 25 - 34  $\mu$ M)。しかし、pH 5.4 では InsA<sub>8-17</sub> ペプチドの DR04:06 タンパク質への結合は見られなかった。これらの結果から、哺乳類細胞発現 DR04:06 タンパク質は InsA ペプチドへの結合能を持ち、InsA/DR04:06 複合体がテトラマーの調製に使用できることが示された。

### 【考察】

NIH-DR0406 細胞は昆虫細胞発現系と同等量の DR04:06 タンパク質 (1.8 mg/l) を分泌することが示されたが、Co<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィーによる精製後、その収量は 2%に減少した。培養上清中の血清成分を低下させ、分子量に基づいて DR04:06 タンパク質を分離することにより、DR04:06 タンパク質の Co<sup>2+</sup>への結合量を増加させることで、収量が改善される可能性がある。

NIH3T3 細胞を用いて発現した組換え DR04:06 タンパク質は、InsA<sub>8-17</sub>/DR04:06 複合体の形成に際して、比較的高濃度の InsA<sub>8-17</sub> ペプチドが必要であることが示された。この結果から、培養上清に分泌された DR04:06 タンパク質は、比較的親和性の高い NIH3T3 細胞由来の内在性ペプチドを結合していることが示唆される。また、InsA<sub>8-17</sub> ペプチドの DR04:06 タンパク質への結合は、pH 7.0 でのみ観察された。この結果から、中性条件下で電荷を持たないヒスチジン残基が、InsA<sub>8-17</sub> ペプチドの結合の安定性に寄与していることが示唆されるが、より詳細な検討が必要である。

IAS の発症において、InsA<sub>8-21</sub>/DR04:06 複合体を認識する自己反応性 CD4 陽性 T 細胞の機能は明らかではない。そのため、InsA<sub>8-21</sub>/DR04:06 テトラマーにより InsA<sub>8-21</sub> 特異的 CD4 陽性 T 細胞を分離した後、サイトカイン分泌パターンや細胞表面マーカーを解析し、IAS 発症への関与に関与する T 細胞サブセットを明らかにする必要がある。また、本研究において構築した哺乳類細胞 MHC クラス II テトラマー発現系を用いて他の疾患感受性 HLA クラス II アリルを発現することにより、自己反応性 CD4 陽性 T 細胞が認識する自己抗原エピトープのスクリーニングや、詳細な発症機序が明らかでない自己免疫疾患の病態解明に応用することができると思われる。