

課題番号 : 27指1303

研究課題名 : 慢性B型肝炎の病態変動を検出するためのT細胞染色試薬の開発

主任研究者名 : 宮寺 浩子

キーワード : B型肝炎ウイルス (HBV)、慢性 B型肝炎、ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigens; (HLA)), MHC テトラマー

研究成果 :

本研究の目的は、HLA-DP 拘束性 B型肝炎ウイルス(HBV)エピトープを同定し、慢性 B型肝炎の病態に伴う T細胞免疫系の変動を明らかにすることである。そのため、まず HLA-DP が提示する HBV 抗原ペプチドを同定し、中でも T細胞エピトープとして重要な HBV 抗原ペプチド領域を明らかにする。そして、HLA-DP-HBV 抗原ペプチド複合体を認識する T細胞を染色するための試薬(MHC テトラマー)を開発する。H27年度は以下の項目について研究を行った。

1. HLA-DP 結合抗原の探索 :

HLA-DP拘束性HBVペプチドを同定するため、まず、HLA-DPが結合しうるペプチド領域を同定することとし、HLA-ペプチド結合アッセイ系を確立した(投稿準備中)。日本人集団に高頻度に維持される6種類のHLA-DPアレル(HLA-DPB1*02:01, -DPB1*03:01, -DPB1*04:01, -DPB1*04:02, -DPB1*05:01, -DPB1*09:01)を含む主要なDPA1-DPB1ハプロタイプを対象として、これらのDPアレル産物を組換えタンパク質として発現した。各HLA-DPアレル産物に結合するHBV抗原ペプチド領域を表面抗原(HBs), コア抗原(HBc)全領域をカバーするペプチドライブラリーから探索した。その結果、特定のHLA-DPアレル産物に結合するHBs, HBc領域を複数箇所同定した(投稿準備中)。さらに、短鎖ペプチドを用いた結合解析を行い、これらのウイルス抗原ペプチド配列とHLA-DPとの間の相互作用に大きく寄与するアミノ酸残基を推定した。しかし、HBs, HBc ペプチドライブラリーの大半は疎水性が高く、HLA-ペプチド結合アッセイで非特異的シグナルを生じたため、異なる評価系(HLA発現アッセイ)を構築し、HLA-DP結合領域の探索を行った。H27年度には、HBs, HBc全領域の約50%の領域についてHLA-DP結合能を解析した。未解析領域はH28年度上半期に終了予定である。

2. MHC テトラマー発現系の構築 :

HLA-DP が結合する HBV 抗原ペプチドを同定後、この中から T細胞エピトープを絞り込み、また、HLA-HBV ペプチド複合体を認識する T細胞をヒト末梢血中に検出するために MHC テトラマーを作成することとした。MHC テトラマーは、MHC-ペプチド複合体を4量体化および蛍光標識し、T細胞受容体の特異的に検出するためのタンパク質試薬である。HLA クラス I の場合、MHC テトラマーは試薬会社等から入手可能な場合があるが、HLA クラス II については市販品が入手困難もしくは高額であるため、外部研究機関への委託、もしくは各研究者が作成する必要がある。本研究では、複数の HLA-DP アレルと HBV 抗原ペプチドの組合せから成る多種類の MHC テトラマーを使用予定であるため、MHC テトラマーを組換えタンパク質として大量発現、調整することとした。

HLA テトラマーの大量発現は、一般的には昆虫細胞発現系を用いて行われる。しかし、多種類のアレルとペプチド複合体について高発現安定株を樹立するのは煩雑であるため、電気穿孔法を用いた哺乳類細胞での一過性発現を試みた。まず MHC テトラマーを設計し発現ベクターを大量調製した。これを発現宿主細胞(細胞数 2×10^8)に電気穿孔法で導入し、導入後9日間、培地中に分泌される MHC テトラマー量を ELISA により経時的に測定した。同様の方法で、抗体タンパク質を大量発現出来ることが先行研究で報告されている。二種類のプロモーター配列を用いて発現を行い、プロモーターによる発現量の違いが認められた。しかし、いずれの場合も期待したレベルでの MHC タンパク質発現が認められなかった。このため、現在は発現宿主細胞を変更するなど、発現系の最適化に引き続き取り組んでいる。

Subject No. : 27指1303

Title : Development of T-cell staining reagent for study of immune responses in chronic hepatitis B

Researchers : Hiroko Miyadera

Key word : hepatitis B virus (HBV), chronic hepatitis B infection (CHB), human leukocyte antigens (HLA), HLA tetramer

Abstract : This study aims to characterize the process of T-cell-mediated immunity against HBV infection during progression of chronic hepatitis B. To this end, we plan to identify HLA-DP-restricted T-cell epitopes in the HBs and HBc antigens. Using identified peptides, we plan to establish a protocol to produce MHC tetramer reagents for the detection of antigen-specific T-cells in the human peripheral blood.

1. Screening of HLA-DP-binding peptides:

To identify HLA-DP-restricted HBV peptides, we established HLA-peptide binding assay. First, we prepared the major *HLA-DP* haplotype products as recombinant proteins. These recombinant proteins were then used for HLA-peptide binding assay using labeled synthetic peptides. The peptide libraries that cover the entire region of HBs and HBc antigen have been used for the screening.

2. Expression of MHC tetramer:

To identify T-cells that recognize certain MHC-peptide complexes, we next attempted to prepare MHC tetramers. The MHC tetramer is generally prepared through tetramerization of soluble MHC molecules and conjugation with fluorescent molecules. To prepare MHC tetramer, we designed expression constructs based on published studies. We previously expressed MHC tetramers using murine cell line but the level of expression was limited (data not shown). Therefore, in this study we used alternative methods for expression of MHC as recombinant protein. One of the methods used in this study is a large scale transfection (electroporation) of the tetramer expression vectors into expression host cells. In this expression system, the protein of interest is expected to achieve high level of transient expression. It has been known that certain recombinant proteins, including antibodies, can be produced at very high level through this approach. We constructed MHC tetramer expression vectors and prepared the plasmids at a large scale. The plasmids were then used for electroporation of host cells (2×10^8 cells). The level of the soluble recombinant HLA protein in the medium was monitored up to 9 days post transfection through ELISA. Among the two different promoters that were tested in this study, one of the promoter showed higher expression levels than the other, however, none of the expression constructs secreted workable amounts of soluble HLA proteins in the medium. We currently attempt to modify the expression using other cell lines as expression host.

国際開発研究費 報告書 (H27年度)

課題番号

27指1303

研究課題名

慢性B型肝炎の病態変動を検出するためのT細胞染色試薬の開発

主任研究者

宮寺 浩子

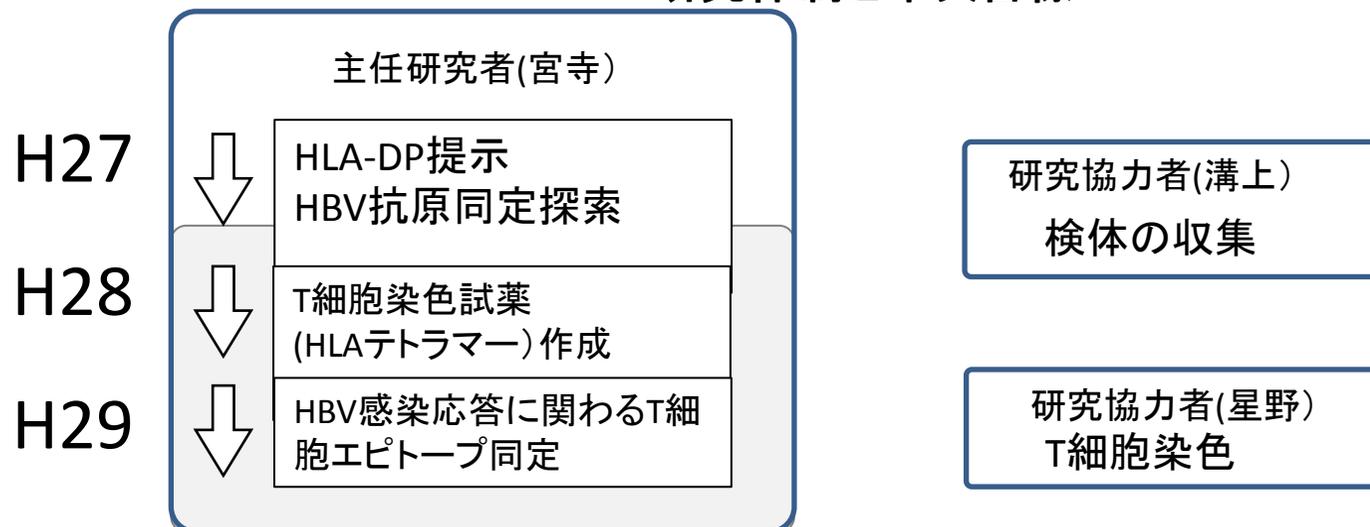
目的：

HLA-DP拘束性HBV抗原ペプチド(T細胞エピトープ)を同定し、これを認識する抗原特異的T細胞の肝炎病態における動態を明らかにする。

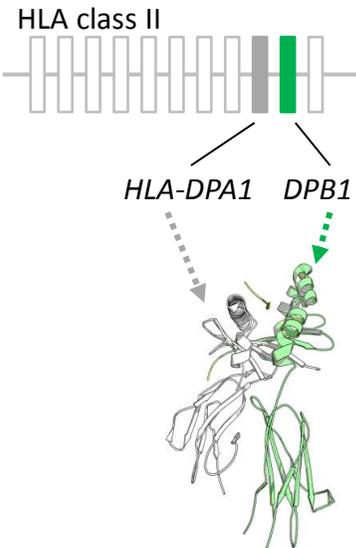
研究計画概要：

- ・HLA-DP拘束性HBVエピトープを同定する(H27, 28)。
- ・HLA-HBVペプチド複合体を認識する抗原特異的T細胞を検出するための試薬(MHCテトラマー)を作成し、B型肝炎慢性化におけるT細胞免疫応答を解析する(H29)。

研究体制と年次目標



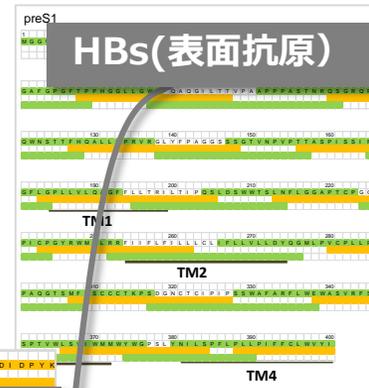
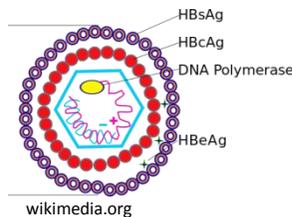
HLA-DP提示抗原探索



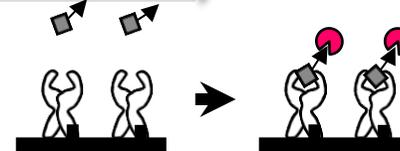
Association of HLA-DP with chronic hepatitis B

DPA1-DPB1 haplotypes	Abbreviations	phenotype	OR	P
DPA1*01:03-DPB1*04:02	DP0402	Protective	0.37	1.95×10^{-7}
DPA1*01:03-DPB1*04:01	DP0401	Protective	0.32	1.17×10^{-6}
DPA1*01:03-DPB1*02:01	DP0201	Protective	0.71	0.004
DPA1*02:02-DPB1*03:01	DP0301	neutral	1.15	-
DPA1*02:02-DPB1*05:01	DP0501	Susceptible	1.51	-
DPA1*02:01-DPB1*09:01	DP0901	Susceptible	1.95	3.38×10^{-6}

Modified from Nishida, Sawai et al. 2014 *PLoS One*

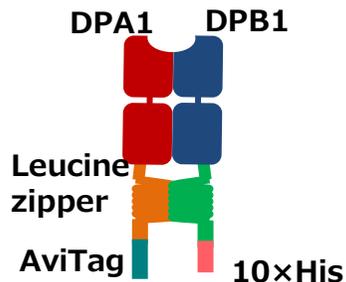


B型肝炎慢性化感受性・抵抗性関連アリル産物が結合するHBV抗原ペプチドを探索、同定した。



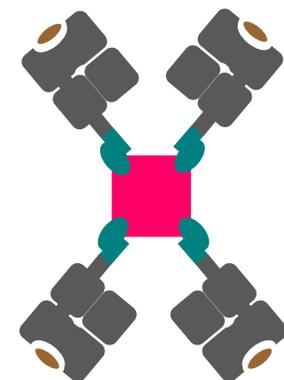
MHCテトラマー作成

抗原特異的T細胞を同定するためのT細胞染色試薬 (MHCテトラマー)を作成中である。



大量発現、精製、多量体化、蛍光標識

可溶型MHCクラスII



MHCテトラマー

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 27指1303

研究課題名： 慢性B型肝炎の病態変動を検出するためのT細胞染色試薬の開発

主任研究者名： 宮寺浩子

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
HLA-DP提示B型肝炎ウイルス抗原ペプチドの探索	岡部由紀, Cindy Chia-Jung Chen, 宮寺浩子, 徳永勝士, 溝上雅史	第24回 日本組織適合性学会大会	水戸市	2015/9/10-12
Screening of the HLA-DP binding peptides from the HBV surface and core antigens	岡部由紀, Cindy Chia-Jung Chen, 宮寺浩子, 徳永勝士	第44回日本免疫学会学術集会	札幌市	2015/11/18-20
A large scale screening of HLA-binding peptides from HBs and HBc peptide libraries	宮寺浩子, 岡部由紀, Cindy Chia-Jung Chen, 徳永勝士, 溝上雅史	第25回アジア太平洋肝臓病学会議年次総会	東京	2016/2/20-24

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。