

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 :

B型肝炎慢性化、ウイルス排除、ワクチン応答は、ヒト白血球抗原(human leukocyte antigens; HLA)クラス II と強く関連することから、HLA クラス II の特定のアリルがHBs抗原産生の誘導を介してB型肝炎ウイルス(HBV)に対する免疫応答に大きく寄与すると考えられる。この一連の免疫応答に関わるHLA クラス II 拘束性エピトープ、およびこれを認識するT細胞を同定することが出来れば、HBVに対する免疫応答の詳細を明らかにする糸口となるだけでなく、B型肝炎慢性化や再活性化等のリスクを予測する上でも有用である。そこで本研究では、HLA クラス II の一つであり、B型肝炎慢性化との関連が報告されているHLA-DPに着目し、HLA-DP 拘束性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を目的として研究を行った。

まずHLA-DP拘束性HBVペプチドを同定するため、HLA-DPが結合しうるペプチド領域を同定することとし、組換えHLAタンパク質と合成ペプチドとの相互作用を解析するためのアッセイ系を確立した(投稿準備中)。以下に示す、日本人集団に高頻度に維持されるHLA-DPハプロタイプ6種類のDPアリル産物を組換えタンパク質として発現した。

- ・慢性肝炎抵抗性ハプロタイプ : HLA-DP0401 (*DPA1*01:03-DPB1*04:01*), HLA-DP0402 (*DPA1*01:03-DPB1*04:02*), HLA-DP0201 (*DPA1*01:03-DPB1*02:01*),
- ・感受性ハプロタイプ : HLA-DP0501 (*DPA1*02-DPB1*05:01*), HLA-DP0901 (*DPA1*02:01-DPB1*09:01*),
- ・中立性ハプロタイプ : HLA-DP0301 (*DPA1*02:02-DPB1*03:01*)

これらの*DPA1-DPB1*ハプロタイプのアリル産物を組換えタンパク質として発現し、各HLA-DPアリル産物に結合するHBV抗原ペプチド領域を表面抗原(HBs) (59ペプチド), コア抗原(HBc) (40ペプチド)をカバーする合成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アリル産物に結合する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、疎水性ペプチドの場合は非特異的シグナルを生じるため測定が困難であり、中でも数種類のペプチドについては、合成困難のため測定を行うことが出来なかった。HBs抗原は疎水性領域が多いため、半数以上のペプチドについてHLAとの結合アッセイを行うことが出来なかった。

このため次に、異なる評価系(HLA発現アッセイ)で、HLA-DP結合領域の探索を行った。この方法では、HLAをペプチドとの融合タンパク質として培養細胞に発現し、内部コントロール(GFP)を用いて細胞表面HLA発現量を定量化する(Miyadera, et al. 2015 *J. Clin. Invest.*; 宮寺・他 2016 日本臨床免疫学会誌)。HLAはペプチドと強く結合するほどタンパク質複合体が安定化し、細胞表面に高発現する性質がある。そのため、細胞表面のHLA発現量を測定することによりペプチドとの相互作用の相対的な強さを推測、評価することが出来る。この方法を用いることにより、疎水性領域を含むHBs, HBc全領域についてHLAとの結合性を測定することが可能であった。H28年度はHLA発現アッセイを用いて、3種類のHLA-DPアリルについてHBs, HBc抗原を対象としたHLA結合領域探索を行い、特定のHLA-DPにアリル特異的、かつ強い相互作用を介して提示されるHBs, HBc抗原領域を複数箇所、見出した。

当初の研究計画ではHLAテトラマーを作成することにより、HLA-DP拘束性HBs, HBc抗原ペプチドを認識するT細胞を同定する予定であったが、HLAテトラマー作製が困難であったため、他の方法によって抗原特異的T細胞同定を進めることとした。具体的には、HLA-DPとの結合が示唆されたHBs, HBc抗原領域についてHLA-DPとの融合タンパク質を作成し、HLA-抗原複合体として培養細胞表面に安定発現させる。これを抗原提示細胞として用い、ワクチン応答陽性健康人末梢血中の反応性T細胞をスクリーニングする。平成28年度は、このための抗原提示細胞作成を開始した。

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 : Susceptibility to chronic hepatitis B (CHB) and responses against HBV vaccination are associated strongly with polymorphisms in human leukocyte antigen (HLA) class II region, indicating that HLA class II are one of the major factors that mediate adapted immune responses against HBV. To identify detailed mechanisms of HLA class II-mediated immune responses, we aim to identify HBs and HBc antigen peptides that are presented to HLA class II and are involved in T-cell mediated immunity and antibody production against HBV. As the first step, we established *in vitro* assay to identify HLA class II-restricted HBV peptides. First, we prepared recombinant proteins encoded by the six *HLA-DP* haplotypes that are maintained at high frequencies in the Japanese population. 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 antigens were designed and used for screening. The *in vitro* assay worked well for approximately half of peptides in the libraries but did not work for hydrophobic regions. Therefore, we next established alternative methods that can also be applicable for hydrophobic regions. Up to the present, we identified several regions of HBs and HBc antigens that can be presented to particular HLA-DP allele products. Using the identified HBs and HBc regions, we plan to search for HLA-DP-restricted T-cell epitopes.

課題番号 27指1303 (主任研究者:宮寺 浩子)
 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

背景1: B型肝炎慢性化抵抗性・感受性と関連するHLA-DPB1アリルが同定された

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

背景2: HLAクラスIIが、どのような機序でB型肝炎慢性化の抑制、促進に関わるのか、その機序は不明である。



目的 :

- HLA-DP拘束性HBV抗原ペプチド (T細胞エピトープ) を認識する抗原特異的T細胞を同定することにより、B型肝炎に対する免疫応答機序を解明する。
- 抗原特異的T細胞を染色するための試薬(HLAテトラマー)を開発し、B型肝炎の様々な病態でのT細胞の動態を明らかにする。

H28年度進捗 :

1. HLA-DP提示HBV抗原の同定

HLA-DPアリル3種類について、HBs, HBc抗原領域を対象とした結合スクリーニングを実施した。

2. T細胞エピトープ探索

健康人末梢血 (HBVワクチン陽性者) を用いたT細胞エピトープ探索を行うための、HLA-抗原複合体の安定発現株 (抗原提示細胞) の作成を開始した。

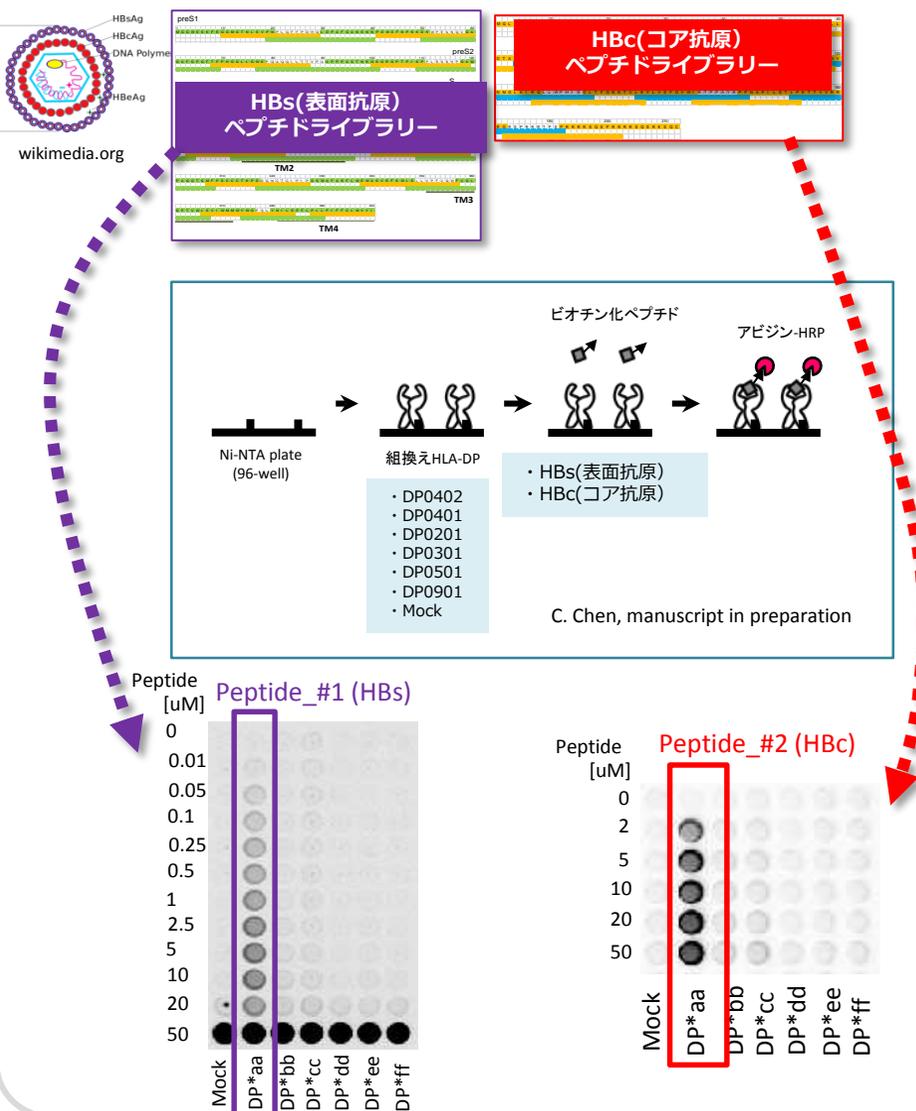
3. T細胞染色試薬(HLAテトラマー)の大量調製系を確立する。

技術的な課題があり計画を一部変更した。HLAテトラマーに代わる方法としてHLA-抗原複合体の安定発現株 (抗原提示細胞) のパネルを作成し、これを用いたT細胞染色を行うこととした。

1. HLA-DP提示HBV抗原の同定

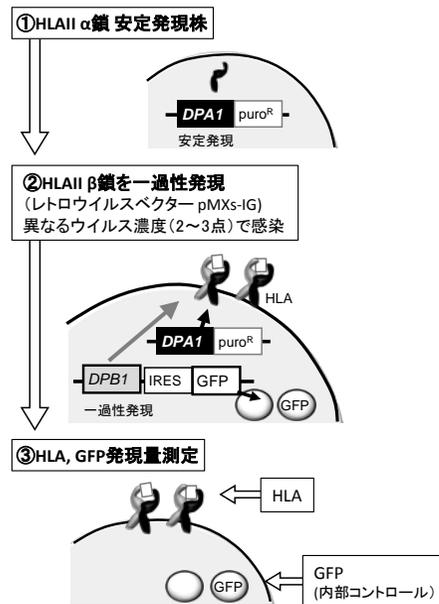
HLA-ペプチド結合解析の測定法を二種類確立し、HBs, HBcライブラリーから、HLA-DPアリル特異的に結合する領域を見出した。今後、HLA結合領域を対象としてT細胞エピトープを同定する。

① HLA-ペプチド結合測定により、HLA-DP結合HBV抗原ペプチドを同定した



② HLA発現アッセイにより、HBs, HBc全領域からHLA提示領域を見出した

HLA発現アッセイの概要
(Miyadera, et al. 2015 J. Clin. Invest. を改変)



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
HLAクラスII結合ペプチドの探索・同定法の開発	宮寺浩子、野口恵美子、溝上雅史、徳永勝士	日本臨床免疫学会誌	Vol. 40 No.1	2017年

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Stability profiling of HLA class II protein for disease association studies	Hiroko Miyadera, Jun Ohashi and Katsushi Tokunaga	The 13th International Congress of Human Genetics	京都	2016年 4月
A large scale screening of HLA-class II-binding peptides from HBs and HBc peptide libraries	Hiroko Miyadera, Yuki Okabe, Cindy Chen, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami	The American Association of Immunologist (AAI) annual meeting	米国	2016年 5月
HLA-DP提示HBs、HBc抗原領域の探索	宮寺浩子、岡部由紀、Cindy Chia-Jung Chen、徳永勝士、考藤達哉、溝上雅史	第52回 日本肝臓学会総会	幕張	2016年 5月
HLA class II protein stability and disease susceptibility	Miyadera, J. Ohashi, and K. Tokunaga	16th International Congress of Immunology	豪州	2016年 8月
HLA結合ペプチドの大規模探索法の開発	宮寺浩子、徳永勝士、野口恵美子	第44回 日本臨床免疫学会総会	東京	2016年 9月
HLAクラスII提示B型肝炎ウイルス抗原領域の探索	宮寺浩子、岡部由紀、Cindy Chia-Jung Chen、徳永勝士、溝上雅史	第25回 日本組織適合性学会大会	札幌	2016年 10月
Large scale analysis of HLA-peptide interactions	H. Miyadera, Y. Okabe, K. Tokunaga, and E. Noguchi	66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics	カナダ	2016年 10月

研究発表及び特許取得報告について

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