

自己免疫疾患に關与するHLAクラスIIの抗原提示を阻害する化合物のスクリーニングのための細胞を用いた迅速評価系の構築

Establishment of A cell-based high-throughput screening assay system for inhibitor compounds of antigen presentation by HLA class II molecule

渡邊 伸央、鈴木雄祐、中川由貴、猪口貞樹、井上茂亮
東海大学医学部・救命救急医学

Nobuo Watanabe, Yusuke Suzuki, Sadaki Inokuchi, Shigeaki Inoue
Department of Emergency and Critical Care Medicine
School of Medicine, Tokai University

[要旨]

幾つかの自己免疫疾患では、自己タンパク質由来のペプチドが特定遺伝子型の human leukocyte antigen class II (HLA) に提示され、自己反応性 T 細胞の活性化が誘導される。このような抗原ペプチドと HLA との結合を阻害する化合物は、疾患特異的な免疫抑制剤となる。この目的のために、我々は HLA 発現細胞と 96 ウエルプレートを用い、DR1 と DR15 に焦点をあてたりウマチと多発性硬化症に対する化合物の迅速簡便なスクリーニング系を構築した。

[Abstract]

Presentation of peptides derived from self-proteins on certain genotypes of human leukocyte antigen class II (HLA) molecules, followed by clonal expansion of self-reactive T cells, is a causative event for some autoimmune diseases. Therefore selective inhibition of such antigen presentation could ameliorate the diseases. In this study we have established, for the first time, a cell- and 96-well microplate-based high-throughput screening system for inhibitor of antigen presentation, targeting rheumatoid arthritis-associated HLA-DR1 (DRB1*01:01) and multiple sclerosis-associated DR15 (DRB1*15:01).

[Key Words]

Autoimmune disease, High throughput screening system

1. はじめに

関節リウマチなどの自己免疫疾患の一部では、Human leukocyte antigen class II (HLA) 上に自己タンパク質由来のペプチドが提示され、その結果、自己抗原に対する T 細胞増殖が誘導される[1, 2]。HLA の DR クラスの β 鎖(DRB1)は多型に富み、例えば DRB1*01:01 への 2 型 コラーゲン ペプチド (CII263-272) の提示が関節リウマチ [3, 4]、DRB1*15:01 へのミエリン塩基性タンパク質由来のペ

プチド(MBP83-99)の提示が多発性硬化症[5, 6]における自己免疫反応に寄与していることが示唆されている。したがって、自己免疫疾患に関わるこれら遺伝子型の HLA と、そこに提示される抗原ペプチドとの結合を阻害する低分子化合物は、他の HLA 機能には影響を与えず、疾患特異的な免疫疾患治療薬となる。本研究ではこのための化合物評価系の確立を目指した。

遺伝子組み換え技術により特定の遺伝子型の HLA を培養細胞に発現させ、抗原ペプチドとの結合が調べられてきた。しかしこれらの研究での結合解析はフロ

ーサイトメーターを使った解析であり、抗原提示阻害剤の候補化合物のスクリーニングには適さない。そこで我々は、特定の HLA 発現細胞とビオチン化抗原ペプチドとの結合を被験化合物存在下で 96 ウエルプレート内で行い、プレートリーダーで迅速にヒット化合物を選別する High throughput screening (HTS)系の構築を試みた。

2. 結果の概要

1) HLA と抗原ペプチドとの結合性の評価

まず、非抗原提示細胞において強制発現させた HLA に抗原提示能があるかどうか調べた。健康人から DRA ならびに 4 種の DRB1(01:01, 04:05, 09:01, 15:01)遺伝子をクローニングし、発現ベクターを作成した。これを HEK293 細胞に導入して発現させ、種々の抗原ペプチドとの結合をフローサイトメーター(FACS)によって測定した。HLA は DRA と DRB1 の両方を発現させた場合にのみ、細胞表面に発現し、抗原ペプチド MBP83-99 (多発性硬化症のミエリン塩基性タンパク質)と結合した。これより我々の発現ベクターによる α 鎖 β 鎖の共発現は、抗原提示能を有する HLA 発現に至ることが示された。

次に各遺伝子型の HLA 発現細胞と種々の抗原ペプチドとの結合性を調べた。その結果、DRB1*15:01 ならびに DRB1*01:01 を含む HLA に対して、MBP83-99 に強い結合性が見られた(図 2)。これより、DRB1*15:01、

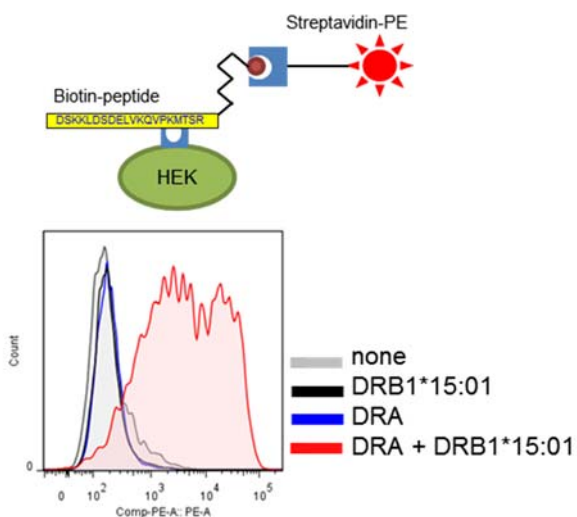


図 1 HEK293 細胞に発現させた HLA と抗原ペプチドの結合

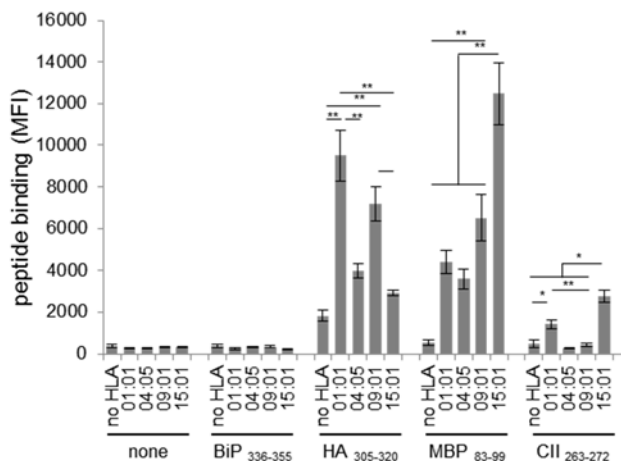


図 2 HEK293 細胞に発現させた各遺伝子型の HLA と抗原ペプチドの結合

評価は図 1 と同様に行い、独立した 3 回の実験結果をグラフにまとめた。

と DRB1*01:01 に焦点を絞りレンチウイルスベクターと、3T3 マウス繊維芽細胞を用いて安定発現細胞の樹立を行った。得られた HLA 安定発現細胞も HEK293T 細胞と同様の遺伝子型依存の抗原ペプチド結合プロフィールを示した。

2) 96 ウエルプレートを用いた抗原ペプチド結合評価系の確立

96 ウエルプレートにおいて、HLA を発現させた 3T3 細胞にビオチン化 MBP83-99 を添加しインキュベートした。非結合ペプチドを洗浄した後、グルタルアルデヒドを用いて細胞を固定し、 β -ガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジン(SA- β -Gal)によって HLA に結合したペプチドを検出した。当初、高濃度の SA- β -Gal と発色基質 (2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside; ONPG)を用いて検出を行ったところ、FACS で見られた遺伝子型依存性が見られなかった。そこで、SA- β -Gal 濃度を 1/10 に低下させ、高感度の蛍光基質 (4-methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside; 4MUG)を用いた。この結果、96 ウエルプレートによる測定でも遺伝子型依存的な抗原ペプチドの結合を測定できることが判明した。

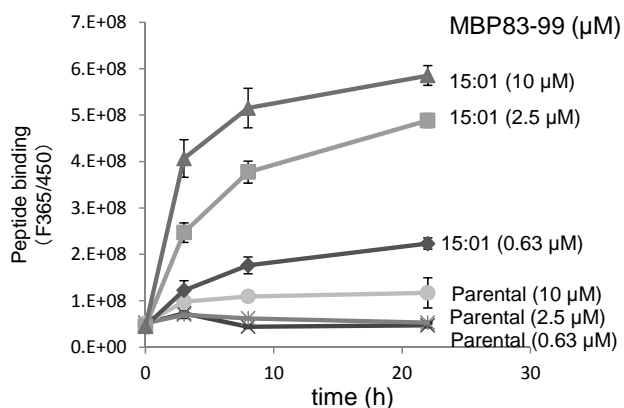


図3 HLAを発現させた3T3細胞とMBPペプチドとの結合の時間、濃度、ならびにHLA依存性

96ウェルプレートでのHTSの条件にて、コントロールの3T3細胞、ならびにDR15(DRB1*15:01)発現3T3細胞を用いて評価を行った。

3) 評価系のバリデーション

本HTSが候補化合物のスクリーニングに利用できるかどうか、モデル化合物を用いて検証実験を行った。CLIP(Class II-associated invariant chain)はHLAのペプチド結合部位に結合する内因性のペプチドである。DR15(DRB1*15:01)の系において、CLIPを共存させたところ、濃度依存的にMBPペプチドの結合が抑制された。また、バインディングアッセイ終了後のウェル内の細胞をクリスタルバイオレットにて染色にて計測したところ、細胞数には変化がないことが示された。これよりCLIPはHLAとMBPペプチドとの結合を抑制したことが示された。このように本系では同一プレートを用いて被験化合物の細胞毒性も同時に評価できるため、擬陽性を除去することが可能となる。

同様な方法にてMBPとDR1(DR01:01)を用いた評価系も構築した。

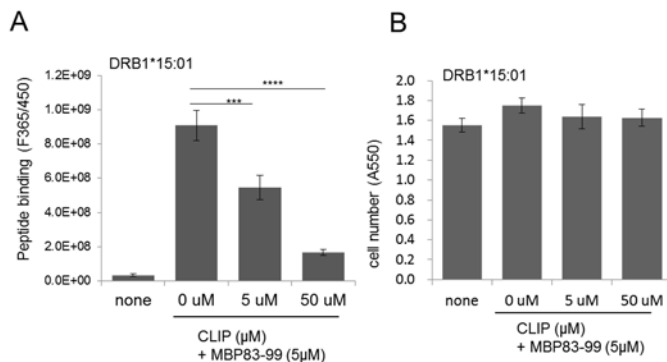


図4 CLIPによる結合阻害効果

(A) CLIPによる濃度依存的なMBP結合抑制効果

(B) CLIPの細胞毒性

3. 展望

本研究によりDR1(DRB1*01:01)とDR15(DRB1*15:01)による抗原提示を阻害する化合物のHTSが構築できた。これまでに遺伝子組み換えタンパク質を用いたHTSは報告されているが、遺伝子導入培養細胞を用いたHTSはこれが世界初のものであると思われる。今後、本系を用いて阻害剤の選択が進むことが期待できる。

近年、癌に対するペプチドワクチンが開発されている。また実際にHLA上への抗原ペプチドの提示を促進する低分子化合物も同定されている。本系は免疫賦活を目的とした抗原提示促進剤のスクリーニングにも転用可能である。また近年、特異体質性薬物毒性(IDT: Idiosyncratic drug toxicity)の原因としても薬剤とHLAとの結合が示唆されている[7]。本評価系は新規薬剤のHLAを介したIDTの可能性評価等にも使用可能である。

4. 引用文献

1. Jones, E.Y., et al., *MHC class II proteins and disease: a structural perspective*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 271-82.
2. Roche, P.A. and K. Furuta, *The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(4): p. 203-16.
3. Rosloniec, E.F., et al., *An HLA-DR1 transgene confers susceptibility to collagen-induced arthritis elicited with human type II collagen*. J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 1113-22.
4. Rosloniec, E.F., et al., *HLA-DR1 (DRB1*0101) and DR4 (DRB1*0401) use the same anchor residues for binding an immunodominant peptide derived from human type II collagen*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 253-9.
5. Wucherpfennig, K.W., et al., *Structural requirements for binding of an immunodominant myelin basic protein peptide to DR2 isotypes and for its recognition by human T cell clones*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 279-90.

6. Ji, N., et al., *Small molecule inhibitor of antigen binding and presentation by HLA-DR2b as a therapeutic strategy for the treatment of multiple sclerosis*. J Immunol, 2013. **191**(10): p. 5074-84.
7. Hirayama, N., *Docking simulations between drugs and HLA molecules associated with idiosyncratic drug toxicity*. Drug Metab Pharmacokinet, 2016.

5.業績

【学会等発表】

1) 鈴木 雄祐、渡邊 伸央、平山令明、井上 茂亮、猪口 貞樹: ヒト HLA に特異的に結合する新規低分子免疫抑制剤の開発
外科侵襲とサイトカイン研究会 2016. 7 東京

2) Watanabe N, Suzuki Y, Hirayama A, Inokuchi S, Inoue S : Development of a small-molecule immunosuppressive agent based on inhibition of HLA-epitope peptide binding. International Federation of Shock Society (IFSS) 2016. 10 Tokyo

6.謝辞

本研究を行うにあたり種々のご助言、援助をいただきました東海大学医学部生体防御学・佐藤健人准教授、分子生命科学・椎名隆准教授、再生医学研究センター八幡崇准教授、先進生命科学研究所・平山令明所長、東海大学・教育研究支援センター・タンパク質部門・塚本秀雄博士、細胞生物学部門・岡田義明博士、核酸部門・松澤秀行博士に感謝いたします。