



|                     |                                                                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | The functional analysis of domain-deleted isoform of human leukocyte antigen (HLA)-G [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | 高橋, 愛実                                                                                                                                                  |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                   |
| Degree Name         | 博士(薬科学)                                                                                                                                                 |
| Dissertation Number | 甲第13176号                                                                                                                                                |
| Issue Date          | 2018-03-22                                                                                                                                              |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/69908">https://hdl.handle.net/2115/69908</a>                                                                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/</a>                                     |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                         |
| File Information    | Ami_Takahashi_review.pdf, 審査の要旨                                                                                                                         |



## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 高 橋 愛 実

|       |     |     |         |
|-------|-----|-----|---------|
| 審査担当者 | 主 査 | 教 授 | 前 仲 勝 実 |
|       | 副 査 | 教 授 | 松 田 正   |
|       | 副 査 | 講 師 | 柏 倉 淳 一 |
|       | 副 査 | 講 師 | 室 本 竜 太 |

### 学 位 論 文 題 名

The functional analysis of domain-deleted isoform of human leukocyte antigen (HLA)-G  
(ドメイン欠損型 HLA-G アイソフォームの機能解析)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

非古典的ヒト白血球抗原（HLA）クラス I 分子の一つである HLA-G は、主に胎盤や胸腺、制御性 T 細胞など限られた細胞で発現し、ヒトの免疫寛容において重要な働きを担う分子として知られてきた。いくつかのスプライシングアイソフォームが知られており、中でも典型的な HLA クラス I 分子と同様に 3 つのドメイン構造（ $\alpha 1$ - $\alpha 3$  ドメイン）をもつ重鎖、 $\beta 2$  ミクログロブリン（ $\beta 2m$ ）、ペプチドから成る HLA-G1 は、機能や構造がよく研究されてきた。これまでに HLA-G1 は、例えば妊娠中の胎盤では、胎児由来の栄養膜細胞上に発現し、母親由来の免疫細胞上に発現する、免疫受容体抑制性チロシンモチーフ（ITIM）を持つ抑制性受容体 LILRB1 および LILRB2 と結合し、免疫抑制性のシグナルを伝達することで、母子免疫寛容を誘導することが知られている。しかし、HLA-G 欠損アレルである *HLA-G\*0105N* をホモでもつ健常人が存在することから、HLA-G1 以外の HLA-G アイソフォームの機能的な重要性が考えられてきた。*HLA-G\*0105N* は、 $\alpha 1$  ドメインをコードするエクソン 3 中のシトシンが欠失し、フレームシフトによって  $\alpha 2$  ドメインをコードするエクソン 4 中で終始コドン形成するようになったアレルである。*HLA-G\*0105N* をホモで持つ場合では、 $\alpha 2$  ドメインを有するアイソフォームは発現されない一方、 $\alpha 2$  ドメインを欠損した HLA-G2 は通常通り発現される。筆者所属研究室で行われた X 線結晶構造解析により、HLA-G1 は抑制性受容体 LILRB2 と  $\alpha 3$  ドメインを介して結合することがすでに明らかとなっているが、HLA-G2 も  $\alpha 3$  ドメインを有していることから、LILRB2 と結合して免疫抑制性の機能を発揮する可能性があった。以上のことから、HLA-G1 の機能を補完し得る HLA-G2 の免疫抑制効果が示唆されてきたが、HLA-G2 はほとんど解析が進んでこなかった。

筆者所属研究室では、最近、大腸菌封入体を用いたリコンビナント HLA-G2 蛋白質の調製法を確立し、HLA-G2 が、これまで HLA-G1 の二量体化に使用されてきた 42 番目のシステイン残基（Cys42）によらない、 $\beta 2m$ -free の二量体を溶液中で自然と形成することを示し、また、表面プラズモン共鳴法を用いて、HLA-G2 が LILRB2 と特異的に結合することも示した。

筆者は、このリコンビナント HLA-G2 蛋白質を用いて、リコンビナント HLA-G2 蛋白質の性状や疾患モデルマウスにおける効果、ヒト免疫における効果を明らかにする研究を行った。本論文では、その研究成果が述べられている。

まず筆者は、リコンビナント HLA-G2 蛋白質を用いて、所属研究室が明らかにした Cys42 によるジスルフィド結合によらない二量体化を、HLA-G2 野生型（WT）および変異型（C42S）を用いて示した上で、Cys42 存在時に起こる継時的な多量体化を示した。Blue-native (BN) PAGE において、1 ヶ月間 4°C で保存した HLA-G2WT 蛋白質は、生成直後の HLA-G2WT 蛋白質と比べて大きな分子量の分子集団が確認された。1 ヶ月間 4°C で保存した HLA-G2C42S 蛋白質は、精製直後の HLA-GWT 蛋白質の泳動パターンとほとんど変わらなかった。HLA-G1 では、二量体化により、単量体よりも強い受容体とのアフィニティーを獲得し、より強いシグナル伝達が可能であることが示されているが、HLA-G2 の二量体化や更なる多量体化は、より強い抑制性のシグナル伝達を可能とし、免疫抑制において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

筆者は、精製されたリコンビナント HLA-G2 蛋白質が、3 ヶ月間 4°C で保存されることで、短い断片に分解されていることを発見した。切断部位は $\alpha 1$  ドメインに集中しており、HLA-G1 の結晶構造では $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シートなどの二次構造を形成している領域に存在した。所属研究室が行ったリコンビナント HLA-G2 蛋白質の電子顕微鏡解析の結果から、 $\alpha 1$  ドメインの柔らかい構造や分子全体のフレキシビリティが影響していると考えられた。

次に筆者は、ヒト LLRB のマウスオルソログである PIR-B と HLA-G2 との結合を解析した。興味深いことに、ヒトの HLA-G1 はマウスの抑制性受容体 PIR-B と十分強く結合し、ヒト関節リウマチモデルマウスの一つであるコラーゲン誘導関節炎 (CIA) マウスにおいて抗免疫効果を示すことがわかっている。今回筆者は、SPR 法を用いて、I 型膜蛋白質である PIR-B の C 末端をビオチン化しセンサーチップに固定化して、細胞上の配向を模倣する形で、リコンビナント HLA-G2 蛋白質との結合を解析した。HLA-G2 ホモダイマーと PIR-B との結合のカイネティクスは、二価結合モデルによりよくフィッティングされた。二価の結合によく見られる、遅い解離も見られた。見かけの  $K_D$  は 130 nM であった。二価、あるいは多価による PIR-B との強い相互作用は、マウス体内で有効な免疫抑制シグナル伝達の可能性を示唆した。

更に筆者は、CIA マウスを用いてリコンビナント HLA-G2 蛋白質の免疫抑制効果を解析した。筆者は、コラーゲン感作後、関節炎発症前の CIA マウスに、リコンビナント HLA-G2 蛋白質の足裏皮下への単回投与を行ったが、HLA-G2 は投与後 1 ヶ月以上にわたり、濃度依存的な抗炎症効果を示した。PIR-B は、主に抗原提示細胞に発現する。HLA-G2 は B 細胞の PIR-B と結合して、直接自己反応性抗体の産生を抑制した可能性もあるが、長期間効果が持続したことから、樹上細胞 (DC) 上の PIR-B に結合して免疫のバランスを変化させた可能性が示唆された。

最後に、ヒト免疫細胞における HLA-G2 の機能を解析した。HLA-G2 の受容体である LILRB2 は、主に単球、マクロファージ、DC に発現する。今回は、LILRB2 発現免疫細胞として単球、DC に着目した。LILRB2 の発現は、単球で 80% 程度だったが、顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) および IL-4 で誘導される一般的な単球由来 IL-4-DC では 15% 以下に発現減少することがわかった。そこで、DC に分化しても LILRB2 発現がある程度維持される (60% 以上) IFN-DC を用いることにした。リコンビナント HLA-G2 蛋白質と培養した単球や IFN-DC は、IL-10 を誘導し、CD86 や HLA-DR の発現を下方制御した。興味深いことに、HLA-G2 存在下で培養した単球や IFN-DC は、IL-6 の産生を強く誘導していた。IL-6 は、近年、炎症性サイトカインとしての機能だけではなく単球系細胞への免疫寛容誘導的效果も数多く報告されている。更に IL-6 や IL-10 により誘導される STAT3 活性化が見られ、その活性が T 細胞活性化を抑制することで知られるトリプトファン代謝酵素、インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) の発現も誘導した。更に驚いたことに、HLA-G2 は単球や IFN-DC 上のプログラム細胞死リガンド 1 (PD-L1) の発現を増強させることがわかった。HLA-G2 と PD-L1 の直接的な関連を明らかにした実験は、これまでにない。同種異系 (allogeneic) または自家 (autologous) の混合リンパ球反応では、HLA-G2 と培養した IFN-DC がそれぞれの実験系が関係する  $CD4^+$  または  $CD8^+$  T 細胞の増殖を抑えた。この結果は、HLA-G2 存在下で培養した単球や IFN-DC の免疫抑制的な phenotype 変化が、機能的にも免疫抑制的であったことを示唆している。

本論文は、これまでほとんど解明されてこなかった HLA-G2 アイソフォームの性状や *in vivo* における効果、ヒトでの機能についての全く新しい知見を得たものであり、HLA-G のヒト生体内での免疫抑制効果とそのメカニズムの解明に大きく貢献するものと考えられる。

よって著者は、北海道大学博士 (薬科学) の学位を授与される資格あるものと認める。