HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular basis for ANGPTL2 recognition of LILRB2 immune checkpoint receptor [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Abdu, Nabila Mutassim Murad
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15160号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87191
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Nabila_Abdu_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　　Nabila Mutassim Murad Abdu

審査担当者	主査	教　授	前　仲　勝　実
	副査	教　授	中　川　真　一
	副査	准教授	黒　木　喜美子
	副査	講　師	米　田　宏

学 位 論 文 題 名

Molecular basis for ANGPTL2 recognition of LILRB2 immune checkpoint receptor
（免疫チェックポイント受容体 LILRB2 に対する ANGPTL2 認識の分子基盤）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

現在、多くの自己免疫疾患や癌が治癒困難な状況にあり、新たな免疫チェックポイントを標的とした治療法の開発がさかんに行われている。免疫チェックポイント受容体の一つ Leukocyte immunoglobulin-like receptor B2（LILRB2）は、相同性の高い 4 つの細胞外 Ig ドメインと細胞内 ITIM（Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif）を持つ抑制性受容体であり、抗原提示細胞の表面に発現している。本来、LILRB2 と相同性が高く、エフェクター細胞を含む幅広い免疫細胞に発現する LILRB1 とともに、主要組織適合性複合体クラス I（MHCI）分子を認識して、健康な自己細胞に対する免疫寛容を誘導するが、近年、腫瘍組織や胎盤で発現するヒト白血球抗原 G（HLA-G）との相互作用による免疫抑制機能に着目した創薬開発が進められている。

一方、LILRB2 は MHCI 以外の多様なリガンドと相互作用することが報告されており、中でも近年新規リガンドとして同定されたアンジオポエチン様受容体 2（ANGPTL2）が LILRB2 との相互作用を介して造血幹細胞の分化を阻害し、白血病の予後を悪くすること、LILRB2 および ANGPTL2 の過剰発現と多数の固形腫瘍の進行との関連が報告されていることから、機能的重要性が示唆されている。しかし、ANGPTL2 と LILRB2 の相互作用様式は未だ明らかとなっておらず、LILRB2 と HLA-G との相互作用を標的とした創薬開発が LILRB2 と ANGPTL2 の相互作用に与える影響についても検討されていない。そこで、本論文では、ANGPTL2 の LILRB2 結合様式について、MHCI との結合競合性があるのか、具体的に LILRB2 のどの部位に結合するのかを明らかにし、ANGPTL2 と MHCI がどのように LILRB2 を介したシグナル制御に寄与するのか理解することを目的とした。

著者はまず、共同研究先が調製した ANGPTL2 全長タンパク質を用いて表面プラズモン共鳴法による相互作用解析を行い、ANGPTL2 が LILRB2 と相同性の高い LILRB1 には結合しないこと、一方で、LILRB2 細胞外 4 つのドメインのうち、N 末側 2 つのドメインタンパク質（LILRB2D1D2）に結合することを明らかにした。さらに、生体内で ANGPTL2 が多量体を形成するのと同様に、ANGPTL2 全長タンパク質が不均一ではあるものの多量体を形成していることを明らかにした上で、LILRB2 への ANGPTL2 の結合のアビディティ効果を検討したところ、ANGPTL2 全長タンパク質は LILRB2D1D2 に対して遅い会合/解離速度で結合し、MHCI が LILRB2 と早い結合/解離速度の結合様式であることと対照的な特徴を持つことが明らかとなった。このことは、多量体化した ANGPTL2 が細胞表面の LILRB2 に対して強い結合親和性を獲得していることを示唆し、LILRB2 発現量が ANGPTL2 機能と相関することと一致していた。さらに、LILRB2 に対して ANGPTL2 と MHCI が競合的に結合するか否かを明らかにするために、ANGPTL2 でブロッキングした LILRB2 に対する MHCI の結合能をブロッキングしない LILRB2 に対する結合能と比較することにより調べた結果、ANGPTL2 と MHCI は競合せず、LILRB2D1D2 上の異なる部位に結合することが示唆された。

しかし、ANGPTL2 と LILRB2 の詳細なタンパク質解析に向けて、ANGPTL2 全長タンパク質が凝集しやすく、多量体形成に寄与する coiled-coil ドメインと受容体結合に寄与すると予想されるフィブリノーゲン様ドメイン（FLD）の間で分解されやすいことが明らかとなったため、ANGPTL2 FLD ドメインのみの組換えタンパク質調製系を確立した。ANGPTL2 FLD タンパク質は多量体を形成せず、表面プラズモン共鳴法により、LILRB2 への結合活性を持っており、FLD ドメインが LILRB2 結合に寄与することが示された。

ANGPTL2FLD 上の LILRB2 結合領域を決定するために、ANGPTL2 結合能を持たない LILRB1 をネガティブコントロールとして、LILRB2 の網羅的変異体解析を表面プラズモン共鳴法により実施した。LILRB1D1D2 と LILRB2D1D2 との間には、全部で 36 種類のアミノ酸残基が存在する。まず、36 種類のアミノ酸残基のうち 23 種類を含むドメイン 1（D1）に注目したが、変異は ANGPTL2FLD と LILRB2 D1D2 間の結合に大きな影響を与えなかった。次に、ANGPTL2 との結合に関与する LILRB2 ドメインを決定するために、LILRB2D1 および LILRB2D2 タンパク質を調製した。予想に反して、LILRB2D2 は ANGPTL2 に対して特異的結合活性を示したが、LILRB2D1 は示さなかったことから、LILRB2 D2 が ANGPTL2 結合ドメインであることが明らかとなった。そこで、LILRB2 D2 の変異体解析を LILRB2D2 の LILRB1 D2 とは異なる 13 個のアミノ酸残基を 3 つの領域にグループ化して実施した。3 つのグループのうち、第 2 グループの変異（LILRB2 T-L）のみが LILRB2 と ANGPTL2 との相互作用を完全に消失させていた。さらに、結合に寄与する残基を明らかにするため、第 2 グループに属するそれぞれの LILRB2 変異体を作製したところ、R117N 変異体が ANGPTL2 との結合能を失うことが明らかになった。

以上のことから、LILRB2 のアルギニン 117 は、ANGPTL2 にとって最も重要な認識部位であることが示される。この領域は、LILRB2 の HLA クラス I 結合領域から離れた場所にあり、競合結合しない結果と一致していた。本研究の成果から、生理条件下で ANGPTL2 は多量体を形成し、細胞表面上の LILRB2 のクラスター化することによって、免疫抑制性タンパク質 HLA-G を含む MHCI との結合により誘導される免疫抑制シグナルを増強・持続させるシグナル機構仮説を考案した。

以上のように、著者はタンパク質解析可能な ANGPTL2 FLD タンパク質の調製に成功し、網羅的変異解析により、LILRB2 上の ANGPTL2 結合に重要な残基を同定した。この成果は、多様なリガンドと相互作用する多機能受容体 LILRB2 を標的とした新しい免疫療法の開発に重要な知見であるとともに、新たな LILRB2 シグナル制御法の開発にもつながる知見である。

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。