



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	HLA-G2によるLILR受容体群を介した免疫調節の分子基盤解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	渡邊, 紘士
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15788号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92564
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroshi_Watanabe_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 渡邊 紘士

学 位 論 文 題 名

HLA-G2 による LILR 受容体群を介した免疫調節の分子基盤解明

ヒト白血球抗原（HLA）-G は胎盤や腫瘍細胞、ウイルス感染細胞などに発現する。HLA-G は妊娠時の母子間免疫寛容や腫瘍の免疫逃避に寄与し、臨床研究により自己免疫疾患やがんとの関連が多数報告されている。HLA-G には複数のスプライシングアイソフォームが存在し、主要なアイソフォームである HLA-G1 欠損胎児が通常妊娠を経て出産可能であったことから、重鎖 $\alpha 2$ ドメインを欠損した HLA-G2 が十分機能を補完していると考えられる。HLA-G1 は抑制型受容体 LILRB1 及び LILRB2 に結合する一方、HLA-G2 は LILRB1 とは結合せず、LILRB2 にのみ、HLA-G1 よりも高い結合親和性で結合し、免疫寛容を誘導する。所属研究室では HLA-G2 の免疫抑制機能に着目し、HLA-G2 が軽鎖 $\beta 2m$ 欠損型 HLA クラス II 様ホモ二量体を形成すること、LILRB2 のマウスオルソログ PIR-B に結合し、関節リウマチモデル並びにアトピー性皮膚炎モデルマウスの系で有意な症状抑制効果を発揮することを明らかにした。以上の結果から、HLA-G2 が過剰な免疫応答を幅広く抑制する可能性が示唆され、特にミエロイド系抗原提示細胞（単球、マクロファージ、樹状細胞）上に発現する LILRB2 特異的に強い親和性で結合する HLA-G2 は、エフェクター細胞上（T 細胞、B 細胞、NK 細胞）に発現する LILRB1 とも結合する HLA-G1 に比べ、副作用の少ないタンパク質製剤として期待される。しかし、HLA-G2 の免疫抑制機能を利用した製剤化、ヒトへの応用に向け、対象疾患の更なる検討は必須である。また、HLA-G2 に焦点を当てた研究例は少なく HLA-G2 の作用点となりうる LILRB2 以外の HLA-G2 受容体の有無について検討されていない点が課題であった。

そこで本研究では、HLA-G2 が広範な免疫抑制作用を示すことを期待し、発症機序が明確でなく、指定難病のひとつである全身性エリテマトーデス（SLE）の自然発症モデルマウスを用いて、HLA-G2 の自己免疫症状抑制効果を検証した。さらに、SLE モデルマウスの系において HLA-G2 の症状発症抑制効果が認められたことから、HLA-G2 の製剤化が期待された。そこで、ヒト生体内での作用機序の理解するために、HLA-G2 の作用点となるヒト HLA-G2 受容体の同定とその機能の解明を目的とした。その結果、新規 HLA-G2 受容体が見出され、この受容体が複数の分子形態を取り、HLA-G2 認識に影響することが予想されたことから、この新規受容体の分子形態の解析、リガンドへの結合能評価を行った。

HLA-G2 の *in vivo* 機能評価にあたり、指定難病のひとつである全身性エリテマトーデス（SLE）を標的疾患とし、SLE 患者と類似した抗核抗体産生や糸球体腎炎を伴う、SLE 自然発症モデルマウスを用いて、HLA-G2 並びにタンパク質の安定化のために PEG 化を行った HLA-G2（PEG-G2）を投与した。その結果、HLA-G2、PEG-G2 は抗核抗体産生の指標である抗 dsDNA 抗体価を有意に抑制し、糸球体腎炎の指標である尿中アルブミン指数を抑制する傾向を示した。さらに、既存 SLE 治療薬ベリムマブの標的分子であり、単球や樹上細胞、活性化 T 細胞などにより産生され、B 細胞の成熟や抗体産生に関与する B 細胞刺激因子（B1yS）の血漿中濃度を測定したところ、HLA-G2、PEG-G2 は抑制傾向を示し、PEG-G2 は有意に抑制した。

続いて、HLA-G2 の生体内作用点となる新規 HLA-G2 受容体の同定を行った。探索にあたり、既知 HLA-G1 として報告のある受容体に着目し、表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いて HLA-G2 との相互作用を検証した。その結果 LILRB2 と同じ LILR 受容体群に属し、4 つの細胞外ドメインを

有する分泌型受容体である LILRA3 が HLA-G2 の新規受容体として同定された。さらに、LILRA3 の HLA-G2 認識ドメインの解析を行ったところ、これまで LILR 受容体群のリガンド認識ドメインとされていたドメイン (D) 1, 2 ではなく、D3, 4 が HLA-G2 認識に関与することが明らかとなった。また、LILRA3 による HLA-G2 と LILRB2 の結合阻害アッセイを行った結果、LILRA3 は HLA-G2 と LILRB2 の結合を阻害し、LILRA3 のヒト受容体への結合阻害作用が初めて示された。

HLA-G2 の新規受容体として LILRA3 が同定された一方、LILRA3 がジスルフィド結合を介した二量体を形成することが報告されている。そのため、LILRA3 が二量体を形成する場合リガンドへの結合能に影響を与えることが予想された。そこで、LILRA3 の二量体化が HLA-G2 結合能に与える影響を分子レベルで検証した。まず、LILRA3 が二量体を取りうる構造を検証するために、LILRA3 の遊離システイン (Cys) 残基の同定を行ったところ、LILRA3 D1 に存在する Cys74 が遊離 Cys 残基であることが示唆され、二量体形成に寄与することが示唆された。また、LILRA3 二量体を用いて HLA-G2 との相互作用について SPR 法を用いて検証したところ、LILRA3 二量体は HLA-G2 に対し多価結合特有の二相性のセンサグラムを示し、さらに単量体と比較して結合能が向上することが明らかとなった。以上の結果から、LILRA3 の Cys74 が遊離 Cys 残基であり、LILRA3 の二量体形成に寄与すること、さらに、LILRA3 が二量体を形成することにより、単量体と比較して HLA-G2 への結合能が向上することが示唆された。

本研究により、発症機序が不明な指定難病である SLE のモデルマウスに対しても HLA-G2 が症状抑制作用を発揮することが明らかとなった。また、HLA-G2 を製剤としてヒトに投与することを想定した際、本研究により明らかとなった新規 HLA-G2 受容体 LILRA3 がデコイ受容体として作用し、HLA-G2 と LILRB2 の相互作用を阻害しうることを明らかにした。さらに、LILRA3 の二量体化によるリガンド結合能の向上により、LILRA3 のデコイ受容体としての機能向上が予想される。本研究の結果は、HLA-G2 が様々な疾患に適応できる可能性を示すとともに、HLA-G2 の LILRB2、LILRA3 を介した免疫調節機能の分子認識基盤を明らかにするものである。