



## 生体内 HLA-G1 タンパク質の過剰な免疫反応による 慢性炎症疾患の治療効果を発見 ～アトピー性皮膚炎マウスを用いて～

### 研究成果のポイント

- ・HLA-G1 タンパク質は、ヒトの胎盤で母体免疫から胎児を守ったり、全身の免疫反応を抑制したりする天然の免疫抑制分子。
- ・HLA-G1 タンパク質溶液をアトピー性皮膚炎マウスの炎症部位に塗布することで、アレルギー反応を抑制でき、皮膚炎治療に効果があることを解明。
- ・HLA-G1 タンパク質はヒトの体内に元々存在しており、過剰な免疫反応による炎症に対する、副作用の少ないバイオ医薬品の開発に期待。

### 研究成果の概要

HLA-G (ヒト主要組織適合性複合体 (MHC) <sup>※1</sup> の一つ) は、胎盤、胸腺、腫瘍細胞に存在する非古典的 MHC クラス I タンパク質です。妊娠時の胎盤では、母親にとって“異物”である父親の遺伝情報をもつ胎児を、母親の免疫から守る必要があります。そのため、胎児は母体の免疫細胞表面の抑制性受容体に結合し、免疫抑制シグナルを伝達する HLA-G タンパク質を発現させることによって、母体の免疫を制御し、妊娠を成り立たせています。また、がん等の腫瘍細胞等が HLA-G を発現することによって、周囲の免疫細胞の自己寛容<sup>※2</sup> を誘導していることも報告されています。

HLA-G は多様なタンパク質の形で存在しますが、そのうち HLA-G1 は生体内で最も存在量が多い HLA-G タンパク質です。これまでに前仲教授らの研究グループでは、HLA-G1 タンパク質を皮下投与することによって、関節リウマチモデルであるコラーゲン誘導性関節炎マウスの関節炎症を緩和できることを明らかにしてきました。

本研究では、HLA-G1 の抗炎症バイオ医薬品としての効用をさらに検討するために、ダニ虫体成分を含む軟膏を塗ることで人工的にアトピー性皮膚炎の症状を誘発したマウスを用いて、炎症抑制作用の有無を観察しました。その結果、HLA-G1 タンパク質溶液を炎症患部に塗布することによって、Th2/Th17 <sup>※3</sup> が関与するアレルギー反応を抑制し、皮膚炎症に治療効果を示すことを明らかにしました。今後、アレルギー性炎症疾患を対象とした副作用の少ないバイオ医薬品の開発に HLA-G1 を応用していくことが期待されます。

なお、本研究は、科学研究費補助金、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)、日本学術振興会 (JSPS) などの助成を受けて実施されました。

## 論文発表の概要

研究論文名：Therapeutic application of human leukocyte antigen-G1 improves atopic dermatitis-like skin lesions in mice. (アトピー性皮膚炎マウスにおけるHLA-G1タンパク質の治療効果)

著者：前田直良<sup>1</sup>，山田千聖<sup>2</sup>，高橋愛実<sup>2</sup>，黒木喜美子<sup>2</sup>，前仲勝実<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>北海道大学大学院薬学研究院創薬科学研究教育センター，<sup>2</sup>北海道大学大学院薬学研究院生体分子機能学研究室)

公表雑誌：International Immunopharmacology

公表日：米国東部時間 2017年7月1日(土)(オンライン公開)

## 研究成果の概要

### (背景)

ヒトの体内において免疫反応を抑制するHLA-Gタンパク質は、一つの遺伝子から発生しますが、多様なかたちを持つタンパク質として存在することで、様々な免疫細胞の活性化を抑制しています。最も存在量が多いと考えられるHLA-G1タンパク質は、広範な免疫細胞表面に発現するLILRB1やLILRB2というタンパク質に結合することによって、自己に対する不要な免疫反応や抗原処理後の過剰な免疫反応抑制に関与し、自己寛容の誘導に重要だと考えられています。前仲教授らの研究グループは、HLA-Gの免疫抑制機能に着目し、その受容体との分子認識機構を分子、原子レベルで詳細に解明するとともに、生体内での慢性炎症抑制機能を検討してきました。その結果、コラーゲン誘導性関節炎マウスにHLA-Gタンパク質溶液を皮下注射することによって、四肢の関節炎症を長期にわたって抑制することが解明されています(Hum Immunol 2013, 2016)。今回は、異なる慢性炎症モデルであるアトピー性皮膚炎マウスを用いて、皮下注射ではなく、炎症部位へのタンパク質溶液塗布による抗炎症効果の有無を検討しました。

### (研究手法)

前仲教授らの研究グループは、HLA-G1タンパク質を大腸菌封入体の巻き戻し法<sup>※4</sup>によって大量調製しました。ダニ由来抗原によりアトピー性皮膚炎様症状を示したマウスの耳に、1日おきに連続10日間HLA-G1タンパク質(5 µgまたは15 µg/両耳)を塗布し、その効果をHLA-G1タンパク質溶液調製に用いているPBS溶液(リン酸緩衝生理食塩水)を塗布した場合と比較しました。その間、耳の炎症の程度を耳介(耳のうち体の外側に飛び出ている部分)の厚さを測定することで観察しました。また、HLA-G1塗布開始後18日目の血中IgE<sup>※5</sup>濃度、及び腋窩リンパ節(脇の下のリンパ節)に由来するリンパ球の抗CD3抗体、抗CD28抗体刺激応答性IFN- $\gamma$ <sup>※6</sup>、IL-13<sup>※7</sup>、IL-17A産生能をELISA法により測定しました。また、副作用の指標として、観察期間中の体重変化を記録しました。

### (研究成果)

精製したHLA-G1タンパク質を耳の炎症部位に1日おきに10回塗布し、耳介の厚さを指標に炎症の程度の推移を観察したところ、HLA-G1塗布群では症状の改善が認められました(図1)。また、その抑制効果は5 µg投与した場合に比べて15 µg投与したときに強く、より改善が見られました。組織学的にも、HLA-G1塗布により炎症部位へ免疫細胞が集結し、さらなる炎症を抑えられていることが確認できました。一方、体重減少に代表される副作用は認められませんでした。

HLA-G1 タンパク質溶液塗布による皮膚炎治療効果のメカニズムを明らかにするために、18 日目に単離した腋窩リンパ節由来リンパ球を抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体で刺激することによって、T 細胞機能を評価したところ、Th2 細胞が産生する IL-13, Th17 細胞が産生する IL-17A 量が低下している一方で、Th1 細胞が産生する IFN- $\gamma$ 量は増えていることが明らかになりました（図 2）。また、18 日目のマウス血中 IgE 濃度が HLA-G1 塗布マウスでは PBS 塗布マウスに比べて有意に低く（図 2）、Th2 反応が抑制されることによって、アレルギー反応で重要な IgE 産生 B 細胞の分化誘導が抑制されていることが示唆されました。

#### （今後への期待）

本研究の結果から、HLA-G1 は炎症部位の皮膚から血中に吸収されることで、アレルギー反応を誘起する Th2 細胞応答及び Th17 細胞応答を共に抑制し、皮膚炎症に対する治療効果を発揮することがわかりました。既に報告済みのコラーゲン誘導性関節炎モデルマウスに続き、アレルギーモデルマウスでも免疫反応を抑制する効果を示したことから、過剰な免疫反応が誘起する慢性炎症疾患に対する、HLA-G1 タンパク質による広範な治療効果・予防効果が期待されます。

#### お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 教授 前仲 勝実（まえなか かつみ）

TEL: 011-706-3970 FAX: 011-706-4986 E-mail: maenaka@pharm.hokudai.ac.jp

北海道大学大学院薬学研究院 助教 黒木 喜美子（くろき きみこ）

TEL: 011-706-3764 FAX: 011-706-4986 E-mail: k-kimiko@pharm.hokudai.ac.jp

ホームページ: <http://convallaria.pharm.hokudai.ac.jp/bunshi/>

#### 〔用語解説〕

- ※1. ヒト主要組織適合性複合体（MHC）：ヒトのほぼすべての細胞上に存在する細胞表面タンパク質。自己または非自己由来の抗原ペプチドを結合することによって、免疫細胞が自己と非自己を見分けることに関与している。その分子構造、発現分布、機能からクラス I とクラス II に分類される。
- ※2. 自己寛容：免疫細胞が自己の組織、細胞、タンパク質に対して免疫反応が起こらないようにする仕組みのこと。
- ※3. Th2/Th17：免疫反応を担うリンパ球の一つであるヘルパーT 細胞の一種。ヘルパーT 細胞(Th)は、産生するサイトカインの種類により、いくつかに分類される。Th2 細胞は IL-4, IL-13 などを産生し、主に液性免疫に関与する。Th17 細胞は IL-17A, IL-17F を産生し、主に炎症性疾患や自己免疫疾患に関与する。
- ※4. 巻き戻し法：不活性な変性状態で発現させた組換えタンパク質を、活性を持つ本来の立体構造へと戻す方法。
- ※5. IgE：アレルギー反応を引き起こす抗体の一種。

※6. IFN：インターフェロンの略称で、動物体内に病原体（特にウイルス）や腫瘍細胞などの異物が侵入した際、細胞が分泌するタンパク質のこと。いくつか種類があり、IFN $\gamma$ はヘルパーT細胞のうちTh1細胞が産生する。アトピー性皮膚炎初期炎症ではTh2細胞が重要であり、Th1細胞の関与は少ないといわれている。

※7. IL：インターロイキン（Interleukin）の略称。白血球によって分泌され、細胞間のコミュニケーション機能を果たす。ILの後ろの数字は種類を表し、現在、30種類以上が知られている。アトピー性皮膚炎になると、IL-13、IL-17の産生量が増える。

【参考図】

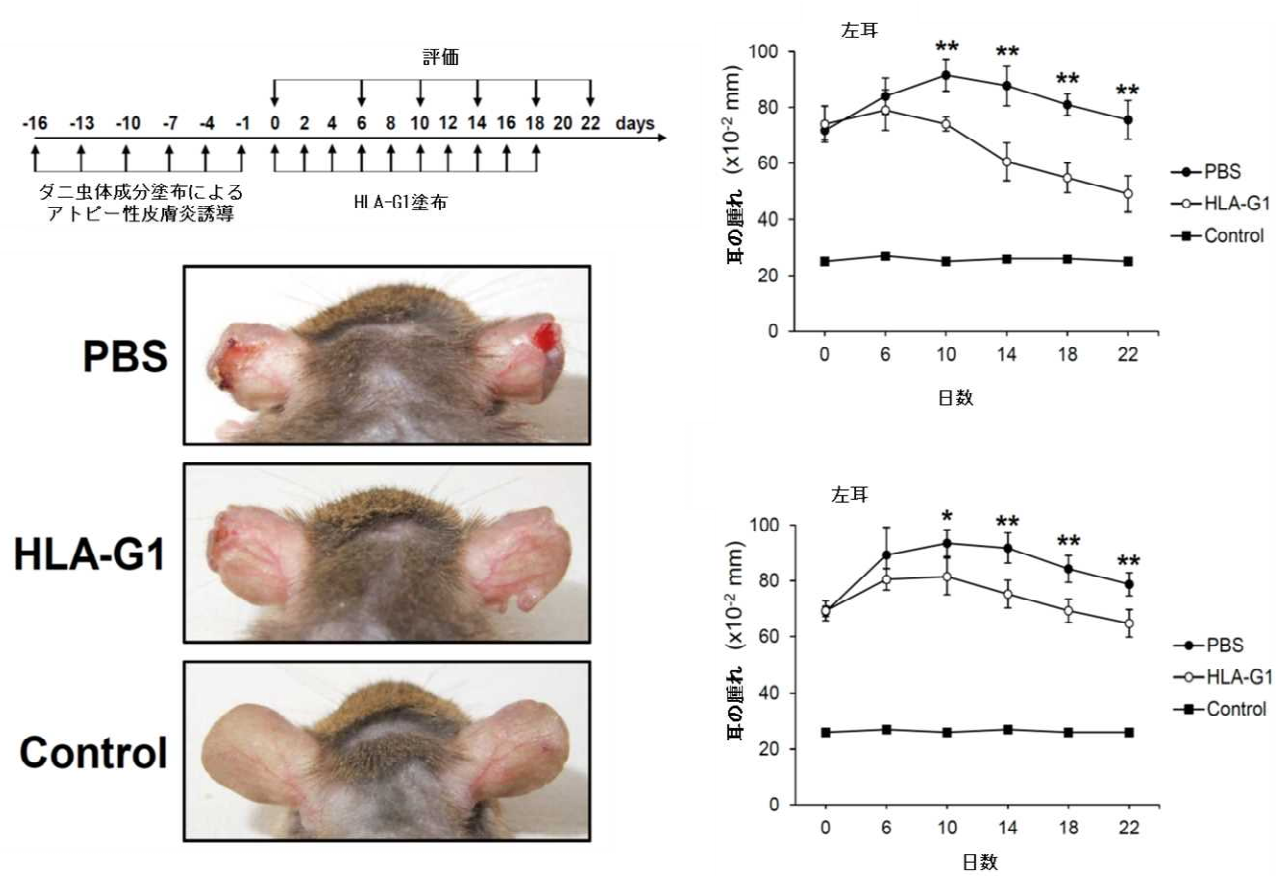


図1 アトピー性皮膚炎マウスにおけるHLA-G1タンパク質の抗炎症効果。まず、ダニ虫体成分含有軟膏を2日おきに6回塗布することによって炎症を起こし、その後HLA-G1タンパク質溶液またはPBSを1日おきに10回塗布した。その間、耳介の厚さを測定し、炎症度の指標とした(右)。HLA-G1タンパク質を15 µg塗布した場合(右上)は、5 µg塗布した場合(右下)に比べ強い抗炎症効果が認められた。コントロールは未発症マウスを表す。各群4匹ずつ観察した。

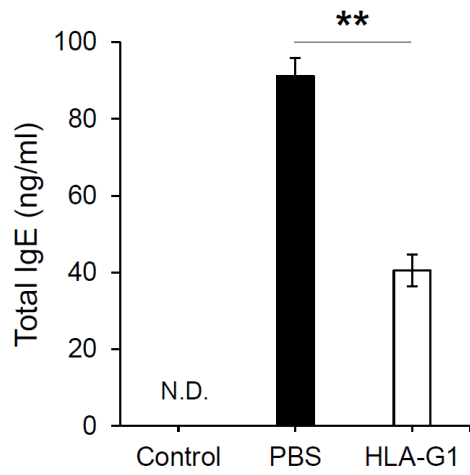
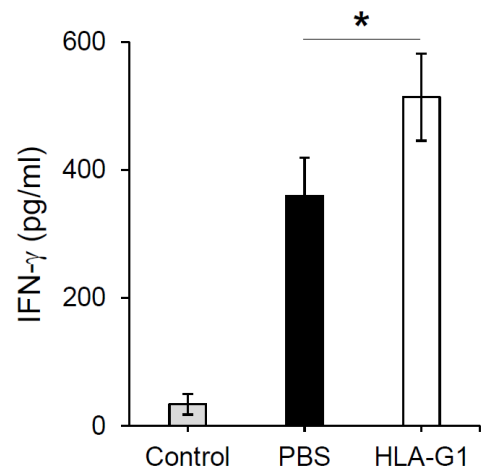
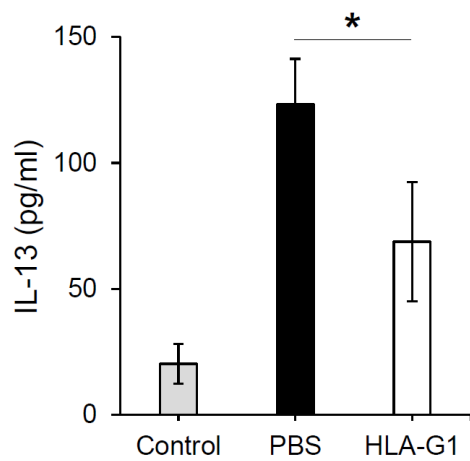
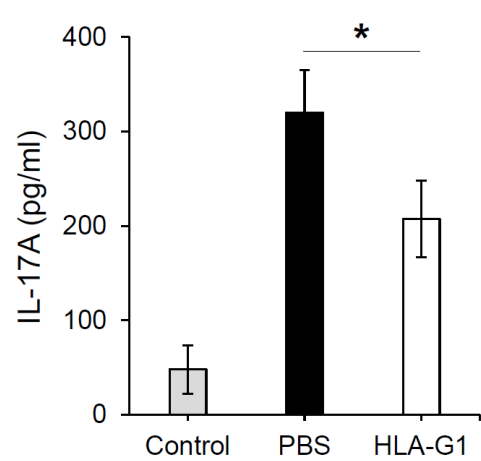
**A****B****C****D**

図2 HLA-G1 塗布開始 18 日後の血中 IgE 濃度 (A) とリンパ節由来リンパ球による IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-17A 産生量 (B-D)。アトピー性皮膚炎と関連の少ない IFN- $\gamma$  産生量は増える一方, IgE, IL-13, IL-17A は HLA-G1 塗布により産生量が少なくなり, HLA-G1 を塗布することで, アトピー性皮膚炎症が抑制されていることがわかる。各群 4 匹ずつ測定した。