



Title	High cell surface expression and peptide binding affinity of HLA-DQA1*05:03, a susceptible allele of neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD)
Author(s)	別府, 祥平
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87883
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	別府 祥平
論文題名 Title	High cell surface expression and peptide binding affinity of <i>HLA-DQA1*05:03</i> , a susceptible allele of neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) (視神経脊髄炎スペクトラム障害 (NMOSD) 疾患感受性アレルである <i>HLA-DQA1*05:03</i> は高い細胞表面発現とペプチド結合親和性を示す)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 視神経脊髄炎スペクトラム障害 (NMOSD) は、脳、脊髄、視神経に炎症を起こす再発性の自己免疫疾患であり、その主病態は、アストロサイト表面に発現するアクアポリン4 (AQP4) を標的とした抗AQP4抗体による補体介在性のアストロサイトパチーである。NMOSDの遺伝的要因についてはほとんど知られていなかったが、2019年に我々のグループは日本人NMOSDを対象としたHLAジェノタイピングを行い、HLA-DQA1*05:03が疾患感受性アレルであることを明らかにした。本研究では、HLA-DQA1*05:03がNMOSD発症に寄与するメカニズムを明らかにすることを目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 我々はまず、HLA-DQA1*05:03がコードするHLA-DQ分子の細胞表面発現量を評価した。プラスミドベクターを用いて複数の組み合わせのHLA-DQA1、DQB1アレルをHEK293細胞に一過性トランスフェクションし、フローサイトメトリーによってHLA-DQの細胞表面発現量を測定した。その結果、HLA-DQA1*05:03の細胞表面発現量が最も高いことが確認された。内在性コントロールとしてGFPを発現可能なpcDNA3.1(+) IRES GFPプラスミドベクターを活用し、トランスフェクション効率を補正した場合も同様の結果であった。また、結合ペプチドが細胞表面発現量に与える影響を調べるため、既報でT細胞エピトープとして報告されているimmunodominant AQP4ペプチドとこれらのHEK293細胞の共培養を行ったが、いずれのペプチドにおいても細胞表面発現量におけるHLA-DQA1*05:03の優位性は保たれた。 さらに、HLA-DQA1*05:03の細胞表面高発現が、DQA1のアミノ酸配列に依存する可能性を検討するため、3つのHLA-DQA1の発現ベクター(DQA1*01:03、DQA1*03:03、DQA1*05:03)の間で、α1ドメインをコードする前半の配列と、α2ドメイン、膜貫通領域、細胞質領域をコードする後半の配列を組み替えたベクターを新たに作成した。いずれの組み合わせにおいても、α1ドメインがHLA-DQA1*05:03由来の場合に細胞表面発現が最も高くなり、α1ドメインのアミノ酸配列がHLA-DQ分子の細胞表面発現量の違いを制御していることが示された。さらに、細胞表面発現量におけるα1ドメイン中の重要残基を明らかにするために、HLA-DQA1*05:03のα1ドメインのアミノ酸配列を鋳型とし、特に多型の頻度が高いアミノ酸位置1カ所のみHLA-DQA1*01:03の配列に置換した4種類の改変ベクターを新たに作成した(V50E、Q53K、F54_R55insGおよびL75M)。V50E、Q53K、F54_R55insGは細胞表面発現量に大きな変化は見られなかったが、L75Mは元のHLA-DQA1*05:03と比較して細胞表面発現量の著しい減少を示し、75位ロイシンの重要性が示唆された。 次にHLA-DQA1*05:03がimmunodominant AQP4ペプチドを効率的に提示するか明らかとするため、HLA-ペプチド結合親和性計算ツールであるNetMHCIIpan 3.2を使用した。まず、immunodominant AQP4ペプチドとの結合下で、HLA-DQA1アレル間で結合親和性を比較したが、HLA-DQA1*05の優位性は見られなかった。次に、HLA-DQA1*05存在下で、immunodominantおよびnon-immunodominant AQP4ペプチド間で比較したところ、HLA-DQA1*05はimmunodominant AQP4ペプチド有意に結合親和性が高いことが明らかとなった。 さらに、HLA、ペプチド、T細胞受容体複合体のモデリングが可能なツールであるImmuneScapeを用いて、pMHCのエネルギー的安定性をEMPIRE (EMpirical Protein-InteRaction Energy) スコア関数で評価した。Immunodominant AQP4ペプチドとの結合下では、HLA-DQA1*05:03によりコードされたpMHCが最もエネルギー的安定性が高かった。さらに、3次元構造モデル解析により、HLA-DQA1*05:03のペプチド結合溝容積の大きさがpMHC複合体のエネルギー的安定性に寄与していることが推察された。 〔総括(Conclusion)〕 HLA-DQA1*05:03が有する高い細胞表面発現量、immunodominant AQP4ペプチドとの高い結合親和性、pMHCの高度なエネルギー的安定性が、NMOSD発症に寄与している可能性がある。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 別府 祥平				
論文審査担当者		(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	望月 秀樹	署名
	副 査	大阪大学教授	保川 通孝	署名
	副 査	大阪大学教授	熊ノ脚 淳	署名

論文審査の結果の要旨

本研究は、日本人の視神経脊髄炎スペクトラム障害（NMOSD）の疾患感受性アレルであるHLA-DQA1*05:03がその発症に関連するメカニズムを解明することを目的とした。HLA-DQA1*05:03は他の様々なDQA1アレルと比較して有意に高い細胞表面発現レベルを示し、その発現はα1ドメインのアミノ酸配列、特に75位のロイシンに強く依存した。さらにin silico解析により、HLA-DQA1*05:03にコードされるHLA-DQはimmunodominant AQP4ペプチドを優先的に提示し、そのペプチド主要組織適合性複合体（pMHC）は他のDQA1アレルよりもHLA-DQA1*05:03存在下でエネルギー的に安定した。このエネルギー的安定性は3次元構造モデル解析により裏付けられた。

以上のことから、本研究はHLA-DQA1*05:03がNMOSDの発症に関与する明確な特性を有していることを明らかにした貴重な研究であり、学位に値するものと認める。