

小麦アレルギーの包括的ゲノム関連解析と T 細胞エピトープの同定

研究課題名	小麦アレルギーの包括的ゲノム関連解析と T 細胞エピトープの同定		
フリガナ	ノグチ エミコ		
代表者名	野口 恵美子		
所属機関 (機関名) (役職名)	筑波大学医学医療系 教授		
共同研究者	氏 名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	矢上 晶子 (ヤガミ アキコ)	藤田医科大学ばんだね病院総合アレルギー科・教授	患者サンプルを使用した免疫応答性解析
本助成金による発表論文, 学会発表	Fukunaga K, Chinuki Y, Hamada Y, Fukutomi Y, Sugiyama A, Kishikawa R, Fukunaga A, Oda Y, Ugajin T, Yokozeki H, Harada N, Suehiro M, Hide M, Nakagawa Y, Noguchi E, Nakamura M, Matsunaga K, Yagami A, Morita E, Mushiroda T. Genome-wide association study reveals an association between the HLA-DPB1*02:01:02 allele and wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. <i>Am J Hum Genet</i> , 2021 DOI: 10.1016/j.ajhg.2021.06.017		

研究結果要約

我々はこれまで、国内多施設共同研究により世界初となる経皮感作加水分解小麦アレルギーの疾患感受性遺伝子を HLA-DQ 領域と RBFOX1 の 2 遺伝子座に同定した(Noguchi et al, J Allergy Clin Immunol, 2019)。さらに、非加水分解型の成人小麦アレルギーについても網羅的遺伝要因の探索を行った。非加水分解型小麦アレルギー遺伝要因の研究の国内多施設共同研究に参加し、非加水分解型小麦アレルギーのリスクアレルとして HLA-DPA1*01:02-DPB1*02:01 ハプロタイプ、抵抗性と関連するハプロタイプとして HLA-DPA1*02:01-DPB1*09:01 を検出した。本研究ではさらに、非加水分解型小麦アレルギーの易罹患性と抵抗性に関連する HLA アレル情報と、in vitro assay である HLA クラス II 結合ペプチド探索法を組み合わせた解析法を用いて小麦アレルゲンの T 細胞エピトープ領域の探索を行い小麦アレルギー感受性 HLA が提示しうる領域を検出した。

研究目的

小麦は食物アレルギーの原因として鶏卵、牛乳に次ぎ第 3 位であり、小麦の消費量の増加にともない増加傾向にある。欧米では小麦に対する不耐症であるセリアック病や非セリアックグルテン感受性疾患の罹患率が高く、小麦タンパク質主成分であるグルテンの除去食材や啓蒙活動なども盛んにおこなわれている。本邦における食物依存性運動誘発アナフィラキシーの約 60%が小麦によるものであり、また、マスメディアの影響で医学的必要性のないと思われる人々にもグルテンフリーダイエットが人気となっていることから、小麦に対する不耐性を生じうる個人を同定すること、エビデンスに基づいた適切な治療法を提供することが求められている。

これらの背景から、本研究では、小麦アレルギー及び関連形質のゲノム解析による包括的な疾患関連遺伝子を同定すること、また、非加水分解型の一般的な小麦アレルギーの主要小麦アレルゲンの T 細胞エピトープを同定することを目的として研究を行った。ヒト遺伝要因の探索と、小麦アレルゲン上の抗原領域の情報を統合することで、食物のアレルゲンとヒト免疫系との相互作用をこれまでになく俯瞰することが可能となり、新しい治療薬・免疫療法アプローチの開発につながると期待される。これらの研究により、将来的には小麦アレルギーの免疫療法開発への基盤となると期待される。

研究計画及び研究手法

1-1各種小麦アレルギーに対する HLA class II 領

域を含む全ゲノム関連解析による疾患感受性・抵抗性アレルの探索(野口)

1-1 非加水分解型小麦アレルギーのゲノム解析

非加水分解型小麦アレルギー患者検体の収集は藤田医科大学病院および関連施設で行った。本研究に参加同意を得られた患者から血液サンプルを収集し、抽出した DNA を使用して SNP アレイによる遺伝子型決定を行った。SNP アレイはイルミナ社の Asian Screening Array (ASA) を使用した。コントロールは自施設で保有する一般健康人サンプルを使用した。本研究は筑波大学、藤田医科大学、および関連施設の倫理委員会の承認を経て行われた。HLA 領域および HLA アレルの推定については SNP2HLA¹⁾を用いた HLA インピュテーションにより行った。

1-2 小麦アレルゲン感作のゲノム解析

臨床症状とゲノム情報を統合させたバイオバンクである東北メディカルメガバンク機構²⁾において蓄積されているデータを用いて、小麦特異的 IgE 陽性に関連するゲノム領域を解析した。筑波大学倫理委員会の承認後に東北メディカルメガバンク機構にデータ利用申請を行った。データ利用申請承認後に分譲されたデータを使用して、小麦アレルゲン感作と関連する遺伝子型の検出を行った。小麦特異的 IgE については多項目アレルゲン特異的 IgE 測定法である MAST-33 により得られたデータから小麦特異的 IgE について抽出し、ルミカウント 2.78 以上を感作陽性、2.77 以下を感作陰性とした。分譲された遺伝子型情報と小麦アレルゲン感作について関連解析をロジ

スティック回帰分析により行った。

[2] HLA アレル型の関連解析情報と HLA ペプチド結合アッセイを用いて免疫原性ペプチドを検出する (野口)

抗原提示細胞に取り込まれた食物アレルゲンはペプチドに分解され、自己の HLA class II とともに T 細胞へ提示され、免疫応答が開始される。HLA class II は個人間での多様性が大きく、保有する HLA クラス II アリルにより、抗原提示しやすいペプチドが個人間で異なる。そのため、食物アレルゲンの T 細胞エピトープを同定することは免疫療法などの脱感作を目指す治療法開発の第一歩となる。本研究では、ゲノム解析で得られた疾患感受性・抵抗性 HLA アレル情報を基に、研究協力者である宮寺が開発した HLA 発現系を利用した結合アッセイ法を用いて小麦アレルゲンコンポーネントの T 細胞エピトープ候補の探索を行った。オメガ 5 グリアジンを含む、複数の小麦コンポーネントを対象として、以下の方法で免疫原性ペプチド候補領域のスクリーニングを行った。

2-1: HLA 結合領域候補の絞り込み

候補となる小麦抗原は高分子タンパク質であるため、これらのすべての領域を対象として HLA 結合測定を実施することは現実的ではない。そこで、まずドッキング・シミュレーションによる HLA 結合領域探索を行った。ドッキング・シミュレーションソフトウェア MOE (MOLSYS Inc.) に搭載された HLA の立体構造予測用ソフトウェア HLA modeler³⁾ 及び HLA とペプチドの

結合親和性を予測するソフトウェア HLA-BAP⁴⁾ を用いて、小麦アレルギー感受性と関連する HLA クラス II アレルに強く結合しうる領域を対象抗原中に探索した。また、近年、結合予測アルゴリズムの開発が進展し、特定の HLA アリルについては比較的高精度に結合ペプチドを予測しうる事が明らかになりつつある。そこで本研究では代表的な結合予測アルゴリズム (NetMHCIIpan4.0)⁵⁾ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>) を用いて、小麦アレルギー感受性 HLA クラス II が結合しうる領域を対象抗原中に探索した。

2-2: HLA と小麦抗原の結合アッセイ

上記で予測した HLA 結合領域および、非加水分解小麦アレルギーの研究において関連が示唆されている抗原部位を対象として、HLA 結合アッセイを行った。HLA 結合アッセイは研究協力者の宮寺が確立した HLA 発現アッセイを用いて行った。この測定系では HLA クラス II β 鎖と、解析対象となる抗原ペプチドとの融合タンパク質を作成し、培養細胞株での表面発現量を定量する⁶⁾。HLA class II α 鎖の安定発現株に候補ペプチドと HLA class II β 鎖のトランスフェクションを行い⁷⁾、小麦抗原に含まれるペプチドと疾患感受性・中立性・抵抗性アレルとの結合実験を実施した。この HLA 結合アッセイ法では、従来の HLA-ペプチド相互作用解析で測定困難な疎水性領域の結合解析も可能である。小麦アレルゲンは疎水性アミノ酸残基を多く含み、同一のアミノ酸残基の繰り返し配列から構成されるため、合成ペプチドを用いた従来の HLA 結合アッセイの実施

は困難であり、本手法では従来法で検出が難しい T 細胞エピトープを見出せる可能性がある。

[3]患者サンプルの収集と非加水分解小麦アレルギーの免疫応答性の解析 (矢上)

非加水分解型の成人小麦アレルギーの免疫原性の解析のため、患者血清を用いた小麦の 2D-Western Blotting を施行するとともに、小麦由来リコンビナントアレルゲンを ELISA と好塩基球活性化試験で評価した。

結果と考察

[1]各種小麦アレルギーに対する HLA class II 領域を含む全ゲノム関連解析による疾患感受性・抵抗性アレルの探索(野口)

1-1 非加水型小麦アレルギーのゲノム解析

非加水分解型の成人小麦アレルギー患者サンプルを使用して全ゲノム関連解析と HLA imputation を行い、疾患感受性アレルとして DPB1*02:01 を検出した。非加水分解型小麦アレルギーは罹患者の少ない希少疾患であり、単独施設による解析では限界があることを考慮して国内多施設共同研究に参加した。リスクアレルとして HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01 ハプロタイプ、抵抗性と関連するハプロタイプとして HLA-DPA1*02:01-DPB1*09:01 が検出された⁸⁾。

1-2 小麦アレルゲン感作のゲノム解析

解析対象となった 18,755 例のうち、MAST-33 小麦 IgE 陽性例は 615 例、陰性例は 18,140 例であった。年齢別、性別による特徴としては、男性

に多く、さらに男性では 40 代以降に感作率が上昇する傾向が観察された。全ゲノム関連解析では有意水準 ($P < 5 \times 10^{-8}$) を満たす関連については検出されなかった。

[2] HLA アレル型の関連解析情報と HLA ペプチド結合アッセイを用いて免疫原性ペプチドを検出する (野口)

2-1: HLA 結合領域候補の絞り込み

ドッキング・シミュレーションおよび、結合予測 ア ル ゴ リ ズ ム (NetMHCIIpan4.0)⁹⁾(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>)を用いて、小麦アレルゲン結合候補領域を予測した。1-1 で明らかになった、小麦アレルギー感受性・抵抗性と関連する HLA クラス II (リスクアレル HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01、抵抗性アレル HLA-DPA1*02:01-DPB1*09:01) および、東アジア集団に高頻度に存在し、小麦アレルギーとは関連しない中立性アレル (HLA-DPA1*02:02-DPB1*05:01) を解析対象とした。リスクアレル HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01 に強く結合することが予測された上位 11 種類のペプチドについて結合解析を行うこととした。

2-2: HLA と小麦抗原の 結合アッセイ

2-1 で選択した 11 種類の小麦アレルゲンペプチドのうち、6 本のペプチドについて結合解析を実施した。まず、ペプチドに相当する部分について

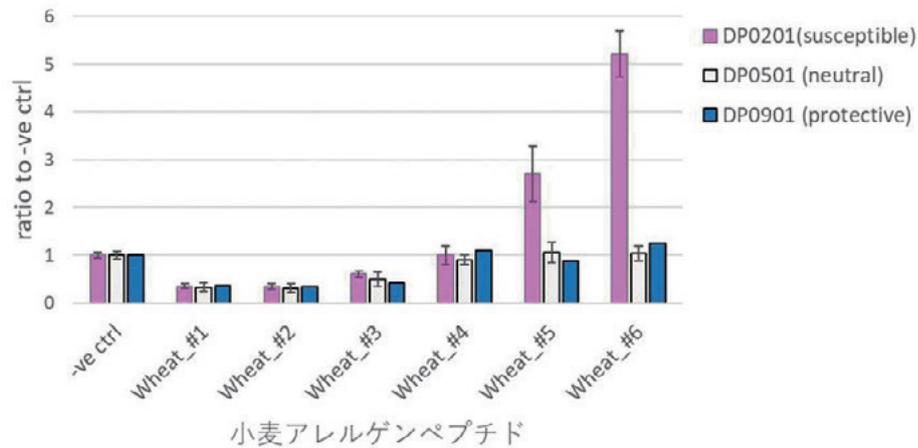


図1 HLA と小麦アレルゲンペプチドの結合解析

ゲノム解析により同定した小麦アレルギーリスクアレル(DP0201 (HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01)) 中立性アレル (DP0501 (HLA-DPA1*02:02-DPB1*05:01)) , 抵抗性アレル(DP0901 (HLA-DPA1*02:01-DPB1*09:01))について、小麦アレルゲン中のペプチド(#1-6)の結合能を測定した (mean±SD, n ≥ 3 (DP0201, DP0501), n≤2 (DP0901))。

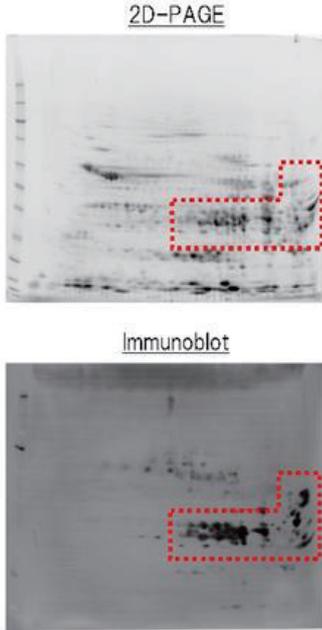
て一本鎖 DNA を外部委託により合成した。次に、一本鎖 DNA を鋳型として PCR を行い、DP β 鎖をコードする発現用プラスミドに挿入した。構築した発現プラスミドを用いて、HLA-DPα 鎖安定発現株に導入し、HLA の表面発現量を測定した。6 種類のペプチドのうち、2 本がリスクアレル HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01 と強く結合した。これらの 2 本は抵抗性アレル (HLA-DPA1*02:01-DPB1*09:01)、中立性アレル(HLA-DPA1*02:02-DPB1*05:01) とは強い結合を示さなかった(添付資料 図1)。一方、6 種類のペプチドのうち、3 種類は結合予測上位であったにも関わらず、リスクアレル HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01 を含むいずれのアレルについても結合が認められず、ネガティブコントロール(g9 ペプチド:GGGGGGGGG)よりも低値を示した。そのため、これらのペプチド(#1-3)は HLA との結合能を持たない、もしくは、ペプチドに含まれる配列が HLA の正常なフォールディングを妨げ

ている可能性が示唆された。結合が認められたペプチドのうち、最も強く結合したペプチド(#6)は、ネガティブコントロール(g9 ペプチド:GGGGGGGGG) および抵抗性アレル (HLA-DPA1*02:01-DPB1*09:01)、中立性アレル(HLA-DPA1*02:02-DPB1*05:01) と比較して約 4 倍の細胞表面発現量を示した(図1)。以上の結果から、ペプチド#4 が DP0201 拘束性 T 細胞エピトープである可能性が示唆された。

上記に示すように本研究では 6 種類の候補ペプチド中、2 種類が HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01 と強く結合することを見出した。今回、解析対象としたペプチド領域は小麦アレルゲン中のごく一部である。そのため今後、より多くの候補ペプチドについて解析を行うことにより、T 細胞エピトープ候補領域を多数、見出すことが出来る可能性がある。

① IgE 抗原の探索・評価

2-D Immunoblotting



② 抗原性の評価

好塩基球活性化試験

タンパク質A(大腸菌リコンビナント)

	抗原濃度 (ng/ml)					
	10000	1000	100	10	1	0.1
症例 1	28.6%	17.1%	5.2%	1.3%	2.4%	1.5%
症例 2	4.1%	0.8%	0.4%	0.8%	0.6%	1.4%
症例 3	43.7%	28.1%	19.2%	4.7%	2.2%	3.7%
症例 4	24.4%	5.9%	2.1%	4.2%	3.2%	1.8%
コントロール 1	2.8%	2.8%	1.7%	2.5%	1.9%	2.4%
コントロール 2	9.4%	2.8%	1.5%	3.3%	2.7%	2.1%
コントロール 3	7.9%	1.3%	1.4%	1.1%	0.9%	0.8%
コントロール 4	11.7%	2.3%	0.8%	2.2%	1.1%	1.9%

小麦(粗製グリアジン)

	抗原濃度 (ng/ml)			
	100	10	1	0.1
症例 1	38.1%	30.2%	7.9%	4.6%
症例 2	18.7%	21.0%	5.3%	2.0%
症例 3	43.8%	59.3%	63.5%	6.0%
症例 4	21.0%	17.7%	5.8%	1.6%
コントロール 1	2.2%	1.2%	1.7%	2.5%
コントロール 2	3.1%	4.1%	2.3%	3.6%
コントロール 3	0.7%	0.8%	0.6%	1.3%
コントロール 4	1.9%	2.3%	1.7%	2.3%

ω-5 グリアジン(大腸菌リコンビナント)

	抗原濃度 (ng/ml)					
	10000	1000	100	10	1	0.1
症例 1	6.6%	25.3%	30.4%	38.9%	36.2%	18.3%
症例 2	1.0%	16.9%	22.0%	22.0%	25.3%	12.8%
症例 3	9.1%	45.2%	43.6%	44.9%	48.7%	69.1%
症例 4	2.7%	10.9%	19.0%	20.8%	22.0%	9.6%
コントロール 1	1.7%	2.0%	2.0%	1.5%	2.0%	2.2%
コントロール 2	2.2%	3.5%	1.5%	4.1%	1.1%	2.3%
コントロール 3	1.4%	1.1%	0.8%	1.5%	1.5%	1.7%
コントロール 4	2.2%	2.1%	3.1%	1.0%	1.7%	2.1%

小麦(可溶性画分)

	抗原濃度 (ng/ml)			
	100	10	1	0.1
症例 1	24.0%	6.9%	2.6%	2.0%
症例 2	21.1%	3.9%	0.6%	1.2%
症例 3	54.5%	70.9%	15.6%	2.0%
症例 4	12.0%	2.2%	2.6%	2.1%
コントロール 1	2.1%	1.3%	1.9%	2.3%
コントロール 2	2.5%	4.0%	1.9%	2.5%
コントロール 3	2.1%	1.3%	1.3%	1.5%
コントロール 4	4.9%	3.2%	1.9%	4.6%

赤字:ネガコンの活性化率+10%以上
青棒:ポジコンの活性化率を100%としたときの相対スケール

	ネガコン	ポジコン
症例 1	2.0%	39.0%
症例 2	1.0%	83.8%
症例 3	2.8%	74.4%
症例 4	2.1%	68.5%
コントロール 1	3.0%	39.1%
コントロール 2	2.9%	78.6%
コントロール 3	1.9%	64.3%
コントロール 4	2.5%	41.3%

図 2 小麦の免疫ブロットと小麦タンパク質の免疫原性の解析

免疫ブロットで複数例に共通の IgE 抗原タンパク質を同定し、精製抗原を用いた ELISA 法で IgE 結合性が評価された。好塩基球活性化試験を行い、タンパク質 A 及びオメガ 5 グリアジンの抗原性が確認された。

[3]患者サンプルの収集と非加水分解小麦アレルギ-の免疫応答性の解析 (矢上)

2D-Western Blotting で複数例に共通して IgE 抗体が結合したタンパク質の ELISA では、非加水分解小麦アレルギー症例に特異的な IgE 抗体の反応が認められた。また、好塩基球活性化試験の結果、当該タンパク質およびオメガ 5 グリアジンは複数例において活性化 (CD203c の発現) を認めた。これにより、当該タンパク質が小麦アレルギー症状の誘発に関与していることが強く示唆された(図 2)。

今後の研究活動について

T 細胞エピートープは脱感作を誘導するうえで重要であり、小麦アレルギーに対する T 細胞エピートープが同定されれば難治性の成人発症小麦アレルギーに対して将来的なアレルゲンペプチド免疫療法等への展開が期待できる。本研究では、小麦アレルゲン中に HLA 結合領域を高確率で見出すことができた。今後、さらに広範囲の領域について同様の解析を行うことで、多数の HLA 提示領域を同定できる可能性がある。ヒト個体では複数種類の HLA アレルが発現されているため、病態の分子機序をさらに突き止めるためには、多様な研究手法により研究を展開する必要がある。例えば、特定の抗原領域によりアレルギーが誘発

される分子機序を解明するためには、患者検体を用いた T 細胞解析や、特定の HLA を発現するマウスモデルの開発などが必要である。また、免疫解析により B 細胞エピトープ、T 細胞エピトープが明らかになれば、これらの知見を基に、植物のバイオテクノロジー技術を応用しエピトープ部位を改変した新たな食物資源の開発や、リコンビナントアレルゲンなどの医薬品開発など、実用性の高い新規治療・予防戦略の開発が可能になることが期待される。

参考文献

- 1) Jia X, Han B, Onengut-Gumuscu S, Chen W M, Concannon P J, Rich S S, Raychaudhuri S, de Bakker P I. Imputing amino acid polymorphisms in human leukocyte antigens. *PLoS One*, 2013 (8): e64683.
- 2) Fuse N, Sakurai-Yageta M, Katsuoka F, Danjoh I, Shimizu R, Tamiya G, Nagami F, Kawame H, Higuchi S, Kinoshita K, Kure S, Yamamoto M. Establishment of Integrated Biobank for Precision Medicine and Personalized Healthcare: The Tohoku Medical Megabank Project. *JMA J*, 2019 (2): 113-122.
- 3) Amari S, Kataoka R, Ikegami T, Hirayama N. HLA-Modeler: Automated Homology Modeling of Human Leukocyte Antigens. *Int J Med Chem*, 2013 (2013): 690513.
- 4) Kataoka R, Amari S, Ikegami T, Hirayama N. HLABAP: HLA Class I-Binding Antigenic Peptide Predictor. *Chem-Bio Informatics Journal*, 2020 (20): 1-4.
- 5) Reynisson B, Barra C, Kaabinejadian S, Hildebrand W H, Peters B, Nielsen M. Improved Prediction of MHC II Antigen Presentation through Integration and Motif Deconvolution of Mass Spectrometry MHC Eluted Ligand Data. *J Proteome Res*, 2020 (19): 2304-2315.
- 6) 宮寺浩子, 野口恵美子, 溝上雅史, 徳永勝士. HLA クラス II 結合ペプチドの探索・同定法の開発. *日本臨床免疫学会会誌*, 2017 (40): 35-39.
- 7) Miyadera H, Ohashi J, Lernmark A, Kitamura T, Tokunaga K. Cell-surface MHC density profiling reveals instability of autoimmunity-associated HLA. *J Clin Invest*, 2015 (125): 275-91.
- 8) Fukunaga K, Chinuki Y, Hamada Y, Fukutomi Y, Sugiyama A, Kishikawa R, Fukunaga A, Oda Y, Ugajin T, Yokozeki H, Harada N, Suehiro M, Hide M, Nakagawa Y, Noguchi E, Nakamura M, Matsunaga K, Yagami A, Morita E, Mushiroda T. Genome-wide association study reveals an association between the HLA-DPB1(*)02:01:02 allele and wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Am J Hum Genet*, 2021

本研究の一部は東北メディカルメガバンク
といわてメディカルメガバンクよりデータ分
譲を受けて行われました (2018-0040)