

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07030

研究課題名(和文) 樹状細胞における細胞周辺環境に応じた抗原提示分子の発現制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) The regulatory mechanism of expression of antigen-presenting molecules responding to the environment in dendritic cells

研究代表者

古田 和幸 (Furuta, Kazuyuki)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：50644936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞による抗原提示においては、抗原提示分子であるMHCとともに共刺激分子および共抑制分子を介した相互作用がT細胞の活性化状態を規定する。これらの分子の細胞表面発現は、周辺環境や病原体からの刺激によって変化する。本研究では、炎症や腫瘍周辺環境に高濃度で産生されるATPの樹状細胞に対する作用を解析した。その結果、ATPは抗原提示分子、共刺激分子の細胞表面発現を誘導する一方で、共抑制分子の発現は誘導しなかった。またこの作用には、ATPに加えATPの代謝産物であるアデノシンも必要であった。さらに、ATP刺激樹状細胞は抗原提示によって、T細胞からのIFN γ 産生を強く誘導することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹状細胞における抗原提示関連因子の発現の誘導因子や発現制御因子については、免疫応答の調節の標的としても重要であるが、そのメカニズムは完全には明らかとなっていない。本研究では、ATPによる樹状細胞活性化機構を見だし、さらにそのメカニズムとしてアデノシンの必要性を明らかとした点で学術的な意義がある。これまで、アデノシン単独刺激は免疫細胞に対して抑制的に作用することが報告されているが、本研究の結果では、ATPと同時に作用することで、樹状細胞に対して、活性化の誘導に作用した。これらの作用の違いを踏まえ、ATPおよびアデノシン受容体を、治療標的とできる可能性があり、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In antigen presentation by dendritic cells, interactions through co-stimulatory and co-inhibitory molecules as well as antigen-presenting molecules, MHC, define the activation state of T cells. The cell surface expression of these molecules changes depending on the environment surrounding the dendritic cells or stimuli from pathogens. In this study, we analyzed the effects of ATP, which exist in the inflammation and tumor sites in high concentrations, on dendritic cells. We found that ATP induces up-regulation of cell surface antigen-presentation molecules and co-stimulatory molecules, but not of co-inhibitory molecules. In addition to ATP, adenosine, a metabolite of ATP, was required for this effect. Furthermore, we found that antigen presentation by ATP-stimulated dendritic cells strongly induced IFN γ production from T cells.

研究分野：生化学

キーワード：樹状細胞 抗原提示 ATP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外来病原体に対する免疫応答において、樹状細胞は末梢組織で取り込んだ病原体に由来する抗原を、主要組織適合抗原分子(MHC-I または MHC-II)によって T 細胞に提示し活性化することを通じて、病原体排除の獲得免疫応答を誘導する。また生体で発生した腫瘍細胞の排除のため腫瘍免疫応答においても、腫瘍特異的な抗原を提示することで、獲得免疫応答が誘導される。そのため、獲得免疫応答の制御機構の解明は、免疫疾患や腫瘍の発症機構の解明や、それらの治療法の開発の観点でも重要である。

樹状細胞の抗原提示においては、抗原提示分子である MHC とともに、共刺激分子および共抑制分子を介した相互作用や、樹状細胞が産生するサイトカインなども T 細胞の活性化状態を規定する。樹状細胞におけるこれらの分子の発現は、樹状細胞の周辺環境や、病原体からの刺激によって変化することが知られており、病原体の排除のためには、適切な制御が必要がある。このような樹状細胞における抗原提示関連因子の発現制御因子は、免疫応答の調節を介した疾患治療の標的としても重要であるが、そのメカニズムは完全には明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では外来抗原および抗原提示分子を制御する因子に対して、樹状細胞の周辺環境因子による刺激が与える作用と、その作用メカニズムを明らかとすることを目的とした。病原体排除の免疫応答において、樹状細胞による抗原提示が適切に機能するためには、環境に応じた抗原提示関連分子の発現調節が重要である。近年、病原菌感染によって活性化された免疫細胞や、組織傷害部位、さらには腫瘍組織内では高濃度の ATP が産生されることが知られており、免疫応答に対してもその作用が報告されている。そこで、本研究では、ATP に着目し、樹状細胞に対する作用を明らかとすることを目的として解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

骨髄由来樹状細胞(BMDC)は B10.BR マウスの脛骨および大腿骨より骨髄細胞を回収し、非働化ウシ胎仔血清(10%)、マウス GM-CSF を含む RPMI-1640 培地で 7-8 日間培養し、得られた細胞を BMDC として用いた。樹状細胞と T 細胞との共培養実験では、BALB/c マウスからリンパ節を単離し、T 細胞を調製した。得られた T 細胞と樹状細胞を培地中で共培養した。

(2) 細胞表面タンパク質発現量の測定

細胞に氷上で、抗原提示に関連するタンパク質の蛍光標識抗体を結合させ、フローサイトメーターで細胞表面におけるそれぞれのタンパク質の発現量を測定した。

(3) サイトカイン産生の測定

細胞を刺激後各時間に培養上清に産生された IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12 について ELISA 法で測定した。T 細胞活性化の解析では、樹状細胞との 24 時間共培養後、T 細胞から培養上清に産生された IFN γ について ELISA 法で測定した。

(4) T 細胞の細胞内 IFN γ の測定

樹状細胞と T 細胞を共培養後、細胞を固定、可溶化し、T 細胞内の IFN γ を IFN γ に対する抗体を用いて、フローサイトメーターで解析した。CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞を区別するために、CD4 抗体、CD8 抗体を用いて同時に染色し、それぞれの陽性細胞について解析した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① 樹状細胞表面の抗原提示関連分子の発現に対する ATP の作用

樹状細胞に対する ATP の作用を解析するために、BMDC の抗原提示関連分子の発現に対する ATP の作用を解析した。実験では、既知の樹状細胞活性化成分であるリポ多糖(LPS)の作用と比較して検討した。その結果、ATP 刺激は抗原提示分子である MHC-I、MHC-II、共刺激分子である CD80、CD86 の発現上昇を誘導した。一方で、共抑制分子である PD-L1 および PD-L2 の発現は、LPS で発現上昇が誘導されるのに対して、ATP では発現に変化はなかった (図 1)。

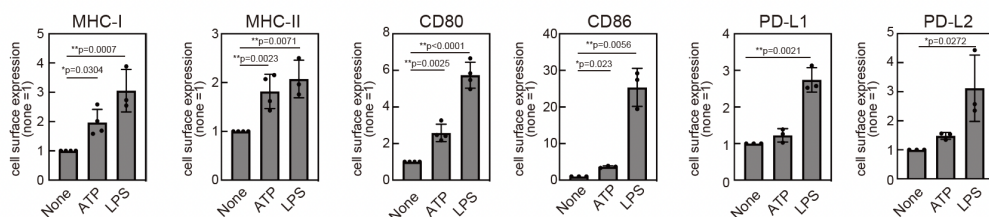


図 1 樹状細胞の抗原提示関連分子の細胞表面発現に対する ATP の作用(文献 1 より引用)

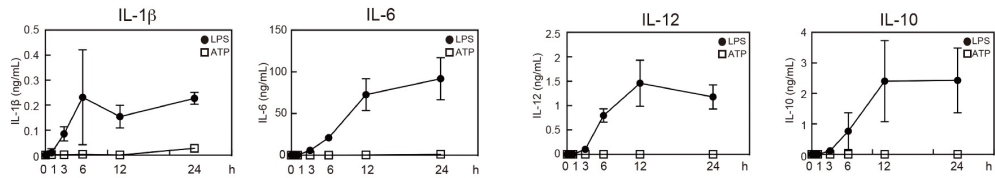


図2 ATP 刺激による樹状細胞のサイトカイン産生(文献 1 より引用)

②ATP 刺激によるサイトカイン産生

ATP 刺激した BMDC から産生される IL-1β、IL-6、IL-10、IL-12 の産生を解析した。これらのサイトカインは LPS 刺激によって、産生が誘導されるが、ATP 刺激ではこれらのサイトカインの産生誘導は見られなかった (図 2)。

③ATP 刺激による樹状細胞活性化における P2X 受容体の役割の解析

ATP による抗原提示関連分子の発現上昇メカニズムを解析した。ATP 受容体である P2X ファミリーの受容体拮抗薬である PPADS の効果を検討した結果、ATP 刺激による MHC-I、MHC-II、CD80、CD86 の発現上昇は PPADS によって抑制された。(図 3)

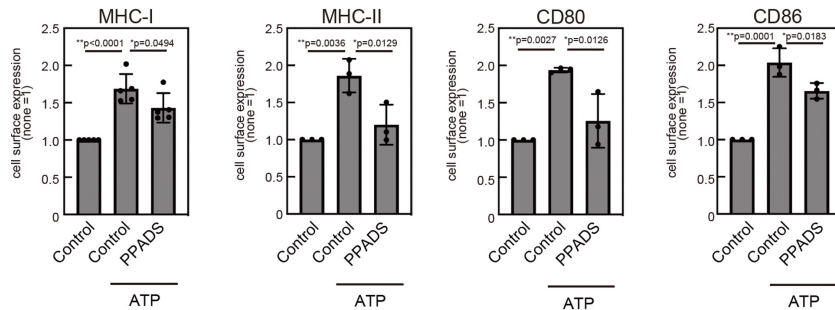


図3 ATP 刺激による樹状細胞活性化における P2X 受容体の役割(文献 1 より引用)

④ATP 刺激による樹状細胞活性化におけるアデノシン受容体の役割の解析

ATP は一部アデノシンに代謝されることが知られているため、ATP による抗原提示関連分子発現誘導へのアデノシン受容体の役割を検討した。アデノシン阻害剤 CGS15943 の効果を検討した結果、ATP 刺激による MHC-I および MHC-II の発現上昇は、アデノシン受容体阻害剤によって抑制された。(図 4)

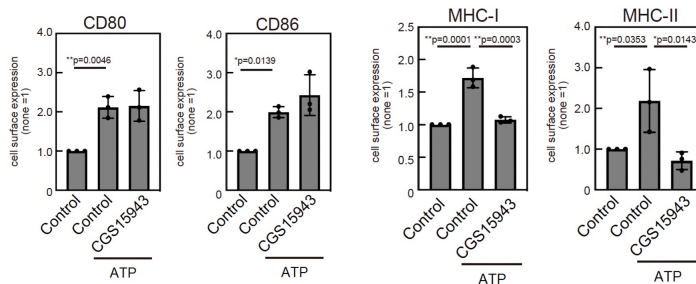


図4 ATP 刺激による樹状細胞活性化におけるアデノシン受容体の役割(文献 1 より引用)

⑤樹状細胞による T 細胞活性化における ATP 刺激の作用

ATP 刺激した樹状細胞による抗原提示機能について、ATP 刺激した樹状細胞と共培養し、誘導される T 細胞を解析することで検討した。共培養後 T 細胞から産生される IFNγ を検討した結果、ATP 刺激した樹状細胞との共培養は、T 細胞からの IFNγ 産生を強く誘導した。さらに、IFNγ 産生細胞を解析した結果、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の両細胞集団において、IFNγ 産生の割合の増加が見られた。(図 5)

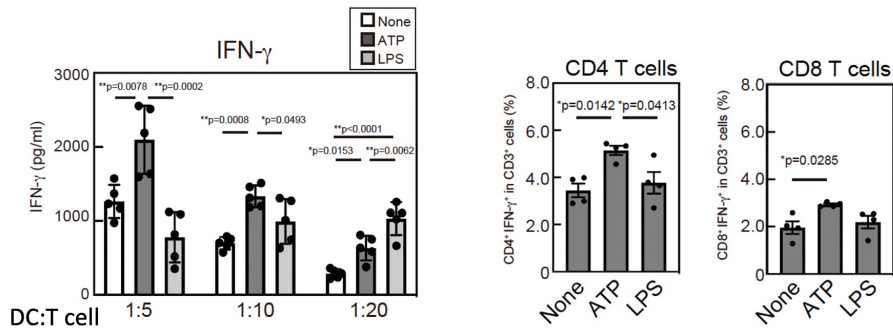


図5 ATP 刺激で刺激された樹状細胞による T 細胞活性化(文献 1 より引用)

(2) 得られた成果の意義と展望

本研究では、樹状細胞の抗原提示機能に影響を与える因子を探索する解析によって、ATP は、これまでに知られている樹状細胞活性化因子である LPS とは異なる作用で樹状細胞の活性化を誘導することを見いだした。(図 6) さらにそのメカニズムを解析し、樹状細胞に対する ATP 刺激によって、一部の ATP がアデノシンに代謝され、ATP とアデノシンがそれぞれの受容体を介して樹状細胞に作用することを明らかとした。アデノシンは免疫細胞に対して抑制的に作用することが報告されているが、本研究の結果では、ATP と同時に作用することで、樹状細胞に対して、活性化の誘導に作用することが明らかとなった。

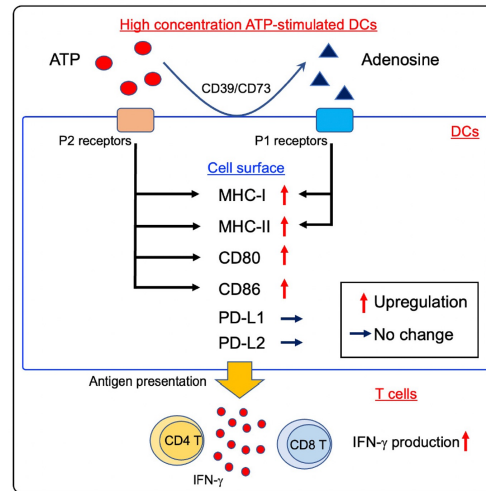


図6 樹状細胞に対する ATP の作用

(文献 1 より引用)

<引用文献>

1. Furuta K*, Onishi H, Ikada Y, Masaki K, Tanaka S, Kaito C

ATP and its metabolite adenosine cooperatively upregulate the antigen-presenting molecules on dendritic cells leading to IFN-γ production by T cells

J Biol Chem. 299(4):104587. (2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kazuyuki Furuta, Hiroka Onishi, Yuki Ikada, Kento Masaki, Satoshi Tanaka, Chikara Kaito	4. 巻 299
2. 論文標題 ATP and its metabolite adenosine cooperatively upregulate the antigen-presenting molecules on dendritic cells leading to IFN- production by T cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.104587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kento Masaki, Yuhji Hiraki, Hiroka Onishi, Yuka Satoh, Paul A Roche, Satoshi Tanaka, Kazuyuki Furuta	4. 巻 9
2. 論文標題 Ligation of MHC Class II Induces PKC-Dependent Clathrin-Mediated Endocytosis of MHC Class II.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9081810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古田和幸、大西宏果、筏勇喜、政木健人、田中智之、垣内 力
2. 発表標題 高濃度ATPによる樹状細胞活性化機構の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古田 和幸、古田 拓巳、佐藤 結香、田中 智之、垣内 力
2. 発表標題 病原体由来成分刺激時の樹状細胞におけるRab11の活性制御を介した 主要組織適合抗原クラスIIの発現誘導機構の解析
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

分子生物学分野 | 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科ホームページ
<https://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/bunsei/>

岡山大学研究成果プレスリリース
「細胞外ATPは樹状細胞を活性化しT細胞からのIFN- γ 産生を誘導する」
https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id1059.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------