

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590422

研究課題名（和文） MARCH I/c-MIR2欠損による免疫異常の解析

研究課題名（英文） Immunological Abnormality caused by MARCH I/c-MIR 2 deficiency

研究代表者

星野 真理（大村真理）(HOSHINO MARI)

独立行政法人理化学研究所・感染免疫応答研究チーム・研究員

研究者番号：10313511

研究成果の概要（和文）：

新規 E3 ユビキチンリガーゼファミリー、MARCH ファミリーの機能の解析を行っている。その結果、これまでにその中の一つである MARCH (membrane-associated RING-CH protein) I は、抗原提示を司る抗原提示細胞に発現する分子である MHC クラス II (MHC II) と 補助受容体 B7-2 の生体内での発現をユビキチン化により制御し、免疫機能を抑制する事ができ、更に、MARCH I の遺伝子欠損(KO) マウスでは、樹状細胞や B 細胞等の抗原提示細胞に機能異常が認められ、その異常は B7-2 ではなく高発現している MHC II 依存性であることを見出している。さらに今回、欠損マウスでは、樹状細胞および制御性 T 細胞にそれぞれ相互に発現する Fas と FasL との相互作用を介したカスパーゼ経路の活性化が誘導され、樹状細胞にアポトーシスを介した細胞数の減少がみられることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have investigated the physiological function of MARCH(membrane associated RING-CH protein) family. So far, we reported that MARCH-I-deficient cDCs and B cells accumulated MHC II and B7-2 and exhibited low Ag-presenting ability for exogenous Ags. Furthermore, MHC II, but not B7-2, was required for impaired cDC function induced by loss of MARCH-I in vivo. On this study we found that conditional inhibition of MARCH-I induced natural Treg-dependent apoptosis of mature DCs due to loss of MHC II ubiquitination. Our results suggest that maturation of DCs induces their "suicide" by facilitating recognition by Tregs, which is induced by loss of pMHC II ubiquitination in the steady state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：E3 ユビキチンリガーゼ、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

私たちは、c-MIR2/MARCH I は MHC クラス II (MHC II) の生体内での発現をユビキチン化により制御していることを見出した。また、MARCH I の欠損マウス (KO マウス) において、樹状細胞、B 細胞等の抗原提示細胞に異常があり、免疫機能低下がおこる事。さらに (2) MARCH I によるユビキチン化部位のアミノ酸を変異させ、MHC II のユビキチン化が起こらないようにしたために MHC II が高発現している、MHC II KI マウスで樹状細胞の異常が見られることから MARCH I のターゲット分子、B7-2, MHC クラス II のうち MHC クラス II の発現亢進が樹状細胞の異常に関与する事をこれまでに見出している。

2. 研究の目的

明らかになっている高発現した MHC クラス II を介した樹状細胞の分化異常がどのような分子や経路を介してどのようなメカニズムで起きているのか？」を以下の点について検討する。

(1) 高発現している MHC II と相互作用する細胞の存在、

(2) MHC II から FcR γ 鎖を経てネガティブシグナルが入ることにより培養樹状細胞の活性化阻害が生じる報告があるが、FcR γ 鎖、DAP12 といった既知の細胞内シグナルの関与、

(3) MHC II に付随する新規細胞内シグナル分子の探索。

3. 研究の方法

(1) 高発現している MHC II と相互作用する細胞の存在

これまで T 細胞、ストローマ等の細胞と樹状細胞との相互作用で抑制性樹状細胞が誘導される報告があるので、T 細胞との相互

作用により分化異常が生じるかの検討を T 細胞が欠損した MARCH I-Rag2 double KO マウスを用いて行う。

(2) MHC クラス II を介した、既知の細胞内シグナルの有無の検討およびその樹状細胞分化異常への関与の検討

(A) 培養細胞を用いた MHC II を介した細胞内シグナルの有無の検討

MARCH I KO マウスで過剰なネガティブシグナルにより樹状細胞分化異常が生じているかの検討を行うために、MARCH I KO マウスから調製した培養樹状細胞でネガティブシグナルの増強が起きているかを MHC II 抗体を用いたクロスリンク法で活性化の阻害が起きているかの検討を行う。

(B) MARCH I-FcR γ 鎖 二重 KO マウスと MARCH I-FcR γ -DAP12 三重 KO マウスを用いた検討

樹状細胞におけるシグナリングについて、FcR γ chain を介した系と DAP12 を介した系が報告されているが、それらの経路が樹状細胞分化異常に関与しているかの検討を行う。詳しく述べると MARCH I-FcR γ 鎖二重 KO マウスおよび MARCH I-DAP12 二重 KO マウスで樹状細胞異常が見られなくなった場合、それら経路が異常に関係あることがわかる。

(3) MHC II に付随する新規細胞シグナル分子の探索

MARCH I (コンベンショナル) KO マウスでの長期にわたる 2 次的影響を除去するために、MHC II 高発現による直接的な影響を見ることができるコンディショナル KO マウス (MARCH I をタモキシフェン (OHT) 投与によってコンディショナルに個体にて欠損させる) を用いて、樹状細胞の異常が惹起できう

るかを検討する。MARCH I コンディショナル KO マウスを用いて、MARCH I を抜くと、経時的に樹状細胞に分化異常が生じることを明らかにしている。

その分化異常が生じる際におきている事象・メカニズムについて、解析を行う。

4. 研究成果

まず、MHC クラス II と相互作用しうる細胞は、MARCH I-Rag1 二重欠損マウスの樹状細胞の解析から異常があることから T 細胞、B 細胞であることは、明らかにできず、また、MHC クラス II から FcR γ 鎖もしくは DAP12 鎖を経たシグナルの樹状細胞異常への関与は、MARCH I-FcR γ 二重欠損マウス、MARCH I-FcR γ -DAP12 三重欠損マウスの樹状細胞の解析の結果、異常があることから関与していないことが明らかになった。

次に、MHC II 抗体を用いたクロスリンクの実験では、ネガティブシグナルの増強は観察されず、樹状細胞分化異常と MHC II を介したネガティブシグナルとの関連を示すことはできなかった。

最後に、MARCH I コンディショナル KO マウスの解析から、コンディショナルに MARCH I を抜くと生じる脾臓の樹状細胞数の減少、樹状細胞のターンオーバーの上昇、樹状細胞の Annexin V での染色および樹状細胞の機能異常は、CD4CD25⁺ T 細胞による Fas-FasL 経路を介したアポトーシスによって生じていることが明らかになった。なお、樹状細胞の機能異常に関連する遺伝子のスクリーニングのために行なった、MARCH I コンディショナル欠損マウスの樹状細胞由来の cDNA を用いた DNA array において、発現の増減が明らかになった遺伝子からも Fas-FasL 経路を支持する結果を得ている。コンディショナルに MARCH I を抜いた場合に生じる脾臓の樹状細胞

数の減少、樹状細胞のターンオーバーの上昇および樹状細胞の機能異常は、樹状細胞のアポトーシスによる可能性が高く、そのアポトーシスは、MHC クラス II 依存的に CD4CD25⁺Foxp3⁺ T 細胞により Fas-FasL 経路を介してカスパーゼ依存的に生じていることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Baravalle G, Park H, McSweeney M, Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Ishido S, Shin JS. Ubiquitination of CD86 Is a Key Mechanism in Regulating Antigen Presentation by Dendritic Cells. J Immunol. Sep 15;187(6):2966-73., 2011. (査読有)

② Tze LE, Horikawa K, Domaschek H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, Way DA, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Andoniou CE, Degli-Esposti MA, Goodnow CC. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. J Exp Med. Jan 208:149-165., 2011. (査読有)

③ Ishido S, Matsuki Y, Goto E, Kajikawa M, Ohmura-Hoshino M. MARCH-I: A new regulator of dendritic cell function. Mol Cells. Mar 4. 2010. (査読無)

④ Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Mito-Yoshida M, Goto E, Aoki-Kawasumi M, Nakayama M, Ohara O, Ishido S. Cutting edge: requirement of MARCH-I-mediated MHC II ubiquitination for the maintenance of conventional dendritic cells. J Immunol. Dec 1;183(11):6893-7. 2009. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

①星野真理, 松木洋平、水戸麻理、石川力也、後藤栄治、梶川瑞穂、八木田秀雄、石戸聡、MHCクラスIIのユビキチン化は樹状細胞の維持に重要である, 第40回日本免疫学会学術集会, 2011年11月27日、千葉、幕張メッセ

②松木洋平, 星野真理、後藤栄治、梶川瑞穂、石戸聡、Effective antigen presentation by loss of MHC class II ubiquitination. 14th International congress of Immunology, 2010年8月22-27日, 神戸

③星野真理、松木洋平、水戸麻理、青木雅美、後藤栄治、石戸聡. MARCH I による樹状細胞の制御, 第39回日本免疫学会総会, 2009年12月2-4日, 大阪国際会議場、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 真理 (大村真理) (HOSHINO MARI)

独立行政法人理化学研究所・感染免疫応答研究チーム・研究員

研究者番号: 10313511

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし