

令和 6 年 4 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19415

研究課題名（和文）MHC発現調節による抗原提示能の人為的操作技術の開発

研究課題名（英文）Artificial control technology of antigen presentation by regulation of MHC expression

研究代表者

畠山 鎮次（Hatakeyama, Shigetsugu）

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：70294973

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ユビキチン-プロテアソーム系やオートファジーは抗原タンパク質の産生に重要な細胞内タンパク質分解システムである。細胞内タンパク質の多くはユビキチン-プロテアソーム系で分解され、小胞体経路でMHCクラスI上に抗原ペプチドとして提示される。また、オートファジーシステムによりバルクの分解を受けたペプチド抗原は、小胞体に入り、一部はMHCクラスII上に提示される。本申請ではオートファジーや抗原提示に関与するTRIM型ユビキチンリガーゼを中心にE3ユビキチンリガーゼによる抗原提示制御の解明を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫疾患の発症において、免疫細胞のセレクション過程に異常も想定されるが、抗原側の質的及び量的な異常が、免疫細胞を活性化し疾患が発症することも推定される。さらに、生体の免疫反応では「affinity」だけでなく「avidity（affinityの総和）」も重要であり、「抗原の質」だけでなく、「抗原の量」の変化も免疫反応を左右すると考えられる。本研究はMHC発現制御に関する遺伝子の探索的意味合いがある。今後、本研究の成果は、新規の免疫反応の調節剤開発（自己免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、感染症等）のための知見を提供する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The ubiquitin-proteasome system and autophagy are intracellular protein degradation systems important for the production of antigenic proteins. Many intracellular proteins are degraded by the ubiquitin-proteasome system and presented as antigenic peptides on MHC class I via the endoplasmic reticulum. In addition, peptide antigens which are degraded by the autophagy system enter the endoplasmic reticulum, and are presented on MHC class II. In this application, we proceeded to elucidate the regulation of antigen presentation by E3 ubiquitin ligases, focusing on TRIM-type ubiquitin ligases involved in autophagy and antigen presentation.

研究分野：生化学

キーワード：ユビキチン MHC

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞質のタンパク質の多くは「ユビキチン-プロテアソーム系」で分解され、その一部(0.01%程度)が小胞体に入り、MHC クラス I 上に抗原ペプチドとして提示される。また、小胞内タンパク市区(膜タンパク質)や細胞内オルガネラは「オートファジー」システムにより分解を受け、小胞体に入り、一部は MHC クラス II 上に抗原ペプチドとして提示される(図 1 参照: 抗原提示プロセス)。ヒト遺伝子上に E3 の遺伝子は約 600 遺伝子あることが推測されており、申請者が解析してきた TRIM 型 E3 ファミリーの遺伝子も、ヒトゲノムにおいて大きな遺伝子ファミリー(約 70 遺伝子)を形成していることが判明している。HLA クラス I 遺伝子領域内に 8 つの TRIM 遺伝子が存在し、獲得免疫の免疫応答に関与することが推定されている。また、免疫担当細胞のシグナル伝達過程において、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化などのタンパク質翻訳後修飾が重要な役割を果たしている。特に自然免疫のシグナル伝達系(NF- κ B シグナルなど)において、TRIM タンパク質を含むユビキチン化の巧妙な調節システムが明らかになっている。免疫疾患の発症において、T 細胞や B 細胞のセレクション過程に異常が想定される場合もあるが、抗原側(新規抗原発現)の質的及び量的な異常が、これらの免疫細胞を活性化させることで疾患が発症することも推定され、抗原提示を司るユビキチンシステムの解析は重要と考えられている。オートファジーの制御に、TRIM タンパク質ファミリーが関与する。これらの TRIM タンパク質はオートファゴソーム形成に関与する制御分子やユビキチン受容体(p62 など)と複合体(TRIMosome)を形成し、限界膜と標的カーゴを相互作用させるための「足場タンパク質」として機能することが想定されている(TRIMosome 形成モデル)。

2. 研究の目的

ユビキチン-プロテアソーム系やオートファジーや分子シャペロン系は抗原タンパク質の産生に重要な細胞内タンパク質分解システムである。細胞内タンパク質の多くはユビキチン-プロテアソーム系で分解され、小胞体経由で MHC クラス I 上に抗原ペプチドとして提示される。また小胞体品質管理機構で認識された膜タンパク質等は VCP/p97 の作用で細胞質内に引きずり出され、ユビキチン-プロテアソーム系で分解され、抗原提示される。また、オートファジーシステムによりバルクの分解を受けたペプチド抗原は、小胞体に入り、一部は MHC クラス II 上に提示される。MHC 自体の発現に関して、NLRC5 や CIITA (MHC class II トランスアクティベーター)などの転写調節システムが報告されているが、現在不明な点が多い。本申請ではオートファジーや抗原提示に関与する TRIM 型ユビキチンリガーゼを中心に E3 ユビキチンリガーゼによる抗原提示制御の解明を進め、さらにその制御システムの破綻が自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症および感染症への影響に関与するかを検討する。具体的には、MHC 分子の発現に関する TRIM タンパク質の同定および MHC 発現調節に関する分子メカニズムの解明を行い、最終的には抗原提示細胞における MHC 発現を人為的に調節することによる免疫調節的治療法(自己免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー性疾患、感染症等)の開発基盤を確立する。

3. 研究の方法

siRNA ライブラリーを使った TRIM ファミリー遺伝子の網羅的ノックダウンによる抗原提示能の解析を進めた。抗原提示細胞(APC)として適切な細胞に対してヒトとマウスの各 TRIM 遺伝子をノックダウンさせた状態で、抗原提示能への影響を検討する。MHC クラス II 抗原提示への影響に関して、MHC クラス II 抗原の発現量変化を FACS で調べた。また、オートファジー関連及び HLA 遺伝子領域の TRIM ファミリーのユビキチン化基質タンパク質の同定を進めた。網羅的な TRIM 遺伝子群の mRNA の検証および MHC class II 関連因子の mRNA の検証について、リアルタイム PCR 法で解析を行った。レトロウイルスを用いて TRIM22 を過剰発現する U87MG 細胞、あるいは CRISPR-Cas9 法を用いてノックアウトした U87MG 細胞を作製し、ウエスタンブロット法で細胞内タンパク質量、フローサイトメトリー法で細胞表面タンパク質量、蛍光免疫染色法で細胞内・細胞表面双方のタンパク質量について解析を行った。MHC class II タンパク質の分解速度を測定するために、Cycloheximide を用いた分解アッセイを行った。TRIM22 過剰発現 HEK293T 細胞を作製し、免疫沈降・質量分析法により結合タンパク質の網羅的な検索を行った。

4. 研究成果

(1) 本申請ではオートファジーや抗原提示に関与する TRIM 型ユビキチンリガーゼを中心に

E3 ユビキチンリガーゼによる抗原提示制御の解明を進め、さらにその制御システムの破綻が自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症および感染症への影響に關与するかを検討した。具体的には siRNA ライブラリーを使った TRIM ファミリー遺伝子の網羅的ノックダウンによる MHC 発現量の解析を行った。初年度においては、TRIM22 がヒト MHC クラス II 抗原の発現制御に關係することを論文発表した。HEK293T 細胞と U87MG 細胞を IFN γ で刺激し、TRIM 遺伝子群の mRNA レベルをリアルタイム PCR 法により網羅的に検証したところ、特に TRIM22 が IFN γ 刺激により最も強く発現上昇していることが明らかとなった。さらに TRIM22 過剰発現 U87MG 細胞を用いたウエスタンブロット法とフローサイトメトリー法により、MHC class II の細胞内タンパク質量や細胞表面発現量が大きく減少していることが明らかとなった。一方で、IFN 刺激で TRIM22 と同様に発現が上昇した TRIM21 を、U87MG 細胞に過剰発現させたところ、MHC class II タンパク質量に変動は見られなかった。さらに、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞を用いたウエスタンブロット法やフローサイトメトリー法、蛍光免疫染色法により、MHC class II の細胞内タンパク質量や細胞表面発現量が増加することが明らかとなった。その一方で、リアルタイム PCR 法では、MHC class II、及びそのマスター制御因子である class II transactivator (CIITA) の mRNA 量は TRIM22 により影響を受けなかった。また、Cycloheximide を用いた分解アッセイでは、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞において MHC class II タンパク質は不安定化しており、TRIM22 はむしろ MHC class II の分解を抑制していることが明らかとなった。さらに、質量分析では、TRIM22 と mTOR、mTOR 複合体構成因子である Raptor、Rictor、G β L との結合が認められた。

(2) 次年度は、MHC クラス II の発現量調節に關係する E3 ユビキチンリガーゼ FBXO11 を同定し、機能解析を進め、論文発表を行った。NLR タンパク質である CIITA は、MHC class II 遺伝子転写のマスター調節因子で、CIITA の活性が転写レベルおよびタンパク質レベルで調節されていることは知られていたが、CIITA タンパク質レベルを決定するメカニズムは解明されていなかった。申請者らは、FBXO11 が CIITA の E3 リガーゼであり、ユビキチン化を介した分解を通じて CIITA タンパク質レベルを調節することを示した。CIITA 結合タンパク質に対する質量分析解析で FBXO11 は、CIITA の結合タンパク質であることが判明した。Cycloheximide を用いた分解アッセイにより、CIITA の半減期は、FBXO11 によって制御されていることが判明した。FBXO11 の過剰発現により、CIITA の制御によるプロモーター活性レベル、転写レベル、及び MHC class II の表面発現レベルが減少した。さらに、ヒトおよびマウスの FBXO11 欠損細胞では、MHC class II および関連遺伝子のレベルが増加していた。正常組織および癌組織では、FBXO11 の発現レベルは MHC class II の発現レベルと負の相関があった。したがって、FBXO11 は MHC class II の発現レベルを決定する重要な調節因子であり、その発現は癌のバイオマーカーとして機能する可能性がある。以上、これらの E3 リガーゼによる MHC 発現調節分子の解析は、アレルギー疾患、自己免疫疾患、感染症及びがんの治療において、将来的に重要な知見となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inoue Ayano, Watanabe Masashi, Kondo Takeshi, Hirano Satoshi, Hatakeyama Shigetsugu	4. 巻 1869
2. 論文標題 TRIM22 negatively regulates MHC-II expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 119318 ~ 119318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2022.119318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimura S, Suzuki M, Nakamaru Y, Kano S, Watanabe M, Honma A, Nakazono A, Tsushima N, Hatakeyama S, Homma A	4. 巻 -
2. 論文標題 TRIM27 expression is associated with poor prognosis in sinonasal mucosal melanoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Rhinology Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4193/Rhin22.405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kasuga Yusuke, Ouda Ryota, Watanabe Masashi, Sun Xin, Kimura Miki, Hatakeyama Shigetsugu, Kobayashi Koichi S.	4. 巻 120
2. 論文標題 FBX011 constitutes a major negative regulator of MHC class II through ubiquitin-dependent proteasomal degradation of CIITA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 2218955120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2218955120	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 Abe Megumi, Yaguchi Hiroaki, Kudo Akihiko, et.al.	4. 巻 94
2. 論文標題 Sez612 autoimmunity in a large cohort study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry	6. 最初と最後の頁 667 ~ 668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2022-330194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 渡部 昌, 高橋正樹, 畠山 鎮次
2. 発表標題 がん遺伝子産物PPM1Dのタンパク質分解機構
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 工藤 彰彦, 矢口 裕章, 渡部 昌, 上床 尚, 白井 慎一, 岩田 育子, 松島 理明, 高橋 秀尚, 畠山 鎮次, 矢部 一郎
2. 発表標題 自己免疫性小脳失調症に対する免疫沈降法と質量分析法を用いた網羅的自己抗体測定方法の開発
3. 学会等名 日本神経免疫学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------