

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390122

研究課題名(和文) 抗原提示分子のユビキチン化による新たな免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) Novel immune regulation through regulated MHC II ubiquitination

研究代表者

石戸 聡 (ISHIDO, Satoshi)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10273781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：定常状態における樹状細胞にて抗原を提示している(pMHC IIは、MARCH-1によってユビキチン化されることにより、新たな抗原を提示することが出来ると考えられている。一方、感染により、MHC IIのユビキチン化は消失し、免疫が開始されると考えられている。この仮説を検証するために、MHC IIが恒常的にユビキチン化されているマウスを作成した。このマウスではpMHC II発現が不安定化しており、免疫応答が低下していた。さらに、定常状態の末梢における血球分画にて、リンパ球数の低下を認めた。このように、pMHC IIのユビキチン化消失が、適正な免疫応答に必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：pMHC II are continuously replaced with newly generated pMHC II through continuous ubiquitination by MARCH-1. The recycling of pMHC II is thought to be necessary for quick immune response against newly invading pathogens. In contrast, infectious stimuli inhibit recycling of pMHC II through inhibition of MARCH-1-mediated ubiquitination, thereby initiating immunity. Therefore, we are challenging to have experimental evidence for the hypotheses. We have generated the mice whose pMHC II is continuously ubiquitinated. This mouse showed impairment of immune response. In addition, the number of lymphocyte was reduced in the periphery. In MHC II-deficient mice, the number of leukocyte including lymphocyte was increased in the periphery, indicating that reduction of lymphocyte number is not simply due to down-regulation of MHC II in this mouse. Our results support the present hypothesis and suggest that regulated ubiquitination of pMHC II requires homeostasis of lymphocytes.

研究分野：感染免疫学

キーワード：ユビキチン MHC class II 樹状細胞 抗原提示

1. 研究開始当初の背景

我々は、2007年に世界に先駆けて免疫応答を制御する中核分子である MHC class II (MHC II)、CD86 をユビキチン化する生理的な E3 ユビキチンリガーゼ MARCH-I を発見し報告した。開始当初、世界レベルにて MHC II および CD86 のユビキチン化の意義について共同研究を進めていた。その中で、MHC II のユビキチン化の意義を検討するために、免疫応答における MARCH-I の発現、MHC II のユビキチン化状況を調べていた。その結果、様々な免疫開始を誘導する刺激によって、MARCH-I の発現が減少すること、MHC II ユビキチン化が減少することを見出していた。さらに、MHC II のユビキチン化減少によって、抗原提示機能の上昇が認められる一方で、樹状細胞のアポトーシスが出現する事を見出していた。CD86 に関しても、MHC II と同様に CD86 も定常状態にある樹状細胞にてユビキチン化されている事を見出していた。従って、ユビキチン化されない CD86 変異体が野生型 CD86 に替わって発現する CD86 knock-in マウス (CD86-K less-KI) を作成し、CD86 のユビキチン化の意義について検討したところ、CD86-K less-KI では全く IgE の産生が抑制されている事を見出していた。さらに、CD86 のユビキチン化を促進させたマウス (CD86 をユビキチン化する酵素である c-MIR の transgenic mouse) では、顕著な IgE の産生亢進があることを見出していた。

2. 研究の目的

上記の背景から、①MHC II ユビキチン化の消失は免疫と寛容の両者を誘導している事、そして②CD86 のユビキチン化の程度が IgE 産生等の Th2 応答を制御しているとの仮説を得た。従って、①の仮説については MHC II のユビキチン化消失が起こらない遺伝子改変マウスを作成する事により検証し、②の仮説については、すでに得られている IgE 産生異常を分子細胞レベルにて解明する事により検証する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) MHC II に関する仮説の検証：MHC II のユビキチン化消失が起こらないマウスを作成し、免疫、および寛容に異常が起こるか否かを調べる。マウスとして、野生型 MHC II を変異型 MHC II (MHC II のβ鎖の細胞内領域にユビキチンを融合させたもの) に置き換えた knock-in マウスを作成する。また、MHC II のユビキチン化酵素 MARCH-I の消失機構を明らかにする事によって、MARCH-I の機能が抑制されないマウスを作成する。

(2) CD86 に関する仮説の検証：CD86 がユビキチン化されていないマウス CD86-K less-KI、CD86 が過剰にユビキチン化されている c-MIR Tg における IgE 産生異常を細胞分子レベルにて明らかにする。さらに、CD86

のみが過剰にユビキチン化される CD86 knock-in マウスを MHC II と同様の方法にて作成し検討を行なう。

4. 研究成果

(1) MHC II に関する仮説の検証：

①MHC II のユビキチン化消失が起こらないマウスの作成：

MHC II のβ鎖の細胞内領域が MARCH-I によってユビキチン化される。従って、β鎖のカルボキシル末端にユビキチンを融合した変異 MHC β鎖が発現するノックインマウスの作成を試みた。融合されたユビキチンは、ユビキチン化によって結合したユビキチンと同様の機能を持っている。従って、生理的な MHC II のユビキチン化消失が起こったとしても、人為的に融合されたユビキチンによって MHC II のユビキチン化は維持される。融合するユビキチンとして、野生型ユビキチンと、モノユビキチン化のみを誘導するように変異させたユビキチンの2種類を用いる事によって、MHC II のユビキチン化程度が異なるマウスを作成した。野生型のユビキチンを融合したノックインマウスでは、細胞表面における MHC II の発現が全く認められなかった。しかしながら、モノユビキチン化のみを誘導するように変異させたユビキチンを融合したノックインマウス (MHC II-Ubi KI) では、細胞表面に MHC II が発現しており、LPS による活性によっても発現の上昇が認められなかった (図1参照)。このように、MHC II-Ubi KI では、樹状細胞が活性化された時においてもユビキチン化が持続していると考えられる。従っ

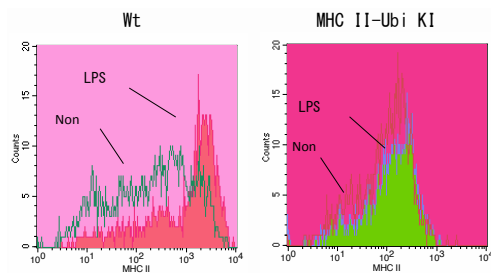


図1:MHC II-Ubi KI における MHC II の発現
野生型 (Wt)、モノユビキチン化のみを誘導するように変異させたユビキチンを融合したノックインマウス (MHC II-Ubi KI) から樹状細胞を作成し、LPS による刺激を加えて MHC II の発現レベルの検討を行なった。Wt では、LPS によって MHC II の発現が上昇しているが、MHC II-Ubi KI では LPS 刺激による上昇が認められない。

て、このマウスを用いて検討を行なった。
②MHC II のユビキチン化消失が起こらないマウス (MHC II-Ubi-KI) を用いた検討
②-1 抗原提示に関する検討
MHC II のユビキチン化持続が抗原提示機能へどのように影響するかを OVA モデル抗原を用いて検討した。MHC II-Ubi-KI のホモ、ある

いはヘテロから樹状細胞を作成し、OT-II CD4 T細胞の分裂度合いを指標として検討した。図2にて示すように、ホモでは強く抗原提示機能が抑制され、ヘテロでは中程度に抑制された。このように、ユビキチン化の持続は抗原提示機能を抑制する事が明らかとなった(図2参照)。

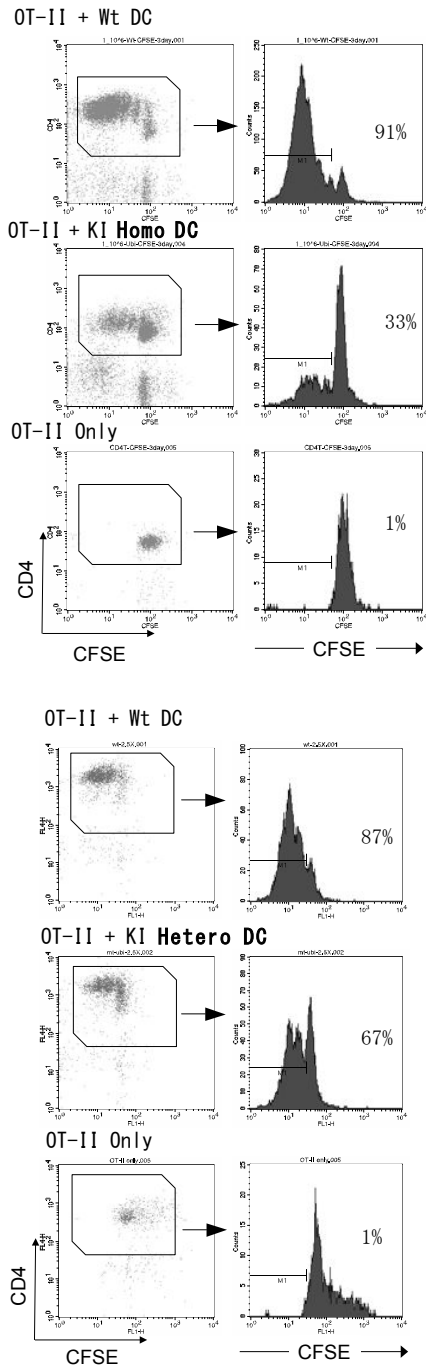


図2: MHC II-Ubi KIにおける抗原提示機能 B6-MHCII-mtUbi-KI(Homo(左))あるいは(Hetero(右))からBMDCを作成し、OVAに対する抗原提示機能を、CFSEラベルしたOT-II CD4 Tを用いて検討した。Homo由来のDCは顕著に抗原提示機能が抑制されており、Hetero由来のDCは約20%程度抑制されている。

②-2 免疫応答に関する検討

持続したMHC IIのユビキチン化によって抗原提示機能が抑制される事から、免疫応答の検討を行なった。OVAをモデル抗原とし、OVAに対する抗体価を経時的に検討した。その結果、MHC II-Ubi-KIでは免疫応答が顕著に抑制されていた。これらの事から、MHC IIのユビキチン化の持続は、免疫応答を減弱させる事が明らかとなった。すなわち、MHC IIのユビキチン化消失は、免疫応答開始に必要な事との仮説を支持するものである。

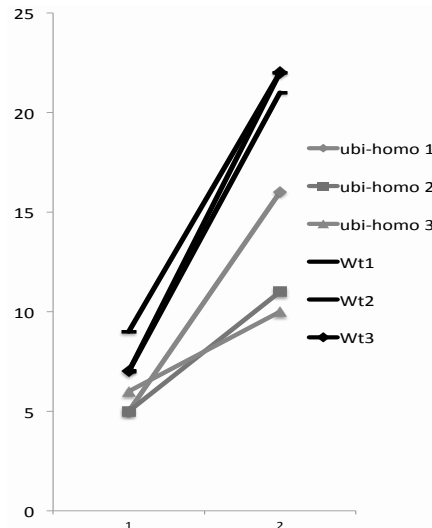


図3: MHC II-Ubi KIにおける免疫応答

野生型(Wt)、モノユビキチン化のみを誘導するように変異させたユビキチンを融合したノックインマウス(ubi-homo)にモデル抗原としてOVAを100ug腹腔内投与し、OVAに対する抗体価を3週間後に検討した。それぞれ3匹ずつである。1は投与前、2は3週間後の結果である。すべての個体においてT細胞依存性抗原に対する免疫応答が減弱している。

②-3 病理学的検討(組織学的検討)

MHC IIのユビキチン化の持続により、抗原提示機能が抑制され、免疫応答も抑制される事が明らかとなったことから、詳細な病理学的検討を行なった。その中で、SPFの環境下においてMHC II-Ubi-KIは約1年後に消瘦し死亡する事が明らかとなった。解剖した結果、MHC II-Ubi-KIの皮下脂肪の減少が顕著であった。各臓器を詳細に検討すると、好中球等の浸潤は少なく、急性炎症を示す所見は認められなかった。しかしながら、顕著な脾腫を認め、その中には、多核巨細胞が散在して認められた。これらは、1年齢のヘテロマウスで巨大脾腫を持つものでも、顕著であった(図3)。糸球体や、皮膚には明らかな炎症像はなく、また、自己免疫疾患を示す病理像も存在しなかった。心臓、肺にも大きな異常は認められなかった。

(図3)。糸球体や、皮膚には明らかな炎症像はなく、また、自己免疫疾患を示す病理像も存在しなかった。心臓、肺にも大きな異常は認められなかった。

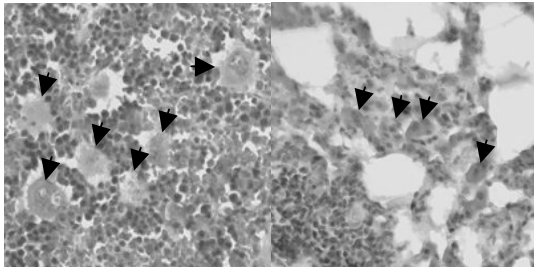


図3：MHC II-Ubi-KI の病理像
脾臓（左）、肺（右）に多核巨細胞を優位に認める（矢印の頭）。持続性炎症等による血球貪食を示唆している可能性がある。

②-4 病理学的検討（血液学的検討）

顕著であったのは、多核巨細胞の出現、消瘦であった事から、MHC II-Ubi-KI は慢性炎症が基本にあり、その進展により死に至るのではないかと考えた。現在、ウイルス感染、自己免疫疾患等による慢性炎症が持続すると、食細胞による血球貪食がおこり、血球が減少すると報告されている。食細胞は、様々な血液細胞を貪食し、巨大化し、貪食された細胞の核を細胞内にもつと報告されている。従って、末梢血の詳細な検討を行なった。その結果、MHC II-Ubi-KI では、白血球数が低い傾向にあり、特にリンパ球数の減少が認められた。しかしながら、赤血球には大きな変化は認められなかった。

②-5 MHC II 欠損マウスとの比較

以上のように、MHC II-Ubi-KI では慢性炎症が持続している可能性が強く示唆された。MHC II-Ubi-KI では、抗原提示、免疫応答の低下がある事から、慢性炎症は単なる、MHC II の機能異常による易感染性によってもたらされている可能性がある。従って、MHC II 欠損マウスにて末梢血の比較検討を行なった。その結果、MHC II 欠損マウスでは、リンパ球、B 細胞数の増加が認められ、減少する所見は認められなかった。MHC II-Ubi-KI および、MHC II 欠損マウスでは、胸腺における positive selection の異常により CD4 T 細胞数の顕著な減少が認められる。従って、野生型に、それぞれの骨髄細胞を移植したキメラマウスを作成し同様の検討を行なった。その結果、MHC II-Ubi-KI キメラでは同様にリンパ球減少、B 細胞数減少が認められ、MHC II 欠損キメラでは顕著な減少は認められなかった。このように、MHC II-Ubi-KI で認められる慢性炎症は、MHC II 機能異常による易感染性によるものではないと考えられる。現在までの結果から、ユビキチン化が持続している MHC II は、不完全な抗原提示を行い、MHC II 欠損による免疫不全とは異なる病態を引き起こす事が示唆された。

（2）CD86 に関する仮説の検証：

CD86 のユビキチン化が持続しているマウスは ES 細胞まで作成することが出来たが、個体にすることが出来ていない。しかしながら、c-MIR の transgenic mouse (Tg) にて高 IgE の意義を気管支喘息モデルを用いて追求した。その結果、c-MIR Tg では、抗原刺激によって肺泡洗浄液に好酸球の増加を認めた。しかしながら、喘息が優位に出現することはなかった。

〔成果の総括〕

MHC II のユビキチン化が消失しない状況では、MHC II 欠損による慢性炎症とは異なった病態が起こることが強く示唆された。少なくとも、MHC II のユビキチン化消失が、免疫機構の維持に重要であることが明らかとなった。本研究にて明らかとなった MHC II-Ubi-KI における慢性炎症の機序を明らかにすることで、MHC II のユビキチン化による制御の意義が明らかになると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

① Ishikawa, R., Kajikawa, M. and Ishido, S. Loss of MHC II ubiquitination inhibits the activation and differentiation of CD4 T cells. *Int. Immunol.* 2014

May;26(5):283-9. doi: 10.1093/intimm/dxt066. Epub 2013 Dec 26. (査読有)

② Oh, J., Wu, N., Baravalle, G., Cohn, B., Ma, J., Lo, B., Mellman, I., Ishido, S., Anderson, M. and Shin, JS. MARCH1-mediated MHCII ubiquitination promotes dendritic cell selection of natural regulatory T cells. *J Exp Med.* 2013 Jun

3;210(6):1069-77. doi: 10.1084/jem.20122695. Epub 2013 May 27. (査読有)

③ Furuta, K., Ishido, S. and Roche, PA. Encounter with antigen-specific promoted CD4 cells promotes MHC class II degradation in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2012 Nov 20;109(47):19380-5. doi: 10.1073/pnas.1213868109. Epub 2012 Nov 5. (査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

Satoshi Ishido Loss of MHC II ubiquitination induces negative consequence to dendritic cells 8th International Workshop on Antigen Processing & Presentation 10-13 June 2014 Philadelphia (USA)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石戸 聡 (ISHIDO, Satoshi)
昭和薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：10273781

(2) 連携研究者

直江 吉則 (NAOE, Yoshinori)
独立行政法人国立長寿医療センター・老化機
構研究部免疫研究室・室長
研究者番号：50392048