

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670185

研究課題名(和文)プロテアソーム遺伝子変異と免疫疾患

研究課題名(英文)Proteasome genes and immunologic disorders

研究代表者

笠原 正典(Kasahara, Masanori)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30241318

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):プロテアソームは、主要組織適合性複合体クラスI分子に結合するペプチドの産生に関わるマルチ・サブユニット・タンパク質分解酵素である。本研究では、 $\beta 5$ ファミリーのプロテアソームサブユニットである $\beta 5t$ 、 $\beta 5i$ 遺伝子に変異を導入して、その機能を欠失させた遺伝子改変マウスと、 $\beta 5t$ トランスジェニックマウスを用いて、プロテアソームがCD8+ T細胞の胸腺選択に果たす役割を解析した。また、ダウン症患者胸腺における $\beta 5t$ サブユニットの発現を解析した。

研究成果の概要(英文):Proteasomes are multi-subunit proteases responsible for the production of peptides presented by major histocompatibility complex class I molecules. In this project, we investigated the role of proteasomes in the thymic selection of CD8+ T cells using mice genetically modified for the $\beta 5$ family of proteasome subunits. We also investigated the expression of the thymoproteasome-specific $\beta 5t$ subunit in the thymus in patients with Down syndrome.

研究分野：病理学

キーワード：プロテアソーム 胸腺

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは細胞内タンパク質分解を担う主要なプロテアーゼである。最近まで、(1)多くの組織で構成的に発現され、さまざまな生命現象を制御する構成型プロテアソームと(2)免疫応答に際して誘導され、主要組織適合遺伝子複合体クラス I 分子による抗原提示を促進する免疫プロテアソームの2種が知られていたが、2007年に第3のプロテアソームが発見された(図1)。胸腺プロテアソームと命名されたこの新種のプロテアソームは胸腺皮質上皮に特異的に発現され CD8+ T 細胞の分化、とくに同細胞の正の選択に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、その機能に関しては不明な点が多い。また、胸腺プロテアソームの疾患における関与については不明である。

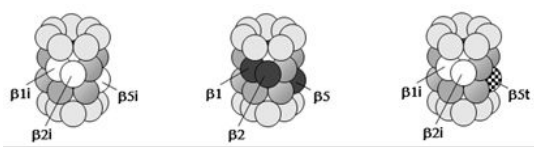


図1. 三種のプロテアソームの構造

触媒サブユニットとして、免疫プロテアソーム(左)は $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ サブユニット、構成型プロテアソーム(中央)は $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ サブユニット、胸腺プロテアソームは $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5t$ サブユニットを有している。

2. 研究の目的

本研究では、 $\beta 5$ ファミリーのプロテアソームサブユニットである $\beta 5t$, $\beta 5i$ 遺伝子に変異を導入して、その機能を欠失させた遺伝子改変マウスと $\beta 5t$ トランスジェニックマウスを用いて、プロテアソームが CD8+ T 細胞の胸腺選択に果たす役割を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) $\beta 5t$ -transgenic (Tg) マウスは既報の方法により作成した。胸腺皮質、髄質に特定の $\beta 5$ ファミリーサブユニット ($\beta 5$, $\beta 5i$, $\beta 5t$) を発現する遺伝子改変マウスは、種々の遺伝子改変マウスを適切に交配することにより作製した。

(2) ダウン症患者胸腺における $\beta 5t$ サブユニットならびにカテプシンの発現は免疫組織化学的に検討した。

4. 研究成果

(1) プロテアソームの CD8+ T 細胞選択に与える影響の解析

CD8+ T 細胞選択におけるプロテアソームの関与を解析するため、6種類の遺伝子改変マウス ($\beta 5t^{-/-}$, $\beta 5i^{-/-}$, $\beta 5i^{-/-}\beta 5t^{-/-}$, $\beta 5t$ -Tg, $\beta 5i^{-/-}\beta 5t$ -Tg, $\beta 5i^{-/-}\beta 5t$ -Tg) を使用した。

$\beta 5i^{-/-}\beta 5t^{-/-}$, $\beta 5t$ -Tg, $\beta 5i^{-/-}\beta 5t$ -Tg, $\beta 5i^{-/-}\beta 5t$ -Tg マウスは、交配によって作成した。すでに報告されているとおり、 $\beta 5t^{-/-}$ マウスでは、CD8+ T 細胞の減少、CD4/8 比の上昇が認められたが、 $\beta 5i^{-/-}$ マウスでは目立った変化は見られなかった。皮質と髄質に発現する $\beta 5$ ファミリーサブユニットが一部で重複すると推定される $\beta 5t$ -Tg ならびに $\beta 5i^{-/-}\beta 5t$ -Tg マウスでは、CD4/8 比の軽度な上昇を認めた。皮質と髄質で同一の $\beta 5$ ファミリーサブユニットを発現すると推定される $\beta 5i^{-/-}\beta 5t^{-/-}$, $\beta 5i^{-/-}\beta 5t$ -Tg では、顕著な CD8+ T 細胞の減少、CD4/8 比の上昇を認めた。CD8+ T 細胞の減少が見られた系統では、CD8+ T 細胞において TCR- β の発現が低下していた。

胸腺内では皮質上皮と髄質上皮に異なった $\beta 5$ ファミリーサブユニットが発現されているが、このことが T 細胞レパトリの形成に関与していると考えられる。これまでの研究により、 $\beta 5t$ 依存性の自己ペプチド産生が皮質における CD8+ T 細胞の正の選択に重要であることが示されている。一方で、髄質上皮には $\beta 5i$ が発現しており、胸腺の正の選択と負の選択に提示される MHC class I/ペプチド複合体には相違があると考えられる。今回の検討により、皮質上皮と髄質上皮に発現する $\beta 5$ サブユニットに重複がある遺伝子改変マウスで CD8+ T 細胞の減少を認めたことから、CD8+ T 細胞の分化には、皮質上皮と髄質上皮で発現する $\beta 5$ ファミリーサブユニットの種類に差異があることが重要である可能性が示唆された。

(2) ダウン症患者胸腺における $\beta 5t$ サブユニットの発現

ダウン症(21トリソミー)患者の多くは、細胞性免疫の低下を主体とした免疫異常を呈し、胸腺には萎縮や形態異常が認められる。本症患者における胸腺の形態異常と免疫異常の関連性を検討する目的で、13、18、21トリソミー患者の胸腺について、組織学的変化と $\beta 5t$ サブユニットならびにカテプシンの発現を免疫組織化学的に検討した。13、18トリソミー患者の胸腺は、形態学的に正常あるいは軽度の胸腺細胞の脱落を認めるのみであったのに対し、ダウン症患者の胸腺では半数以上に小葉構築の消失と高度な胸腺細胞の脱落が認められた。組織学的変化の高度なダウン症患者の胸腺では、萎縮した皮質領域はケラチン陽性の紡錘形細胞に置換され、 $\beta 5t$ の発現が顕著に低下する一方、カテプシン L やカテプシン V の発現は比較的保たれていた。 $\beta 5t$ の発現低下を伴う胸腺構築の異常は、本症患者における免疫異常に関与している可能性がある (*Histopathology* doi: 10.1111/his.12642, 2015)。

(3) 胸腺プロテアソームの疾患における関与

構成型プロテアソームを構成するサブユ

ニットは合計 14 種 (7 種の α サブユニットと 7 種の β サブユニット) から成るが、これらの変異によるヒト疾患は知られていない。プロテアソームは生命現象の維持に必須のプロテアーゼであるため、おそらくわずかな変異も致命的であり許容されないためと考えられる。これに対して、最近、我が国と欧米の研究者らにより、免疫プロテアソームを構成する $\beta 5i$ サブユニットの変異が中條西村症候群や JMP 症候群 (Joint contractures, muscular atrophy, microcytic anemia, and panniculitis-associated lipodystrophy) などの自己炎症性症候群の原因となっていることが報告された (*PNAS* 108: 14914, 2011; *J Clin Invest* 121: 4150, 2011; *Am J Hum Genet* 87: 866, 2010)。

$\beta 5t$ サブユニットをノックアウトしたマウスでは CD8+ T 細胞の分化が障害され、末梢 CD8+ T 細胞数が激減することから、原因不明の CD8+ T 細胞減少を呈する者の中に、 $\beta 5t$ サブユニットに変異を有する者がいる可能性を考え探索を行った。

この過程で、ヒト $\beta 5t$ サブユニットには多型が存在することを見出した。現在、同多型の意義と疾患への関与を解析している。

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 23 件)

Tomaru, U., Tsuji, T., Kiuchi, S., Ishizu, A., Otsuka, N., Ito, T., Ikeda, H., Fukasawa, Y. and Kasahara, M. Decreased expression of a thymus-specific proteasome subunit $\beta 5t$ in Down syndrome patients. *Histopathology* 2015. doi: 10.1111/his.12642. (査読有)

Yamada, Y., Tomaru, U., Ishizu, A., Ito, T., Kiuchi, T., Ono, A., Miyajima, S., Nagai, K., Higashi, T., Matsuno, Y., Dosaka-Akita, H., Nishimura, M., Miwa, S. and Kasahara, M. Decreased proteasomal function accelerates cigarette smoke-induced pulmonary emphysema. *Lab. Invest.* 95: 2015. 625-634, doi: 10.1038/labinvest.2015.43. (査読有)

Ikeshita, S., Kiuchi, S., Miyatake, Y. and Kasahara, M. Pancreatic cancer cells express CD44 variant 9 and multidrug resistance protein 1 during mitosis. *Mol. Exp. Pathol.* 98: 2015. 41-46, doi: 10.1016/j.yexmp.2014.12.001. (査読有)

Miyatake, Y., Sheefy, N., Ikeshita, S., Hall, W. W. and Kasahara, M. Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces CD44 high cancer stem cell-like ATL cells in an NF- κ B- and vimentin-dependent manner. *Cancer Lett.* 357: 2015. 355-363, doi: 10.1016/j.canlet.2014.11.055. (査読有)

Iinuma, C., Waki, M., Kawakami, A.,

Yamaguchi, M., Tomaru, U., Sasaki, N., Masuda, S., Mtasui, Y., Iwasaki, S., Baba, T., Kasahara, M., Yoshiki, T. Paletta, D., Herrmann, T., and Ishizu, A. Establishment of a vascular endothelial cell-reactive type II NKT cell clone from a rat model of autoimmune vasculitis. *Int. Immunol.* 27: 2015. 105-114, doi: 10.1093/intimm/dxu088. (査読有)

Fujita, H., Hatanaka, Y., Sutoh, Y., Suzuki, Y., Oba, K., Kubota, K. C., Otsuka, N., Fugo, K., Mitsuhashi, T., Kasahara, M. and Matsuno, Y. Immunohistochemical validation and expression profiling of NKG2D ligands in a wide spectrum of human epithelial neoplasms. *J. Histochem. Cytochem.* 63: 2015. 217-227, doi: 10.1369/0022155414563800. (査読有)

Mohamed, R. H., Sutoh, Y., Itoh, Y., Miyatake, Y., Otsuka, N., Ogasawara, K. and Kasahara, M. The *SKINT1-like* gene is inactivated in hominoids but not in all primate species: implications for the origin of dendritic epidermal T cells. *PLoS ONE* 10: 2015. e0123258, doi: 10.1371/journal.pone.0123258. (査読有)

Tsuchisaka, A., Kaneko, S., Imaoka, K., Ota, M., Kishimoto, K., Tomaru, U., Kasahara, M., Ohata, C., Furumura, M., Takamori, S., Morita, E. and Hashimoto, T. Presence of autoimmune regulator and absence of desmoglein 1 in thymoma associated with a pemphigus foliaceus patient. *Br. J. Dermatol.* 19: 2014 doi: 10.1111/bjd.13617. (査読有)

Venkatesh, B., Lee, A. P., Ravi, V., Maurya, A. K., Lian, M. M., Swann, J. B., Ohta, Y., Flajnik, M. F., Sutoh, Y., Kasahara, M., Hoon, S., Gangu, V., Roy, S. W., Irimia, M., Korzh, V., Kondrychyn, I., Lim, Z. W., Tay, B.-H., Tohari, S., Kong, K. W., Ho, S., Lorente-Galdos, B., Quilez, J., Marques-Bonet, T., Raney, B. J., Ingham, P. W., Tay, A., Hillier, L. W., Minx, P., Boehm, T., Wilson, R. K., Brenner, S. and Warren, W. C. The elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature* 505: 2014. 174-179, doi: 10.1038/nature12826. (査読有)

Ibusuki, A., Kawai, K., Yoshida, S., Uchida, Y., Nitahara-Takeuchi, A., Kuroki, K., Kajikawa, M., Ose, T., Maenaka, K., Kasahara, M. and Kanekura, T. NKG2D triggers cytotoxicity in murine epidermal gd T cells via PI3K-dependent, Syk/ZAP70-independent signaling pathway. *J. Invest. Dermatol.* 134: 2014. 396-404, doi: 10.1038/jid.2013.353. (査読有)

Ströbel, P., Hartmann, E., Rosenwald, A., Kalla, J., Ott, G., Schalke, B., Kasahara, M.

- Tomaru, U. and Marx, A. Corticomedullary differentiation and maturational arrest in thymomas. *Histopathology* 64: 2014. 557-566, doi: 10.1111/his.12279. (査読有)
- Kanda, R., Sutoh, Y., Kasamatsu, J., Maenaka, K., Kasahara, M. and Ose, T. Crystal structure of the lamprey variable lymphocyte receptor C reveals an unusual feature in its N-terminal capping module. *PLoS ONE* 9: 2014. e85875, doi: 10.1371/journal.pone.0085875. (査読有)
- Kasahara, M. and Sutoh, Y. Two forms of adaptive immunity in vertebrates: similarities and differences. *Adv. Immunol.* 122: 2014. 59-90, doi: 10.1016/B978-0-12-800267-4.00002-X. (査読有)
- Yamada, Y., Tomaru, U., Ishizu, A., Kiuchi, T., Kasahara, M. and Matsuno, Y. Expression of thymoproteasome subunit $\beta 5t$ in type AB thymoma. *J. Clin. Pathol.* 67: 2014. 276-278, doi: 10.1136/jclinpath-2013-201930. (査読有)
- Sutoh, Y. and Kasahara, M. Copy number and sequence variation of leucine-rich repeat modules suggests distinct functional constraints operating on variable lymphocyte receptors expressed by T-cell-like and B-cell-like lymphocytes. *Immunogenetics* 66: 2014. 403-409, doi: 10.1007/s00251-014-0773-6. (査読有)
- Ikeshita, S., Miyatake, Y., Otsuka, N. and Kasahara, M. MICA/B expression in macrophage foam cells infiltrating atheromatous plaques. *Exp. Mol. Pathol.* 97: 2014. 171-175, doi: 10.1016/j.yexmp.2014.07.002. (査読有)
- Venkatesh, B., Lee, A. P., Swann, J. B., Ohta, Y., Flajnik, M. F., Kasahara, M., Boehm, T. and Warren, W. C. Venkatesh *et al.* reply. *Nature* 511: 2014. E9-E10, doi: 10.1038/nature13447. (査読有)
- Ando, R., Noda, K., Tomaru, U., Kamoshita, M., Ozawa, Y., Notomi, S., Hisatomi, T., Noda, M., Kanda, A., Ishibashi, T., Kasahara, M. and Ishida, S. Decreased proteasomal activity causes photoreceptor degeneration in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55: 2014. 4682-4690, doi: 10.1167/iovs.13-13272. (査読有)
- Fukaya, S., Matsui, Y., Tomaru, U., Kawakami, A., Sogo, S., Bohgaki, T., Atsumi, T., Koike, T., Kasahara, M. and Ishizu, A. Overexpression of TNF- α -converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation. *Lab. Invest.* 93: 2013. 72-80, doi: 10.1038/labinvest.2012.153. (査読有)
- Kasahara, M. Impact of whole-genome duplication on vertebrate development and evolution. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24: 2013. 81-82, doi: 10.1016/j.semedb.2013.01.010. (査読有)
- 21 Miyatake, Y., Oliveira, A. L. A., Jarboui, M. A., Ota, S., Tomaru, U., Teshima, T., Hall, W. W. and Kasahara, M. Protective roles of epithelial cells in the survival of adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Am. J. Pathol.* 182: 2013. 1832-1842, doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.015. (査読有)
- 22 Tomaru, U. and Kasahara, M. Thymoproteasome: role in thymic selection and clinical significance as a diagnostic marker for thymic epithelial tumors. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 61: 2013. 357-365, doi: 10.1007/s00005-013-0234-1. (査読有)
- 23 Kasahara, M. *Déjà vu*: three lineages of lymphocytes in lampreys. *Immunol. Cell. Biol.* 91: 2013. 599-600, doi: 10.1038/icb.2013.52. (査読有)
- [学会発表](計 51 件)
- 笠原正典: 主要組織適合遺伝子複合体についての最近の話題. 第 934 回 市立札幌病院 学術研修会, 市立札幌病院(北海道・札幌市), 2015.3.12
- 木内静香, 外丸詩野, 辻隆裕, 石津明洋, 鈴木昭, 大塚紀幸, 伊藤智樹, 池田仁, 深澤雄一郎, 笠原正典: ダウン症患者の胸腺におけるプロテアソームサブユニット $\beta 5t$ の発現低下. 第 34 回日本胸腺研究会, ユニコムプラザさがみはら(神奈川県・相模原市), 2015.2.7
- Kiuchi, S., Tomaru, U., Konno, S., Miyajima, S., Ishizu, A., Kasahara, M.: Aberrant expression of proteasomal $\beta 5$ subunit affects T cell repertoires in the thymus. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会, 国立京都国際会館(京都府・京都市), 2014.12.10-12
- 伊藤智樹, 外丸詩野, 大村優, 戸松留花, 石津明洋, 笠原正典: プロテアソーム機能低下モデルマウスにおける脳機能障害の解析. 第 47 回北海道病理談話会(病理分科会), 旭川グランドホテル(北海道・旭川市), 2014.10.11
- 伊藤智樹, 外丸詩野, 大村優, 石津明洋, 笠原正典: プロテアソーム機能異常と脳機能の低下. 第 103 回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANA クラウンプラザ(広島県・広島市), 2014.4.24-26
- 木内静香, 外丸詩野, 紺野沙織, 石津明洋, 宮島祥太, 平川彩香, 笠原正典: 胸腺におけるプロテアソームキモトリプシン様活性サブユニットの発現と T 細胞選択. 第 103 回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANA クラウンプラザ(広島県・広島市), 2014.4.24-26
- 笠原正典: 主要組織適合遺伝子複合体をめぐる研究の進歩. 第 103 回日本病理学

会総会, 広島国際会議場・ANA クラウンプラザ(広島県・広島市), 2014.4.24-26
Konno, S., Tomaru, U., Ishizu, A., Kasahara, M.: Aberrant proteasomal expression affects T cell differentiation and functions. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ (千葉県・千葉市), 2013.12.11-13
紺野沙織, 外丸詩野, 岸本菜奈, 石津明洋, 笠原正典: プロテアソームの発現異常における免疫応答の変化. 第 102 回日本病理学会総会, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館 (北海道・札幌市), 2013.6.6-8
山田洋介, 外丸詩野, 畑中佳奈子, 石津明洋, 木内隆之, 三橋智子, 松野吉宏, 笠原正典: AB 型胸腺腫における $\beta 5t$ の発現. 第 32 回日本胸腺研究会, 北海道大学学術交流会館 (北海道・札幌市), 2013.2.9

〔図書〕(計 10 件)

Miyatake, Y. and Kasahara, M. Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces CD44 high cancer stem cell-like phenotypes in adult T cell leukemia/lymphoma cells. *In: Seya, T., Matsumoto, M., Udaka, K. and Sato, N. (eds.): "Inflammation and Immunity in Cancer"*, pp. 75-84, Springer, Tokyo, 2015.
笠原正典: (分担執筆) 異形成. 南山堂医学大辞典 改訂 20 版, pp. 97-98, 南山堂, 東京, 2015.
笠原正典 (分担執筆): 免疫とその異常. (坂本穆彦, 北川昌伸, 仁木利郎 編): 標準病理学 第 5 版, pp. 96-135, 医学書院, 東京, 2015.
Kasahara, M. Variable lymphocyte receptors: a current overview. *In: Hsu, E. and Du Pasquier, L. (eds.): Pathogen-Host: antigenic variation versus somatic adaptation*, in press, Springer, New York, 2015.
Sutoh, Y. and Kasahara, M. The immune system of agnathans (jawless vertebrates). *In: Ratcliffe, M. J. H. (ed.): Encyclopedia of Immunobiology*, Elsevier, UK, in press, 2015.
石倉 浩, 笠原正典: (分担執筆) 細胞の増殖・分化と組織修復, 笠原正典, 石倉 浩, 佐藤昇志 (編): 器官病理学 改訂 14 版, pp. 13-26, 南山堂, 東京, 2013.
笠原正典: (分担執筆) 免疫応答機序と免疫異常, 笠原正典, 石倉 浩, 佐藤昇志 (編): 器官病理学 改訂 14 版, pp. 97-104, 南山堂, 東京, 2013.
笠原正典: (分担執筆) 遺伝子異常と疾患, 笠原正典, 石倉 浩, 佐藤昇志 (編): 器官病理学 改訂 14 版, pp. 33-59, 南山堂, 東京, 2013.
笠原正典: (分担執筆) 骨格筋, 笠原正典, 石倉 浩, 佐藤昇志 (編): 器官病

理学 改訂 14 版, pp. 835-847, 南山堂, 東京, 2013.

Kasahara, M. Polyploid origin of the human genome. (3rd Ed.). *In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK. DOI: 10.1002/9780470015902.a0005071.pub3*, 2013. (January 15, 2013).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.path1-hokudai.jp/path1/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 正典 (KASAHARA MASANORI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30241318