

機関番号：20101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790359

研究課題名 (和文) Hsp90 によるシャペロン分子の時空間制御と免疫応答

研究課題名 (英文) Hsp90 controls immune response through spatio-temporal regulation of chaperoned molecule via targeting dendritic cells

研究代表者

奥谷 浩一 (OKUYA KOICHI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70457703

研究成果の概要 (和文)：

樹状細胞におけるHsp90による結合分子の空間的・時間的制御による免疫応答の調節について検討した。Hsp90は結合分子を初期エンドソームに輸送・局在させる、すなわち時間的・空間的制御能を有することを明らかにした。免疫賦活能を有するCpG-ODNをHsp90と複合体を作成すると樹状細胞内の初期エンドソームに長時間留まり免疫応答が増強することを示し、Hsp90は抗腫瘍免疫における有効なアジュバントとなる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Recent studies have suggested that Toll-like receptor 9 (TLR9) signaling in early endosomes leads to interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells (pDCs), whereas TLR9 signaling in late endosomes induces pDC maturation, IL-6 and TNF- α secretion. Here we show that human DNA as well as CpG-oligodeoxynucleotides (ODNs) in complex with heat shock protein 90 (Hsp90) stimulate pDCs to produce large quantities of IFN- α . The Hsp90-CpG-A complexes are targeted into the Rab5⁺, EEA1⁻ “static” early endosome after internalization by DCs, suggesting that preferential sorting of Hsp90 chaperoned self-DNA/CpG-ODNs to the static endosome is required for signaling through TLR9 for IFN- α production. Thus, extracellular Hsp90 converts inert self-DNA/CpG-ODNs into a potent trigger of IFN- α production via spatiotemporal regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：Hsp90、樹状細胞、初期エンドソーム、腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

近年、多数の腫瘍拒絶抗原分子が同定され、抗原ペプチドや蛋白を用いた腫瘍特異的ワクチン療法が臨床試験の段階にある。当講座で行っている臨床試験においても一部の症例では腫瘍の完全退縮といった劇的な治療効果を認め、新たな治療法として注目を集めているが、一方で十分な治療効果を得られていない症例が多数あるのが現状である。そこで我々はワクチンの抗原性を高める有効な immunopotentiator の開発が重要であると考え、熱ショック蛋白質（HSP）を用いることを考えた。

我々はこれまで細胞外の Hsp90-抗原ペプチド複合体が樹状細胞により取り込まれクロスプレゼンテーションにより抗原特異的細胞傷害性 T 細胞を効率よく誘導することを報告している。これは Hsp90 が結合ペプチドを初期エンドソームに輸送・局在させることによるものであり、Hsp90 は初期エンドソームが関与する細胞内経路に深く関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では樹状細胞における Hsp90 による結合分子の空間的・時間的制御による免疫応答の調節について検討することを目的とした。すなわち Hsp90-CpG ODN 複合体による免疫応答を CpG ODN 単独での免疫応答と比較検討し、Hsp90 の役割を明らかにする。また Hsp90 とその結合分子の局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討し、Hsp90 の免疫応答制御のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) Hsp90-CpG ODN 複合体による IFN- α 産生を含む免疫応答と樹状細胞サブセットによる差異について、Hsp90 の局在を中心に検討する。

(2) 自己の DNA も Hsp90 と複合体を形成すると免疫原性を獲得することが明らかになり、自己免疫疾患である SLE 患者血清を用いて Hsp90 による免疫応答の調節について IFN- α の産生能を Hsp90 の有無で比較することで検討した。

4. 研究成果

(1) 外来性に投与した Hsp90 は経時的に樹状細胞表面から初期エンドソーム（Rab5⁺, EEA1⁺の静的初期エンドソーム）に移行し、長時間貯留することが観察された。

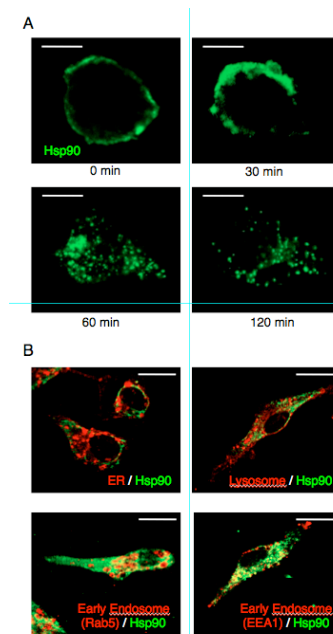


図 1. Hsp90 の樹状細胞内動態

(2) マウス樹状細胞は 2 つのサブセット、すなわち従来型（conventional）DC（cDC）および形質細胞様（plasmacytoid）DC（pDC）

に分類され、CpG-ODNのうちCpG-A刺激によりpDCは大量のIFN- α を産生するが、cDCは同様の刺激でもIFN- α を産生しないことが知られており、我々も同様の結果を得た。ところがHsp90と複合体を形成したCpG-Aの刺激によりpDCのIFN- α 産生が約2倍に増強するだけでなく、cDCがIFN- α を産生することが示された。これらのサイトカイン産生能はTLR9ノックアウトマウス由来の樹状細胞では完全に阻害されることよりTLR9依存性であることが示された。

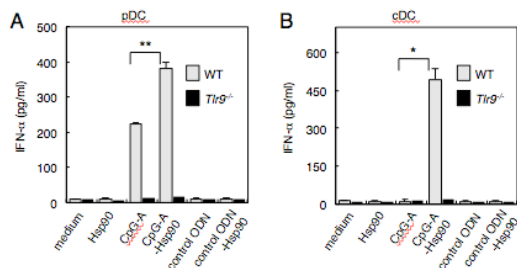


図2. 樹状細胞のIFN- α 産生能

(3) cDCによるCpG-Aの取り込みは複合体形成の如何に関わらず同程度であったが、その細胞内動態が大きく変化することが観察された。CpG-A単独では細胞内で初期エンドソーム(Rab5⁺, EEA1⁻の動的初期エンドソーム)を経てすぐにライソソームに輸送されてしまい、TLR9を介したIFN- α を産生する経路を活性化することができない。ところがHsp90と複合体を形成したCpG-AはRab5⁺, EEA1⁺の静的初期エンドソームに長時間貯留していたことから、本来CpG-A刺激で活性化できないTLR9を介してIFN- α を産生するシグナル伝達経路が活性化することが明らかになった。さらに初期エンドソームの酸性化を阻害することでcDCのIFN- α 産生が抑制されることもこの結果を支持するものだと考えられる。

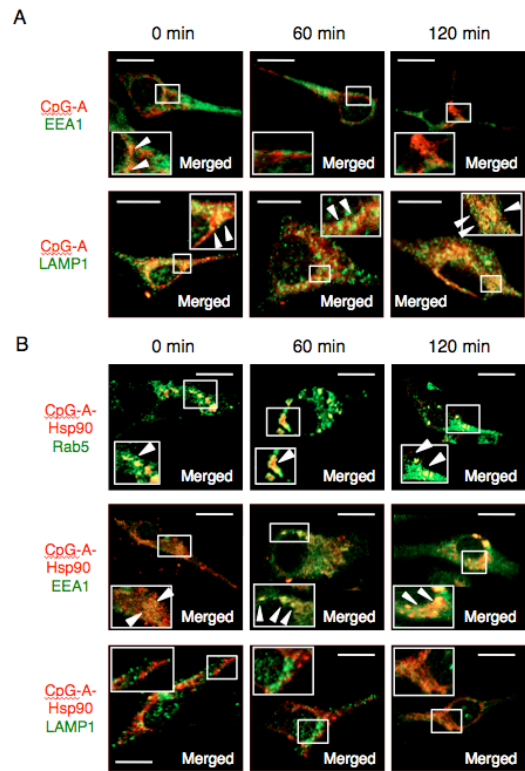


図3. CpG-Aの樹状細胞内動態

(4) また、Hsp90によるCpG-Aの免疫応答増強能は*in vivo*でも示され、ヒトpDCのIFN- α 産生能も増強することが示された。

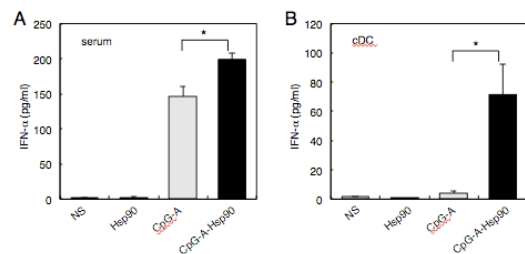


図4. ヒト樹状細胞のIFN- α 産生能

(5) 本来免疫原性を持たない自己のDNAもHsp90と複合体を形成すると、ヒトpDCのIFN- α 産生能を誘導することが明らかになった。そこでSLE患者血清中のHsp90濃度を測定すると健常人と比較して高値であった。SLE患者血清をヒトpDCに刺激するとIFN- α を産生したが、健常人の血清をヒトpDCに刺激してもIFN- α は産生しなかったことから

SLE患者血清中にIFN- α 産生を促進する分子が存在することが示された。またこのSLE患者血清から抗Hsp90抗体を用いてHsp90を除去するとIFN- α の産生能は50%となった。pDCからIFN- α 産生を刺激する分子はヒトDNAおよびRNAといわれており、SLE患者の血清中ではこれらのIFN- α 産生に関わる分子とHsp90が複合体を形成していることが示された。このように複合体を形成することで自己のDNAの分解を抑制し、かつ効率よくヒトpDCに取り込まれ、初期エンドソームに局在させることでIFN- α の産生を促進するものと考えられ、Hsp90がSLEの病態に関わると考えられるとともに、Hsp90を除去することでIFN- α の産生を抑制し、SLE治療の一つとなることが期待された。

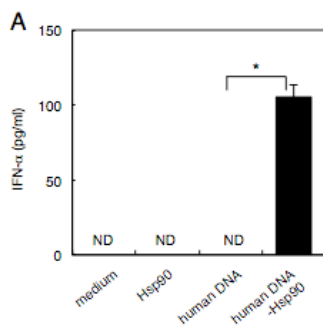


図5. 自己DNA刺激時のIFN- α 産生能

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 奥谷浩一、田村保明、佐藤昇志、平田公一、自然免疫機構と熱ショック蛋白質、Surgery Frontier、査読無、17巻4号、369-372、2010
- ② Koichi Okuya, Yasuaki Tamura, Keita Saito, Goro Kutomi, Toshihiko Torigoe, Koichi Hirata, and Noriyuki Sato、Spatiotemporal regulation of heat

shock protein 90-chaperoned self-DNA and CpG-oligodeoxynucleotide for type I IFN induction via targeting to static early endosome、Journal of immunology、査読有、184、2010、7092-7099

- ③ 奥谷浩一、田村保明、平田公一、佐藤昇志、Heat shock protein 90による免疫応答増強効果の臨床応用をめざして、biotherapy、査読無、24(1)、27-33、2010
- ④ 奥谷浩一、田村保明、平田公一、佐藤昇志：熱ショックタンパク質のがんワクチンへの応用、最新医学、査読無、64(11)、2386-2391、2009

[学会発表] (計6件)

- ① 奥谷浩一、田村保明、齋藤慶太、九富五郎、鳥越俊彦、木村康利、大村東生、古畑智久、平田公一、佐藤昇志、Hsp90 boosts type-I interferon induction via spatio-temporal regulation of chaperoned molecule and modulate anti-tumor immunity、第69回日本癌学会学術総会、2010.9.22-24、大阪
- ② 奥谷浩一、田村保明、齋藤慶太、九富五郎、鳥越俊彦、平田公一、佐藤昇志、Hsp90 boosts type-I interferon induction via spatio-temporal regulation of chaperoned molecule、第14回日本がん免疫学会総会、2010.7.22、23、熊本
- ③ 奥谷浩一、田村保明、齋藤慶太、九富五郎、鳥越俊彦、平田公一、佐藤昇志、Hsp90 controls immune response through spatio-temporal regulation of chaperoned molecule via targeting dendritic cells、第39回日本免疫学会学術総会、2009.12.2-4、大阪
- ④ 奥谷浩一、田村保明、齋藤慶太、九富五郎、鳥越俊彦、平田公一、佐藤昇志、Hsp90 drastically augments anti-tumor

immunity via spatio-temporal regulation、第 68 回日本癌学会学術総会、2009. 10. 1-3、横浜

⑤ 奥谷浩一、田村保明、齋藤慶太、九富五郎、鳥越俊彦、平田公一、佐藤昇志、Hsp90 controls immune response through spatio-temporal regulation of chaperoned molecule via targeting dendritic cells、第 13 回日本がん免疫学会総会、2009. 6. 24、25、北九州

⑥ 奥谷浩一、田村保明、九富五郎、齋藤慶太、高橋あかり、鳥越俊彦、亀嶋秀和、鶴間哲弘、古畑智久、平田公一、佐藤昇志、Hsp90 による免疫応答増強効果の免疫治療への応用を目指して、第 30 回癌免疫外科研究会、2009. 5. 21、22、久留米

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥谷 浩一 (OKUYA KOICHI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70457703

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：