

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19080

研究課題名（和文）細胞傷害顆粒を認識する膜結合型ハイブリッド分子の創製と高純度精製法の開発

研究課題名（英文）Construction of membrane-bound hybrid molecules for analyzing cytotoxic granules

研究代表者

片岡 孝夫（KATAOKA, Takao）

京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授

研究者番号：20242307

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：細胞傷害性T細胞やナチュラルキラー細胞は、細胞傷害顆粒を有し、腫瘍化した細胞やウイルスに感染した細胞を直接的に殺傷する。細胞傷害顆粒には、パーフォリン（ポアを形成するタンパク質）やグランザイム（細胞死を誘導するセリンプロテアーゼ）などの可溶性タンパク質が含まれている。本研究では、パーフォリン、グランザイムB、膜結合タンパク質を用いて膜結合型ハイブリッド分子を構築した。さらに、ヌクレオフェクション法を用いてマウス細胞傷害性T細胞株CTLL-2細胞に膜結合型ハイブリッド分子を安定的に発現させる方法を確認した。パーフォリン、グランザイムB、IFN- γ の発現に対する転写因子の作用を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞傷害性T細胞やナチュラルキラー細胞が有する細胞傷害顆粒に対する膜結合型ハイブリッド分子を構築することを目的とした。これまでに、膜結合型ハイブリッド分子の候補を構築し、マウス細胞傷害性T細胞株CTLL-2細胞に遺伝子導入する方法を確認した。これらの研究成果は、細胞傷害顆粒の高純度精製法の開発に向けて重要な足がかりである。一方、加齢にともないがん細胞やウイルス感染細胞に対する抵抗力が弱くなることから、細胞傷害性T細胞やナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性を強化する方法を確認することによって、がんや感染症に対する新しい治療法や予防法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cytotoxic T cells and natural killer cells harbor secretory lysosomes termed cytotoxic granules, and directly eliminate transformed cells and virus-infected cells. Cytotoxic granules contain soluble molecules, such as perforin (pore-forming protein) and granzymes (cell death-inducing serine proteases). In this study, membrane-bound hybrid molecules were constructed by using perforin, granzyme B, and membrane-bound proteins. The mouse cytotoxic T cell line CTLL-2 cells stably expressing membrane-bound hybrid molecules were established by nucleofection. The actions of transcription factors on the expression of perforin, granzyme B, IFN- γ were elucidated.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞傷害顆粒 パーフォリン グランザイムB LAMP1 IFN- γ Eomesodermin Runx3 NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes: CTL) やナチュラルキラー (natural killer: NK) 細胞は、腫瘍化した細胞やウイルスに感染した細胞を直接的に殺傷する。CTL や NK 細胞は、細胞傷害顆粒という分泌型リソソームを有している。分泌型リソソームは、普遍的なリソソームの特徴と細胞特異的な生理機能をもつ特殊な細胞小器官であり、免疫細胞や色素細胞に存在している。細胞傷害顆粒には、パーフォリン (細胞膜にポアを形成するタンパク質) やグランザイム (細胞死を誘導するセリンプロテアーゼ) などの可溶性タンパク質が含まれている。CTL や NK 細胞は、標的細胞を認識すると免疫シナプスを形成し、細胞傷害顆粒を放出する。このとき、標的細胞の細胞膜にパーフォリンの重合によるポアが形成される。このポアを介してグランザイム B が標的細胞内に移行し、プロカスペーゼや Bcl-2 ファミリータンパク質 Bid 等の細胞内基質を限定分解し、アポトーシスを誘導する。

CTL や NK 細胞は、パーフォリン依存性細胞傷害経路に加えて、Fas リガンド依存性細胞傷害経路を有している。Fas リガンドは、標的細胞に発現している Fas に結合すると、death-inducing signaling complex の形成を介して、プロカスペーゼ 8 を活性化し、アポトーシスを誘導する。さらに、CTL や NK 細胞は、サイトカインとして interferon- γ (IFN- γ) を産生する。IFN- γ は、主要組織適合遺伝子複合体の発現の亢進を介して、がんに対する免疫応答に重要な役割を担っている。

2. 研究の目的

細胞傷害顆粒には、パーフォリンやグランザイム等の可溶性タンパク質に加えて、lysosomal-associated membrane protein (LAMP) ファミリー等の膜結合タンパク質が含まれている。細胞傷害顆粒の内部 pH は、液胞型 H⁺-ATPase によって酸性に維持され、その酸性 pH が細胞傷害顆粒の構造と機能の維持に必須である。これまでに、細胞傷害顆粒のプロテオミクスに関する研究が報告されているが、細胞傷害顆粒を高純度で精製する方法が未だ確立されていないため、細胞傷害顆粒の構成因子の全貌や生合成の仕組みはほとんど解明されていない。

パーフォリンやグランザイム B は、細胞傷害顆粒のマーカータンパク質であるが、可溶性タンパク質でありサイトゾル側に突出部分がないため、アフィニティー精製用タグとして利用することができない。一方、LAMP ファミリー等の膜結合タンパク質は、サイトゾル側に突出部分があり、アフィニティー精製用タグとして利用可能であるが、細胞傷害顆粒だけでなく、リソソームにも広く局在していると考えられる。本研究では、細胞傷害顆粒の高純度精製に応用するために、パーフォリンやグランザイム B 等の可溶性タンパク質と LAMP1 等の膜結合タンパク質との膜結合型ハイブリッド分子を創製することを目的とした。

T-box 転写因子 Eomesodermin (Eomes) は、CTL や NK 細胞の分化、IFN- γ の発現、細胞傷害活性に重要である。マウスリンパ腫 BW5147 細胞や EL4 細胞は、IFN- γ を発現していないが、Eomes を強制発現させることによって、IFN- γ を発現する。Runt ファミリー転写因子 Runx3 は、Eomes、IFN- γ 、パーフォリン、グランザイム B の発現を制御している。本研究では、IFN- γ 、パーフォリン、グランザイム B の転写に必要な転写因子の作用を解明することを目的として、パーフォリンやグランザイム B の発現に対する Runx3 の影響、及び、Eomes 依存性の IFN- γ 発現に対する転写因子 nuclear factor κ B (NF- κ B) の影響を調べた。

3. 研究の方法

マウス細胞傷害性 T 細胞株 CTLL-2 細胞 (RCB0637, RIKEN BRC Cell Bank, Tsukuba, Japan)、マウスリンパ腫 BW5147 細胞 (JCRB9002, Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japan)、マウスリンパ腫 EL4 細胞 (RCB1641, RIKEN BRC Cell Bank)、ラット NK 細胞様 RNK-16 細胞 (DeLla Reynolds 博士と Craig W. Reynolds 博士より分与)、ヒト NK 細胞様 YNT10 細胞 (八木田秀雄博士より分与)、ヒト NK 細胞様 KHYG-1 細胞 (JCRB0156, Health Science Research Resources Bank)、ヒト NK 細胞様 MTA 細胞 (IF050513, Health Science Research Resources Bank) を実験に用いた。SR プロモーター (目的遺伝子の発現用) 及びピュロマイシン耐性遺伝子 (トランスフェクタントの選択用) を有する発現ベクター (Rafick-Pierre Sékaly 博士より分与) と EF1 プロモーター (目的遺伝子の発現用) 及びピュロマイシン耐性遺伝子、もしくはハイグロマイシン耐性遺伝子 (トランスフェクタントの選択用) を有する発現ベクター (David C. S. Huang 博士より分与) を実験に用いた。Gene Pulser Xcell™ エレクトロポレーションシステム (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 及び 4D-Nucleofector® (Lonza, Basel, Switzerland) を用いて遺伝子導入を行なった。トータル RNA の抽出、逆転写反応、Thermal Cycler Dice® Real Time System Lite (Takara Bio, Kusatsu, Japan) によるリアルタイム PCR を用いて mRNA の発現を解析した。細胞ライゼートの調製、ウェスタンブロッティング、Amersham Imager 680 (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) による化学発光の検出を用いてタンパク質の発現を解析した。Axio Observer D1 ハイエンド倒立顕微鏡デジタルカメラシステム (Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて EGFP 蛍光タンパク質の蛍光を観察した。クロマチン免疫沈降法を用いて、特定の DNA 領域に対する転写因子の結合を調べた。モネンシン処理によりサイトカインの分泌を阻害した後、蛍光抗体で染色した T 細胞のサイトカイン発現を FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いたフローサイトメトリーで解析した。

4. 研究成果

(1) 膜結合型ハイブリッド分子の構築

LAMP ファミリーは、C末端のサイトゾル突出領域にチロシンモチーフ YXX (X: 任意のアミノ酸、疎水性アミノ酸)を有する。カチオン依存性マンノース 6-リン酸レセプター(CD-MPR)及びカチオン非依存性マンノース 6-リン酸レセプター(CI-MPR)は、C末端のサイトゾル突出領域にジロイシンモチーフ DXLL (X: 任意のアミノ酸)を有する。液胞型 H⁺-ATPase V₀サブユニット a1(ATP6V0A1)は8回膜貫通タンパク質であり、C末端はサイトゾル側に突出している。ヒト CD-MPR 遺伝子、ヒト CI-MPR 遺伝子の部分配列、ヒト ATP6V0A1 遺伝子の部分配列をクローニングし、Perforin(1-555)+CD-MPR(180-277)、Perforin(1-555)+CI-MPR(2279-2491)、Perforin(1-555)+ATP6V0A1(750-837)を連結した。C末端側に EGFP と FLAG を付加できる SR 発現ベクターを新たに構築し、この SR 発現ベクターに、既に構築済みの Perforin(1-555)-LAMP1(325-417)に加えて、Perforin(1-555)+CD-MPR(180-277)、Perforin(1-555)+CI-MPR(2279-2491)、Perforin(1-555)+ATP6V0A1(750-837)を挿入した。これらの SR 発現ベクターには、制限酵素 PvuI の切断配列が2箇所あり、その1箇所が SR プロモーター内にあった。そこで、SR プロモーター内の PvuI サイトに変異を導入した SR 発現ベクターを構築し、Perforin(1-555)-LAMP1(325-417)、Perforin(1-555)+CD-MPR(180-277)、Perforin(1-555)+ATP6V0A1(750-837)を連結した。

(2) 膜結合型ハイブリッド分子の遺伝子導入法の確立

4D-Nucleofector™ を用いたヌクレオフェクションの遺伝子導入効率を調べるために、CTLL-2細胞、RNK-16細胞、YTN10細胞、KHYG-1細胞、MTA細胞へ pmaxGFP 遺伝子を導入し、1日後に細胞生存率と pmaxGFP の蛍光を観察した。その結果、RNK-16細胞以外の CTLL-2細胞、YTN10細胞、KHYG-1細胞、MTA細胞では、pmaxGFP の蛍光が観察されたことから、遺伝子導入効率が低いものの一過的な遺伝子導入が可能であることが示された。さらに、CTLL-2細胞を用いてヌクレオフェクションの遺伝子導入と薬剤耐性遺伝子によるセレクションを行った結果、EGFP もしくは LAMP1-EGFP を安定発現する少数のクローンが得られたが、Perforin(1-555)+LAMP1(325-417)-EGFP と Granzyme B(1-247)+LAMP1(325-417)-EGFP を安定発現させるクローンを構築することができなかった。そこで、C末端に EGFP と FLAG エピトプタグを連結させる改良に加えて、制限酵素 PvuI の切断部位を1箇所にするための変異を導入し、PvuI で発現ベクターを切断した場合に目的遺伝子の発現ユニットとピューロマイシン耐性遺伝子の発現ユニットが直鎖状プラスミドで連続的に並ぶようにした。これらの改良によって、EGFP+FLAG と LAMP1(1-417)+EGFP+FLAG に加えて、Perforin(1-555)+LAMP1(325-417)+EGFP+FLAG と Granzyme B(1-247)+LAMP1(325-417)+EGFP+FLAG を発現する CTLL-2細胞クローンを樹立することに成功した。これらの CTLL-2細胞クローンでは、導入した融合遺伝子の発現及び内在性パーフォリンの発現が検出された。

(3) IFN- γ 、パーフォリン、グランザイム B の転写に対する Runx3 の影響

CTLL-2細胞から調製した cDNA ライブラリーから Runx3 遺伝子をクローニングし、ピューロマイシン耐性遺伝子、もしくはハイグロマイシン耐性遺伝子を有する発現ベクターにサブクローニングした。FLAG-Runx3 を安定発現する BW5147細胞、及びコントロール BW5147細胞を構築した。Runx3 を安定発現する BW5147細胞では、プロテインキナーゼ C 活性化剤 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) とカルシウムイオノフォア ionomycin (IM) で刺激すると、IFN- γ mRNA の発現が検出されたが、CTLL-2細胞に比べてパーフォリン mRNA とグランザイム B mRNA の発現がほとんど検出されなかった。さらに、FLAG-Eomes と FLAG-Runx3 を安定発現する BW5147細胞を構築し、PMA と IM で刺激したところ、IFN- γ mRNA の発現が顕著に誘導されたが、CTLL-2細胞に比べてパーフォリン mRNA とグランザイム B mRNA の発現がほとんど検出されなかった。以上の結果から、Runx3 は IFN- γ 発現を誘導することができるが、パーフォリンとグランザイム B の発現を誘導することができないことを明らかにした。

(4) Eomes 依存的 IFN- γ の転写に対する NF- κ B の影響

マウスリンパ腫 BW5147細胞では、NF- κ B 経路に対する小分子阻害剤 (TPCA-1、IKK-16) は、PMA と IM で誘導される Eomes 依存的な IFN- γ の発現を適度に阻害した。本研究では、Eomes を安定発現する EL4細胞及びマウス初代 T細胞を用いて IFN- γ 発現に対する NF- κ B の直接的な影響を調べた。Eomes を安定発現する EL4細胞では、PMA と IM で刺激すると、IFN- γ 発現、及び NF- κ B サブユニット RelA と NFATc2 の IFN- γ プロモーターへの結合が強力に促進された。さらに、Eomes を安定発現する EL4細胞では、TPCA-1 と IKK-16 は IL-2 の発現を顕著に阻害したが、IFN- γ の発現を阻害しなかった。これらの条件下で、TPCA-1 は IFN- γ プロモーターへの RelA の結合を大きく阻害していたが、Eomes や NFATc2 の結合を阻害しなかった。抗 CD3抗体と抗 CD28抗体で活性化したエフェクター CD4⁺ T細胞と CD8⁺ T細胞を用いて、PMA とカルシウムイオノフォア A23187 で IFN- γ や IL-2 の発現を誘導すると、TPCA-1 と IKK-16 は IL-2 発現を顕著に阻害したが、IFN- γ 発現を大きく阻害しなかった。以上の結果から、NF- κ B は、Eomes を安定発現する EL4細胞や初代エフェクター T細胞において、PMA とカルシウムイオノフォアで誘導される IFN- γ 発現に必ずしも必要でないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yumiko Tanaka, Ayaka Nakao, Yasunobu Miyake, Yukina Higashi, Riho Tanigaki, Takao Kataoka	4. 巻 22
2. 論文標題 Small molecule inhibitors targeting nuclear factor B activation markedly reduce expression of interleukin-2, but not interferon- , induced by phorbol esters and calcium ionophores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222313098	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	三宅 靖延 (MIYAKE Yasunobu)		

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