

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18864

研究課題名(和文) 樹状細胞の抗原提示を制御するRabタンパク質の解析

研究課題名(英文) Role of Rab family proteins in regulation of antigen presentation in dendritic cells

研究代表者

古田 和幸 (Furuta, Kazuyuki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：50644936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：主要組織適合抗原クラスII(MHC-II)は、抗原提示細胞に発現し、病原体成分をT細胞に提示することで病原体排除のための獲得免疫応答を誘導する。MHC-IIの細胞表面の発現量は免疫応答を調節する因子であるが、その調節の分子機構は明らかではない。本研究では、刺激によるMHC-II発現変化の分子機構を解析し以下の成果を得た。(1)細胞表面MHC-IIの架橋は細胞内にカルシウム流入を誘導し、MHC-IIのエンドサイトーシスを誘導することを見いだした。(2)リポ多糖(LPS)刺激によってRab11の発現が誘導されることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：MHC-II expressed on antigen presenting cells such as dendritic cells presents antigenic peptides to CD4 T cells and initiates acquired immunity. The cell-surface expression of MHC-II is tightly regulated, however, the regulation mechanism remains to be clarified. In this study we obtained the following results: 1. MHC-II crosslinking induced intracellular Ca<sup>2+</sup> influx was required for MHC-II endocytosis. 2. LPS induced Rab11 expression in dendritic cells.

研究分野：生物系薬学

キーワード：抗原提示 樹状細胞 MHC-II Rab

## 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞は皮膚や粘膜などの末梢組織に存在し、生体内に侵入した病原体などを取り込み、これらの病原体に由来するタンパク質をペプチドと分解し、主要組織適合抗原クラス II (MHC-II) との複合体を細胞内で形成し細胞表面に提示する。T 細胞はこの抗原を T 細胞受容体 (TCR) で認識すると活性化され、サイトカイン産生などを介して、様々な免疫細胞を活性化する。その結果、抗原特異的免疫応答である獲得免疫応答が惹起される。

MHC-II の細胞表面発現量は T 細胞活性化誘導の決定因子の一つであるため、その発現量は厳密に制御されている。例えば、樹状細胞は、定常状態では周辺に存在する自己のタンパク質を常に取り込んでいるが MHC-II は低発現であり免疫応答を誘導しない。一方、病原体が生体に侵入すると、病原体の構成成分であるリポ多糖 (LPS) などが、樹状細胞の Toll 様受容体 (TLR) を刺激し樹状細胞を活性化する。その結果、樹状細胞の細胞表面 MHC-II 発現量が亢進し、効率よく抗原を提示する。また、樹状細胞表面の MHC-II が TCR によって架橋 (クロスリンク) されると、MHC-II が速やかにエンドサイトーシスされる。このような、MHC-II の細胞表面発現制御は多くの膜タンパク質と同様に細胞内タンパク質輸送機構である小胞輸送によって制御されていると考えられるが、その詳細なメカニズムは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では樹状細胞において、刺激によって細胞表面 MHC-II 発現を変化させる分子メカニズムの解明を目的として以下の点について解析を行った

1. MHC-II のクロスリンクが誘導する MHC-II のエンドサイトーシスを誘導するシグナル、およびエンドサイトーシスの分子メカニズムの解析。

2. LPS 刺激による MHC-II 発現上昇を制御する小胞輸送の分子メカニズムの解析。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞培養: 骨髄由来樹状細胞 (BMDC) は B10.BR マウスの脛骨および大腿骨より骨髄細胞を回収し、非働化ウシ胎仔血清 (10%) ペニシリン・ストレプトマイシン、 $\beta$ -メルカプトエタノール、マウス GM-CSF を含む RPMI-1640 培地で 7 日間培養し、得られた細胞を BMDC として用いた。この細胞は 90% 以上が樹状細胞マーカーである CD11c 陽性であることを確認した。

(2) 細胞表面 MHC-II の発現量測定: 細胞に氷上で蛍光標識抗 MHC-II 抗体を結合させ、この細胞について、フローサイトメーター (FACSCalibur) で MHC-II の発現量を測定した。

(3) 細胞表面 MHC-II のエンドサイトーシス測

定: BMDC を回収後、抗 MHC-II 抗体 (クローン 11-5.2) で氷上下、細胞表面 MHC-II を標識した。これらの細胞を洗浄後、抗マウス抗 IgG 抗体を含む培地で 37°C でインキュベートすることで細胞表面 MHC-II をクロスリンクした。その結果、細胞に残存した MHC-II を蛍光標識した抗マウス IgG 抗体で検出した。

(4) 定量的 RT-PCR: 細胞から RNA を抽出後、逆転写により cDNA の合成を行った。PCR 反応は StepOnePlus (Applied Biosystems) によって、標的遺伝子のプライマーを用いて増幅を行い、mRNA 量を相対的に定量した。

(5) 蛍光抗体染色: 細胞をカバーガラスに接着させ、固定後、細胞膜透過処理を行なった。1 次抗体を 37°C で 1 時間処理し、その後、2 次抗体として Alexa Fluor 蛍光標識抗抗体を用いて、目的タンパク質を染色した。局在は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(6) イムノプロット法: 細胞を細胞破碎液で可溶化し、遠心後得た上清を SDS sample buffer で懸濁し、煮沸し SDS-PAGE によって分離した。PVDF 膜に転写後、1 次抗体として特異的抗体、2 次抗体として、HRP 標識抗体を用いて目的タンパク質を標識し、化学発光によって検出した。

## 4. 研究成果

(1) クロスリンクによる MHC-II 発現抑制機構の解析

MHC-II のクロスリンクによる細胞内シグナルの誘導

MHC-II のクロスリンクは、B 細胞においては  $Ca^{2+}$  の細胞内流入が誘導されることが報告されている。そこで、BMDC における MHC-II のクロスリンクによる細胞内  $Ca^{2+}$  流入を解析した。その結果、MHC-II のクロスリンクによって細胞内  $Ca^{2+}$  流入が誘導された。この細胞内  $Ca^{2+}$  流入が MHC-II のエンドサイトーシス誘導に関与しているか解析するために細胞内  $Ca^{2+}$  キレート剤の効果を検討した。その結果、細胞内  $Ca^{2+}$  キレート剤によって MHC-II のエンドサイトーシスが阻害された

MHC-II のエンドサイトーシスに対する阻害剤の効果

細胞内  $Ca^{2+}$  流入を誘導するシグナル伝達として、Syk などのチロシンキナーゼによる PLC の活性化を介した経路が知られている。そこで次に、各種シグナル分子の阻害剤を用いて MHC-II エンドサイトーシスへの影響を解析した。その結果、クロスリンクが誘導する MHC-II のエンドサイトーシスは PLC、Syk の阻害剤によって抑制されたことから、MHC-II のクロスリンクは Syk、PLC の活性化を介して MHC-II のエンドサイトーシスを誘導すると考えられた。

MHC-II のエンドサイトーシス経路の解析  
膜タンパク質の細胞内への移行には複数の経路が存在し、マクロピノサイトーシス、クラスリン依存的エンドサイトーシス、クラスリン非依存的エンドサイトーシスが主要な経路として知られている。そこで、クロスリンクによる MHC-II エンドサイトーシスはどの経路によるのかを解析するために阻害剤を用いて検討した。その結果、アクチン重合阻害剤がクロスリンクによる MHC-II のエンドサイトーシスを抑制した。さらに、クラスリン依存的エンドサイトーシスの阻害剤によってもクロスリンクによる MHC-II のエンドサイトーシスは抑制された。この結果から、クロスリンクによる MHC-II エンドサイトーシスはクラスリン依存的経路によるものと考えられた。

## (2) Rab ファミリータンパク質による MHC-II の発現制御機構の解析

樹状細胞におけるリサイクリング制御 Rab タンパク質の解析

膜タンパク質の細胞表面発現制御のひとつはエンドサイトーシスされたタンパク質の細胞表面へのリサイクリングである。リサイクリングを制御する Rab ファミリータンパク質として、Rab11、Rab4、Rab35 が知られている。これまでに発現細胞を用いた解析によって、Rab11 および Rab35 が MHC-II のリサイクリングを制御することを示唆する結果を得ていた。そこでこれらの Rab タンパク質の樹状細胞における発現を解析したところ、樹状細胞は Rab11 および Rab35 を発現することが明らかとなった。

### LPS 刺激による Rab11 の発現誘導

樹状細胞は LPS 刺激によって MHC-II の発現が亢進する。そこで LPS 刺激による Rab タンパク質の発現量変化を検討した。その結果、LPS 刺激によって Rab11 の発現が上昇することを見いだした。

これまでの検討で、MHC-II の発現制御は Rab11 によることを示唆する結果が得られた。今後 Rab11 による MHC-II の発現が制御機構についてさらに詳細な解析が必要である。

## 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 4 件)

Takeuchi, T., Harada, Y., Moriyama, S., Furuta, K., Tanaka, S., Miyaji, T., Omote, H., Moriyama, Y., and Hiasa, M. Vesicular polyamine transporter mediates vesicular storage and release of polyamine from mast cells. *J. Biol. Chem.*, 292, 3909-3918, (2017) 査読有、DOI: 10.1074/jbc.M116.756197.

Manabe, Y., Yoshimura, M., Sakamaki, K., Inoue, A., Kakinoki, A., Hokari, S., Sakanaka, M., Aoki, J., Miyachi, H., Furuta, K., and Tanaka, S. 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene and its derivatives act as secretagogues on rodent mast cells. *Eur. J. Immunol.*, 47, 60-67. (2017) 査読有、DOI: 10.1002/eji.201646536

Sakanaka, M., Kurimune, Y., Yamada, K., Hyodo, Y., Natsuhara, M., Ichikawa, A., Furuta, K., and Tanaka, S. Down-modulation of antigen-induced activation of mast cells sensitized with a highly cytokinergic clone. *Immunol. Lett.* 174, 1-8. (2016) 査読有、DOI: 10.1016/j.imlet.2016.04.003

Oshikawa, Y., Furuta, K., Tanaka, S., and Ojida, A. Cell surface-anchored fluorescent probe capable of real-time imaging of single mast cell degranulation based on histamine-induced coordination displacement. *Anal. Chem.* 88, 1526-1529. (2016) 査読有、DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04758

〔学会発表〕(計 5 件)

古田 和幸、平木 勇次、政木 健人、田中 智之、主要組織適合抗原クラス II (MHC-II) の誘導するシグナルを介した MHC-II のエンドサイトーシス機構、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25 日～27 日、宮城県仙台市

古田 和幸、平木 勇次、田中 智之、MHC-II シグナルが誘導する MHC-II のエンドサイトーシス促進機構の解析、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日～27 日、宮城県仙台市

古田 和幸、平木 勇次、政木 健人、田中 智之、主要組織適合抗原クラス II (MHC-II) のエンドサイトーシスを促進するシグナル伝達機構の解析、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26 日～29 日、神奈川県横浜市

古田 和幸、黒田 真弘、田中 智之、主要組織適合抗原クラス II のリサイクリングおよび発現を制御する Rab の解析、第 38 回日本分子生物学会第 88 会日本生化学会合同大会、2015 年 12 月 1 日～4 日、兵庫県神戸市

古田 和幸、黒田 真弘、田中 智之、主要組織適合抗原クラス II のリサイクリングを制御する Rab の解析、第 67 回日本細胞生物学会大会 2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日、東京都江戸川区

〔図書〕(計 0 件)

〔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

ホームページ：<http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/meneki/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古田 和幸 (FURUTA, Kazuyuki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：50644936