

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14648

研究課題名(和文) プロテアソームの遺伝的多様性と免疫疾患

研究課題名(英文) Genetic variations of proteasome and immune-related diseases

研究代表者

新田 剛 (Nitta, Takeshi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：30373343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺プロテアソーム遺伝子PSMB11の多様性(variation)がCD8 T細胞の抗原認識レパトアと免疫関連疾患の感受性に影響を及ぼす可能性を検証した。機能に影響を与える3種類のvariationについて、ノックインマウスを作製したところ、胸腺でのCD8 T細胞の正の選択が阻害された。特に日本人に多くみられるG49Sは、CD8 T細胞のTCRレパトアを変化させ、自己免疫疾患であるシェーグレン症候群の発症リスクを高めることが示された。以上の結果より、PSMB11のvariationがCD8 T細胞のレパトア選択と自己免疫疾患の感受性を変化させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The thymoproteasome is a thymus-specific proteasome that contains a unique catalytic subunit PSMB11 and is essential for the development of CD8 T cells. Here we addressed whether genetic variations of human PSMB11 influence CD8 T cell selection and autoimmunity. By the computational analysis, we found that PSMB11 was highly enriched for nucleotide changes that interfere with protein function. The introduction of these 'damaging' variations of PSMB11 into mice by genome editing revealed that these variations impaired the development of CD8 T cells in vivo. One of the PSMB11 polymorphisms, G49S, altered the CD8 T cell repertoire in mice and is associated with a higher risk of an autoimmune disease in humans. Our findings suggest that proteasome variation exerts a significant influence on T cell repertoire selection and may contribute to the difference in individual susceptibility to autoimmunity.

研究分野：免疫学

キーワード：遺伝子多様性 免疫学 ゲノム プロテアソーム T細胞 自己免疫疾患 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

T細胞（Tリンパ球）は免疫システムの司令塔であり、自己の細胞上にMHC分子とともに提示された抗原ペプチドを認識する。抗原ペプチドは、自己または外来タンパク質がプロテアーゼによって分解されることで産生される。このプロセスを担うのは、細胞内のタンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームと、リソソーム内プロテアーゼ群であり、それぞれMHCクラスI、クラスIIに提示される抗原ペプチドを産生する。これらのプロテアーゼによる抗原提示はT細胞の分化と機能に必須である。T細胞抗原受容体（TCR）はゲノム遺伝子の再構成（VDJ組換え）によって細胞レベルでの抗原認識の多様性を作り出し、MHCは遺伝子多型をもつことで生物種集団内の個体レベルでの多様性を生み出している。

申請者は、胸腺皮質上皮細胞（cTEC）に特異的に発現される「胸腺プロテアソーム」がMHCクラスI結合ペプチド産生を介してCD8 T細胞の正の選択を制御することを示してきた（Nitta et al, *Immunity* 2010）。さらに、ヒトプロテアソーム遺伝子の多様性情報を収集し、サブユニット $\beta 5t$ 、 $\beta 5i$ 、 $\beta 1i$ 遺伝子に、機能に影響を与える変異が多いことを発見した。これらはMHCクラスI結合ペプチドの産生を担う「キモトリプシン様活性」をもつ触媒サブユニットである。特に、 $\beta 5t$ は「胸腺プロテアソーム」の構成因子であり、これらの変異は胸腺でのCD8 T細胞レパトア選択に影響し、ヒト集団におけるT細胞レパトアの多様性、さらには免疫疾患に対する感受性の差異を生じさせる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、プロテアソームの遺伝子多様性（variation）がCD8 T細胞のレパトア選択に影響し、抗原認識能の多様性を生み出すという可能性を検証する。具体的には、ヒト型variationを導入したマウスの表現型解析とヒトゲノム連鎖解析を行い、免疫疾患感受性を決定づける新たな原理の解明をめざす。

3. 研究の方法

(1)ヒトプロテアソーム遺伝子のデータベース解析

本研究では、ヒトのプロテアソーム遺伝子情報を独自に収集した。米国のゲノムデータベースNCBI、Exomeおよび日本のデータベースHGVDより、全プロテアソームサブユニット遺伝子のvariationの種類とアレル頻度の情報を取得した。アミノ酸置換をもたらすvariationについては、構造予測アルゴリズムPolyphen-2を用いて、機能に影響を及ぼす可能性を推測した。

(2)PSMB11 variantsの機能解析

PSMB11 variationsについて、ヒト細胞株を用いて生化学的な機能検証を行った。それぞ

れのvariantのcDNA発現ベクターを作製し、293T細胞にトランスフェクションし、48時間後のタンパク質発現とプロテアソーム形成を免疫沈降とウェスタンブロットにより解析した。また、プロテアソームの触媒活性を測定した。

(3)Psmb11変異マウスの作製と表現型解析

3種類のPSMB11 damaging variations (G49S, S80Hfs, A208T)を、CRISPR/Cas9法を用いてマウスゲノムに導入した。マウスPsmb11遺伝子を認識するsgRNAと、置換塩基を含むオリゴDNAを作製し、C57BL/6マウス受精卵にマイクロインジェクションし、偽妊娠マウスに移植することでファウンダー個体を得た。

4~6週齢のマウスから胸腺、脾臓を採取し、細胞を調製して蛍光標識抗体にて染色し、フローサイトメトリーによって解析した。また、酵素処理によって胸腺ストロマ細胞を解離させ、フローサイトメトリーによって胸腺上皮細胞の頻度とMHCクラスI/ペプチド複合体の発現を解析した。 $\beta 5t$ タンパク質の発現解析については、胸腺のタンパク質抽出液を調製し、抗 $\beta 5t$ 抗体にて免疫沈降しウェスタンブロットを行った。

TCRレパトア解析のため、TCR β 鎖（V β 5.2-D β 2-J β 2.6-C β 2）を発現するレトロウイルスベクターを作製し、これをマウス骨髓由来のSca1+細胞に感染させ、放射線照射したホストマウスに移植することで、TCR β レトロジェニックマウスを作製した。移植の5週間後にTCR V β 5+ CD8SP胸腺細胞をソーティングし、Repertoire Genesis社に委託してTCR α の次世代シーケンズ解析を行った。

(4)PSMB11 G49Sと自己免疫疾患の関連解析

G49S variationと疾患との関連を調べるため、高地雄太博士（理化学研究所）、住田孝之博士（筑波大学）、山本一彦博士（理化学研究所）との共同研究により、自己免疫疾患および癌患者の検体を用いてGWAS解析を行い、PSMB11 G49S (rs34457782)の情報を抽出した。

4. 研究成果

(1)PSMB11の高頻度damaging variationはプロテアソーム活性を変化させる

ヒトの20Sプロテアソームを構成する18種類の遺伝子（PSMA1-7, PSMB1-11）についてデータベース検索を行い、variation情報を収集した。Polyphen-2スコア0.95以上のミスセンス変異およびナンセンス変異、フレームシフト、挿入欠失といったタンパク質構造に影響を与えると考えられるvariationを'damaging variation'、Polyphen-2スコア0.95未満のミスセンス変異を'benign variation'と分類した。その結果、PSMB8/ $\beta 5i$ 、PSMB9/ $\beta 1i$ 、PSMB11/ $\beta 5t$ の3遺伝子に、damaging variationが多数かつ高頻度に存在することがわかつ

た。これら3つはMHCクラスI結合ペプチドの生成に必要な「キモトリプシン様活性」をもつ触媒サブユニットである。特に、PSMB11/β5tはdamaging/benignの比が最も高く、機能に影響を与えるvariationに富んでいることが示唆された。

PSMB11/β5tには46種類のアミノ酸変化をもたらすvariationが存在する(Exomeデータベース)。そのうち、比較的高いアレル頻度を示す9種類のvariationについて、293T細胞に発現させプロテアソームのキモトリプシン様活性への影響を調べた。9種類のうち、S80Hfsではβ5tタンパク質の発現が認められなかった。残り8種類のミスセンス変異では、β5tタンパク質が発現しプロテアソーム複合体に組み込まれていることが確認された。G49Sについては、N末端のプロペプチドが野生型とは異なる位置で切断を受け、野生型(28kDa)よりも大きい分子量(30kDa)の異常型として検出された。

さらに、構成されたプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した。Damaging variationのうち4種類のミスセンス変異(G49S, R193C, R238H, A208T)では、キモトリプシン様活性の有意な上昇が認められた。一方、Benign variationの4種類(R115Q, S165N, R169C, A203T)では、キモトリプシン様活性の上昇はみられなかった。これらの結果から、PSMB11/β5tのdamaging variationは胸腺プロテアソームのキモトリプシン様活性に影響を与えることが示唆された。

(2)Psmb11変異マウスcTECにおけるMHCクラスI/ペプチド複合体の変化

アレル頻度が高く(米国で0.4%以上)、プロテアソーム活性を変化させた3種類のdamaging variations(G49S, S80fs, A208T)について、CRISPR/Cas9ゲノム編集法を用いて、当該塩基置換を導入したマウスを作製した。3種類の変異マウスはいずれも、ホモ接合で発生や行動の異常を示さなかった。また、胸腺の発生や組織構造、cTECとmTECの数も正常であった。従って、これらのdamaging variationは過去に研究代表者らが報告したドミナントネガティブ変異(Nitta et al, *EMBO Rep* 2015)とは異なり、cTECの分化を阻害しないことが示された。

変異マウスにおけるβ5tタンパク質の性状を調べるため、胸腺抽出液より抗β5t抗体を用いて胸腺プロテアソームを免疫沈降し、ウェスタンブロットによって解析した。G49Sマウスは、293T細胞の場合と同じく、N末端プロペプチドの異常切断を示した。また、A208Tマウスではβ5tタンパク質の発現が低下しており、S80Hfsマウスではβ5tタンパク質発現が全く検出されなかった。

次に、cTECにおいてMHCクラスIに提示されたペプチドの性状を調べるため、MHCクラスI/ペプチド複合体を認識するモノクローナル抗体(25-D1.16)を用いてフローサイ

トメトリー解析を行った。3種類の変異マウス(G49S, S80Hfs, A208T)いずれにおいても、cTECにおけるMHCクラスI結合ペプチドが変化していることが示された。以上の結果より、これらのdamaging variationsは胸腺プロテアソームのキモトリプシン様活性に影響し、cTECにおけるMHCクラスI結合ペプチドを変化させることが示唆された。

(3)Psmb11変異マウスにおけるCD8 T細胞分化阻害

3種類のPsmb11変異マウス(G49S, S80Hfs, A208T)いずれにおいても、胸腺におけるCD8SP細胞数の有意な減少がみられた。CD4SP細胞数には大きな変化はみられなかった。また、3種類のPsmb11変異マウスでは、脾臓のCD8 T細胞数も有意に減少し、特にCD44-low CD62L-highナイーブCD8 T細胞が顕著に減少していた。これらの表現型は過去に報告されたPsmb11欠損マウスと同じであり、今回調べたdamaging variationは全て機能欠失型であることが示唆された。

(4)G49S variationはCD8 T細胞レパトアのサイズと多様性を低下させる

PSMB11/β5tのdamaging variationの中でもG49S(SNP rs34457782-A)は複数の人種間に共通しており、特に日本人に高頻度に検出される(アレル頻度3%)。そこで、G49SがCD8 T細胞レパトアに与える影響について、変異マウスを用いて解析した。HY-TCR-TgおよびOT-I-TCR Tgマウスを用いた解析から、G49SはCD8 T細胞の正の選択を低下させることがわかった。また、ポリクローナル条件下でCD8 T細胞におけるTCR-Vβ鎖の頻度に変化しており、TCRレパトアの変化が示唆された。さらに、TCR-Vβ鎖レトロジェニックマウスを作製し、次世代シーケンサーを用いてTCR-Vα鎖を網羅的に調べる手法により、G49SマウスにおけるTCRレパトア変化を定量的に解析した。その結果、G49Sマウスでは野生型マウスに比べて、CD8 T細胞における特定のTCRの出現頻度が有意に低下しており、出現頻度が上昇したTCRは検出されなかった。従って、G49S変異はCD8 T細胞レパトアの多様性を低下させることが明らかになった。

(5)G49S variationはシェーグレン症候群のリスクと関連する

G49S variationとヒト疾患との関連を調べるため、高地雄太博士(理化学研究所)、住田孝之博士(筑波大学)、山本一彦博士(理化学研究所)との共同研究により、自己免疫疾患および癌との関連解析を行った。その結果、G49S variationのホモ接合とシェーグレン症候群の発症との間に有意な関連が認められた(Odds ratio 7.15, P=0.00089)。その他の疾患(関節リウマチ、自己免疫性筋炎、癌)に対しては有意な関連はみられなかった。

以上の結果より、ヒトゲノムに高頻度に存在する PSMB11 遺伝子の *damaging variation* は、 $\beta 5t$ タンパク質の構造と胸腺プロテアソームのキモトリプシン様活性を変化させ、本来とは異なる MHC クラス I 結合ペプチドを生成することで、CD8 T 細胞の正の選択を低下させることが示唆された。また、ヒトゲノム関連解析から、PSMB11 G49S は自己免疫疾患のひとつであるシェーグレン症候群の発症リスクと有意に関連することが明らかになった。

これらの成果をまとめ、*Science Immunology* 誌に発表した。抗原ペプチド生成に関わる遺伝子の *variation* が T 細胞レパトアを変化させるという仮説を証明することができた。また、胸腺プロテアソームの *variation* が自己免疫疾患の感受性に影響することを初めて明らかにすることができた。ヒトにおいて G49S のホモ接合が CD8 T 細胞の数や TCR レパトアを変化させるかどうか、および G49S がシェーグレン症候群のリスクを高めるメカニズムについては、今後さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Nitta T, Kochi Y, Muro R, Tomofuji, Y, Okamura T, Murata S, Suzuki H, Sumida T, Yamamoto K, Takayanagi H. Human thymoproteasome variations influence CD8 T cell selection. *Sci Immunol*, 2, eaan5165, 2017. Doi: 10.1126/sciimmunol.aan5165
査読あり

[学会発表] (計 5 件)

1. Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Harumi Suzuki, Hiroshi Takayanagi. 'Human thymoproteasome variations influence CD8 T cell repertoire' 第 46 回日本免疫学会学術集会 2017 年 12 月 13 日
2. 新田 剛「プロテアソームの遺伝的多様性と T 細胞選択・自己免疫疾患」日本リウマチ学会 第 3 回ベーシックリサーチカンファレンス・次世代リーダーセッション 2017 年 10 月 13 日 (招待講演)
3. 新田 剛、高柳 広「プロテアソームの遺伝子多様性による CD8 T 細胞レパトアの変化」第 3 回日本骨免疫学会 2017 年 6 月 28 日
4. Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Harumi Suzuki, Hiroshi Takayanagi. 'Thymoproteasome mutations impact CD8 T cell immunity' 第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 5-7 日
5. 新田 剛、室龍之介、高柳 広「プロテアソーム遺伝子変異による CD8 T 細胞のレパトア変容」日本リウマチ学会ベーシック

リサーチカンファレンス 2016 年 10 月
14-15 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://osteoimmunology.com/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新田 剛 (NITTA, Takeshi)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30373343

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

室 龍之介 (MURO, Ryunosuke)
東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員
研究者番号：80761262