

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15112

研究課題名(和文) Trogocytosis分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of MHC trogocytosis

研究代表者

中山 勝文(Nakayama, Masafumi)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・准教授

研究者番号：20453582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Trogocytosisとは2種類の異なる免疫細胞が接触した際にその接触面に形成される免疫シナプスを介して一方の細胞膜断片が相手側の細胞にダイナミックに移動するという現象である。本研究において我々は樹状細胞(DC)がアポトーシスT細胞からMHCクラスI分子(MHCI)を含む膜断片を速やかに引き抜くことを見出した。Trogocytosisは未熟なphagocytosis機構であると考えられているが、このMHCI細胞間移動は、PS受容体を介するphagocytosis機構に依存しないことも判明した。現在、そのMHCドレス化の分子メカニズムの解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Cross-presentation of dying cell antigens is crucial for the induction and/or regulation of cytotoxic T lymphocytes. This process is mediated by a certain DC subset such as mouse CD8 $\alpha$ + DCs that can efficiently engulf dying cells and present these exogenous antigens with the endogenous MHC class I molecules (MHCI). In addition to this cross-presentation, several recent studies have revealed that DCs can acquire MHCI from neighboring cells, and present the pre-formed antigen peptide-MHCI complexes without requiring any further processing, which is recently called cross-dressing. However, the physiological role of cross-dressing is not fully understood. We here found that trogocytosis of dying cell-derived MHCI by splenic DCs is independent on Tim-3, a phosphatidylserine receptor,-mediated phagocytosis, and that cross-dressing contributes to the early T cell proliferation.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 MHC トロゴサイトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

最近、我々を含む複数の研究グループの報告から、2種類の異なる免疫細胞が接触した際にその接触面に形成される免疫シナプスを介して一方の細胞膜が相手側の細胞にダイナミックに移動するという現象が新たな細胞間コミュニケーション手段として注目され始めている。この現象は trogocytosis (かじりという意味のラテン語 *trogo* に由来) と命名されているが、その分子メカニズムおよび生理的意義について不明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

我々は DC がアポトーシス細胞から速やか(10分以内)に MHC I を引き抜いて身に纏う(ドレス化)することを見出している。DC は免疫応答の司令塔としての重要な役割を持ち、DC 上の MHC I は癌細胞やウイルス感染細胞を攻撃する CD8 陽性 T 細胞の活性化に関わる重要な分子である。そこで本研究では、DC の MHC I trogocytosis 分子機構の解明と生理的意義を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 3-1. トロゴサイトーシス実験

Balb/c マウス(H-2Kd)あるいは機能的 MHC I を欠損している beta-2 microglubuin 欠損(beta2m KO)マウスの脾臓 DC と C57BL/6 マウス(H-2Kb)由来アポトーシス細胞を10分間培養し、CD11c 陽性 DC 上の MHC I H-2Kb タンパクレベルをフローサイトメトリー(BD FACS Accuri C6)および共焦点顕微鏡(Carl Zeiss LSM510)により測定した。

### 3-2. 抗原提示能測定

OT-I マウス[MHC I H-2Kb 上に提示された卵白アルブミン(OVA)ペプチドを特異的に認識する T 細胞受容体トランスジェニックマウス]由来 CD8 陽性 T 細胞を蛍光色素 CFSE で標識し、その CFSE 蛍光強度の減弱度を FACS で測定することにより T 細胞増殖を評価した。In vitro 実験では、DC と共培養した後に測定した。In vivo 実験では、マウスに静注移入した CFSE 標識 OT-I CD8 陽性 T 細胞の脾臓での CFSE 蛍光強度を測定した。

## 4. 研究成果

始めに我々は、樹状細胞(DC)によるアポトーシス細胞貪食機構を解析する過程において、多くの DC がアポトーシス細胞を貪食するのではなく、アポトーシス細胞由来 MHC I を含む膜断片を捉えていることを共焦点顕微鏡解析により観察した。我々は既に多くの免疫細胞間で細胞接触依存的に細胞膜が移

動する現象(trogocytosis)を見出しており(Nakayama et al, PNAS, 2011; Nakamura, Nakayama et al, PNAS, 2013)、今回もその trogocytosis を介してアポトーシス細胞 MHC I が DC に移動しているか否かを解析した。

具体的に、この移動は10分間以内の短時間で認められたこと、そしてトランスウェル培養により2つの細胞間接触を阻害した場合は24時間後でも認められなかったことから、アポトーシス細胞 MHC I の DC への移動は trogocytosis を介していることが示唆された。

アポトーシス細胞は膜断片が形成され、その膜断片上にはホスファチジルセリン(PS)が表出している。そのため、PS 受容体が trogocytosis に関与しているか否かを解析した。我々は既にマウス脾臓 CD8alpha+ DC の PS 受容体として Tim-3 が機能すること報告しているが(Nakayama et al, Blood, 2009)、Tim-3 欠損 CD8alpha+ DC においても野生型 CD8alpha+ DC と同様の MHC I ドレス化が認められた。マウス脾臓 CD8alpha- DC サブセットは、アポトーシス細胞の貪食能を持たないが、MHC I ドレス化は CD8alpha+ DC と同様に CD8alpha- DC にも認められた。これらの結果は、アポトーシス細胞由来 MHC I の DC への trogocytosis 機構は、PS 受容体を介する phagocytosis 機構とは異なることを示唆する。

つぎに我々は、このドレス化 MHC I の抗原提示能について解析した。C57BL/6 マウス(H-2Kb)由来アポトーシス細胞から H-2Kb を獲得した beta2m KO マウス由来 DC に OVA ペプチドを添加し、OT-I CD8+ T 細胞と共培養した結果、顕著な T 細胞増殖が認められた。次に beta2m KO マウスに OT-I CD8+ T 細胞を移入し、その翌日に OVA タンパクを導入した C57BL/6 マウスアポトーシス脾細胞を移入した結果、脾臓において顕著な OT-I CD8+ T 細胞増殖が認められた。このときの比較対象として、beta2m KO アポトーシス細胞を beta2m KO マウスに移入した際は OT-I CD8+ T 細胞が全く認められないこと、一方、beta2m KO アポトーシス細胞を野生型 C57BL/6 マウスに移入した際は cross-presentation 機構により OT-I CD8+ T 細胞が増殖することを確認した。以上の結果は、CD8+ T 細胞の初期の細胞増殖にドレス化 MHC I が関与していることを示唆する。現在、その MHC ドレス化の分子メカニズムの解析を進めている。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- (1) Nakayama M. Macrophage recognition of crystals and nanoparticles. *Front. Immunol.* 9, 103, 2018 (査読有)
- (2) Isshiki T, Akiba H, Nakayama M, Harada N, Okumura K, Homma, S, and Miyake S. Cutting Edge: Anti-TIM-3 treatment exacerbate pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J. Immunol.* 199, 3733-3737, 2017 (査読有)
- (3) Funamoto K, Yoshino D, Matubara K, Zervantonakis IK, Funamoto K, Nakayama M, Masamune J, Kimura Y, and Kamm RD. Endothelial monolayer permeability under controlled oxygen tension. *Integr. Biol.(Camb.)* 19, 529-538, 2017 (査読有)
- (4) Tsugita M, Morimoto N, and Nakayama M. SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles synergistically trigger macrophage inflammatory responses. *Part. Fibre Toxicol.* 14:11, 2017 (査読有)
- (5) Tsugita M, Morimoto N, Tashiro M, Kinoshita K, and Nakayama M. SR-B1 is a silica receptor that mediates canonical inflammasome activation. *Cell Rep.* 18, 1298-1311, 2017 (査読有)  
*This article was selected by the Faculty of 1000 as an article of special significance in biology and medicine.*
- (6) Takeda K, Nakayama M, Hayakawa Y, Kojima Y, Ikeda H, Imai N, Ogasawara K, Okumura K, Thomas DM, and Smyth MJ. IFN-gamma is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoediting. *Nature Commun.* 8:14607, 2017 (査読有)
- (7) Morimoto N, Wakamura M, Muramatsu K, Toita S, Nakayama M, Shoji W, Suzuki M, and Winnik FM. Membrane translocation and organelle-selective delivery steered

by polymeric zwitterionic nanospheres. *Biomacromolecules.* 17, 1523-1535, 2016 (査読有)

- (8) Sonofuchi K, Hagiwara Y, Koizumi Y, Chiba A, Kawano M, Nakayama M, Ogasawara K, Yabe Y, and Itoi E. Quantitative in vivo biocompatibility of new ultralow-nickel cobalt-chromium-molybdenum alloys. *J. Orthop. Res.* 34, 1505-1513, 2016 (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Nakayama M Recognition of nanoparticles and crystals by scavenger receptors. 11th Meeting of the Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium 2018年1月 大阪
  - (2) Nakayama M Identification of a silica receptor associate with canonical inflammasome activation The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2017年12月 仙台
  - (3) 中山勝文 SR-B1 はシリカ粒子認識およびインフラマソーム活性化に関する 第26回日本 Cell Death 学会学術集会 2017年7月 東京
  - (4) Isshiki T, Akiba H, Nakayama M, Harada N, Okumura K, Miyake S TIM-3 regulates pulmonary fibrosis through apoptotic cell clearance. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2016年12月 沖縄
- 〔図書〕(計3件)
- (1) 中山勝文 第11章 CD8陽性エフェクターT細胞の分化と機能 翻訳 細胞分子免疫学(原著 Cellular and Molecular Immunology 9<sup>th</sup> Edition)中尾篤人監訳 エルゼビアジャパン 2018年3月
  - (2) 中山勝文 新規シリカ受容体の同定 臨床免疫・アレルギー科 科学評論社 68巻 p544-549, 2017年
  - (3) 中山勝文 Trogocytosis による免疫調節機構 臨床免疫・アレルギー科 科学評論社 68巻 p544-549, 2017年

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fris.tohoku.ac.jp/researcher/creative/nakayama.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

中山 勝文 (NAKAYAMA MASAFUMI)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・

准教授

研究者番号：20453582

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )