

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 6 月 20 日現在

機関番号：94508

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21219

研究課題名（和文）小胞体ストレスと抗原のクロスプレゼンテーションの関連と膠原病の発症機序の解明研究

研究課題名（英文）Studies on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus mediated by endoplasmic reticulum stress and antigen cross-presentation

研究代表者

積山 賢（Tsumiyama, Ken）

株式会社膠原病研究所・研究部・主任研究員

研究者番号：20514607

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000 円

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレスに着目し、樹状細胞（DC）における抗原のクロスプレゼンテーションとの関連を解明することで、全身性エリテマトーデス（SLE）の発症機序を解明することを目的として、研究を行った。その結果、SLEの発症時において、DCでは小胞体ストレス応答が働いていた。また、小胞体ストレスはDC内のエンドソームに存在するSec61を増加させ、これにより細胞質に放出される抗原が増加することで抗原のクロスプレゼンテーションが促進された。これらのことから、小胞体ストレスはDCにおけるSec61を増加させて抗原のクロスプレゼンテーションを促進し、SLEの組織傷害に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、難病であるSLEの発症メカニズムの一端を明らかにすることができた。この中で、これまで明らかではなかった抗原のクロスプレゼンテーションの意義として、SLEの発症に関与することを示すことができた。また、細胞の恒常性を維持する機構である小胞体ストレス応答が、SLEの発症に関与することが示された。これにより、小胞体ストレス応答関連分子を標的としたSLEの治療の可能性が示されたと考える。

研究成果の概要（英文）：We examined the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) by studying the contribution of the endoplasmic reticulum (ER) stress to antigen cross-presentation in DC. We found that the expression of unfolded protein response (UPR)-related molecules were increased in DC of mice when SLE was induced. Further, ER stress increased endosomal Sec61 in DC thereby increasing the amount of antigen accumulated in the cytoplasm and promoting antigen cross-presentation. Thus, ER stress increased endosomal Sec61 thereby contributing to the induction of lupus tissue injury by facilitating antigen cross-presentation.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：全身性エリテマトーデス（SLE） 小胞体ストレス 抗原のクロスプレゼンテーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルスなどの内因性抗原は MHC (major histocompatibility complex) クラスにより、一方で外来抗原は MHC クラスにより提示されるという本来の様式とは異なる「クロスプレゼンテーション」は、重要性が注目されながらも、その医学的意義は不明であった。ウイルス免疫や腫瘍免疫において、その必要性が報告されているが、詳細な経路や重要分子等を含めて、その全容は未だ解明されていない。

私達はこれまでに、樹状細胞 (DC) における抗原のクロスプレゼンテーションが全身性エリテマトーデス (SLE) の発症に必須であることを発見した (Tsumiyama *et al.* PLoS One 4:e8382, 2009)。その証拠は、

- ・ 外来抗原を繰り返し投与すると、健常マウスに SLE の発症が誘導された。
- ・ 糸球体腎炎の成因は免疫複合体だけでは不十分で、エフェクターとして細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が組織を傷害することを示した。また、健常マウスに CTL を移入すると腎炎が発症した (Tsumiyama *et al.* J Immunol 191;91, 2013)。
- ・ 抗原のクロスプレゼンテーションが促進されることで CTL が生成した。一方で抗原のクロスプレゼンテーションを阻害すると CTL は増加せず、腎炎は抑制された。

そこで、抗原のクロスプレゼンテーションについて検討を行ったところ、トランスロコンとして知られる Sec61 が重要分子であることを見出した。SLE を発症したマウスでは、エンドソームに存在する Sec61 が増加し、抗原がエンドソームから細胞質に移行する経路が促進されてクロスプレゼンテーションが強く起こり、これが SLE の発症において重要なステップになることを突き止めた。しかし、Sec61 がエンドソームにおいて増加する機構は解明できていない。

一方、細胞内動態や代謝の変調、生体機能の恒常性の異常の原因として、小胞体ストレスが注目されている。小胞体内のカルシウムの枯渇や細胞への酸化ストレス、変異タンパク質の発現、低グルコース状態や低酸素状態などの様々な生理的ストレスによって、正常な構造に折り畳まれなかった変性タンパク質が小胞体に蓄積し、これによって細胞はアポトーシスに陥り、延いては糖尿病や神経変性疾患などが惹き起こされることが報告されている。しかし私達の身体には、この変性タンパク質によるストレスを回避する機能として、小胞体ストレス応答が備わっている。その機構は、PERK や ATF6、IRE1 などのストレスセンサー分子が変性タンパク質を感知すると、タンパク質の翻訳量を低下させることで小胞体におけるタンパク質の折り畳みを軽減したり、熱ショックタンパク質 (HSP) などの分子シャペロンタンパク質の量を増やすことで折り畳み機能を向上させたり、変性タンパク質の除去機構である小胞体関連分解 (ERAD) を活性化して変性タンパク質自体を除去することで、小胞体ストレスを取り除くように働く。

ここで、上述の Sec61 は ERAD に属し、変性タンパク質を小胞体から細胞質に放出するためのチャネルとして働く。また、分子シャペロンタンパク質である HSP90 は抗原のクロスプレゼンテーションに関わることが報告されている (PNAS 108;16363, 2011)。このように、小胞体ストレス応答に関与する分子の一部は、抗原のクロスプレゼンテーションにも関与していることが考えられ、実際に小胞体ストレス応答の IRE1 を介する経路に属する XBP1 の欠損により、抗原のクロスプレゼンテーションが抑制されることが報告されている (Nature 15;248, 2014)。しかし、小胞体ストレス応答がどのように抗原のクロスプレゼンテーションに関わるかは明らかにされていない。更に、SLE の発症を誘導する方法として私達が見出した外来抗原の繰り返し投与は、個体に強い生理的ストレスを与えていると考えられ、これにより小胞体ストレス応答が働いていることが推察された。

上記の経緯から、SLE での組織傷害を誘導する抗原のクロスプレゼンテーションの促進には、小胞体ストレスが関与すること、特に Sec61 がエンドソームにおいて増加する過程に小胞体ストレス応答が関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、小胞体ストレスおよび小胞体ストレス応答が抗原のクロスプレゼンテーションの促進に関与することで、SLE の発症に寄与するか否かを明らかにすることを目的とした。これを達成するために、

- (1) SLE の発症において、小胞体ストレス応答が働いているか
- (2) 小胞体ストレスはどのように抗原のクロスプレゼンテーションに関わるか
- (3) 小胞体ストレスは SLE の発症に関与するか
- (4) Sec61 と相互作用する分子の探索

の 4 点について検討を行った。

このように、小胞体ストレスおよび小胞体ストレス応答に着目して抗原のクロスプレゼンテーションの機構を解明することで、抗原のクロスプレゼンテーションの医学的意義、すなわち SLE の発症を誘導する機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) SLE の発症において、小胞体ストレス応答が働いているか

マウスに外来抗原として卵白アルブミン (OVA) を繰り返し投与し、SLE の発症を誘導し、このマウスの DC における小胞体ストレス誘導分子および小胞体ストレス応答関連分子の発現、

活性化を検出することで、SLE の発症において小胞体ストレス応答が働いているか、またどのような分子および経路が活性化しているのかを検討した。

マウスへの SLE の発症誘導 (PLoS One 4:e8382,2009)

マウスに OVA を繰り返し投与し、SLE の発症を誘導した。

DC の単離

磁気ビーズを用い、CD11c をマーカーとして、マウスの脾臓から DC を単離し、全細胞タンパク、核タンパクを抽出した。

各分子の検出

a. 全細胞タンパクを用いて、Bip、PERK、IRE1 alpha をウエスタンブロットにより検出し、各分子の発現量を解析した。

b. 全細胞タンパクを用いて、リン酸化 eIF2alpha をウエスタンブロットにより検出し、分子の活性化を解析した。

c. 核タンパクを用いて、XBP1 をウエスタンブロットにより検出し、分子の活性化による核内移行を解析した。

(2) 小胞体ストレスはどのように抗原のクロスプレゼンテーションに関わるか

骨髄由来 DC (BMDC) を用い、この DC に小胞体ストレスを与えた場合、どのように抗原のクロスプレゼンテーションに作用するか、また私達が着目している分子である Sec61 の挙動に影響を及ぼすかを検討した。

BMDC の作製 (J Exp Med 176:1693, 1992、J Immunol Methods 223:77, 1999)

定法に従い、マウスの骨髄細胞を GM-CSF で刺激培養し、磁気ビーズを用いて CD11c 陽性の細胞を単離し、これを BMDC として用いた。

小胞体ストレスの負荷、および小胞体ストレス応答の誘導

小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを BMDC と共に培養し、小胞体ストレス応答を誘導した。上述 (1) - と同様の検討を行い、BMDC に小胞体ストレス応答が誘導されたことを確認した。

小胞体ストレスによる Sec61 の挙動変化の検討

上記 の処理を行った BMDC から全細胞タンパクを抽出し、エンドソームマーカーEEA1 に対する抗体で免疫沈降を行い、Sec61 をウエスタンブロットにより検出した。これにより、エンドソームに存在する Sec61 の量を解析し、小胞体ストレスがエンドソームに存在する Sec61 の増加に関与するかを検討した。

抗原の細胞内局在の検討

これまでの先行研究から、BMDC に取り込まれた抗原は、エンドソームから細胞質に移行するが、小胞体ストレスを負荷した BMDC を用いた場合では、このステップにおいて抗原がどのような挙動を示すのかを検討した。上記 の処理を行った BMDC と OVA を培養後、細胞質タンパクを抽出し、細胞質内に存在する OVA をウエスタンブロットにより検出した。

(3) 小胞体ストレスは SLE の発症に関与するか

マウスに OVA を繰り返し投与して SLE の発症を誘導する際に、小胞体ストレス誘導剤を投与し、これらのマウスにおける組織傷害の程度および CTL の生成を解析した。これにより、小胞体ストレスと抗原のクロスプレゼンテーションの関連を *in vivo* で解析し、SLE の発症における小胞体ストレスの関与を検討した。

マウスへの SLE の発症誘導 (PLoS One 4:e8382,2009) と薬剤の投与

マウスに OVA を繰り返し投与し、SLE の発症を誘導した。その際、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを OVA と共に投与した。

組織傷害の検討

組織傷害として、糸球体腎炎を評価した。呈色反応による半定量試験紙を用いてタンパク尿を検出した。

CTL の検出

細胞内染色により脾臓の IFN γ 産生 CD8 T 細胞をフローサイトメーターで検出した。

DC における抗原のクロスプレゼンテーション能力の検討

の処置を行った各マウスの脾臓から、(1) - と同様に DC を単離し、(2) - および同様の検討を行った。SLE 発症時において、DC では抗原のクロスプレゼンテーションが亢進していることを私達は報告しているが (PLoS One 4:e8382,2009)、SLE の発症誘導と共に小胞体ストレスを負荷したマウスの DC では、Sec61 の発現量や DC 内に取り込まれた抗原の局在に変化があるかを解析した。

(4) Sec61 と相互作用する分子の探索

私達が抗原のクロスプレゼンテーションにおける重要分子として着目している Sec61 が、どのような分子と相互作用しているのかを検討するため、Sec61 の免疫沈降を行い、質量分析によって Sec61 と相互作用している分子の同定を試みた。

マウスへの SLE の発症誘導 (PLoS One 4:e8382,2009)

マウスに OVA を繰り返し投与し、SLE の発症を誘導した。

DC の単離

磁気ビーズを用い、CD11c をマーカーとして、マウスの脾臓から DC を単離し、全細胞タンパクを抽出した。

Sec61 の免疫沈降および質量分析

のタンパクを用いて Sec61 の免疫沈降を行った。免疫沈降後のサンプルを質量分析し、Sec61 と共沈した分子を同定した。

4 . 研究成果

(1) SLE の発症において、小胞体ストレス応答が働いているか

OVA の繰り返し投与により SLE を発症したマウスの DC では、Bip、PERK、IRE1 alpha、リン酸化 eIF2 alpha の発現が増加し、また XBP1 の核内移行が増加していた。このことから、SLE の発症時に DC において小胞体ストレス応答が働いていることが分かった。

(2) 小胞体ストレスはどのように抗原のクロスプレゼンテーションに関わるか

ツニカマイシンとの培養により小胞体ストレスを負荷した BMDC では、EEA1 と共沈降する Sec61 が増加した。また、この BMDC を更に OVA と培養し、細胞質に存在する OVA を検出した。その結果、細胞質に存在する OVA が増加した。これらのことから、小胞体ストレスはエンドソームに存在する Sec61 を増加させ、これにより細胞質に放出される抗原が増加して抗原のクロスプレゼンテーションが促進されることが示唆された。

(3) 小胞体ストレスは SLE の発症に関与するか

マウスに SLE の発症を誘導する際に、小胞体ストレス誘導剤を投与し、これらのマウスにおける組織傷害の程度を評価する予定であったが、本検討のターゲット細胞である DC 以外の細胞への小胞体ストレス誘導剤の影響が見られ、小胞体ストレスによる DC での抗原のクロスプレゼンテーションの増強と SLE の発症を正しく評価することができなかった。

(4) Sec61 と相互作用する分子の探索

質量分析により Sec61 と相互作用する分子として、proteasome や aminopeptidase、cathepsin 等のタンパク質分解関連分子、Rab や Rap-1 等の低分子 G タンパク質関連分子、H-2Kd や tapasin 等の MHC クラス I 関連分子が同定された。以上より、小胞体ストレスにより増加した Sec61 はこれらの分子と相互作用することで抗原のクロスプレゼンテーションを増強させ、これにより CTL を増加させて SLE の組織傷害に関与していることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

Tsumiyama K, Shoizawa S.

Endoplasmic reticulum stress induces lupus kidney disease by facilitating antigen cross-presentation via the increase of endosomal Sec61.

アメリカリウマチ学会 2016、2016 年

Tsumiyama K, Shoizawa S.

Endoplasmic reticulum stress facilitates antigen cross-presentation by increasing endosomal Sec61 to generate lupus kidney disease.

第 45 回日本免疫学会総会・学術集会、2016 年

積山賢、塩沢俊一

小胞体ストレスは抗原のクロスプレゼンテーションを促進して SLE の組織傷害を引き起こす

第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017 年

〔その他〕

ホームページ等

<https://irdbio.co.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。