

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08273

研究課題名(和文) 活性化樹状細胞の抗原提示レベルを制御する細胞内小胞輸送機構の解明

研究課題名(英文) Intracellular trafficking mechanisms regulating the level 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞は主要組織適合抗原クラスII(MHC-II)を介して、病原体成分をT細胞に提示することで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。これまでに、MHC-IIが活性化T細胞のTCRによって架橋されると、細胞内へのエンドサイトーシスが誘導されることを見出している。本研究ではMHC-IIの架橋が誘導するシグナル伝達機構を解析した。解析の結果、MHC-IIの架橋はSyk/PLCの活性化を介してカルシウム流入を誘導し、その結果PKCの活性化を介したクラスリン依存性のエンドサイトーシスを誘導することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、MHC-IIの細胞表面からのダウンレギュレーション機構として、カルシウム流入によるPKCの活性化を介した、クラスリン依存性のエンドサイトーシスという新たなMHC-IIのエンドサイトーシスを誘導する機構が明らかとなった。今後、MHC-IIの発現異常の関連する疾患において、MHC-IIの発現調節の標的となる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells induce an immune response by presenting pathogen-derived antigens to T cells by major histocompatibility antigen class II (MHC-II). The cell surface expression level of MHC-II is a regulator of the immune response. We have previously found that crosslinking of MHC-II by the TCR of activated T cells induces endocytosis of MHC-II. In this study, we analyzed the signaling mechanism induced by MHC-II crosslinking. We found that crosslinking of MHC-II induces calcium influx via activation of Syk/PLC, resulting in clathrin-dependent endocytosis of MHC-II mediated with PKC activation.

研究分野：生化学・細胞生物学

キーワード：樹状細胞 MHC-II エンドサイトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞は生体内に侵入した病原細菌などの外来性抗原を細胞内に取り込み、抗原由来ペプチドを主要組織適合抗原クラス II (MHC-II)との複合体として細胞表面に提示する。それを特異的な T 細胞が認識し活性化ことで、獲得免疫応答が開始される。MHC-II の発現調節は免疫応答の誘導に重要であるが、その調節機構には不明な点が多く残されている。私達はこれまでに、樹状細胞表面に発現する MHC-II が、活性化 T 細胞の発現する TCR と相互作用すると、MHC-II がクロスリンクされ、エンドサイトーシスされることで細胞表面 MHC-II の発現量が低下し、その結果、樹状細胞の T 細胞活性化能が低下することを見出していた。これらの知見から、TCR との相互作用によって樹状細胞内に何らかのシグナルが誘導され、MHC-II のエンドサイトーシスが促進される可能性が考えられた。しかしながらそのシグナル伝達の実態は不明であった。

2. 研究の目的

研究開始当初において、樹状細胞において MHC-II のクロスリンクによって細胞内へのカルシウム流入が誘導されること、細胞内カルシウムキレート剤処理によってクロスリンクによる MHC-II のエンドサイトーシスが抑制されることを見出しており、MHC-II のエンドサイトーシスには細胞内へのカルシウムの流入が必要であると考えられた。しかしながら、エンドサイトーシスが誘導される詳細なシグナル伝達、およびエンドサイトーシス機構は未だ不明であった。そこで、本研究では、MHC-II の発現調節機構の解明を目的とし、特に MHC-II のエンドサイトーシスを誘導するシグナル伝達、およびエンドサイトーシスの分子メカニズムの解析を目的として検討を行った。

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%)、2-メルカプトエタノール、マウス GM-CSF を含む RPMI-1640 培地で 7-8 日間培養し、得られた細胞を BMDC として用いた。

(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で MHC-II の発現量を測定した。

(3) イムノブロットによるリン酸化 Syk の検出：BMDC に抗 MHC-II 抗体を氷上で結合させた後、抗マウス IgG 抗体を含むメディウム中で、37°C、0 分間、2 分間、5 分間、10 分間インキュベートした。その後、これらの細胞を、細胞破砕液に懸濁し、氷上 15 分静置後遠心し上清を得た。これらのサンプルについて、SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜に転写した。一次抗体として抗 Phospho-Syk (Tyr525/526)抗体、抗 Syk 抗体を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体を用いてイムノブロット法で検出した。ペルオキシダーゼ活性は、ECL 化学発光試薬を用いて検出した。

(4) 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。

(5) 蛍光抗体法による MHC-II とクラスリンの共局在の観察：BMDC に抗 MHC-II 抗体を氷上で結合させた後、蛍光標識二次抗体を氷上で結合させた。この細胞を 37°C で 0 分、2 分、5 分、10 分インキュベート後、固定液による細胞の固定、可溶化を行った。その後、抗クラスリン重鎖抗体および、蛍光標識二次抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

4. 研究成果

(1) MHC-II のカルシウム流入における Syk および PLC の役割

MHC-II のクロスリンクによって誘導されるエンドサイトーシスにおける Syk および PLC の役割を解析するために、それぞれの阻害剤の効果を検討した。その結果 Syk および PLC の阻害剤はクロスリンクによる MHC-II のエンドサイトーシスを阻害した(図 1)次に細胞内カルシウム流入における Syk および PLC の役割の解析を行った。その結果、Syk 阻害剤である、piceatannol、PLC 阻害剤である U73122 によってクロスリンクによる細胞内カルシウム流入が抑制されたこの結果より、MHC-II のクロスリンクによるカルシウム流入は Syk/PLC を介すると考えられた(図 1)。

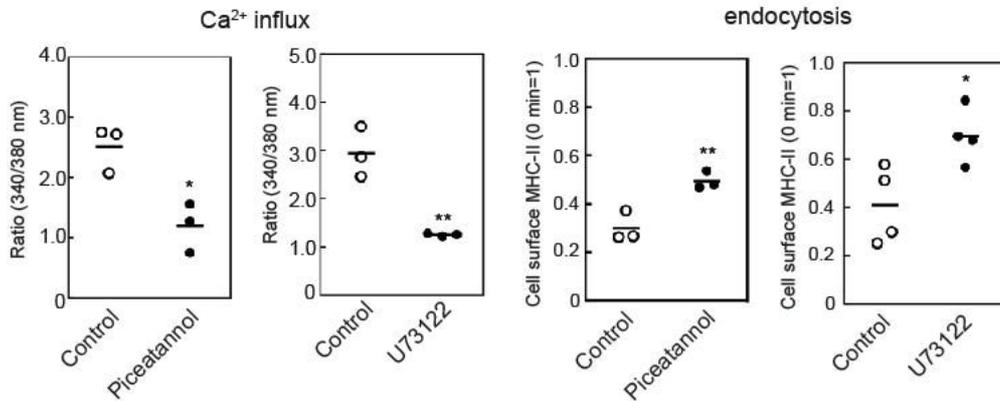


図1. MHC-IIのクロスリンクの誘導するエンドサイトーシスとカルシウム流入に対する阻害剤の作用 (引用文献1より引用)

(2) MHC-IIのクロスリンクによる Syk の活性化

次に BMDC において MHC-II のクロスリンクによる Syk の活性化を検討した。MHC-II のクロスリンク後の Syk のリン酸化をイムノブロットによって検討したところ、クロスリンクによる Syk のリン酸化が亢進した。この結果より、MHC-II のクロスリンクは Syk の活性化を誘導すると考えられた (図2)。

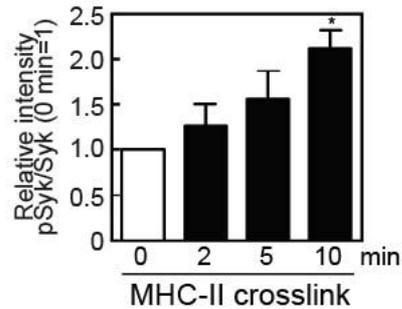


図2 MHC-IIのクロスリンクによる Syk のリン酸化

(3) MHC-II エンドサイトーシスにおける PKC の役割

PLC の活性化はジアシルグリセロール産生と細胞質カルシウム流入の誘導によって PKC を活性化することが知られている。そこで PKC 活性化剤である TPA およびカルシウムイオノフォア A23187 処理が MHC-II のエンドサイトーシスを誘導するかを検討したところ、これらの処理はエンドサイトーシスを促進した (図3)。また、PKC 阻害剤である staurosporine および GF109203X によって、クロスリンクによる MHC-II のエンドサイトーシスが抑制された (図3)。

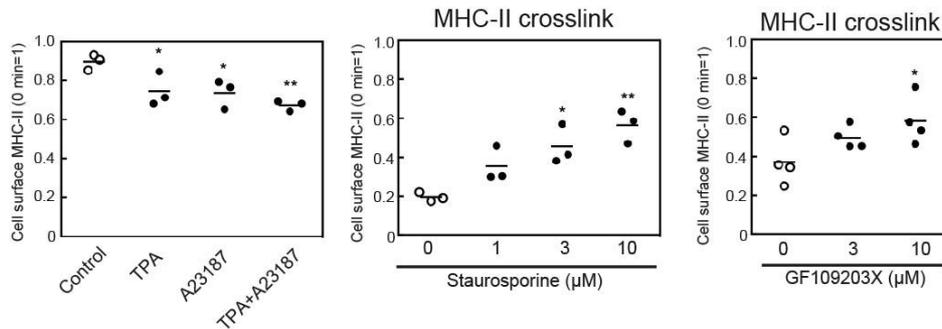


図3. MHC-IIのエンドサイトーシスへの PKC の関与 (引用文献1より引用)

(4) クロスリンクが誘導する MHC-II エンドサイトーシスにおけるクラスリンの役割

膜タンパク質のエンドサイトーシス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。蛍光抗体法によってクロスリンク後の MHC-II とクラスリンの局在を観察し、共局在を解析し定量した。その結果、クロスリンク後2分および5分では、MHC-II のクラスリンとの共局在が観察された。一方、10分後には、MHC-II は細胞内に局在し、クラスリンとの共局在は観察されなくなった。Chlorpromazine 処理した細胞においては MHC-II の細胞内への取り込み、および、クラスリンと MHC-II の細胞表面付近での共局在は観察されなかった (図4)。

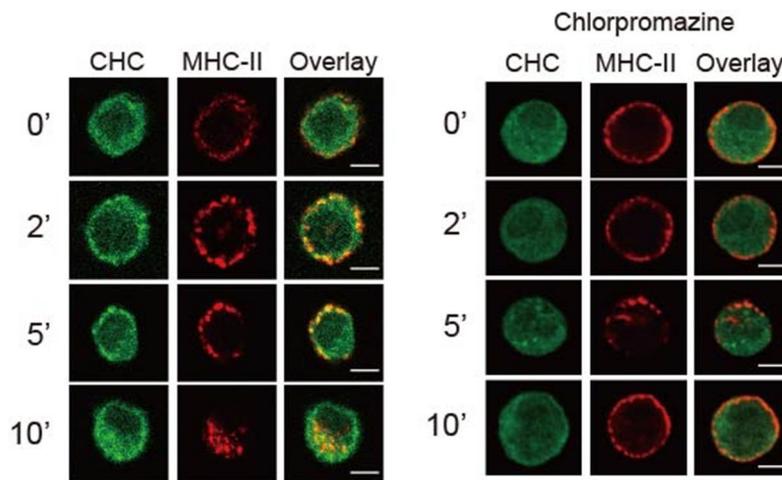


図4. MHC-IIのクロスリンク後のMHC-IIの細胞内局在 (引用文献1より引用)

(5) MHC-IIのクロスリンクは Syk/PLC の活性化を介してカルシウム流入を誘導し、その結果活性化される PKC によって MHC-II のクラスリン依存性エンドサイトーシスが誘導されると考えられた (図5)。

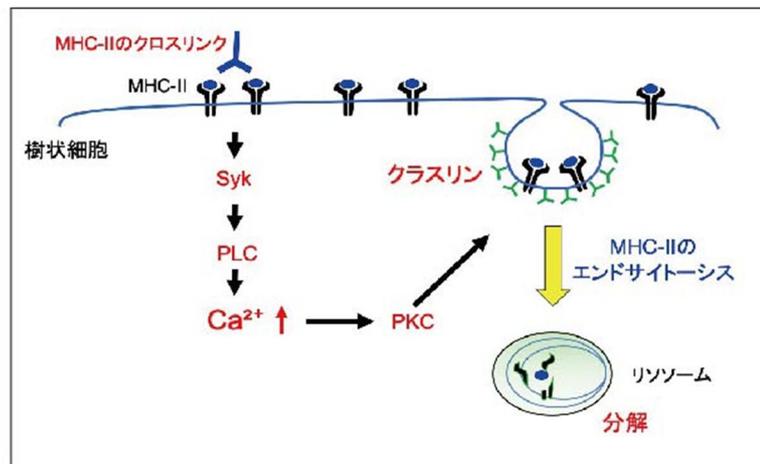


図5. MHC-IIのクロスリンクによるエンドサイトーシス誘導機構

< 引用文献 >

1. Masaki K, Hiraki Y, Onishi H, Satoh Y, Roche PA, Tanaka S, Furuta K. Ligation of MHC Class II Induces PKC-Dependent Clathrin-Mediated Endocytosis of MHC Class II. *Cells.*, 9(8), 1810, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kento Masaki, Yuhji Hiraki, Hiroka Onishi, Yuka Satoh, Paul A Roche, Satoshi Tanaka, Kazuyuki Furuta	4. 巻 30
2. 論文標題 Ligation of MHC Class II Induces PKC-Dependent Clathrin-Mediated Endocytosis of MHC Class II	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9081810.	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 該当する
1. 著者名 Aya Kakinoki, Tsuyoshi Kameo, Shoko Yamashita, Kazuyuki Furuta, Satoshi Tanaka	4. 巻 21
2. 論文標題 Establishment and Characterization of a Murine Mucosal Mast Cell Culture Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21010236.	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 -
1. 著者名 Matsuo Yoshimi, Yanase Yuhki, Irifuku Reiko, Takahagi Shunsuke, Mihara Shoji, Ishii Kaori, Kawaguchi Tomoko, Tanaka Akio, Iwamoto Kazumasa, Watanuki Haruka, Furuta Kazuyuki, Tanaka Satoshi, Inoue Asuka, Aoki Junken, Hide Michihiro	4. 巻 73
2. 論文標題 Neuromedin U directly induces degranulation of skin mast cells, presumably via MRGPRX2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2256 ~ 2260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.13555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kamei Miho, Otani Yukie, Hayashi Hidenori, Nakamura Tadaho, Yanai Kazuhiko, Furuta Kazuyuki, Tanaka Satoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Suppression of IFN- Production in Murine Splenocytes by Histamine Receptor Antagonists	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4083 ~ 4083
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19124083	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 -

1. 著者名 Uchida Ryota, Egawa Tomonori, Fujita Yoshio, Furuta Kazuyuki, Taguchi Hiroaki, Tanaka Satoshi, Nishida Keigo	4. 巻 105
2. 論文標題 Identification of the minimal region of peptide derived from ADP-ribosylation factor1 (ARF1) that inhibits IgE-mediated mast cell activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 32 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molimm.2018.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Keiko, Sato Hitomi, Sakamaki Kazuma, Kamada Mayumi, Okuno Yasushi, Fukuishi Nobuyuki, Furuta Kazuyuki, Tanaka Satoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Suppression of IgE-Independent Degranulation of Murine Connective Tissue-Type Mast Cells by Dexamethasone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 112 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8020112	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤 結香、古田 拓巳、黒田 真弘、田中 智之、古田 和幸
2. 発表標題 Rab11の活性化を介した主要組織適合抗原クラスIIの細胞表面発現制御
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 政木 健人、平木 勇次、田中 智之、古田 和幸
2. 発表標題 細胞内カルシウム流入が誘導する主要組織適合抗原クラスIIのエンドサイトーシス機構の解析
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会・第19回日本蛋白質科学会年会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古田和幸、佐藤結香、黒田真弘、田中智之
2. 発表標題 Rab11-mediated regulation of cell-surface MHC-II on dendritic cells
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学科 第51回日本発牛生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古田和幸、政木健人、平木勇次、田中智之
2. 発表標題 樹状細胞におけるPKC活性化を介したMHC-IIのエンドサイトーシスの促進
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古田和幸、佐藤結香、黒田真弘、田中智之
2. 発表標題 Rab11による樹状細胞のMHC-II発現調節機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古田和幸、大野恵理子、田中智之
2. 発表標題 樹状細胞におけるヒスタミン産生誘導とその機能の解析
3. 学会等名 第21回日本ヒスタミン学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤結香、黒田真弘、田中智之、古田和幸
2. 発表標題 主要組織適合抗原クラスIIの細胞表面発現調節におけるRab11の役割の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio 2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

分子生物学分野 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/bunsei/

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

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
---------	---------