

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06631

研究課題名(和文)細胞傷害性T細胞への抗原提示を決定する新たな小胞体分子シャペロンの同定

研究課題名(英文) Identification of endoplasmic reticulum molecular chaperones to determine antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes

研究代表者

松井 政則 (Matsui, Masanori)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50199741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：1個のアミノ酸置換(H74L)を持つHLA-A2変異分子HLA-A2-H74Lが、細胞傷害性T細胞(CTL)へ抗原提示できない現象を発見した。これは、未知の小胞体分子シャペロンが、HLA-A2-H74Lとうまく相互作用できないためだと推測された。最近同定された分子TABPBRが、その特性から、この現象に關与している可能性が高いと考え解析を行なった。TABPBRをノックアウトしたヒト細胞株を作製し、HLA-A2の抗原提示を解析した結果、抗原提示能が若干ながら低下していることが明らかになった。従って、TABPBRがHLA-A2の抗原提示に重要な役割をしているということが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞傷害性T細胞(CTL)は、がん細胞やウイルス感染細胞の排除に極めて重要な役割を果たしている。従って、その誘導を行う抗原提示機構を理解する事は重要である。本研究では、新規小胞体分子シャペロン、TABPBRの抗原提示における重要性が示唆された。この分子シャペロンは抗原提示能を促進すると考えられるので、がんやウイルス感染症に対する新しいCTL誘導型ワクチンに利用できるであろう。さらに、治療薬・治療法の標的分子となりえる。このように、本研究結果は学術的に高い意味を持つとともに、ワクチンなど臨床応用も期待でき、社会的に大きな意義を持つと思われる。

研究成果の概要(英文)：The HLA-A2 mutant molecule HLA-A2-H74L with one amino acid substitution from Histidine to Leucine at position 74 fails to present antigen to cytotoxic T cells because it does not bind to endogenously processed antigenic peptides. This phenomenon is thought to be due to the lack of the interaction between HLA-A2-H74L and an unknown molecular chaperone in the ER, which may assist to exchange from self-peptides to antigenic peptides.

We attempted to identify this molecule using immunoprecipitation and mass spectrometry, but we failed. At that time, a new molecular chaperone, TABPBR, was identified. Due to its properties, it is highly possible that the molecular chaperone in question is TABPBR. The analysis of a human cell line in which TABPBR was knocked out by the CRISPR/Cas9 method revealed the antigen-presenting ability of the cell line was slightly reduced, suggesting a critical role of TABPBR in the antigen presentation associated with HLA class I.

研究分野：免疫学 ウイルス学

キーワード：細胞傷害性T細胞 HLAクラスI 抗原提示 分子シャペロン 小胞体 アジュバント TABPBR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、がん免疫療法は、第4のがん治療法として大いに期待されている。その中心は、がん細胞を攻撃する細胞傷害性T細胞(CTL)である。また、ウイルス感染症においても、感染細胞を排除するCTLの重要性はよく知られている。

(2) CTLの誘導機構を研究するには、HLAクラスI分子(HLA-I)による抗原提示機構の詳細を理解する事が重要である。抗原提示の過程では、細胞質内のがん抗原やウイルス由来抗原がプロテアソームによって抗原ペプチドに分解され小胞体に輸送される。小胞体内では、さまざまな分子シャペロンの助けにより、HLA-Iがペプチドと結合してHLA-I・ペプチド複合体となり、細胞表面に移動してペプチド特異的CTLに認識され、標的細胞が破壊される。

(3) 私は、HLA-Iで最もポピュラーなHLA-A2で、構成アミノ酸の74番目をヒスチジンからロイシンに変えた分子(HLA-A2-H74L)をヒト細胞株に発現させて比較検討したところ、以下の特徴があることを見出した(引用文献 &)。

- HLA-A2-H74Lは、細胞内の抗原ペプチドをCTLに抗原提示できない。
- HLA-A2-H74Lは、HLA-A2と同じく細胞表面上に高発現する。

(4) 以上から、細胞表面上のHLA-A2-H74Lには、自己ペプチドが結合しているが抗原ペプチドは結合していないのでCTLに認識されないと考えられる。即ち、小胞体内で、HLA-A2-H74L・自己ペプチド複合体は形成できるが、HLA-A2-H74L・抗原ペプチド複合体は形成できない。その原因がH74Lへの変異であると思われる。

2. 研究の目的

(1) HLA-A2-H74Lを解析することにより、小胞体内のHLA-I・ペプチド複合体形成過程で、自己ペプチドから抗原ペプチドに置き換える未知の分子シャペロンを同定する。

(2) 同定した分子シャペロンを利用した新しいがんワクチンアジュバントの開発へと展開するための研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 細胞株の作製

FLAGタグ遺伝子を融合させたHLA-A2またはHLA-A2-H74L遺伝子を作製し、発現ベクターに組み込んだ。その遺伝子をそれぞれヒト細胞株であるC1R細胞にトランスフェクションし、細胞表面に発現(C1R-A2, C1R-H74L)させた。発現の確認には、抗HLA-A2抗体、BB7.2を使用し、フローサイトメトリーで検出した。

(2) 免疫沈降

C1R-A2およびC1R-H74L細胞を培養して一定数増やし、NP40を含んだlysis bufferで溶かしてそれぞれの細胞溶解液を調整した。そして、抗FLAG抗体を結合したアフィニティーゲルを用いて共免疫沈降を行った。

(3) ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)

12%のポリアクリルアミドゲルを作製し、C1R-A2 および C1R-H74L 細胞からの抗 FLAG 抗体による免疫沈降物を電気泳動した。泳動したゲルは銀染色をして、C1R-A2 および C1R-H74L からの電気泳動像を比較、検討した。

(4) 質量分析

SDS-PAGE 電気泳動像において、C1R-A2 が C1R-H74L の片方にしか見られないバンドを切り出し、プロテオーム解析サービスを行っている会社 (Medical ProteoScope) に、質量分析を依頼した。

(5) CRISPR/Cas9

TAPBPR ゲノム遺伝子の sgRNA を CRISPR/Cas9 発現ベクター (pCas-Guide-EF1a-GFP, OriGene) に組み込んだ。作製したプラスミドを、HLA-A2 発現細胞 (C1R-A2) に遺伝子導入してクローニングし、T7E1 アッセイ、DNA シーケンス、ウエスタンブロット等で、TAPBPR タンパク質が発現していないことを確認した。

(6) CTL 活性の測定

TAPBPR を発現していない C1R-A2 細胞およびコントロールの細胞を、in vitro で Influenza A virus を感染させ、内在性にウイルスタンパク質を発現させて標的細胞とした。Influenza A virus matrix peptide (FMP) 特異的 CTL は、HLA-A2 トランスジェニックマウスを免疫して作製した。この FMP 特異的 CTL がこの標的細胞を溶解するかどうかを、CD107 分子の一時的発現をフローサイトメトリーで測定することによって確認した。

4. 研究成果

(1) SDS-PAGE による解析

FLAG タグを融合させた HLA-A2 または HLA-A2-H74L を発現する C1R-A2 細胞、C1R-H74L 細胞、それぞれの細胞溶解液を調整し、抗 FLAG 抗体で共免疫沈降を行った。

当初の研究計画では、免疫沈降物を全自動 2 次元電気泳動装置 (Auto2D, SHARP) にかけて、2 次元的に分離したパターンを比較することにしていた。しかし、Auto2D が予想以上に不安定で少し濃いサンプルをかけるとすぐに止まってしまった。また、質量分析をお願いした会社から 1 次元の分離で十分であるとのアドバイスをいただいた。そこで、1 次元の SDS-PAGE で、免疫沈降物を分離し比較したところ、HLA-A2 と HLA-A2-H74L の片方にしか見られないバンドが複数個検出された。

(2) 質量分析

HLA-A2 と HLA-A2-H74L の片方にしか見られないバンドを切り出し、プロテオーム解析サービスを行っている会社 (Medical ProteoScope) に、質量分析を依頼した。その結果、HLA-A2 alpha chain と Actin であるとのことで、質量分析による分子シャペロンの同定に成功しなかった。

2013 年に、抗原提示機構に関わる新しい小胞体分子シャペロンである、Tapasin binding protein (TAPBPR) (引用文献) が発見された。当初はあまり話題にならなかったが、2017 年に X 線構造解析がされてその特徴が明らかにされ (引用文献 &), MHC-I による抗原提示に極めて重要な役割をすることが推測された。その特徴が類似していることから、本研究で

我々が探し求めている分子シャペロン自身かそれに類似の分子シャペロンであると考えられた。そこで、TAPBPR に焦点を当てて、解析することにした。

まず、GFP 融合 TAPBPR 遺伝子を作製し、C1R-A2 細胞と C1R-H74L 細胞にそれぞれ発現させてクローニングし、クローン細胞を樹立した。それらの細胞の細胞溶解液を作製し、抗 GFP 抗体で免疫沈降を行った。その分離パターンを比較したところ、明らかに HLA-A2 発現細胞にのみ見られるバンドが存在した。すなわち、TAPBPR-HLA-A2-ペプチド複合体に新たなタンパク分子が結合しており、HLA-A2-H74L では1つのアミノ酸変異(H74L)のためにその分子が結合できないと予想できる。この分子は、我々が求めている分子シャペロンである可能性があるため、このバンドに相当するタンパク質の質量分析 (Medical ProteoScope) を行った。しかし、HLA-A2 の一部の分子であることがわかり、分子シャペロンを見つけることはできなかった。

(3) TAPBPR 欠損細胞株の樹立

求めようとしている分子シャペロンが TAPBPR となんらかの関係があると考えられたため、CRISPR/Cas9 法で、C1R-A2 細胞の TAPBPR をノックアウトした C1R-A2-TAPBPR-KO 細胞を作製し、C1R-A2-H74L 細胞と比較検討することにした。TAPBPRgRNA を CRISPR/Cas9 ベクターに挿入し、C1R-A2 細胞にトランスフェクションしてクローニングした。増殖したクローンに TAPBPR が発現しているかどうか、Western blot で検出することを試みたが、市販の抗体を複数試しても良い抗体がみつからなかった。そこで、Western blot の代わりに RT-PCR を使うことによって、C1R-A2-TAPBPR-KO クローンを複数作製することに成功した。フローサイトメトリーで測定したところ、C1R-A2-TAPBPR-KO の細胞表面における HLA-A2 発現量は、C1R-A2 細胞における場合と変わらなかった。従って、C1R-A2-TAPBPR-KO 細胞では、自己抗原が小胞体内で正常にプロセッシングされ HLA-A2 に結合していることが明らかになった。

(4) CTL 活性の測定

次に抗原特異的 CTL が、内在性抗原を発現する C1R-A2-TAPBPR-KO 細胞を認識するかどうかを解析することにした。

HLA-A2 トランスジェニックマウスに、インフルエンザウイルスマトリックスタンパク質(FMP)を発現するアデノウイルスで免疫し、FMP 特異的 CTL を誘導した。一方、標的細胞として、C1R-A2-TAPBPR-KO 細胞、および C1R-A2 および C1R-A2-H74L 細胞を使用した。これらの細胞を *in vitro* でインフルエンザウイルスに感染させ、内在性 FMP を発現させた。そして、これらの標的細胞が、FMP 特異的 CTL によって認識されるかどうかを、CD107 分子の一時的発現をフローサイトメトリーで測定することによって測定した。その結果、C1R-A2-TAPBPR-KO 細胞の抗原提示能は、C1R-A2-H74L 細胞ほどでないが、C1R-A2 細胞よりも若干ながら低下していることが明らかになった。従って、HLA-A2-H74L が内在性抗原を CTL へ抗原提示できないのは、一つのアミノ酸置換 (H74L) によって TAPBPR との相互作用ができないことが原因の一つであるということが示唆された。

< 引用文献 >

Caley R. R., A. L. Peace-Brewer, M. Matsui, and J. A. Frelinger. Analysis of the mutant HLA-A*0201 heavy chain H74L: impaired TAP-dependent peptide loading. *Hum. Immunol.* 60(9): 743-754, 1999.

Matsui, M., M. Kawano, S. Matsushita, and T. Akatsuka. Introduction of a point mutation into an HLA class I single-chain trimer induces enhancement of CTL priming and antitumor immunity. *Molecular*

Therapy - Methods & Clinical Development 1: 14027, 2014.

Boylea, L. H., C. Hermann, J. M. Boname, K. M. Porter, P. A. Patel, M. L. Burr, L. M. Duncan, M. E. Harbour, D. A. Rhodes, K. Skjødt, P. J. Lehner, and J. Trowsdale. Tapasin-related protein TAPBPR is an additional component of the MHC class I presentation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 3465-3470, 2013.

Thomas, C., and R. Tampé. Structure of the TAPBPR–MHC I complex defines the mechanism of peptide loading and editing. *Science* 358: 1060–1064, 2017.

Jiang, J., K. Natarajan, L. F. Boyd, G. I. Morozov, M. G. Mage, and D. H. Margulies. Crystal structure of a TAPBPR–MHC I complex reveals the mechanism of peptide editing in antigen presentation. *Science* 358: 1064–1068, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takagi Akira, Matsui Masanori	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of HLA-A*24:02-restricted CTL candidate epitopes derived from the non-structural polyprotein 1a of SARS-CoV-2 and analysis of their conservation using the mutation database of SARS-CoV-2 variants.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e01659-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.01659-21	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 Takagi Akira, Matsui Masanori	4. 巻 95
2. 論文標題 Identification of HLA-A*02:01-Restricted Candidate Epitopes Derived from the Nonstructural Polyprotein 1a of SARS-CoV-2 That May Be Natural Targets of CD8+ T Cell Recognition In Vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01837-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01837-20	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 Saika Kikue, Kato Masahiko, Sanada Hideaki, Matsushita Sho, Matsui Masanori, Handa Hiroshi, Kawano Masaaki	4. 巻 101
2. 論文標題 Induction of adaptive immune responses against antigens incorporated within the capsid of simian virus 40	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 853 ~ 862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.001445	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 Kawano Masaaki, Saika Kikue, Takagi Rie, Matsui Masanori, Matsushita Sho	4. 巻 5
2. 論文標題 Tannic acid acts as an agonist of the dopamine D2L receptor, regulates immune responses, and ameliorates experimentally induced colitis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, & Immunity - Health	6. 最初と最後の頁 100071 ~ 100071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbih.2020.100071	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 Kawano, M., Takagi, R., Saika, K., Matsui, M., Matsushita, S.	4. 巻 30
2. 論文標題 Dopamine regulates cytokine secretion during innate and adaptive immune responses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 591-606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy057.	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松井政則、高木徹
2. 発表標題 新型コロナウイルス由来CTLエピトープの同定とCTL誘導型ワクチン応用への可能性
3. 学会等名 BioJapan 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高木徹、村上孝、松井政則
2. 発表標題 抗原提示に関連した分子シャペロンの同定に必要な新規CTL assayの確立
3. 学会等名 埼玉医大 第17回 RCGM フロンティアシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木徹、松井政則
2. 発表標題 分子シャペロンgp96の抗原提示に関する研究
3. 学会等名 第22回日本ワクチン学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawano, M., Saika, K., Takagi, R., Matsui, M., Matsushita, S.
2. 発表標題 Tannic acid affects dopamine receptors, regulates immune responses, and ameliorates experimentally induced colitis.
3. 学会等名 第76回日本免疫学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kawano, M., Hatakeyama, M., Matsui, M., Handa, H.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 IOP-SCIENCE	5. 総ページ数 29
3. 書名 Magnetic Nanoparticles for Medical Diagnostics	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 SARS-CoV-2の細胞傷害性T細胞エピトープペプチド及びその利用	発明者 松井政則、高木徹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-120675	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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