

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16289

研究課題名（和文）免疫担当細胞における免疫プロテアソームの新規機能的意義の解明

研究課題名（英文）Roles of immunoproteasome in immune cells

研究代表者

折茂 貴是 (Orimo, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：80843036

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：プロテアソームは、不要あるいは不良のタンパク質を分解処理することにより細胞内環境の恒常性維持に必須の役割を果たすタンパク質複合体である。免疫不全と自己炎症を呈した患者由来のプロテアソームサブユニットの新規遺伝子バリエーションを導入したマウスの作成、解析を行った。この遺伝子バリエーションを有するマウスでは、B細胞、T細胞、樹状細胞が減少している一方で、好中球、単球は増加していた。このマウスはプロテアソーム機能異常による病態を反映する新規のモデルマウスである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不要になった、あるいは合成がうまくできなかったタンパク質は速やかに処理されなければならない。このシステムに関わるタンパク質複合体プロテアソームの遺伝子変異（バリエーション）により、難治性の炎症が発症するが、その病態はよくわかっていない。本研究では、難治性の炎症症状を示す患者で見つかったプロテアソームの新しい遺伝子バリエーションをマウスに導入、解析することにより、患者の免疫異常を再現することに成功した。このマウスは、プロテアソーム機能異常、免疫不全の病態の解明、新規治療薬の開発に有用と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Proteasome is a protein complex involved in cellular homeostasis by degrading unnecessary or useless proteins. I have generated and analyzed mutant mice carrying a novel missense variant of the PSMB9 proteasome subunit gene found in two unrelated patients with manifestations similar to, but distinct from proteasome-associated autoinflammatory syndromes. In the heterozygous mutant mice, B, T and dendritic cells were decreased, while neutrophils and monocytes were increased. This is a novel mouse model which is useful for clarifying the pathogenesis of proteasome dysfunctions and for developing effective therapeutic maneuvers for autoinflammation and immunodeficiency.

研究分野：免疫学

キーワード：プロテアソーム 免疫不全 リンパ球 樹状細胞 好中球 単球

1. 研究開始当初の背景

不要になったタンパク質あるいは正しく合成されなかった不良のタンパク質は分解除去されることにより、細胞内環境の恒常性が維持されている。プロテアソームは、タンパク質の分解除去を担うタンパク質複合体であり、7種類のサブユニット(1~7)と、7種類のサブユニット(1~7)から構成される。分解活性を担うのは1, 2, 5であるが、それらが1i, 2i, 5iに置換された免疫プロテアソーム、1i, 2i, 5tに置換された胸腺プロテアソームは、MHCクラスI拘束性の抗原ペプチドの生成にも関与し、細胞傷害性T細胞(CD8T細胞)の生成、機能的分化に必須の役割を果たしている。このプロテアソームサブユニット遺伝子の変異(バリエーション)により、凍瘡様皮膚炎と脂肪萎縮を主徴とする、プロテアソーム関連自己炎症性症候群(Proteasome-associated autoinflammatory syndrome, PRAAS)という自己炎症性疾患が生じる(J Clin Invest. 125: 4196, 2015)が、適切なモデルマウスがなく、その病態は不明で、治療法も確立されていない。

2. 研究の目的

PRAAS様の症状と共に、免疫不全を併発した、血縁関係のない2名の患者において、1i(遺伝子名はPSMB9)のアミノ酸置換を起こす新規のde novoヘテロ遺伝子バリエーション(PSMB9 G156D)が認められた。G156は種を越えて保存されており、構造の推定解析により、リングの会合部に位置すると考えられた。この遺伝子バリエーションの病理的意義を明らかにするため、その遺伝子バリエーションをCRISPR法によりマウスに導入した。

本研究では、このPsmb9 G156D変異マウスについて免疫学的解析を進め、免疫プロテアソームの変異により、免疫系がどのように障害されるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

Psmb9 G156D変異マウスにおいて、T細胞、B細胞、樹状細胞、単球、好中球など免疫担当細胞のFACS解析、組織学的解析などを行った。

また、MHCクラスI、クラスIIの発現、および卵白アルブミン(ovalbumin(OVA)由来のペプチドがMHCクラスIと会合し細胞表面に抗原提示されているかどうか解析した。

4. 研究成果

(1) Psmb9 G156D変異マウスにおける獲得免疫系の異常

Psmb9

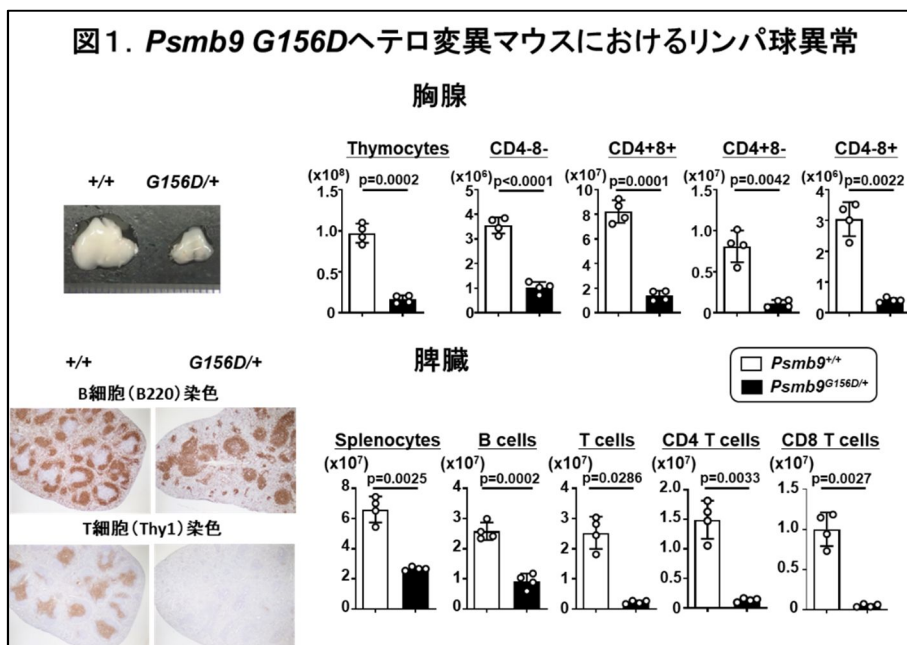
G156Dヘテロ変異マウスは外見上正常であり、生存率も野生型マウスと変わらなかった。

免疫学的には、まず、胸腺は著明に萎縮し、胸腺細胞数が著明に低下していた。また、CD4、CD8の発現で分けられる胸腺細胞サブセットはすべて減少していた(図1)。

脾臓においてはCD4TおよびCD8T細胞に加えて、B細胞も減少し、組織学的には濾胞構造の形成不全が認められた(図1)。

減少していた脾臓T細胞をさらに詳細に解析したところ、CD4T、CD8T細胞共にナイーブT細胞の割合が低下している一方で、メモリー系の細胞の割合は増加していた(図には示していない)。また、血中免疫グロブリンは全てのアイソタイプで顕著に低下していた(図2)。

図1. Psmb9 G156Dヘテロ変異マウスにおけるリンパ球異常



(2) Psmb9 G156D変異マウスにおける自然免疫系の異常

自然免疫担当細胞に関しては、まず、Psmb9 G156Dヘテロ変異マウスの脾臓において、樹状

細胞 (Dendritic cells) が顕著に減少していた一方で、好中球、単球は増加していた (図3) また、骨髄においても、好中球、単球は増加していた (図には示していない)。

(3) *Psmb9 G156D* ホモ変異マウスにおける免疫異常

Psmb9 G156D ホモ変異マウスは特に外見上異常を認めなかったが、生後 6 - 7 か月程度で死亡した。*Psmb9 G156D* ホモ変異マウスの脾臓では、B 細胞、T 細胞、および樹状細胞のいずれもほぼ完全に欠失していた (図4)。

(4) *Psmb9 G156D* 変異マウスにおける抗原提示能
既報では、免疫プロテアソームサブユニット欠損マウスにおいて、MHC クラス I 拘束性抗原ペプチドの生成が障害され、MHC クラス I の発現が低下し、その結果として CD8T 細胞の数が減少する。そこで、*Psmb9 G156D* ヘテロ変異マウスの B 細胞において、MHC クラス I の発現を検討したが、野生型マウスの B 細胞と比較して、ほぼ同程度の発現が認められた (図5)。また、MHC クラス II の発現はむしろ亢進していた。

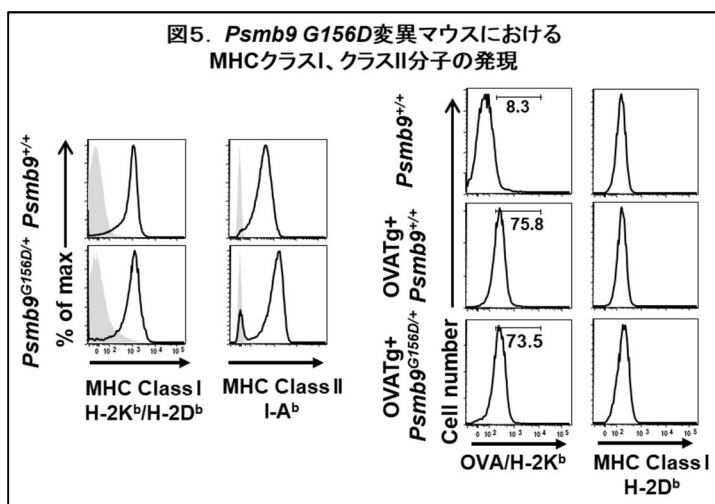
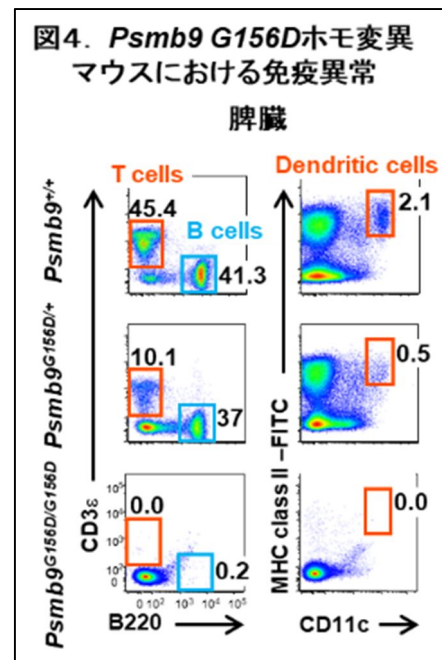
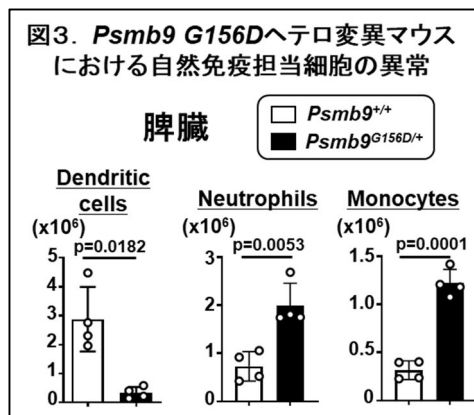
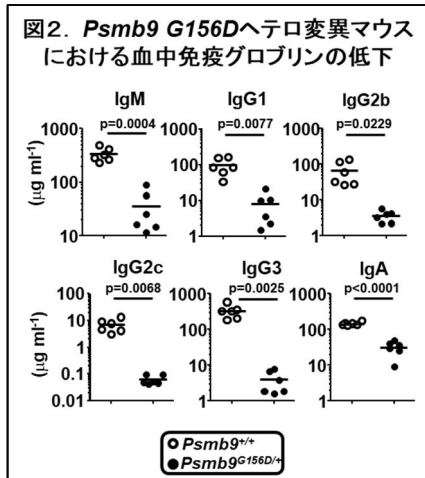
次に、OVA をすべての細胞で高発現させるマウス (OVATg マウス) と *Psmb9 G156D* 変異マウスを交配し、OVA を高発現させた *Psmb9 G156D* ヘテロ変異マウス (OVATg-*Psmb9 G156D* 変異マウス) を作成した。OVATg マウスの B 細胞では、OVA 由来のペプチドと MHC クラス I の複合体 (OVA/H-2Kb) の発現が高頻度に (70% 以上) 認められるが、その発現レベルは、OVATg-*Psmb9 G156D* 変異マウスの B 細胞でもほとんど同じレベルであった。

(まとめ)

免疫不全を伴う PRAAS 患者で認められた遺伝子バリエーション (PSMB9 G156D) をマウスに導入し、解析することにより、*Psmb9 G156D* ヘテロ変異マウスにおいて、獲得免疫不全、樹状細胞の減少、好中球、単球の増加が認められることが明らかになった。これらの所見は患者の所見をほぼ再現しており、*Psmb9 G156D* のヘテロ接合性遺伝子バリエーションが病気の原因であることが強く示唆された。

また、MHC クラス I の発現、MHC クラス I 拘束性の OVA 抗原ペプチドの発現が正常であったことから、*Psmb9 G156D* 変異による CD8T 細胞の減少は、MHC クラス I の発現低下によるものではないことが示唆された。

Psmb9 G156D 変異により生じた多彩な免疫異常がどのようなメカニズムで起こっているのか、特に、免疫担当細胞のそれぞれの分化過程のどのレベルでどのような異常が生じているのかが明らかにしていくことは非常に重要と考えられる。これまでに、B 細胞、樹状細胞の異常は細胞自身の異常であること、そして、特に抗体産生細胞への分化が障害されていることなどが明らか



になってきている。今後このマウスの解析を進め、プロテアソームにより制御される免疫系の恒常性維持、およびその破綻により生じる病態の分子基盤を明らかにしていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 4.Y. Mizumoto, H. Hemmi, M. Katsuda, M. Miyazawa, Y. Kitahata, A. Miyamoto, M. Nakamori, T. Ojima, K. Matsuda, M. Nakamura, K. Hayata, Y. Fukuda-Ohta, M. Sugiyama, T. Ohta, T. Orimo, S. Okura, I. Sasaki, K. Tamada, H. Yamaue, T. Kaisho.	4. 巻 122
2. 論文標題 Anticancer effects of chemokine-directed antigen delivery to a cross-presenting dendritic cell subset with immune checkpoint blockade	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1185 ~ 1193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0757-2	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 T. Kato, M. Yamamoto, T. Orimo, I. Sasaki, K. Murakami, H. Hemmi, Y. Fukuda-Ohta, K. Isono, S. Takayama, H. Nakamura, Y. Otsuki, T. Miyamoto, J. Takita, T. Yasumi, R. Nishikomori, T. Matsubayashi, K. Izawa, T. Kaisho	4. 巻 73
2. 論文標題 Augmentation of STING-induced type I interferon production in COPA syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol	6. 最初と最後の頁 2105-2115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41790	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 N.Kanazawa, et al.全著者32名中19番目	4. 巻 12
2. 論文標題 Heterozygous missense variant of the proteasome subunit -type 9 causes neonatal-onset autoinflammation and immunodeficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 6819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27085-y	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21件（うち招待講演 0件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 佐々木泉、折茂貴是、張江伊水、滝沢優子、古川綱一、改正恒康
2. 発表標題 The roles of unfold protein responses in cholera toxinB-induced interleukin-1 production.
3. 学会等名 第27回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中日尚子、林茉莉、加藤喬、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、改正恒康
2. 発表標題 遺伝性炎症性疾患COPA症候群の分子基盤の解明
3. 学会等名 第88回和歌山医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張江伊水、滝沢優子、加藤喬、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、改正恒康
2. 発表標題 遺伝性炎症性疾患COPA症候群のモデルマウスの樹立とその解析
3. 学会等名 第88回和歌山医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三並桃花、石田エヴァ如月、加藤喬、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、改正恒康
2. 発表標題 自然免疫応答における小胞体ストレスセンサー IRE1 の機能的意義
3. 学会等名 第88回和歌山医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤喬、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、張江伊水、田中日向子、佐々木泉、村上康平、邊見弘明、本田吉孝、井澤和司、西小森隆太、改正恒康
2. 発表標題 自己炎症性疾患COPA症候群変異マウスにおけるSTINGシグナルの活性化
3. 学会等名 第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤喬、川野果歩、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、改正恒康
2. 発表標題 遺伝子改変マウスを用いたCOPA症候群の病態解明
3. 学会等名 第89回和歌山医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤瀬幹太、加藤喬、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、改正恒康
2. 発表標題 自然免疫応答における小胞体ストレスセンサーIRE1 の機能的意義
3. 学会等名 第89回和歌山医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 賀来美嘉、加藤喬、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、改正恒康
2. 発表標題 コレラ毒素による炎症性サイトカインIL-6産生誘導機構の解明
3. 学会等名 第89回和歌山医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 I. Sasaki, Y. Fukuda-Ohta, N. Wakaki-Nishiyama, C. Nakai, S. Morita, D. Okuzaki, M. Kaku, K. Sawase, T. Kato, T. Orimo, K. Furukawa, T. Kaisho
2. 発表標題 An endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 is involved in cholera toxin-induced interleukin-1 production from tissue resident macrophages
3. 学会等名 第28回日本免疫毒性学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 喬、折茂 貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、村上康平、邊見弘明、本田吉孝、井澤和司、大月寛郎、松林正、西小森隆太、改正恒康
2. 発表標題 自己炎症性疾患COPA症候群モデルマウスにおけるI型IFN症発症の分子基盤
3. 学会等名 第28回日本免疫毒性学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Kato, T. Orimo, Y. Fukuda-Ohta, I. Sasaki, H. Hemmi, Y. Honda, K. Izawa, R. Nishikomori, T. Kaisho
2. 発表標題 Hyperactivation of STING-induced type I interferon pathway in dendritic cells from novel mice model for an autoinflammatory disease, COPA syndrome
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 H. Hemmi, T. Orimo, I. Sasaki, T. Kato, Y. Fukuda-Ohta, N. Kinjo, H. Ohnishi, N. Kanazawa, T. Kaisho
2. 発表標題 Impaired development of myeloid cells in proteasome subunit mutant mice
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Yamashita, T. Orimo, T. Kato, Y. Fukuda-Ohta, I. Sasaki, H. Hemmi, S. Tamura, T. Kaisho
2. 発表標題 Hypomorphic mutation of Lig4 gene in mice predisposes to intestinal inflammation driven by CD4+ Th1 cells
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	I. Sasaki, Y. Fukuda-Ohta, S. Morita, D. Okuzaki, T. Kato, T. Orimo, K. Furukawa, T. Kaisho
2. 発表標題	An endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 is involved in cholera toxin-induced interleukin-1 production from resident peritoneal macrophages
3. 学会等名	第50回日本免疫学会総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	加藤喬、折茂貴是、大田(福田)有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、村上康平、邊見弘明、本田吉孝、井澤和司、八角高裕、大月寛郎、松林正、西小森隆太、改正恒康
2. 発表標題	COPA症候群の新規モデルマウスにおけるSTINGの活性化とT細胞の異常. Activation of STING and T cell abnormalities in a novel mouse model of COPA syndrome
3. 学会等名	第5回日本免疫不全・自己炎症学会総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Y. Mizumoto, H. Hemmi, M. Katsuda, Y. Fukuda-Ohta, T. Orimo, I. Sasaki, K. Tamada, H. Yamaue, T. Kaisho
2. 発表標題	Chemokine-mediated delivery of cancer peptide vaccine to a dendritic cell subset with high crosspresentation activity
3. 学会等名	The 27th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage (MMCB 2020+1) (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	S. Tamura, Y. Yamashita, T. Orimo, S. Iwabuchi, I. Sasaki, H. Hemmi, S. Hashimoto, T. Sonoki, T. Kaisho
2. 発表標題	Th1-skewing colitis in mutant mice with homozygous missense mutation of DNA ligase IV
3. 学会等名	The 27th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage (MMCB 2020+1) (国際学会)
4. 発表年	2021年

1 . 発表者名 H. Hemmi, T. Orimo, Naoko Nishiyama, T. Kato, T. Ozasa, I. Sasaki, H. Ohnishi, N. Kinjo, N. Kanzawa, T. Kaisho
2 . 発表標題 Impaired monocyte and dendritic cell development in mice carrying a mutation identified from the proteasome-associated autoinflammation and immunodeficiency disease patient
3 . 学会等名 The 27th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage (MMCB 2020+1) (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 T. Kato, T. Orimo, Y. Fukuda-Ohta, N. Wakaki-Nishiyama, C. Nakai, I. Sasaki, K. Murakami, H. Hemmi, Y. Honda, K. Izawa, Y. Otsuki, T. Matsubayashi, R. Nishikomori, T. Kaisho
2 . 発表標題 Interstitial Lung Disease and abnormal STING activation in COPA V242G heterozygous variant mice
3 . 学会等名 IEIIS2021: 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 I. Sasaki, Y. Fukuda-Ohta, N. Wakaki-Nishiyama, C. Nakai, S. Morita, D. Okuzaki, M. Kaku, K. Sawase, A. Yamamoto, T. Kato, T. Orimo, K. Furukawa, T. Kaisho
2 . 発表標題 Critical roles of IRE1 in cholera toxin-induced interleukin-1 production from resident peritoneal macrophages
3 . 学会等名 IEIIS2021: 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 H. Hemmi, T. Orimo, I. Sasaki, T. Kato, Y. Fukuda-Ohta, N. Kinjo, H. Ohnishi, N. Kanzawa, T. Kaisho
2 . 発表標題 Analysis of innate immune cells in proteasome subunit mutant mice
3 . 学会等名 IEIIS2021: 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4 . 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------