

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：33303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23366

研究課題名（和文）アポトーシス細胞表層に露出した53BP1による自己免疫抑制機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of self tolerance by a DDR factor externalized on the surface of apoptotic cells

研究代表者

砂谷 優実（SUNATANI, Yumi）

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：70581057

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、食細胞によるアポトーシス細胞の貪食に対して、また貪食後の食細胞における免疫応答に対して、53BP1により誘導されるクロマチンのアポトーシス細胞表層への露出がどのような影響を及ぼすかを、53BP1欠損細胞を用いて明らかにすることを目的とした。

その結果、53BP1の新規機能として、アポトーシス細胞表層へのクロマチン露出を促進出現することで、食細胞によるアポトーシス細胞貪食を促進すること、および自己であるアポトーシス細胞に対して食細胞が免疫的に寛容になるよう誘導する役割があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

53BP1については、DNA損傷修復における機能解析が進んでいるが、アポトーシスにおける機能の報告はほとんどない。本研究の成果は、DNA損傷修復研究分野にとって非常に興味深いものであることが期待される。

クロマチンがアポトーシス細胞の表層に露出することは既に報告されているが、その露出機構は不明である。露出したクロマチンには、自己免疫寛容を誘導する説と、逆に自己抗原となるとい説がある。本研究は、この2つの説のいずれが正しいかを決定するための手がかりになると考えられ、自己免疫疾患の理解および治療法の開発に大きな知見を与えることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated a roll of 53BP1 in the externalization of chromatin on the cell surface of apoptotic cells and the phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. As a result, I revealed that 53BP1 is required to the phagocytosis of apoptotic cells and the self tolerance against apoptotic cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

p53 結合タンパク質として見出された 53BP1 は、放射線等により生じた DNA 二本鎖切断部位のヒストンと結合することで、DNA 二本鎖切断部位に速やかに集積し、相同組み換えによる修復を抑え、非相同末端再結合修復を促進する。一方、放射線により致命的な損傷を受けた細胞はアポトーシスに陥る。アポトーシス細胞の表層には、クロマチンが露出することが知られている。アポトーシス細胞表層のクロマチンには補体 C1q が結合することで、アポトーシス細胞の貪食が促進されるとの報告がある。申請者は、アポトーシス細胞において、53BP1 がカスパーゼ依存性に切断されること、切断後の 53BP1 断片がアポトーシス細胞表層に露出すること、53BP1 欠損によりアポトーシス細胞表層へのクロマチン露出が減少することを見出していた。

アポトーシス細胞は出現後速やかに、マクロファージや樹状細胞を始めとした食細胞に貪食除去され、これにより生体の恒常性が保たれている。アポトーシス細胞の速やかな貪食除去に加え、貪食した食細胞による炎症抑制性サイトカインの分泌が、細胞内容物に対する自己抗体産生の抑制に重要であることがわかっている (Nagata S, Ann Rev Immunol 2018)。そこで申請者は、53BP1 欠損細胞では、クロマチン露出が減少することで、アポトーシス細胞の貪食除去が抑制されるのではないかと予想した。

2. 研究の目的

本研究では、53BP1 が、食細胞によるアポトーシス細胞の貪食、貪食後の食細胞における免疫応答に対してどのような影響を及ぼすかを、53BP1 欠損細胞および 53BP1 ノックアウトマウスを用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ~ (3) の 3 点の問いを立て、以下に示す実験系を構築して、これらの問いを明らかにしようとして計画した。

【問い】

- (1) 53BP1 欠損アポトーシス細胞は貪食されにくくなるか？
- (2) 53BP1 欠損アポトーシス細胞を貪食した食細胞では、自己への免疫応答が活性化するか？
- (3) 53BP1 はクロマチンとの結合を介してアポトーシス細胞貪食を促進するのか？

【貪食実験】

野生型あるいは 53BP1 欠損細胞をスタウロスポリンで処理することでアポトーシスを誘導した後細胞表層を蛍光色素で標識し、食細胞と共培養することで、アポトーシス細胞を貪食させる。反応後の試料を蛍光顕微鏡下で観察し、細胞内にアポトーシス細胞由来の蛍光を有する食細胞を、アポトーシス細胞を貪食した食細胞と判定し、その貪食程度を数値解析する。

【貪食細胞のサイトカイン応答】

ヒト単球由来 THP-1 細胞株を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で 3 日間刺激することでマクロファージへ分化誘導し、PMA を除去した後さらに 1 日間培養した細胞を食細胞とする。一方、siRNA を用いた RNA 干渉により 53BP1 発現を抑制した Jurkat 細胞に、ヌクレオフェクションにより野生型 53BP1 あるいは Tudor 変異型 53BP1 発現ベクターを導入した後スタウロスポリンで処理した細胞を、貪食標的のアポトーシス細胞とする。培養器に付着培養した食細胞に、食細胞の 5 倍量のアポトーシス細胞を添加し、30 分間あるいは 60 分間共培養することで、貪食反応を実施する。反応液および貪食されなかったアポトーシス細胞を除去し、付着している食細胞の全 RNA を RNeasy Mini Kit (キアゲン) で抽出して相補 DNA を作成し、相補 DNA を鋳型とした各種サイトカインの RT-PCR を行う。

4. 研究成果

研究の主な成果

本研究では、当初はアポトーシス細胞として、マウス初代培養胸腺あるいは脾臓細胞を用いる予定であった。しかし、新型コロナウイルス感染拡大防止策のため、予定していた 53BP1 ノックアウトマウスの繁殖維持を縮小せざるを得ない状況となったため、アポトーシス細胞として、複数の株化細胞 (ヒト T リンパ球性急性白血病由来 Jurkat 細胞株、マウス T リンパ腫由来 EL4 細胞株、B リンパ球性白血病由来 L1210 細胞株) を追加導入し、実験を行った。Jurkat 細胞においては、siRNA を用いた RNA 干渉により 53BP1 発現抑制細胞を、あるいは CRISPR/Cas9 ゲノム編集

技術を用いることで 53BP1 欠損細胞を得て、実験を進行させた。EL4 細胞においては、53BP1 の細胞表層露出が検出不良であったため、使用を断念した。L1210 細胞においては、53BP1 の細胞表層露出を検出でき、53BP1 欠損細胞の作製に取り掛かった。

(1) 53BP1 欠損アポトーシス細胞は貪食されにくくなるか？

Jurkat 細胞を用いた実験の結果、53BP1 発現抑制あるいは欠損アポトーシス細胞は食細胞に貪食されにくいことが判明した。また、アポトーシス細胞貪食を制御する分子の発現を解析した結果、53BP1 欠損アポトーシス細胞において発現が減少する新規分子を同定した。

(2) 53BP1 欠損アポトーシス細胞を貪食した食細胞では、自己への免疫応答が活性化するか？

53BP1 発現抑制アポトーシス細胞を貪食した食細胞における炎症性サイトカイン TNF- α および IL-6 の遺伝子発現の増加、および自己免疫誘導に関わるサイトカイン IL-12 および IL-23 の遺伝子発現の減少が、RT-PCR を用いて mRNA レベルで検出された。以上の結果から、アポトーシス細胞を貪食した食細胞が、自己への免疫応答を抑える機構において、53BP1 が何らかの役割を果たしていることが示唆された。

(3) 53BP1 はクロマチンとの結合を介してアポトーシス細胞貪食を促進するのか？

53BP1 は、核内ではヒストンに結合している。ヒストン結合部位である Tudor ドメインは、3BP1 の C 末端側に存在し、アポトーシス時にカスパーゼで切断されて生じる C 末断片にも Tudor ドメインが保持されている。そこで、アポトーシス細胞表層への露出およびその貪食促進に、Tudor ドメインが必要なのではないかと予想し、Tudor ドメインのヒストン結合責任 3 アミン酸残基をアラニンに置換した Tudor 変異 53BP1 発現ベクターを構築した。野生型 53BP1 発現ベクターあるいは Tudor 変異 53BP1 発現ベクターを Jurkat 細胞にヌクレオフェクションにより導入し、53BP1 の細胞表層への露出程度、アポトーシス細胞の貪食、およびアポトーシス細胞貪食後の食細胞におけるサイトカインの産生を解析した。

クロマチンの細胞表層への露出

53BP1 の欠損により減少したアポトーシス細胞表層へ DNA の露出は、野生型 53BP1 発現ベクターの導入により回復した。一方、Tudor 変異 53BP1 発現ベクターを導入しても、DNA の露出はほとんど回復しなかった。この結果より、53BP1 がクロマチンをアポトーシス細胞表層へ露出させるためには、53BP1 のクロマチン結合能が必要であると考えられた。

食細胞による貪食

53BP1 の発現抑制により減少したアポトーシス細胞貪食は、53BP1 欠損アポトーシス細胞への野生型 53BP1 発現ベクターの導入により回復した。一方、Tudor 変異 53BP1 発現ベクターを導入しても、貪食の回復程度は小さかった。この結果から、アポトーシス細胞が食細胞に貪食されやすくなるためには、53BP1 のクロマチン結合能が必要であると考えられた。

アポトーシス貪食後の食細胞におけるサイトカインの産生

アポトーシス細胞と共培養した食細胞が産生するサイトカインの発現を RT-PCR で解析した。その結果、アポトーシス細胞の 53BP1 の発現抑制により増加した食細胞による炎症性サイトカイン TNF- α および IL-6 の産生、および減少した自己免疫誘導に関わるサイトカイン IL-12 および IL-23 の産生は、アポトーシス細胞への野生型 53BP1 発現ベクターの導入により、それぞれ野生型アポトーシス細胞貪食時と同程度となった。しかし、Tudor 変異 53BP1 発現ベクターを導入したときは 53BP1 発現抑制細胞と同様の結果となった。以上より、53BP1 を介したクロマチンの結合および細胞表層への露出には、食細胞による自己攻撃性の免疫応答を抑えるという生理的意義があることが示唆された。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では、53BP1 の新規機能として、アポトーシス細胞表層へのクロマチン露出を制御することで、食細胞によるアポトーシス細胞貪食を促進すること、および自己であるアポトーシス細胞に対して食細胞が免疫的に寛容になるよう誘導する役割があることを見出した。これまでに、53BP1 は DNA 損傷修復に関わる機能の報告例がほとんどであり、アポトーシスに関する機能は報告されていない。本研究の成果は、DNA 損傷修復研究分野にインパクトを与えるものと期待される。

今後の展望

本研究では、53BP1 がアポトーシス細胞表層へのクロマチン露出を制御することで、食細胞の自己免疫応答を抑制することが示唆されたが、実際に生体内で自己寛容が誘導されているかを明らかにするには至らなかった。今後の研究により、53BP1 による自己寛容誘導の詳細なメカニズムが明らかにされることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------