

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390156

研究課題名（和文） 主要組織適合抗原による新たな制御機構の解明

研究課題名（英文） Exploration into MHC class II-mediated immune regulation

研究代表者

石戸 聡 (ISHIDO SATOSHI)

独立行政法人理化学研究所・感染免疫応答研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10273781

研究成果の概要（和文）：

樹状細胞に発現している MHC II のユビキチン化が抑制される事によって、樹状細胞が制御性 T 細胞によって認識され Fas-FasL シグナルによって排除される事を見出した。MHC II のユビキチン化は感染等の活性化によって抑制される事から、MHC class II (MHC II) のユビキチン化抑制は過剰な免疫応答を抑制し自己免疫疾患、あるいはサイトカインストームを予防する機能を有している可能性が見出された。

研究成果の概要（英文）：

We found that loss of MHC II ubiquitination induces Fas-mediated apoptosis of dendritic cells through the recognition by Tregs. Given that MHC II ubiquitination is promptly inhibited by several activation signals, our results suggest that loss of MHC II ubiquitination prevents excessive immune responses (i.e. autoimmunity).

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 4,600,000 | 1,380,000 | 5,980,000 |
| 2010年度 | 4,100,000 | 1,230,000 | 5,330,000 |
| 2011年度 | 5,500,000 | 1,650,000 | 7,150,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,200,000 | 4,260,000 | 18,460,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：MHC II、ユビキチン化、樹状細胞、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

MHC class II (MHC II) は、抗原提示細胞の細胞表面に発現し、CD4 T 細胞へ異物抗原 (病原体等) を提示する分子である。すなわち、MHC II は、病原体等の異物侵入を免疫担当細胞である T 細胞へ伝えて免疫を起動する重要な分子として認識されている。近年我々は、感染等によって免疫が起っていない状態 (定常状態) では、MHC II は MARCH-I と呼ばれる E3 ユビキチンリガーによってユビキチン化され、その発現が分解によって抑制されている事を見出した (EMBO J 2007)。さらに、感染等によって免疫が起動する時に、MARCH-I の発現が抑制される事により MHC II の分解が消失し、効率の良い抗原提示が出来るようになる事が Ira Mellman らのグループによって明らかにされた (Nature 2006, PNAS 2007)。これらの事から、感染によって起る免疫は MARCH-I 発現の減少によって引き起こされると考えられている。

しかしながら、我々は、遺伝子改変マウスの解析から新たな MHC II の機能が存在する可能性を見出した。具体的には、① MHC II ユビキチン化抑制による樹状細胞機能の抑制、② MHC II ユビキチン化抑制による MHC class I の発現抑制である。これらの結果から、MHC II は、免疫起動分子としてのみではなく、速やかに免疫を停止し過剰な免疫応答を抑制する分子としても働くとの重要な仮説を得た。

2. 研究の目的

図1に示した仮説を検証する目的にて、MHC II の安定化による樹状細胞の機能異常発現の分子機構を明らかにする。本研究課題にて具体的には、ユビキチン化されない MHC II が conditional に発現する遺伝子改変マウスを作成、解析する事により、安定化した MHC II の発現による樹状細胞の変化を分子細胞レベルにて明らかにする事を目指した。

3. 研究の方法

(1) MHC II のユビキチン化が条件的に消失するマウスの作成
MHC II のユビキチン化酵素である MARCH-I

がタモキシフェン (OHT) の投与によって欠損するマウス (MARCH-I cKO)、さらに OHT によってユビキチン化されない変異型 MHC II が発現するマウス (MHC II cKI) を作成する。

(2) MARCH-I cKO、MHC II cKI の樹状細胞に関する解析

MARCH-I cKO、MHC II cKI にて MHC II のユビキチン化を消失させ樹状細胞の性状を細胞生物学的、生化学的に解析する。

4. 研究成果

(1) MARCH-I cKO、MHC cKI の作成

(a) MARCH-I cKO 作成と確認。

targeting vector を作成し、M1 ES 細胞ゲノムの改変を行った。改変された ES 細胞を用いてキメラマウスを作成し、3lox マウスを作成した。3lox マウスを EIIa-cre マウスと交配することによって、Neo 遺伝子を削除し flox マウスを作成した。MARCH-I flox マウスと ERT2-cre マウスを交配し、MARCH-I cKO とした。OHT 投与により、lox にて挟まれた MARCH-I の活性中心をコードする領域が欠損する事を確認した。それに呼応して、樹状細胞の MHC II 発現が特異的に上昇する事を確認した。

(b) MHC II cKI の作成と確認。

targeting vector を作成し、(a) と同様に M1 ES 細胞ゲノムの改変を行い、キメラマウスを作成した。3lox マウスを EIIa-cre マウスと交配し、Neo 遺伝子を削除し flox マウスを作成した。flox マウスに ERT2-cre マウスを交配し、MHC II cKI とした。OHT 投与により、lox にて挟まれた MHC II のエクソンが欠損し、変異型のエクソンが連結される事を確認した。さらに、樹状細胞の MHC II 発現が特異的に上昇する事を確認した。

(2) 樹状細胞にて MHC II が安定化する事よって樹状細胞のアポトーシスが起る事を見出した。

(a) MARCH-I の欠損による樹状細胞のアポトーシス出現。

MARCH-I cKO にて MARCH-I を欠損させると樹状細胞の数が減少する事を見出した。さらに、樹状細胞が annexin V 陽性となり、caspase 活性の上昇が認められた。caspase inhibitor にて MARCH-I 欠損によるアポト

ーシスが抑制された。これらの事から、MARCH-I 欠損によって樹状細胞がアポトーシスによって排除される事が明らかとなった。

(b) MARCH-I 欠損によるアポトーシスには微小環境が必要である。

MARCH-I は樹状細胞の他に B 細胞等にも発現している。従って、MARCH-I cKO にて認められた樹状細胞のアポトーシスが、樹状細胞の MARCH-I 欠損によるものであるのか否かを検討した。MARCH-I 欠損マウスあるいは正常マウスの骨髄細胞から Flt-3 ligand にて樹状細胞を *in vitro* にて作成し、アポトーシスの出現について検討した。In vitro にて作成された樹状細胞 (BMDC) の MHC II の発現は上昇していたが、アポトーシスは認められなかった。これらの事から、MARCH-I 欠損樹状細胞と何らかの微小環境との相互作用によりアポトーシスが出現していると考えた。従って、それぞれの BMDC を同系統マウスに移植し、移植した BMDC の変化を検討した。その結果、移植後 3 日後に annexin V が陽性となりアポトーシスが出現した。Annexin V 陽性細胞が実際に、細胞死となり排除される事を検討する為に、移植後の BMDC の数を経時的に検討したところ、MARCH-I 欠損 BMDC は正常樹状細胞に比較し優位にその細胞数が減少した。このように、樹状細胞の MARCH-I 欠損によって微小環境との相互作用が起これ、樹状細胞がアポトーシスに陥って排除される事が明らかとなった。

(c) アポトーシスには MHC II の安定化が必要である。

MARCH-I 欠損による樹状細胞のアポトーシスは安定化した MHC II によると考えられる。従って、この点を明らかにする事を試みた。MARCH-I cKO と MHC II KO を交配し、MHC II を欠損させた状態にて MARCH-I を欠損させ、樹状細胞のアポトーシスを検討した。MHC II 欠損にてアポトーシスは完全に抑制された。さらに、MHC II のユビキチン化欠損のみにてアポトーシスが出現するか否かを MHC II cKI を用いて検討した。その結果、MHC II のユビキチン化抑制のみにて樹状細胞のアポトーシスが認められた。このアポトーシスが樹状細胞の MHC II 安定化によるか否かを、(b) と同様に樹状細胞の移植実験にて検討した。MHC II の

235 番目のリジンをアルギニンに置換した MHC II KI マウスの BM から樹状細胞を作成し移植を行った。MARCH-I 欠損樹状細胞と同様に、MHC II KI 由来の樹状細胞においてアポトーシスが認められた。これらの事から、樹状細胞における MHC II ユビキチン化消失によって、細胞外微小環境との相互作用が生じ、樹状細胞がアポトーシスに陥ると考えられた。

(3) 制御性 T 細胞が安定化した MHC II を認識し Fas シグナルによって樹状細胞のアポトーシスを誘導する。

(a) アポトーシスには Fas シグナルが関与する。

MHC II の安定化によるアポトーシスがどのようなシグナルによって誘導されているのかについて検討した。MARCH-I cKO にて樹状細胞のアポトーシスを誘導し、活性化された caspase の種類を検討した。その結果、caspase8 が主に活性化されていた。Caspase8 は Fas によるアポトーシスシグナルの下流に位置する事から、Fas によるアポトーシスが考えられた。従って、FasL を抗体により block しアポトーシスが抑制されるか否かを検討した。その結果、抑制が認められ Fas の関与が強く示唆された。Fas の関与を確認する為に、MARCH-I 欠損樹状細胞を FasL 欠損マウスへ移植しアポトーシスの出現を検討した。予想通りに、FasL 欠損マウスにおいてはアポトーシスの出現は認められなかった。これらの事から、MHC II 安定化による樹状細胞のアポトーシスは Fas シグナルによると結論づけた。

(b) MHC II 安定化による樹状細胞のアポトーシスには制御性 T 細胞 (Treg) が関与する。Fas は活性化 T 細胞、制御性 T 細胞に発現している事、さらにアポトーシスに微小環境が関与している事から、T 細胞によるアポトーシスが考えられた。さらに、アポトーシスは定常状態において起こっている事から、T 細胞として制御性 T 細胞の関与を強く疑った。まず、CD25 抗体にて制御性 T 細胞を消失させ検討した。その結果、CD25 陽性 T 細胞の除去によりアポトーシスが抑制された。次に、T 細胞欠損マウスに制御性 T 細胞のマーカーである Foxp3 陽性細胞と MARCH-I 欠損樹状細胞を移植し検討した。その結果、MARCH-I 欠損樹状細胞は Foxp3

陽性細胞存在下にてアポトーシスを起こす事が明らかとなった。これらの結果から、樹状細胞における MHC II の安定化によって、樹状細胞が Treg の認識を受け、Fas 依存性のアポトーシスを受ける事が明らかとなった。

(4) 成果のまとめ

MHC II のユビキチン化消失は、Treg による認識を促し、樹状細胞をアポトーシスによって排除する事が明らかとなった。MHC II のユビキチン化の消失は、樹状細胞の活性化による MARCH-I 抑制によって引き起こされることから、次の仮説を得るに至った。

(1) 定常状態において MHC II ユビキチン化の消失による安定化によって樹状細胞が恒常的に排除される事により、免疫学的寛容が成立している。(2) 感染によって、病原体由来抗原を提示する MHC II が安定的に発現し、CD4T 細胞を効率良く活性化することにより感染免疫応答を誘導する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Hunt, D., Wilson, JE., Weih, KA., Ishido, S., Harton, JA., Roche, PA. and Drake, JR. MARCH1 down-regulation in IL-10-activated B cells increases MHC class II expression. **PLoS One**. (査読有) 2012;7(5):e37330. Epub 2012 May 17.
2. Galbas, T., Steimle, V., Lapointe, R., Ishido, S. and Thibodeau J. MARCH1 down-regulation in IL-10-activated B cells increases MHC class II expression. **Cytokine**. (査読有) 2012 Apr 12. [Epub ahead of print]
3. Tanno, H., Yamaguchi, T., Goto, E., Ishido, S. and Komada, M. The Ankrd 13 family of UIM-bearing proteins regulates EGF receptor endocytosis from the plasma membrane. **Mol. Biol. Cell**. (査読有) 2012 Apr;23(7):1343-53. Epub 2012 Feb 1.
4. Kajikawa, M., Li PC., Goto, E., Miyashita, N, Aoki-Kawasumi, M, Mito-Yoshida, M, Ikegaya, M., Sugita, Y. and Ishido, S. The inter-transmembrane region of KSHV MIR2 contributes to B7-2 downregulation. **J. Virol**. (査読有) May;86(9):5288-96. Epub 2012 Feb 29.
5. Baravalle, G., Park, H., McSweeney, M., Ohmura-Hoshino, M., Matsuki, Y., Ishido, S. and Shin, JS. Ubiquitination of CD86 Is a Key Mechanism in Regulating Antigen Presentation by Dendritic Cells. **J. Immunol**. (査読有) 2011 Sep 15;187(6):2966-73. Epub 2011 Aug 17.
6. Toyomoto, M., Ishido, S., Miyasaka, N., Sugimoto, H. and Kohsaka, H. Anti-arthritis effect of E3 ubiquitin ligase, c-MIR, expression in the joints. **International immunology** (査読有) 2011 Mar;23(3):177-83.
7. Tze, LE., Horikawa, K., Domaschenz, H., Howard, DR., Roots, CM., Rigby, RJ., Way, DA., Ohmura-Hoshino, M., Ishido, S., Andoniou, CE., Degli-Esposti, MA. and Goodnow, CC. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. **J. Exp. Med**. (査読有) 2011 Jan 17;208(1):149-65. Epub 2011 Jan 10.
8. Goto, E., Yamanaka, Y., Ishikawa, A., Aoki-Kawasumi, M., Mito-Yoshida, M., Ohmura-Hoshino, M., Matsuki, Y., Kajikawa, M., Hirano, H. and Ishido, S. Contribution of K11-linked ubiquitination to MIR2-mediated MHC class I internalization. **J. Biol. Chem**. (査読有) 2010 Nov;285(46):35311-9. Epub 2010 Sep 10.
9. Walseng, E., Furuta, K., Bosch, B., Weih, KA., Matsuki, Y., Bakke, O., Ishido, S. and Roche, PA. Ubiquitination Regulates MHC Class II-Peptide Complex Retention and Degradation in Dendritic Cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. (査読有) 2010 Nov;107(47):20465-70. Epub 2010 Nov 8
10. Ishido, S., Matsuki, Y., Goto, E., Kajikawa, M. and Ohmura-Hoshino, M. MARCH-I: a new regulator of dendritic cell function. **Mol. Cells** (査読有) 2010 Mar;29(3):229-32. Epub 2010 Mar 4.

11. Ohmura-Hoshino, M., Matsuki, Y., Mito-Yoshida, M., Goto, E., Aoki-Kawasumi, M., Nakayama, M., Ohara, O. and Ishido, S. Cutting edge: Requirement of MARCH-I-mediated MHC II ubiquitination for the maintenance of conventional dendritic cell. **J. Immunol.** (査読有) 2009 Dec;183(11):6893-7.

[学会発表] (計 8 件)

1. 石戸聡、ユビキチンによる膜タンパク質輸送制御とその意義について、A T I 討論会、東京、2012年3月9日
2. 石戸聡、ユビキチン化による新たな免疫制御機構の仮説、徳島大学疾患ゲノム研究センター特別セミナー、徳島、2011年12月16日
3. 石戸聡、ユビキチン化による新たな免疫制御機構、第84回日本生化学会大会、京都、2011年9月23日
4. 梶川 瑞穂、Pai-Chi Li、後藤英治、杉田有治、石戸聡、Molecular basis for immunoreceptor recognition by MIR2 ubiquitin ligase of KSHV、International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011)、札幌、2011年9月15日
5. 石戸聡 ユビキチン修飾系による膜タンパク質の輸送制御、特定領域研究「タンパク質分解」シンポジウム「ユビキチン研究の新展開 タンパク質分解・新機能・疾患」、東京、2010年8月21日
6. Satoshi Ishido MARCH-I: A new regulator of dendritic cell function, INSERM-Pasteur-RCAI joint meeting Frontier in Immunology - from basic to clinics. 横浜、2010年8月30日
7. 石戸聡 主要組織適合抗原を制御するユビキチンリガーゼファミリー 第82回日本生化学会大会、ワークショップ「エンドサイトーシスによる細胞機能の制御」、京都、2009年10月21日
8. Satoshi Ishido Novel immune regulation by ubiquitination 32th Annual Meeting of the Molecular

Biology Society of Japan、横浜、2009年12月10日

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)
 名称: B7-2 分子または MHC クラス II 分子等の抗原提示関連分子の細胞表面における発現を負に制御する哺乳類由来の新規タンパク質とその利用
 特許第 4515266 号、登録日 2010-05-21
 発明者: 石戸聡
 権利者: 財団法人新産業創造研究機構

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
 石戸 聡 (ISHIDO SATOSHI)
 独立行政法人理化学研究所・感染免疫応答研究チーム・チームリーダー
 研究者番号: 1 0 2 7 3 7 8 1

(2) 研究分担者
 後藤 栄治 (GOTO EIJI)
 独立行政法人理化学研究所・感染免疫応答研究チーム・研究員
 研究者番号: 4 0 4 3 5 6 4 9

(3) 連携研究者
 なし