

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23日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590400

研究課題名（和文） 低酸素ストレス応答性分子シャペロンによる免疫応答制御

研究課題名（英文） Hypoxia-inducible ERO1- α acts as a member of pre-peptide loading complex and regulates immune responses in the context of MHC class I and class II molecules.

研究代表者

田村 保明 (TAMURA YASUAKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80322329

研究成果の概要（和文）：

小胞体中存在するendoplasmic reticulum oxidoreductin 1 (ERO1)- α は、正常組織と比較して、癌細胞では高発現していた。またERO1- α は低酸素で発現が誘導されるが、免疫組織学的検索により、腫瘍内の低酸素領域での発現増加を確認した。興味深いことに、大腸癌症例ではERO1- α の発現が高い腫瘍においては、MHC class Iの発現が維持されていた。このように腫瘍細胞におけるERO1- α の発現は、腫瘍細胞の免疫原性の維持に大変重要な分子であることが明らかになった。大腸癌細胞株SW480にERO1- α を強制発現させると、酸化型のMHC class I分子が増加し、細胞表面上の発現が増加した。一方、ERO1- α の発現をノックダウンすると、細胞表面上のMHC class I発現が低下し、細胞傷害性T細胞による認識が低下していた。さらに低酸素環境におけるMHC class Iによる抗原提示を検討する目的で、OVAを発現L細胞を用いて検討すると、ERO1- α 発現増加に伴って特異的細胞傷害性T細胞による認識が増強した。さらにB細胞性白血病株を用いて、ERO1- α のノックダウンを行うと、MHC class II分子の発現と抗原提示が抑制された。このようにERO1- α の発現は宿主免疫監視機構に重要な役割を果たしていることが明らかになった。この細胞内機序として、ERO1- α はPDIの再酸化を介してMHC class Iおよびclass II分子内のジスルフィド結合形成促進に関与していることを明らかにした。このように癌細胞におけるERO1- α の発現はMHC class I/II分子の発現に重要な役割を果たしており、腫瘍の免疫原性を規定する因子となると考えられた。また低酸素環境にある腫瘍に対するT細胞応答の理解に重要な分子であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The human endoplasmic reticulum oxidoreductin like (ERO1- α) is an oxidizing enzyme that exists in endoplasmic reticulum and is induced under stress environment such as the hypoxia. It regulates a redox state of various kinds of protein through protein disulfide isomerase (PDI). Interestingly, although the expression of ERO1- α in the normal tissue was comparatively limited, various types of cancer cells expressed the large amount of ERO1- α . As the major histocompatibility complex (MHC) class I molecule carries the intramolecular disulfide bonds, we examined whether the hERO1-La plays a role in the oxidative folding and the expression of MHC class I molecules in cancer cells. We established ERO1- α overexpressed and knockdown SW480 cells. As a result, surface expression of MHC class I molecule was up-regulated in the ERO1- α -overexpressed SW480 and down-regulated in the ERO1- α knockdown SW480. Moreover, we have observed that the oxidized form of MHC class I was increased in the hERO1-La-overexpressed SW480. In addition, we have observed that the hERO1-La knockdown SW480 have an impaired response to cytotoxic T lymphocyte (CTL). Interestingly, ERO1- α is highly expressed in the antigen presenting cells such as B cells and dendritic cells among the normal cells. As the major histocompatibility complex (MHC) class II molecule also carries the intramolecular disulfide bonds, we examined whether the ERO1- α plays a role in the oxidative folding and the expression of MHC class II molecules in B cell line. Because human B cell lymphoma line BALL-1 showed high expression of ERO1- α , we generated BALL-1 cells with ERO1- α knockdown using shRNA. As a result, surface expression of MHC class II molecule was down-regulated in the ERO1- α -knockdown cells compared to wild type cells. Moreover, knockdown of hERO1- α resulted in the decrease of oxidized form of MHC class II, thereby

decreasing the stable peptide-MHC class II complexes. These data suggested that ERO1- α may play an important role in the immune responses against foreign antigens. These data suggested that the ERO1- α regulates immune response via modulation of MHC class I and class II expression and the quality.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理

1. 研究開始当初の背景

担癌状態において、癌細胞は常に低酸素環境下に曝されており、癌細胞はこの低酸素環境に対し、様々な分子の発現を調節することによって適応している。特に、癌細胞は低酸素状態におかれると HIF-1 の発現を介して VEGF の産生を促進し、血管新生を誘導し、低酸素・低グルコース状態を改善することが最近明らかになってきた。一方、小胞体に存在する oxygen-regulated protein 150 (ORP150)、human endoplasmic reticulum oxidoreductase 1- α (ERO1- α) および protein disulfide isomerase (PDI) は低酸素によって誘導される分子シャペロンである。申請者の田村は、世界で初めて腫瘍から精製した Hsp70 および小胞体の分子シャペロンである Gp96 は癌抗原ペプチドを結合しており、これを免疫することによって、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導し、抗腫瘍効果・治療効果を示すことを報告した (Tamura et al, Science, 1997, Sato et al, Blood, 2001)。また腫瘍由来の Hsp70 や Hsp90 は樹状細胞に取り込まれ、樹状細胞に取り込まれ、外来性抗原である Hsp70/90-抗

原ペプチド複合体を MHC class I 分子に提示される経路であるクロスプレゼンテーション経路に誘導することを示した (Ueda et al, Cancer Sci.2004, Kurotaki et al, J Immunol, 2007)。さらに腫瘍から精製した ORP150 や in vitro で作製した ORP150-癌抗原ペプチド複合体を免疫した場合においても、クロスプレゼンテーション経路に入り、効率よく細胞傷害性 T 細胞を活性化すること示してきた。最近我々は、この ORP150 に会合する分子として ERO1- α を同定した。ERO1- α は PDI の酸化状態を保つという機能が報告されている酸化酵素であり、ジスルフィド結合の形成に大変重要な役割を果たしていることが示唆されている。これを裏付けるように、分子内に複数のジスルフィド結合を有する VEGF の産生調節に関与していることが報告されている。またごく最近 PDI は MHC class I 分子のジスルフィド結合形成に重要であると報告された。この事実から我々は、**低酸素で誘導される ERO1- α は低酸素環境下にある腫瘍細胞の MHC class I 分子の発現調節に関与する可能性を考えた。**さらに癌の免疫療法を考えた場合、この低酸素

環境下における宿主免疫機構と癌細胞の相互関係を理解することは重要であると考えられるが、その報告は少ない。

2. 研究の目的

固形癌に共通して存在する低酸素環境における、宿主免疫細胞による抗腫瘍免疫応答の解析を行う。すなわち各種ヒト癌細胞株における低酸素負荷による低酸素誘導性分子シヤペロンの発現変化とこれに伴う癌細胞におけるジスルフィド結合を有する免疫関連分子、特に MHC class I, class II 分子、CD80, CD86 を含む共刺激分子の発現変化・酸化還元状態について検討する。さらに腫瘍特異的な T 細胞の T 細胞受容体 (ジスルフィド結合を有する) の発現変化とその腫瘍細胞傷害活性に与える影響について検討する。本研究から得られる知見は、癌のワクチン療法の進歩や癌幹細胞を標的とする新しい治療に貢献できるものと考えられる。

3. 研究の方法

低酸素環境下で発現誘導される ERO1- α の機能、特にジスルフィド結合形成能が免疫関連分子発現に与える影響を検討する。また dominant negative として機能する変異遺伝子導入細胞株を作製することで、通常酸素分圧および低酸素環境における ERO1- α の免疫関連分子発現に関わる役割を明らかにする。

1. ヒト ERO1- α の CXXCXXC 変異遺伝子クローニング

(1) ERO1- α の C 末端側に存在する CXXCXXC モチーフは、そのジスルフィド結合形成に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、390 番目、394 番目、397 番目のシステイン(C) をアラニン (A) に変異した mutant 遺伝子をクローニングする。

(2) これを恒常的に ERO1- α と MHC class I 分子を発現している 293T 細胞、

hypovascular な腫瘍である膵臓癌細胞株 Panc-1, hypervascular な腫瘍である大腸癌細胞株 SW480, さらに B 細胞株 NH-1 に導入して、その MHC class I 分子, class II 分子の細胞表面上の発現変化をフローサイトメトリーを用いて検討する。

(3) 小胞体における MHC class I 分子, class II 分子の酸化還元状態、蛋白量について、我々が開発した抗ヒト HLA-ABC 抗体 EMR8.5 を用いて Western blotting 法により検討する。

(4) Blue native PAGE を用いた MHC class I-シヤペロン複合体構成分子の検討

ERO1- α 、PDI と peptide loading complex を形成する TAP, Tapasin, Erp57, カルネキシン、カルレティクリンとの複合体形成を、免疫沈降法および Blue native PAGE を用いて検討する。

4. 研究成果

1. ERO1- α は低酸素環境で発現誘導される分子である。

大腸癌細胞株 SW480 を 1% 低酸素環境で培養を行うと、ERO1- α の蛋白レベルの増加を認めた。培養開始 4 時間以降で、ERO1- α 発現は増大し、24 時間後ではおよそ 10 倍の蛋白量増加を認めた。

2. ERO1- α は低酸素環境で発現誘導される分子である。

大腸癌細胞株 SW480 を 1% 低酸素環境で培養を行うと、ERO1- α の蛋白レベルの増加を認めた。培養開始 4 時間以降で、ERO1- α 発現は増大し、24 時間後ではおよそ 10 倍の蛋白量増加を認めた。

3. 大腸癌、膵癌および乳癌組織における ERO1- α の発現

一般的に、少なくとも癌組織の一部は低酸素環境にあると考えられているため、腫瘍組織

における ERO1- α の発現を検討した。大腸癌組織では約 70% の症例で、不規則な地図状の染色パターンを示した。また膵臓癌では、約 60% に ERO1- α の発現を認めた。一方、乳癌組織では、約 30% に、胃癌では約 20% に染色陽性を認めたが、その頻度は、前 2 者と比較して、低かった。このように癌腫により発現率の差を認めるものの、正常組織では全く発現を認めないことから、ERO1- α は腫瘍に高発現していることが明らかになった。

4. ERO1- α -PDI システムによる MHC class I 分子の酸化的フォールディング

MHC class I 分子内には、3 箇所のジスルフィド結合 (S-S 結合) が存在する。特に抗原ペプチドを結合し、提示する α 2 ドメイン内の S-S 結合は T 細胞応答にとって非常に重要な役割を果たしていることが推測される。ERO1- α の基質である PDI は、この MHC class I 分子の S-S 結合を形成する酸化酵素であることが Park らによって示されている。この報告では PDI は peptide loading complex (PLC) の一員であることも示している。しかし、これについては否定的な報告も見られる。また PDI は MHC class I 分子の S-S 結合を形成する際、自身は還元されるため、再酸化される必要がある。この PDI を再酸化するのが ERO1- α であると考えられている。そこで、ERO1- α の機能が MHC class I 分子の品質や発現、さらには抗原提示能に関わっているかについて検討を行った。まず、SW480 細胞を用いて、その細胞溶解物における MHC class I 分子と ERO1- α 、PDI の分子会合を明らかにした。Non-reducing 状態での western blotting での検討で、ERO1- α と PDI は S-S 結合により会合していることを示した。さらにこの

ERO1- α -PDI システムの PLC への関与を明らかにするために、Blue native PAGE を用いて検討した結果、ERO1- α と PDI はカルネキシン、MHC class I 分子と複合体を形成していることを明らかにした。しかし、ERO1- α と PDI は TAP との会合は認めなかった。すなわち ERO1- α -PDI システムは TAP を中心とした PLC には含まれないことを明らかにした。この事実は、ERO1- α と PDI は PLC に入る前の段階で MHC class I 分子内の S-S 結合を形成したのち、PLC に送られると考えられた。

5. ERO1- α による MHC class I 分子の発現制御と抗原提示に及ぼす影響

上記の結果を基に、ERO1- α の発現が MHC class I 分子の酸化的フォールディングを介した細胞表面発現および酸化還元状態に及ぼす影響を検討した。大腸癌細胞株 SW480 に ERO1- α を強制発現させると、酸化型の MHC class I 分子が増加し、フローサイトメーターによる検討で細胞表面上の発現が 2.4 倍に増加した。一方、ERO1- α の発現をノックダウンすると、細胞表面上の MHC class I 発現が 40% 低下し、SW480 を傷害する細胞傷害性 T 細胞による認識が低下していた。これらの結果は、ERO1- α が MHC class I 分子内の S-S 結合形成に重要な役割を果たしており、S-S 結合形成不全が生じると、細胞表面上の MHC class I が低下し、T 細胞による認識が抑制されることを示すものである。さらに in vivo での意義を明らかにする目的で、低酸素環境下における MHC class I 分子による抗原提示能の変化を検討する目的で、OVA を発現させた L 細胞を用いて検討した。その結果、低酸素による ERO1- α 発現増加に伴って OVA 特異的細胞傷害性 T 細胞による認識が増強した。このように、腫瘍に高発現している低酸素誘導性 ERO1- α は MHC class I 分子

の酸化的フォールディングを介して、T 細胞に対する抗原提示に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

6. 大腸癌組織における MHC class

分子発現における ERO1- α の関与

次に大腸癌組織を用いて MHC class I 分子と ERO1- α の発現を検討した。興味深いことに、大腸癌症例では ERO1- α の発現が高い腫瘍においては、MHC class I の発現が維持されていた。一方、ERO1- α が発現低下している症例では、腫瘍組織での MHC class I 分子の発現は減弱していた。このように腫瘍細胞における ERO1-a の発現は、腫瘍細胞の免疫原性の維持に大変重要な分子であることが明らかになった。

7. ERO1- α による MHC class II 分子の発現制御と T 細胞応答

我々は ERO1- α は、MHC class II 分子を発現している B 細胞系腫瘍においても高い発現を認めることを明らかにしている。MHC class II 分子内には 4 箇所の S-S 結合が存在する。そこで B 細胞系における MHC class II 分子の発現制御における ERO1- α の意義を検討した。B 細胞性白血病株 NH-1 を用いて、ERO1- α のノックダウンを行うと、細胞表面上の MHC class II 分子の発現が著明に低下した。細胞内の MHC class II 分子のフォールディング、酸化還元状態を検討すると、ERO1- α ノックダウン細胞では MHC class II 分子と抗原ペプチドの複合体の発現低下を認めた。また、MHC class II 分子ヘテロダイマーのフォールディングを検討したところ、還元型から酸化型への回復が遅延することが明らかとなった。このような細胞を用いて、NH-1 特異的ヘルパー T 細胞クローンによる抗原認識を検討したところ、T 細胞応答が抑制された。このように ERO1- α の発現は MHC class I のみならず、MHC class II 分子の発現制御を介して、宿主免疫監視機構に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

8. システイン変異型 ERO1- α は MHC class I 分子内のジスルフィド結合形

成不全を惹起し、MHC class I 蛋白発現を減少させる。

ERO1- α の C 末端側に存在する CXXCXXC モチーフは、そのジスルフィド結合形成に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、390 番目、394 番目、397 番目のシステイン(C) をアラニン (A) に変異した mutant 遺伝子をクローニングし、293T 細胞に導入した。それぞれの変異 ERO1- α 導入細胞株において、MHC class I 分子の発現および酸化還元状態を検討すると、いずれの変異遺伝子導入細胞においても MHC class I 分子の細胞表面発現は、野生株と比較して低下していた。さらに細胞内での MHC class I 蛋白を western blotting により検討したところ、特に 394 番目の変異遺伝子導入細胞株で、MHC class I 分子の蛋白量が著減し、還元型の MHC class I 分子のみが検出された。この結果は 397 番目のシステインが PDI を介する S-S 結合形成に非常に重要であることを示すものである。今後、SW480 に同様の変異遺伝子を発現させ、T 細胞応答の変化を検討する。

9. 研究成果のまとめ

癌細胞における ERO1-a の発現は、MHC class I/II 分子の発現に重要な役割を果たしており、腫瘍の免疫原性を規定する因子となると考えられた。また低酸素環境にある腫瘍に対する T 細胞応答の理解に重要な分子であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Tamura Y. et al. Tumor-Produced Secreted Form of Binding of Immunoglobulin Protein (BiP) elicits Antigen Specific Tumor Immunity. J Immunology, 査読有り、186,

- 4325-4330, 2011.
2. Oura J, Tamura Y, Extracellular Heat Shock Protein 90 Translocates Chaperoned Antigen from Endosome to Proteasome for Generating Antigenic Peptide to be Cross-presented by Dendritic Cells. *Int Immunol*, 査読有り、23, 223-237, 2011.
 3. Okuya K., Tamura Y, Saito K, Kutomi G, Torigoe T, Hirata K, Sato N. Spatiotemporal regulation of heat shock protein 90-chaperoned self-DNA and CpG-oligodeoxynucleotide for type-I interferon induction via targeting to static early endosome. *J Immunol*. 査読有り、15;184, 7092-9, 2010.
 4. Kutomi G, Tamura Y. Targeting to Static Endosome is Required for Efficient Cross-Presentation of ER-resident Oxygen Regulated Protein 150-Peptide Complexes. *J Immunol*. 査読有り、183, 5861-5869, 2009.

[学会発表] (計 3 件)

1. 久木田和晴、田村保明. Hypoxia-inducible human endoplasmic reticulum oxidoreductase 1-L α (hERO1-L α) regulates immune response of cancer cells via modulation of MHC class I expression. 日本癌学会, 平成 23 年 10 月 3-5 日, 名古屋
2. 田村保明. Human endoplasmic reticulum oxidoreductase 1-like α (hERO1-L α) governs expression of MHC class II molecules through redox state on the antigen presenting cells. 日本癌学会, 平成 23 年 10 月 3-5 日, 名古屋
3. 久木田和晴、田村保明. human endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 like (hERO1-L) による MHC class I 分子の発現制御. 日本病理学会, 平成 23 年 4 月 28 日, 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/pathol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 保明 (TAMURA YASUAKI)