

## 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25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22501027

研究課題名（和文） クロスプレゼンテーションにおけるHsp90 $\alpha$ 研究研究課題名（英文） Analysis of a role of Hsp90 $\alpha$  in antigen cross presentation

## 研究代表者

鶴殿 平一郎 (UDONO HEIICHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50260659

研究成果の概要（和文）： クロスプレゼンテーションにおける Hsp90 $\alpha$  研究

がん抗原やウイルス抗原をキラーT細胞が認識するためには、樹状細胞がウイルス感染細胞などの抗原を貪食し、エンドソーム内の抗原が細胞質へ引き出され、プロテアソームで分解されて抗原ペプチドになることが重要である。しかし、抗原が細胞質へ移動する機構は不明である。我々は、Hsp90 $\alpha$ 欠損マウスを作製し、熱ショックタンパク質 Hsp90 がエンドソーム中の抗原を細胞質へ移動させるのに必須であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Analysis of a role of Hsp90 $\alpha$  in antigen cross presentation

In antigen cross-presentation, dendritic cells (DCs) take up extracellular antigens (Ag) and translocate them from the endosome to the cytosol for proteasomal degradation. The molecules responsible for Ag translocation are unknown. By using Hsp90 $\alpha$  KO mice, we demonstrated that HSP90 is essential in pulling endosomal Ag out into the cytosol.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 免疫学

科研費の分科・細目： 腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード： Hsp90、クロスプレゼンテーション、樹状細胞、ノックアウトマウス

### 1. 研究開始当初の背景

クロスプレゼンテーション (XP) 経路は生体防御の観点から極めて重要視されている。気道上皮などへのウイルス感染、或は遺伝子変異に伴う正常細胞の癌化などの際には、これらの変異細胞は専門的抗原提示細胞ではないため、T細胞を活性化することができない。そこで、感染細胞、癌細胞内に生じたウイルス抗原、癌抗原をDCが取り込み、分解処理した後にMHCクラスI分子により抗原提示を行い、CD8<sup>+</sup>T細胞を活性化することが大切になる。我々はXP経路におけるHsp90の役割について検討を行った。現在までのpreliminaryな結果は、Hsp90がXP経路に必須の分子であることを示唆している。Hsp90はエンドソーム膜から細胞質へ移行中の蛋白に会合し、細胞質へ引き出す分子であると予想される。Hsp90のうちHsp90 $\alpha$ にそのような機能があるようだ。従って、本研究ではHsp90による細胞外蛋白抗原の細胞質内移行とそれに続くユビキチン-プロテアソーム(UP)システムによる分解に焦点を当てる。クロスプレゼンテーションにおける分子シャペロンHsp90の必要不可欠な役割についてHsp90 $\alpha$  nullを用いて明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究では我々が作成したHsp90 $\alpha$  nullマウス及びconditional Hsp90 $\alpha$  KOマウスを用いて、腫瘍免疫に於けるHsp90 $\alpha$ の役割、とりわけ樹状細胞によるクロスプレゼンテーション(XP)におけるHsp90 $\alpha$ の機能を解析する。さらに、エンドソームに取り込まれた外来性蛋白抗原が細胞質へ出てくる際にHsp90 $\alpha$ が必須である事を証明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子改変マウスを用いた実験

Hsp90 $\alpha$  nullマウス及びDCでのHsp90 conditional KOマウスの作成とクロスプレゼンテーション機能の解析

個体レベルにおけるHsp90の重要性を解析するために、Hsp90 $\alpha$ のconditional KOマウスの作成を行う。これは既に進行中であり、現在既にfloxマウスが取れており、これとCD11c-CREと掛け合わせてDCのみでHsp90機能を欠失したマウスを作製する。Hsp90 $\alpha$  nullマウス由来の樹状細胞を用いてクロスプレゼンテーション機能を調べる。また、Hsp90 $\alpha$  nullマウス及びDCでのin vitro及びin vivoクロスプレゼンテーションに関する研究を行う。

#### (2) 生化学的解析

分子メカニズム、即ち外来性蛋白のエンドソームから細胞質への移行におけるHsp90 $\alpha$ の役割に関する検討：phagosome/endosomeからの抗原遊離実験を行う。

我々は、Hsp90 $\alpha$ は正に“driving force molecule”としてエンドソーム膜から細胞質へ移行中の蛋白抗原に会合し、細胞質へ引き出す分子であると予想している。そうであるならば、正常BMDCとHsp90 $\alpha$  null BMDCにOVAを取り込ませた場合、Hsp90 $\alpha$  null BMDCではOVAの細胞質移行が消失ないし遅れると予測される。これに関しては、注意深く詳細に検討を加えていく。まず、細胞分画キットを用いてのOVAへの細胞質移行をみる実験を行う。次にphagosome/endosomeを精製し、そこにHsp90 $\alpha$ を含む細胞質分画を加える事により、実際にOVAが外にreleaseされるのかという実験を行う。0.8ミクロンのLatex BeadsにOVAを吸着させこれをBMDCに取り込ませると効率よくXPが作動するがHsp90阻害剤で抑制される。このLatex Beadsを含んだphagosome/endosomeの精製に我々は既に成功している。従って、Hsp90 $\alpha$  null BMDCにLatex Beads-OVAを取り込ませphagosome/endosomeを精製し、ここに正常BMDC又はHsp90 $\alpha$  null BMDCより調整した細胞質分画を加えた場合、外にreleaseされるOVAの量がHsp90 $\alpha$  nullでは減少するのかを調べる。

### 4. 研究成果

本研究では我々が作成したHsp90 $\alpha$  nullマウス及びconditional Hsp90 $\alpha$  KOマウスを用いて、腫瘍免疫に於けるHsp90 $\alpha$ の役割、

とりわけ樹状細胞によるクロスプレゼンテーション(XP)におけるHsp90 $\alpha$ の機能を解析した。さらに、エンドソームに取り込まれた外来性蛋白抗原が細胞質へ出てくる際にHsp90 $\alpha$ が必須である事を証明することを目指した。この目的のうち主要な部分は達成されたと考える。まず、Hsp90 $\alpha$  null マウス及びHsp90 $\alpha$  KO マウスの作成、樹立は予定通りに進み、同マウスを用いて in vitro、in vivo のXPにおけるHsp90 $\alpha$ の必要性を証明する事ができた。即ち、Hsp90 $\alpha$  null 樹状細胞では可溶性抗原及び細胞関連抗原の両方のXP機能が低下していた。またシトクロームc投与マウスではXPに関するCD11c+CD8+樹状細胞がアポトーシスにより死滅するが、Hsp90 $\alpha$  null マウスにおいては死滅が回避される事を証明した。即ち、投与したシトクロームcがHsp90 $\alpha$  null のCD11c+CD8+樹状細胞においては細胞質へ届かないことを示唆している。さらに貪食された可溶性抗原が細胞質へ移行する過程をImageStream解析及び蛍光顕微鏡解析により明らかにできた。即ち、Hsp90 $\alpha$  null 樹状細胞においては貪食されてエンドソーム内に入った抗原が細胞質へ移行しにくい事、またHsp90阻害剤で予め樹状細胞を処理しておく、細胞質への移行がさらに抑制されることがわかった。生化学的に抗原貪食ファゴソームを精製し、これにHsp90を添加するだけで抗原がファゴソームの外に遊離されることが判明した。

## 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9件)

- ① Eikawa S, Kakimi K, Isobe M, Kuzushima K, Luescher I, Ohue Y, Ikeuchi K, Uenaka A, Nishikawa H, Udono H, Oka M, Nakayama E. Induction of CD8 T-cell responses restricted to multiple HLA class I alleles in a cancer patient by immunization with a 20-mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) peptide. *Int. J. Cancer*, 132(2): 345-354, 2013. 査読

有 doi: 10.1002/ijc.27682.

- ② Ito S, Nagata Y, Susumu S, Yoneda A, Matsuo M, Yui K, Udono H, Eguchi S, Kanematsu. Phenotypic analysis of monocyte-derived dendritic cells loaded with tumor antigen with heat shock cognate protein 70. *T. Anticancer Res.*, 32(11): 4897-904. 2012. 査読有  
<http://ar.iiarjournals.org/>
- ③ Kato Y, Kajiwara C, Ishige I, Mizukami S, Yamazaki C, Eikawa S, Kakimi K. and Udono H. HSP70 and HSP90 differentially regulate translocation of extracellular antigen to the cytosol for cross-presentation. *Autoimmune diseases*, Volume 2012 (2012), Article ID 745962, 10 pages. 査読有  
doi: 10.1155/2012/745962.
- ④ Kajiwara C, Kondo S, Uda S, Dai L, Ichianagi T, Chiba T, Ishido S, Koji T and Udono H. Spermatogenesis arrest caused by conditional deletion of Hsp90a in adult mice. *Biology Open (BIO)*, 1: 977-982, 2012. doi: 10.1242/bio.2012646. 査読有  
doi: 10.1242/bio.2012646.
- ⑤ Li Y, Li S, Hoshino M, Ishikawa R, Kajiwara C, Gao X, Zhao X, Ishido S, Udono H, and Wang JY. HSP90 $\alpha$  deficiency does not affect Ig gene hypermutation and class switch but causes enhanced MHC class II Ag presentation. *Int. Immunol.*, 24: 751-758, 2012. 査読有  
doi: 10.1093/intimm/dxs076.
- ⑥ Mizukami S, Kajiwara C, Tanaka M, Kaisho T, Udono H. Differential MyD88/IRAK4 requirements for cross-priming and tumor rejection induced by hsp70-model Ag fusion protein. *Cancer Science*, 103,

851-859, 2012. 査読有  
doi:  
10.1111/j.1349-7006.2012.02233.x.

- ⑦ Udono H. Heat shock protein magic in antigen trafficking within dendritic cells - implications in antigen cross-presentation in Immunity. *Acta Medica Okayama*, 66(1): 1-6, 2012. 査読有  
[http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/am\\_o/vol66/iss1/1](http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/am_o/vol66/iss1/1)
- ⑧ Imai T, Kato Y, Kajiwara C, Mizukami S, Ishige I, Ichiyanagi T, Hikida M, Wang JY, Udono H. HSP90 contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 16363-16368, 2011. 査読有  
doi: 10.1073/pnas.1108372108.
- ⑨ Ichiyanagi T, Imai T, Kajiwara C, Mizukami S, Nakai A, Nakayama T, Udono H. Essential role of endogenous HSP90 of dendritic cells in antigen cross-presentation. *J. Immunology*, 185: 2693-2700, 2010. 査読有  
doi: 10.4049/jimmunol.1000821.

[学会発表] (計 18 件)

#### 国際 (招聘)

- ① Heiichiro UDONO, HSP70 and HSP90 differentially regulate translocation of extracellular antigen to the cytosol for cross-presentation. The 6<sup>th</sup> Conference on The Hsp90 Chaperone Machine, Sep. 22, 2012, Les Diablerets, Switzerland.
- ② Heiichiro UDONO, Dendritic cell requires HSP90 as a cytosolic translocator of extracellular antigen for cross-presentation. University of Michigan-RCAI Joint Workshop,

2011.12.11, (独) 理科学研究所RCAI (横浜).

#### 国内

- ③ Shingo Eikawa, Koji Kurose, Hirofumi Matsumoto, Midori Isobe, Akiko Uenaka, Shusaku Mizukami, Chihiro Yamazaki, Yoshihiro Ohe, Mikio Oka, Heiichiro Udono, Eiichi Nakayama: Inhibition of regulatory T-cell migration by ELR motif-binding peptide. 第71回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012年9月21日.
- ④ Chihiro Yamazaki, Shusaku Mizukami, Heiichiro Udono: Hsp90 existing on DC cell surface forms a chaperone complex and is involved in internalization of an antibody to Hsp90. 第71回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012年9月19日.
- ⑤ Shusaku Mizukami, Chihiro Yamazaki, Heiichiro Udono: Newly vaccine strategy with mAbs against heat shock protein 90 (HSP90) on surface of antigen presenting cells. 第71回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012年9月19日.
- ⑥ 水上修作、山崎千尋、鵜殿平一郎: 抗原提示細胞膜表面HSP90を標的としたmAbワクチン開発の基盤的研究、第16回日本がん免疫学会総会 (札幌)、2012年7月28日.
- ⑦ Shingo Eikawa, Koji Kurose, Hirofumi Matsumoto, Midori Isobe, Akiko Uenaka, Shusaku Mizukami, Chihiro Yamazaki, Mikio Oka, Heiichiro Udono, Eiichi Nakayama: Inhibition of regulatory T-cell migration by ELR motif-binding peptide. 第16回日本がん免疫学会総会 (札幌)、2012年7月27日.
- ⑧ 鵜殿平一郎、 水上修作、山崎千尋、榮川伸吾: FcR・依存性に発現する樹状細胞膜表面シャペロン複合体、第16回日本がん免疫学会総会 (札幌)、2012年7月27日.

- ⑨ Chihiro Yamazaki, Shusaku Mizukami, Heiichiro Udono: Hsp90 existing on DC cell surface forms a chaperone complex and is involved in internalization of an antibody to Hsp90. 第16回日本がん免疫学会総会（札幌）、2012年7月26日.
- ⑩ 水上修作、松浦貴志、梶原千晶、宇田静葉、鶴殿平一郎: 抗原提示細胞膜表面HSP90を標的としたmAbワクチンの可能性検討、第31回岡山免疫懇話会（岡山）、2012年3月7日.
- ⑪ 笠井道之、鶴殿平一郎、高浜洋介、胸腺上皮細胞株におけるbeta5サブユニットの発現プロファイル、第40回日本免疫学会総会・学術集会（千葉）、2011年11月29日.
- ⑫ Yu Kato, Takashi Imai, Chiaki Kajiwara, Shusaku Mizukami, Ikuo Ishige, Tomoko Ichianagi, Masaki Hikida, Wang Ji-Yang, Heiichiro Udono: Dendritic cells require HSP90 as a cytosolic translocator of extracellular antigen for cross-presentation. 第40回日本免疫学会総会・学術集会（千葉）、2011年11月28日.
- ⑬ 加藤 悠、今井 孝、梶原千晶、水上修作、石下郁夫、一柳朋子、引田正喜、王継揚、鶴殿平一郎: クロスプレゼンテーションには細胞質トランスロケーターとしてのHSP90が関与している、第6回臨床ストレス応答学会大会（名古屋）、2011年11月5日.
- ⑭ 水上修作、松浦貴志、宇田静葉、梶原千晶、鶴殿平一郎: 抗原提示細胞膜表面HSP90を標的としたmAbワクチンの可能性検討、第6回臨床ストレス応答学会大会（名古屋）、2011年11月5日.
- ⑮ 水上修作、松浦貴志、梶原千晶、宇田静葉、鶴殿平一郎: mAbs against Heat Shock Protein 90 (HSP90) on surface of antigen

presenting cells. 第70回日本癌学会学術総会（名古屋）、2011年10月5日.

- ⑯ 加藤 悠、今井 孝、梶原千晶、水上修作、石下郁夫、一柳朋子、疋田正喜、王継揚、鶴殿平一郎: Dendritic cells require HSP90 as a cytosolic translocator of extracellular antigen for cross-presentation. 第70回日本癌学会学術総会（名古屋）、2011年10月4日.
- ⑰ 加藤 悠、今井 孝、梶原千晶、水上修作、石下郁夫、一柳朋子、引田正喜、王継揚、鶴殿平一郎: クロスプレゼンテーションには細胞質トランスロケーターとしてのHSP90が必須である、第15回日本がん免疫学会総会（大阪）、2011年6月30日.
- ⑱ 水上修作、松浦貴志、梶原千晶、宇田静葉、鶴殿平一郎: mAbを用いた抗原提示細胞膜表面HSP90の解析とワクチンの可能性検討、第15回日本がん免疫学会総会、（大阪）、2011年6月30日.

〔図書〕（計2件）

- ① 鶴殿平一郎、生化学、熱ショックタンパク質と交差抗原提示機構、第84巻 第10号、829-839、2012.
- ② 山崎千尋、鶴殿平一郎、臨床免疫・アレルギー科樹状細胞による交差抗原提示とHSP. 58(2): 143-147, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：新規抗HSP90モノクローナル抗体  
NOVEL ANTI-HSP90 MONOCLONAL ANTIBODY  
発明者：鶴殿平一郎、水上修作  
権利者：（独）理化学研究所  
種類：PCT出願  
番号：PCT/JP2011/059213  
種類：US出願  
番号：13/086064  
出願年月日：2011/04/13

国内外の別：国外

[その他]

1. 化学工業日報 2011年9月20日  
抗原提示のしくみ解明  
たん白質 Hsp90 免疫認識機構に必須
2. 日経産業新聞 2011年9月28日  
免疫系、がん細胞認識し攻撃  
必須たんぱく質特定
3. 山陽新聞 2011年9月20日  
免疫活性化に特定タンパク
4. 読売新聞 2011年12月19日  
免疫細胞活性化に介添えたんぱく質
5. 日経プレスリリース 2011年9月20日

タンパク質の折り畳みを助ける「Hsp90」  
が免疫機構でも機能を発揮－樹状細胞が  
がんやウイルス抗原を取り込み、抗原提  
示する仕組みを解明－

6. RIKEN Research Highlight 2012/02/03  
“Holding back Immunity”

ホームページ

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/immuno/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鵜殿 平一郎 (UDONO HEIICHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：50260659