

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659223

研究課題名(和文) MHCクラス II 分子に提示される細胞内ミスフォールド蛋白質の機能解明

研究課題名(英文) Analysis of function of misfolded proteins presented on MHC class II molecules.

研究代表者

荒瀬 尚 (Arase, Hisashi)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：10261900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：我々は細胞内のミスフォールド蛋白質分子がペプチドに分解されることなく、MHCクラスIIによって細胞表面に運ばれることを発見したが、提示された蛋白質分子の機能は不明である。MHCクラスIIに提示された蛋白質分子が免疫応答に関与しているかを解析した。その結果、MHCクラスII分子がB細胞にも抗原を提示することが明らかになった。さらに、自己免疫疾患における自己抗体がMHCクラスII分子に提示されたミスフォールド蛋白質分子を特異的に認識することが明らかになった。以上より、MHCクラスII分子に誤ってミスフォールド蛋白質が提示されることが自己免疫疾患の原因である可能性が判明した。

研究成果の概要(英文)：MHC class II molecules play an important role in immune response by presenting peptide antigens to T cells. However, we found that MHC class II molecules transport cellular misfolded proteins to the cell surface without processing to peptides. Therefore, we analyzed functions of misfolded proteins transported to the cell surface by MHC class II molecules in this study. We found that proteins presented on MHC class II molecules efficiently stimulate antigen specific B cells. Although MHC class II molecules have been thought to present peptide antigens to T cells, our findings indicate that MHC class II molecules can present protein antigens to B cells. Furthermore, when we analyzed autoantibodies from autoimmune patients, we found that proteins presented on MHC class II molecules are specifically recognized by autoantibodies. These findings suggested that misfolded proteins aberrantly presented on MHC class II molecules are a target autoimmune diseases.

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：抗原認識 B細胞 MHCクラス II 自己免疫疾患 T細胞 関節リウマチ 自己抗体 HLA-DR

1. 研究開始当初の背景

細胞外から取り込まれた抗原は、ライソゾームによってペプチドに分解された後、MHC クラス II 分子に提示され、ヘルパーT細胞に認識される。このように、MHC クラス II 分子は免疫応答の制御に中心的な役割を担っている。また、MHC クラス II は MHC クラス I とともに様々な免疫疾患とも密接に関連している。しかし、依然として特定の MHC クラス II がどのように免疫疾患の発症と関連するかは、ほとんど明らかになっていない。一方、我々は、NK 細胞レセプター KIR のリガンド認識機構の解析から、偶然にも MHC クラス II が小胞体内のミスフォールド分子の細胞表面発現を誘導することを発見した。さらに、解析を進めることにより、小胞体内のミスフォールド分子は MHC クラス II のペプチド結合部位に結合し、MHC クラス II によって細胞外へ運ばれていることが明らかになった

2. 研究の目的

MHC クラス II 分子は、種々の細胞外の蛋白質分子由来のペプチドを提示することによって、免疫応答において中心的な役割を担っている。ところが、我々は NK 細胞レセプターによる認識機構の解析中に、細胞内のミスフォールド蛋白質分子がペプチドに分解されること無く蛋白質分子のまま MHC クラス II の抗原結合部位に結合し、MHC クラス II によって細胞表面に運ばれることを発見した。今まで MHC クラス II 分子が、ペプチドになっていない細胞内の蛋白質分子を提示することは全く知られておらず、全く新たな MHC クラス II 分子の機能であると考えられ、本研究によってその機能の解明を行う。

3. 研究の方法

293 細胞に MHC クラス II 分子とタグで標識した HEL 蛋白質を発現させ、それが MHC クラス II 分子に提示されるかどうかを解析した。MHC クラス II に提示された蛋白質分子が B 細胞の活性化に関与しているかどうかを解析するために、HEL 抗原に対する BCR を遺伝子導入した B 細胞ラインや GFP レポーター細胞が MHC クラス II に提示された蛋白質分子によって活性化されるかどうかを解析する。

4. 研究成果

(1) MHC クラス II 分子によるミスフォールド卵白リゾチームの提示

MHC クラス II 分子にミスフォールドした MHC クラス I 分子が提示されることから、他の分子でも同様な現象が認められる可能性が考えられる。そこで、分泌蛋白質である卵白リゾチーム (HEL) 蛋白質が MHC クラス II 分子に提示されるかどうかを解析した。HEL 蛋白質には、分子内に S-S 結合が数カ所存在するが、S-S 結合部位に変異を加えることでミスフォールドすることが知られている。そこで、野生型 HEL および変異型 HEL 蛋白質を 293T 細胞に発現させると単独では細胞表面に認められなかったが、マウスの MHC クラス II の一つである I-A^k の存在下では HEL が細胞表面に出現した。特に、野生型に比べて、変異型リゾチームは I-A^k によって効率よく細胞表面に誘導された。また、I-A^k によって誘導されたリゾチームは、野生型、変異型双方とも正しくフォールドされたリゾチームに特異的な抗体である HyHEL10 には認識されず、構造非依存性に認識する Gloop4 抗体では認識された。従って、HLA-Cw4 に限らず、小胞体内のミスフォールドされた分子は MHC クラス II 分子の抗原提示部位に結合すると、MHC クラス II 分子によって細胞表面に輸送され提示されることが判明した。

(2) MHC クラス II 分子による B 細胞への抗原提示能

高親和性の B 細胞レセプターを発現している B 細胞は可溶性分子にも反応するが、一般的に低親和性の B 細胞レセプターを発現しているナイーブな B 細胞のプライミングには、細胞表面上に抗原が提示されることが重要である。そこで、MHC クラス II 分子に提示されたミスフォールド蛋白質が B 細胞への抗原提示に関与する可能性を解析した。HEL 特異的な B 細胞レセプターである Gloop4 B 細胞レセプターを発現させた B 細胞 (HEL-A20 B 細胞) を作製し、I-A^k と HEL のトランスフェクタントとの共培養を行った。その結果、HEL 単独では HEL-A20 B 細胞の活性化は認められなかったが、I-A^k に提示された HEL は HEL-A20 B 細胞を強力に活性化した (図 1)。以上より、MHC クラス II 分子は小胞体内のミスフォールドした分子を提示することによって抗原特異的な B 細胞応答に関与していることが明らかになった。

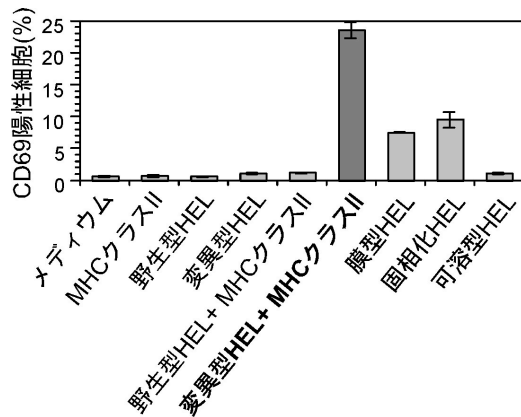


図1 MHC クラス II に提示された HEL 蛋白質における HEL 特異的な B 細胞の活性化

HEL 特異的な Gloop2 B 細胞レセプターを発現させた A20 B 細胞 (HEL-A20 細胞) を、MHC クラス II、野生型 HEL、変異型 HEL、膜型 HEL を発現させた 293T 細胞と共培養し、6 時間後、活性化マーカーである CD69 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで調べた。また、コントロールとして、プレートに固相化した HEL や可溶性 HEL で HEL-A20 細胞を刺激した (文献 5 より改変)。その結果、MHC クラス II に提示された HEL 蛋白質における HEL 特異的な B 細胞を活性化することが判明した。

(3) ミスフォールド蛋白質/MHC クラス II 分子複合体が自己抗体の標的分子である。

関節リウマチにおける代表的な自己抗体としてリウマチ因子が古くから知られており、現在でも関節リウマチの診断の重要な指標になっている。リウマチ因子は、変性した IgG に対する自己抗体であるが、病態生理的な標的抗原は明らかでなく、なぜ関節リウマチでリウマチ因子が陽性になるかも明らかでない。IgG は重鎖と軽鎖からなり、重鎖のみでは分泌もされないし、細胞表面にも発現しない。ところが、MHC クラス II 分子が存在すると IgG 重鎖 (IgGH) が単独で細胞表面に出現するようになる。MHC クラス II 分子による IgGH の細胞表面発現は、MHC クラス II 分子に結合したペプチドで阻害されるため、IgGH は MHC クラス II 分子のペプチド結合部位に結合する。さらに、この IgGH/MHC クラス II 分子複合体は、関節リウマチ患者の自己抗体に認識されることが明らかになった。一方、血清中の正常な IgG は認識されない。また、IgGH/MHC クラス II 分子複合体に対する自己抗体は関節リウマチ患者に特異的で、健康人や他の疾患でリウマチ因子が陽性になる患者でも検出されない。従って、IgGH/MHC クラス II 分子複合体は、関節リウマチの自己抗体の特異的標的抗原であることが判明した。実際、IgGH/MHC クラス II 分子複合体は関節リウマチ患者の滑膜組織中に検出されるが、変形性

関節症の滑膜組織には認められない。

(4) 抗ミスフォールド蛋白質/MHC クラス II 分子複合体抗体と関節リウマチ感受性

関節リウマチの感受性には MHC クラス II 分子が最も深く関与している。そこで、IgGH と種々の HLA-DR との複合体に対する自己抗体の結合性を解析すると、それぞれの HLA-DR アリルによる関節リウマチの罹りやすさ (オッズ比) と IgGH/HLA-DR 分子複合体に対する自己抗体の結合性という全く異なるパラメーターが、非常に高い相関を示した (相関係数 0.81)。つまり、IgGH/HLA-DR 分子複合体を形成しやすい MHC クラス II 分子を持っているヒトは関節リウマチに罹りやすいことになる。以上より、IgGH/MHC クラス II 分子複合体が自己抗体の標的として関節リウマチの発症に関わっていると考えられる。

(5) ミスフォールド蛋白質/MHC クラス II 分子複合体による新たな自己免疫疾患発症機構

細胞内ではミスフォールド蛋白質は常に作られているが、通常は細胞内で速やかに分解され、細胞外に運ばれることは無い。従って、免疫システムはそのようなミスフォールドタンパク質に寛容になっていないと考えられる。ところが、細胞内のミスフォールド蛋白質が自己免疫疾患に感受性の MHC クラス II 分子と結合すると、細胞外に輸送されてしまい、それが異物として自己抗体の標的になっていると考えられる。

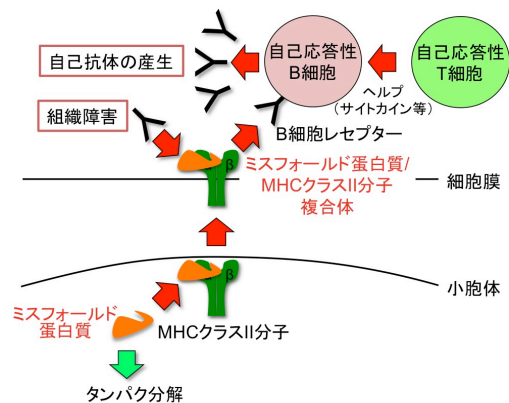


図2 ミスフォールド蛋白質/MHC クラス II 分子複合体による新たな自己免疫疾患の発症機構

MHC クラス II 分子は、非免疫細胞ではほとんど発現しておらず、IgG を多量に産生するプラズマ細胞も MHC クラス II の発現は低い。ところが、感染等の炎症で産生される IFN- γ 等のサイトカインによって、ヒト由来細胞は非常に強く MHC クラス II を発現する。従って、MHC クラス II 陰性細胞に MHC クラス II 分子が発現すると、細胞内のミスフォールド蛋

白質がMHCクラスII分子によって細胞外へ輸送されてしまい、異物としてミスフォールド蛋白質に対する自己抗体の産生が引き起こされると考えられる(図2)。実際、自己免疫疾患は、ウイルス感染等をきっかけとして発病する場合がある。また、多くの自己免疫疾患の標的組織では、異常なMHCクラスII分子の発現が認められる。このように、MHCクラスII分子が誤って細胞内のミスフォールド蛋白質を細胞外へ輸送してしまうことが、関節リウマチを含めて多くの自己免疫疾患の原因ではないかという新たな発症機構が考えられた。

通常は細胞内で生じた変性蛋白質は速やかに分解され、細胞外に排出されることはない。ところが、細胞内の変性蛋白質が、自己免疫疾患に罹りやすい型の主要組織適合抗原に結合してしまうと、それらは分解されずに主要組織適合抗原によって細胞外に運ばれて、その複合体が異物として自己抗体の標的分子になっていることが明らかになった。

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. Kuroki, K., Wang, J., Ose, T., Yamaguchi, M., Tabata, S., Maita, N., Nakamura, S., Kajikawa, M., Kogure, A., Satoh T., Arase, H. and Maenaka, K. Structural basis for simultaneous recognition of an O-glycan and its attached peptide of mucin family by immune receptor PILR α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. in press 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1324105111
- ②. Wang, J., Arase, H. Regulation of immune responses by neutrophils. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2014 in press 査読有
DOI: 10.1111/nyas.12445.
- ③. Haldar, M., Kohyama, M., So, A. Y., Kc, W., Wu X, Briseño, C.G., Satpathy, A. T., Kretzer, N.M., Arase, H., Rajasekaran, N.S., Wang, L., Egawa, T., Igarashi, K., Baltimore, D., Murphy, T.L., Murphy, K.M. Heme-Mediated SPI-C Induction Promotes Monocyte Differentiation into Iron-Recycling Macrophages. *Cell* 156:1223-1234. 2014. 査読有
DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.069.
- ④. Jin, H., Arase, N., Hirayasu, K., Kohyama, M., Suenaga, T., Saito, F., Tanimura, K., Matsuoka, S., Ebina, K., Shi, K., Toyama-Sorimachi, N., Yasuda, S., Horita, T., Hiwa, R., Takasugi, K., Ohmura, K., Yoshikawa, H., Saito, T., Atsumi, T., Sasazuki, T., Katayama, I., Lanier, L.L., and Arase, H. Autoantibodies to IgG/HLA-DR complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111: 3787-3792. 2014. 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1401105111.
- ⑤. Arase, N., Wataya-Kaneda, M., Oiso, N., Arase, H., Katayama, I. CD1a-positive familial cutaneous mastocytosis without germ-line or somatic mutations in c-kit. *Br J Dermatol*. 169:201-204. 2013, 査読有
DOI: 10.1111/bjd.12265.
- ⑥. Imai, T., Koyanagi, N., Ogawa, R., Shindo, K., Suenaga, T., Sato, A., Arai, J., Kato, A., Kiyono, H., Arase, H., Kawaguchi, Y. Us3 Kinase encoded by Herpes Simplex Virus 1 Mediates Downregulation of Cell Surface Major Histocompatibility Complex Class I and Evasion of CD8+ T cells. *PLoS One*. 8:e72050. 2013, 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0072050.
- ⑦. Jiang, Y., Arase, N., Kohyama, M., Hirayasu, K., Suenaga, T., Jin, H., Matsumoto, M., Shida, K., L. Lanier, L., Saito, T. and Arase, H. Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules. *Int. Immunol*. 25:235-246, 2013, 査読有
DOI: 10.1093/intimm/dxs155.
- ⑧. Wang, J., Shiratori, I., Uehori, J., Ikawa, M., Arase, H. Neutrophil infiltration during inflammation is regulated by PILR α via modulation of integrin activation. *Nat. Immunol*. 14:34-40, 2013, 査読有
DOI: 10.1038/ni.2456.
- ⑨. Ihara, S., Kida, H., Arase, H., Tripathi, L.P., Chen, Y.A., Kimura, T., Yoshida, M., Kashiwa, Y., Hirata, H., Fukamizu, R., Inoue, R., Hasegawa, K., Goya, S., Takahashi, R., Minami, T., Tsujino, K., Suzuki, M., Kohmo, S., Inoue, K., Nagatomo, I., Takeda, Y., Kijima, T., Mizuguchi, K., Tachibana, I., Kumanogoh, A. Inhibitory Roles of Signal Transducer and Activator of

Transcription 3 in Antitumor Immunity during Carcinogen-Induced Lung Tumorigenesis. *Cancer Res.* 72:2990-2999, 2012, 査読有
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4062.

〔学会発表〕(計 13 件)

- ①. 荒瀬 尚、病原体とペア型レセプター、第 67 回日本細菌学会東北支部総会、東北大学(宮城)、2013 年 8 月 30 日
- ②. 荒瀬 尚、MHC クラス II 分子と自己抗体、免疫サマースクール 2013、ザ・ルイガンズ(福岡)、2013 年 8 月 1 日
- ③. Tadahiro Suenaga, Yuki Tanaka, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya, Hisashi Arase, “Herpesvirus 6 Glycoprotein B (gB), gH, gL and gQ are Necessary and Sufficient for Cell-to-Cell Fusion”, 38th International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, Michigan (USA), 2013 年 7 月 21 日
- ④. 末永忠広、松本麻紀、有澤史倫、森康子、荒瀬尚、「水痘帯状疱疹ウイルス(VZV) glycoprotein H (gH) 受容体の解析」、第 28 回ヘルペスウイルス研究会、淡路夢舞台国際会議場(淡路市)、2013 年 5 月 31 日
- ⑤. Hisashi Arase, “Misfolded ER proteins transported to the cell surface by MHC class II molecules are targeted by autoantibodies”, Immune Regulation by Immunoreceptors, 筑波大学(つくば市)、2013 年 4 月 12 日
- ⑥. Fuminori Arisawa, Jing Wang, Tadahiro Suenaga, Hisashi Arase, Human cytomegalovirus UL10 regulates immune response via inhibitory PILR α , 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫)、2012 年 12 月 6 日
- ⑦. Yan Jiang, Hui Jin, Masako Kohyama, Noriko Arase, Kouyuki Hirayasu, Tadahiro Suenaga, Maki Matsumoto, Kyoko Shida, Lewis L. Lanier, Takashi Saito, Ichiro Katayama and Hisashi Arase, Transport of misfolded ER proteins to the cell surface by MHC class II molecules, 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸国際会議場(神戸)、2012 年 12 月 6 日
- ⑧. Jing Wang, Ikuo Shiratori, Junji Uehori, Masahito Ikawa, Hisashi Arase, Neutrophil infiltration during inflammation is regulated by PILR α via modulation of integrin activation, 第

41 回日本免疫学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫)、2012 年 12 月 5 日

- ⑨. 田中 悠喜、末永 忠広、松本 麻紀、森 康子、荒瀬 尚、ヘルペスウイルス 6 型の膜融合は gB, gH, gL, gQ によって引き起こされる、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪(大阪)、2012 年 11 月 13 日
- ⑩. 末永 忠広、松本 麻紀、有澤 史倫、森 康子、荒瀬 尚、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の感染におけるシアル酸の役割、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪(大阪)、2012 年 11 月 13 日
- ⑪. Jing Wang, Ikuo Shiratori, Junji Uehori, Masahito Ikawa & Hisashi Arase, Neutrophil infiltration during inflammation is regulated by PILR α via modulation of integrin activation, IEIIS2012, National Center of Sciences Building(東京), Oct. 25, 2012
- ⑫. 谷村 憲司、小嶋 伸恵、荒瀬 尚、山田 秀人、妊娠中の水痘初感染により子宮内胎児死亡に至った 1 例、第 27 回ヘルペスウイルス研究会、あいち健康プラザ健康宿泊館プラザホール(愛知)、2012 年 6 月 7 日
- ⑬. 末永忠広、松本麻紀、有澤 史倫、森康子、荒瀬尚、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の膜融合におけるシアル酸の役割、第 27 回ヘルペスウイルス研究会、あいち健康プラザ健康宿泊館プラザホール(愛知)、2012 年 6 月 7 日

〔図書〕(計 2 件)

- ①. 荒瀬規子、荒瀬尚、医薬ジャーナル社、血液フロンティア、2013、7 (39-45)
- ②. 王静、荒瀬尚、医歯薬出版株式会社、週刊 医学のあゆみ「免疫グロブリン様受容体による免疫制御と疾患」2013、6 (219-224)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：自己抗体の検出方法、自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する方法、自己抗体の検出試薬および自己免疫疾患用の試験試薬
発明者：荒瀬尚、谷村憲司、金暉、荒瀬規子
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-148833
出願年月日：2013 年 7 月 17 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒瀬 尚 (ARASE, Hisashi)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：10261900