

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700993

研究課題名(和文) 樹状細胞膜表面におけるHsp90分子の分子生物学的意義

研究課題名(英文) Studies on the molecular biological implications of dendritic cell surface Hsp90

研究代表者

山崎 千尋(YAMAZAKI, Chihiro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60620995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：Hsp90は細胞質に存在し、正常な三次元構造をとれず凝集したタンパク質分子を認識して正しい構造を取れるようrefoldingを助ける、シャペロンと呼ばれる分子群の一員である。本研究課題において、Hsp90の機能を解析するために作製したモノクローナル抗体を用いた解析により、樹状細胞膜表面にHsp90が存在することが確認された。また、この抗体はHsp90依存的に樹状細胞内にエンドサイトーシスされることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Several monoclonal antibodies to Hsp90 have been established, and one of them, cl one 5H12, revealed that Hsp90 existed on dendritic cell surface. Because Hsp90 does not have a transmembrane domain, it should need to make a complex with a transmembrane protein. To analyze this cell surface complex, 6H8 was used to immunoprecipitate Hsp90 on the dendritic cell line, DC2.4, and the complex contained at least Hsp90, Hsc70, Hsp70-Hsp90 organizing protein (Hop).

We also have data which shows that antigen conjugated to another mAb to Hsp90, 6H8, efficiently cross-presented in vivo. To clarify the mechanisms of this phenomenon, we assayed internalization of 5H12 to DC2.4 and found that 85% of surface-bound 5H12 was internalized to DC2.4 within 15 minutes. This rapid and efficient internalization should be an explanation to immunostimulating effect of mAb to Hsp90.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：免疫学 Hsp90 樹状細胞 エンドサイトーシス クロスプレゼンテーション

### 1. 研究開始当初の背景

Hsp90 は細胞質に存在し、正常な三次元構造をとれず凝集したタンパク質分子を認識して正しい構造を取れるよう refolding を助ける、シャペロンと呼ばれる分子群の一員である。樹状細胞により貪食された外来性タンパク抗原が分解を受け抗原提示される過程(クロスプレゼンテーション)において、抗原タンパクはエンドゾームから細胞質へ移行するという過程を経るが、この過程に Hsp90 が必須であることが報告されている。

このように、Hsp90 は細胞質において多様な役割を果たす分子であるが、一方で、神経細胞やある種のがん細胞においては、本来細胞質に存在するはずの Hsp90 が細胞膜表面にも存在していることが報告されている。

Hsp90 がクロスプレゼンテーションの際に及ぼす影響を解析する目的で、Hsp90 特異的な新規モノクローナル抗体をいくつか作製していた。このうちの 6H8 という抗体は、当初の目的であったクロスプレゼンテーションを阻害する作用は持っていなかったが、予想外なことに DC の膜表面を染色できることが判明した。このことから、Hsp90 が DC の膜表面にも存在することが新たに明らかとなった。

膜表面 Hsp90 を認識する 6H8 抗体を蛍光標識し、樹状細胞様細胞株である DC2.4 を染色して 37 にて引き続き培養を行うと 15 分で 6H8 抗体がエンドサイトーシスされていることが確認できた。Hsp90 は正常な三次元構造をとれなくなったタンパク質分子に結合する能力が高いことから、そのようなタンパク質分子を抗原として細胞外から取り込む新たな経路が存在するのではないかと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究課題においては、樹状細胞膜表面 Hsp90 の存在様式と、その生理学的意義の解明を目的とした。具体的には、以下の通りである。

(1)Hsp90 が膜表面で会合している分子を同定し、その会合様式の全容を解明する。

(2)Hsp90 が関与するエンドサイトーシスの分子メカニズムを解明する。

(3)本来細胞質に存在するはずの Hsp90 が細胞膜表面に移行する経路を解明する。

(4)細胞膜表面の Hsp90 が樹状細胞の機能に及ぼす影響を明らかにし、その生理学的な存在意義を解明する。

### 3. 研究の方法

(1)樹状細胞膜表面の Hsp90 を認識できる抗体を用いて、Hsp90 を含む分子複合体を免疫沈降で回収し、質量分析により含まれるタンパク質分子を同定した。また、同定された分子を、shRNA を用いてノックダウンし、膜表面 Hsp90 の発現を FACS を用いて解析した。

(2)膜表面 Hsp90 を認識する抗体を蛍光標識し、樹状細胞様細胞株である DC2.4 を染色して 37 にて引き続き培養を行う際、Hsp90、Hsp70 の阻害剤を添加し、Hsp90 のエンドサイトーシスが阻害されるか否かを確認した。(3)細胞膜表面 Hsp90 の会合分子であると同定された分子について、蛍光タンパクとの融合タンパクを発現させる発現ベクターを作製した。この発現ベクターを DC2.4 にトランスフェクションし、蛍光顕微鏡を用いて細胞内局在の確認を試みた。

### 4. 研究成果

当初、当研究室で作製された抗 Hsp90 モノクローナル抗体 6H8 が樹状細胞様細胞株 DC2.4 の細胞膜表面を染色することから、樹状細胞膜表面には Hsp90 が存在するとしてその生理的存在意義、また Hsp90 を含む細胞膜上の複合体の解析を試みた。

しかしその後の解析により、DC2.4 には FcRI (CD64) が高発現していることが判明し、解析に使用してきた抗 Hsp90 モノクローナル抗体 6H8 のサブクラスがマウス IgG2a であったため、6H8 は Hsp90 への結合以外に Fc レセプターを介して結合していることが強く示唆された。サブクラスがマウス IgG1 である別の抗 Hsp90 抗体 (5H12) を用いて再度解析を行ったところ、それでもなお DC2.4 は染色されたがその蛍光強度は弱く、膜表面に Hsp90 は存在するものの微量であることが確認された。また、より生理的条件に近い樹状細胞としてマウス骨髄由来樹状細胞を染色したところ、やはり非常に弱い細胞膜表面での Hsp90 の発現は認められた。

(1)Hsp90 が膜表面で会合している分子の同定

DC2.4 の膜表面を抗 Hsp90 モノクローナル抗体で染色し、余分な抗体を洗浄した。その後 DC2.4 を溶解することで、膜表面 Hsp90 のみを免疫沈降し、会合しているタンパクを質量分析とウェスタンブロットを用いて解析した。その結果、この複合体には少なくとも Hsp90/Hop/Hsc70/FcR が含まれていることが判明した。他の co-chaperone である Hsp40、p23、AHA1 はこの複合体に含まれていないことも判明した。

shRNA を用いて FcR をノックダウンしたところ、膜表面 Hsp90 の発現が低下した。このことから、膜表面 Hsp90 の発現には FcR が必須であることが明らかとなった。FcR は細胞膜貫通ドメインを持つが、細胞外ドメインは非常に小さいため、Hsp 複合体が細胞膜表面に存在するためには他の分子の関与が考えられた。FcR と会合するいくつかの既知の分子について、shRNA を用いてノックダウンを行ったところ、FcRI をノックダウンした際に膜表面 Hsp90 の発現が低下した。なお、この確認の際には抗 Hsp90 抗体 (5H12) とそのアイソタイプコントロール(マウス

IgG1)を用いており、DC2.4細胞への5H12の結合が、抗体のFc部位とFcレセプターとの結合に影響されている可能性は排除された。

(2)Hsp90が関与するエンドサイトーシスの分子メカニズムの解明

抗Hsp90抗体(5H12)を蛍光色素(Alexa Fluor488)とビオチンで標識し、DC2.4細胞を染色した後に余分な抗体を洗浄した。その後4または37で細胞を15分間培養した後、別の蛍光色素(APC)で標識されたストレプトアビジンを添加した。この際、ビオチン標識された5H12が細胞内にエンドサイトーシスされていれば、ビオチンとストレプトアビジンが結合できず、APCの蛍光強度が減少する。37で細胞を培養した時のAlexaFluor488とAPCの蛍光強度の減少率を比較することにより、5H12のエンドサイトーシス効率を測定することができる。また、同様の解析をアイソタイプコントロール(マウスIgG1)、抗FcRI抗体を用いて行い、これらの抗体でエンドサイトーシスの様子を比較した。

FACSを用いて解析を行ったところ、アイソタイプコントロールに比べて、5H12は効率よく細胞内へ取り込まれていることが認められ、5H12の取込みはHsp90依存的事であることが示唆された。このときHsp90、Hsp70の阻害剤を添加しても5H12の取込みは阻害されなかったことから、Hsp90、Hsp70の機能自体は取込みに影響しないことが分かった。

一方で、抗FcRI抗体は3715分間の培養では細胞内への取込みが認められなかった。これらの結果より、Hsp90が細胞膜表面に存在するためにはFcRIが必要だが、抗Hsp90抗体がエンドサイトーシスされる際には、FcRIと複合体を形成しておらず、別々の動態を示すということが示唆された。

抗Hsp90抗体のエンドサイトーシスのメカニズムを解明する手段として、抗Hsp90抗体(6H8)にモデル抗原ovalbumin(OVA)を結合させたものを抗原としてマウスに投与し、OVA特異的CD8陽性T細胞(OT-1)への抗原提示が効率よく行われるかを確認した。この際、F(ab')<sub>2</sub>化6H8(Fcレセプターに結合できない)と、アイソタイプコントロール(マウスIgG2a)についても同様にOVAを結合させ、マウス生体内での抗原提示を解析した。この結果、6H8-OVA、F(ab')<sub>2</sub>化6H8-OVAは、IgG2a-OVAよりも効率よく抗原提示されることが判明し、抗Hsp90抗体のエンドサイトーシスは細胞膜表面Hsp90との結合に依存し、Fcレセプターによらない、ということが示唆された。

細胞膜Hsp90複合体とFcR、FcRIとの共局在や、抗Hsp90抗体のエンドサイトーシスの様子を蛍光顕微鏡で視覚的に観察することも試みたが、5H12はDC2.4を染色するがその蛍光強度は非常に弱く、蛍光顕微鏡で

観察するのは非常に困難であった。この問題を解決するため、CDRが6H8と同一でサブクラスがIgG1である抗体(6H8-IgG1)の作製を、遺伝子組換えを用いて試みたが、期間中に6H8-IgG1を高効率で産生する細胞の取得には至らなかった。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 5件)

水上修作、山崎千尋、岡山容子、鵜殿平一郎、抗原提示細胞膜表面HSP90を標的としたmAbを用いたワクチン開発の基盤的研究、第17回日本がん免疫学会総会、2013年7月5日、宇部市ANAクラウンプラザホテル宇部

山崎千尋、水上修作、鵜殿平一郎、樹状細胞膜表面に存在するHsp90はシャペロン複合体を構成し、抗Hsp90抗体の迅速な取込みに関与する、第71回日本癌学会学術集会、2012年9月19日、札幌市教育文化会館

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を用いたワクチン開発の基盤的研究、第71回日本癌学会学術集会、2012年9月19日、札幌市教育文化会館

山崎千尋、水上修作、鵜殿平一郎、Hsp90 existing on DC 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、2012年7月26日、札幌市北海道大学学術交流会館

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を用いた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、2012年7月26日、札幌市北海道大学学術交流会館

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山崎 千尋 (YAMAZAKI CHIHIRO)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60620995