

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 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：2013～2014

課題番号：25670143

研究課題名(和文)小胞体内ミスフォールドタンパク質の細胞外への輸送機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of misfolded protein transportation to outside cells

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

研究成果の概要(和文)：我々は、ミスフォールドしたMHCクラスI分子を細胞外へ輸送する分子としてMHCクラスII分子をクローニングした。そこで、他の蛋白質を解析したところ、卵白リゾチームや抗体の重鎖、さらに、リポ蛋白質の一つである 2GP1がMHCクラスII分子に結合することで、細胞外へ輸送され、関節リウマチや抗リン脂質抗体症候群で産生される自己抗体の特異的な標的抗原になっていることが判明した。一方、ミスフォールド蛋白質輸送分子を明らかにするために、細胞表面のミスフォールド蛋白質に会合している分子の検索を行った。その結果、質量分析によって、いくつかの候補分子が同定された。

研究成果の概要(英文)：We have identified MHC class II molecules as a molecule that transports cellular misfolded MHC class I molecules to the cell surface. When we analyzed other proteins, hen egg lysozyme, immunoglobulin heavy chain and 2-glycoprotein I were also transported to the cell surface by MHC class II molecules upon association with MHC class II molecules. Furthermore, these misfolded proteins transported to the cell surface by MHC class II molecules were found to be specific targets for autoantibodies produced in rheumatoid arthritis and antiphospholipid syndrome. In order to identify molecules that transport misfolded proteins to the cell surface, we analyzed molecules that associate with misfolded proteins at the cell surface. We found that several molecules are associated with misfolded proteins by mass spectrometry.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ミスフォールドタンパク質 分子シャペロン MHCクラス 自己抗体 自己免疫疾患

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内外にミスフォールドタンパク質が蓄積すると様々な異常がおこり、アルツハイマー病やアミロイドーシス等様々な疾患の原因になる。小胞体内のミスフォールドタンパク質の品質管理機構として ERAD の分子機構が盛んに研究されてきたが、そのような品質管理を逃避する分子機構についてはほとんど知られていない。従って、ミスフォールドタンパク質によって引き起こされる疾患は、品質管理機構が十分に働かないのが原因の一つであると考えられてきた。ところが、我々は、細胞表面分子の相互作用の解析中に、ミスフォールドタンパク質を能動的に細胞外へ輸送する分子機構が存在することを発見した。

### 2. 研究の目的

細胞内のミスフォールドタンパク質は通常は厳格な品質管理を受け速やかに分解され、細胞外に輸送されることはないと考えられてきた。しかし、我々は、細胞表面にミスフォールドタンパク質が恒常的に発現する細胞から、ミスフォールドタンパク質を積極的に細胞表面へ輸送する分子が存在することを発見した。そこで、本研究ではミスフォールドタンパク質が ERAD を逃れて細胞表面に到達する分子機構について解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) MHC クラス II 分子によって細胞外へ輸送されるミスフォールドタンパク質の同定

ミスフォールドした MHC クラス I 分子を細胞表面に発現する細胞の cDNA ライブラリーをミスフォールドタンパク質が細胞表面に発現しない細胞へ導入することにより、細胞表面にミスフォールドタンパク質の発現を誘導する分子として MHC クラス II 分子をクローニングした。実際、いくつかの分子を MHC クラス II 分子と発現させることにより、そのミスフォールドタンパク質が細胞表面もしくは培養液中に認められるようになったが、生理的な状況で細胞内のどのミスフォールドタンパク質を細胞外へ輸送しているかは明らかでない。そこで、MHC クラス II 分子によって細胞表面に輸送される分子を同定する。

#### (2) 新たなミスフォールドタンパク質の輸送分子の同定

特定のミスフォールドタンパク質を細胞外へ輸送する分子の一つとして MHC クラス II 分子を同定したが、MHC クラス II 欠損細胞においても、ミスフォールドタンパク質の発現が完全に欠落することはない。従って、MHC クラス II 分子以外にも、ミスフォールドタンパク質を細胞外へ輸送する分子が存在すると思われる。そこで、ミスフォールドタンパク質の輸送に関わる分子の同定を試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) MHC クラス II 分子によって細胞外へ輸送されるミスフォールドタンパク質の同定

我々は、ミスフォールドした MHC クラス I 分子を細胞外へ輸送する分子として MHC クラス II 分子をクローニングした。そこで、他の蛋白質を解析したところ、卵白リゾチームや抗体の重鎖、さらに、リボ蛋白質の一つである  $\beta$ 2GPI が MHC クラス II 分子に結合することで、細胞外へ輸送されることが判明した。さらに、MHC クラス II 分子に結合した抗体重鎖や  $\beta$ 2GPI は、それぞれ、関節リウマチや抗リン脂質抗体症候群で産生される自己抗体の特異的な標的抗原になっていることが判明した。実際、患者由来の滑膜や脱落膜を解析すると、抗体重鎖や  $\beta$ 2GPI が MHC クラス II 分子に会合していることが判明した。従って、MHC クラス II 分子によって、細胞外へ輸送されたミスフォールド蛋白質は、自己抗体の標的として、自己免疫疾患の発症に関与していると考えられた。

#### (2) 新たなミスフォールドタンパク質の輸送分子の同定

前述のように、我々は、ミスフォールド蛋白質を細胞外へ輸送する分子として MHC クラス II 分子を同定したが、ある種の細胞では MHC クラス II を発現していなくてもミスフォールド蛋白質が細胞表面に認められることがあることが判明した。そこで、MHC クラス II 分子以外のミスフォールド蛋白質輸送分子を明らかにするために、細胞表面のミスフォールド蛋白質に会合している分子の検索を行った。その結果、質量分析によって、いくつかの候補分子が同定された。そこで、それらの分子が実際に、細胞表面のミスフォールド蛋白質の発現に関与しているかを今後の研究で明らかにする予定である。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Tanimura, K., Jin, H, Suenaga, T., Morikami, S., Arase, N., Kishida, K., Hirayasu, K., Kohyama, M., Ebina, Y., Yasuda, S., Horita, T., Takasugi, K., Ohmura, K., Yamamoto, K., Katayama, I., Sasazuki, T., Lanier, L. L., Atsumi, T., Yamada, H. and Arase, H.  $\beta$  2-glycoprotein I / HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood*. 125: 2835-2844, 2015, 査読有 DOI: 10.1182/blood-2014-08-593624.
2. 荒瀬 尚, 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、臨床免疫・アレルギー

- 一科、第63卷 第2号 187-192, 2015, 査読無
3. Kishida, K., Kohyama, M., Kurashima, Y., Kogure, Y., Wang, J., Hirayasu, K., Suenaga, T., Kiyono, H., Kunisawa, J., Arase, H. Negative regulation of DSS-induced experimental colitis by PILR. *Int. Immunol.* 27: 307-314, 2015, 査読有  
DOI: 10.1093/intimm/dxv004.
  4. 荒瀬 尚、自己免疫疾患におけるMHC(HLA)クラスII分子のあらたな機能、週刊 医学のあゆみ 「HLAのブレイクスルー—臨床応用と疾患研究の進歩」、第251巻・第4号 283-288, 2014, 査読無
  5. Suenaga, T., Kohyama, M., Hirayasu, K., Arase, H. Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system. *Microbiol Immunol.* 58:513-522, 2014, 査読有  
DOI: 10.1111/1348-0421.12180.
  6. Deng, M., Lu, Z., Zheng, J., Wan, X., Chen, X., Hirayasu, K., Sun, H., Lam, Y., Chen, L., Wang, Q., Song, C., Huang, N., Gao, F. G., Jiang, Y., Arase, H., and Zhang, C. A motif in LILRB2 critical for Angptl2 binding and activation. *Blood.* 124:924-935, 2014, 査読有  
DOI: 10.1182/blood-2014-01-549162.
  7. 荒瀬 規子、金 暉、荒瀬 尚、自己免疫疾患の新たな発症メカニズム、感染・炎症・免疫、第44巻2号 67-69, 2014, 査読無
  8. 荒瀬 規子、金 暉、荒瀬 尚、自己免疫疾患の新たな発症メカニズム、細胞工学、第33巻 第7号 762-763, 2014, 査読無
  9. 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 $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111:8877-8882, 2014, 査読有  
DOI: 10.1073/pnas.1324105111
  10. Wang, J., Arase, H. Regulation of immune responses by neutrophils. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1319:66-81, 2014, 査読有  
DOI: 10.1111/nyas.12445.
  11. 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.
  12. 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.
  13. Wang, J., Shiratori, I., Uehori, J., Ikawa M., and Arase, H. Neutrophil infiltration during inflammation is regulated by PILR $\alpha$  via modulation of integrin activation. *Nat. Immunol.* 14:34-40. 2013. 査読有  
DOI: 10.1038/ni.2456.
  14. Minami, T., Kijima, T., Kohmo, S., Arase, H., Otani, Y., Nagatomo, I., Takahashi, R., Miyake, K., Higashiguchi, M., Morimura, O., Ihara, S., Tsujino, K., Hirata, K., Inoue, K., Takeda, Y., Kida, H., Tachibana, I., Kumanogoh, A. Overcoming chemoresistance of small-cell lung cancer through stepwise HER2-targeted antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and VEGF-targeted antiangiogenesis. *Sci Rep.* 3:2669, 2013, 査読有  
DOI: 10.1038/srep02669.
  15. Imai, T., Koyanagi, N., Ogawa, R., Shindo, K., Suenaga, T., Sato, A., Arii, 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<sup>+</sup> T cells. *PLoS One.* 8:e72050. 2013, 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0072050.
  16. 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.

[学会発表] (計 30 件)

1. Hisashi Arase, Cellular misfolded proteins rescued from protein degradation by MHC class II molecules are targets for autoantibodies in autoimmune diseases, Immunology at the Forefront, the 6th IFRc International Symposium (招待講演), KNOWLEDGE THEATER, Grand Front Osaka, (Japan), Feb. 24<sup>th</sup>, 2015
2. 荒瀬 尚, 自己免疫疾患の新たな標的分子: ミスフォールド蛋白質/MHC クラス II 分子複合体, 第 22 回自己抗体と自己免疫シンポジウム (招待講演)、丸ビルホール (東京)、2015 年 2 月 7 日
3. Hui Jin, Lewis L. Lanier and Hisashi Arase, Cellular misfolded proteins rescued from protein degradation by MHC class II molecules are targets for autoantibodies in autoimmune diseases, Keystone Symposia on Autoimmunity and Tolerance, Keystone (U. S. A), Feb. 6<sup>th</sup>, 2015
4. 荒瀬 尚, Cellular misfolded proteins complexed with MHC class II molecules are targets for autoimmune diseases, 第 4 回眉山免疫シンポジウム (招待講演)、徳島大学 (徳島)、2015 年 1 月 30 日
5. 荒瀬 尚, 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、千葉アレルギークリニックカンファレンス 2015 (招待講演)、オークラ千葉ホテル (千葉)、2015 年 1 月 21 日
6. Noriko Arase, Atsushi Tanemura, You Reiri, Megumi Nishioka, Jin Hui, Hisashi Arase, Ichiro Katayama, Inhibition of melanogenesis by HLA class II molecules, 日本研究皮膚科学会 第 39 回年次学術大会・総会、ホテル阪急エキスポパーク (大阪)、2014 年 12 月 12 日
7. Hiwa Ryosuke, Ohmura Koichiro, Arase Noriko, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Matsuoka Sumiko, Iwatani Hirotsugu, Atsumi Tatsuya, Terao Chikashi, Mimori Tsuneyo, Arase Hisashi, Hiwa Ryosuke, Ohmura Koichiro, Arase Noriko, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Matsuoka Sumiko, Iwatani Hirotsugu, Atsumi Tatsuya, Terao Chikashi, Mimori Tsuneyo, Arase Hisashi, 第 43 回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館 (京都)、2014 年 12 月 12 日
8. Kishida Kazuki, Arase Hisashi, Processing of cellular misfolded protein complexed with MHC class II molecules, 第 43 回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館 (京都)、2014 年 12 月 11 日
9. Kohyama Masako, Kishida Kazuki, Arase Hisashi, PIR $\alpha$  negatively regulates size of adipose tissue by controlling monocyte mobility, 第 43 回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館 (京都)、2014 年 12 月 11 日
10. Jin Hui, Arase Noriko, Matsuoka Sumiko, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Nakamaru Yuji, Imatani Yoshinori, Katayama Ichiro, Arase Hisashi, MHC class II-restricted recognition of self-antigen/MHC class II complexes by autoantibodies, 第 43 回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館 (京都)、2014 年 12 月 10 日
11. Hisashi Arase, Cellular misfolded proteins complexed with MHC class II molecules are targets for autoantibodies in autoimmune diseases, France-Japan Workshop (招待講演), The conference room in Cassis is l'Oustau Calendal, Cassis (France), Oct. 23<sup>th</sup>, 2014
12. Hisashi Arase, Paired receptors in host pathogen interaction, 2014 NHRI/IBMS Joint International Conference on Inflammation & Disease (招待講演), Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica(Taiwan), Oct. 16<sup>th</sup>, 2014
13. 荒瀬 尚, Cellular misfolded proteins transported to the cell surface by MHC class II molecules are targets for autoantibodies, Novo Nordisk Innovation Summit 2014 (招待講演), 東京大学 (東京)、2014 年 10 月 2 日
14. 荒瀬 尚, 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、第 57 回日本臨床検査医学会近畿支部総会 (招待講演)、

- 神戸国際会議場 (神戸)、2014年9月20日
15. Tadahiro Suenaga, Fuminori Arisawa, Maki Matsumoto, Hisashi Arase, Sialic Acids on N-glycosylated VZV gB are Required for Membrane Fusion Mediated by Myelin-associated Glycoprotein (MAG), The 39th Annual International Herpesvirus Workshop (IHW2014), Kobe International Exhibition Hall, Japan, Sep. 19<sup>th</sup>, 2014
  16. Hisashi Arase, Regulation of Immune Response by Paired Receptors, Taishan Academic Forum on Cancer & Immune Singnaling Pathways And First Session Stem Cell Immunology Qilu International Forum, Yantai (China), Aug. 10<sup>th</sup>, 2014
  17. 荒瀬 尚、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、第 21 回リウマチ・膠原病セミナー (招待講演)、広島大学病院 (広島)、2014年7月31日
  18. Jin, H., Arase, N., Hirayasu, K., Kohyama, M., Suenaga, T., Saito, F., Tanimura, K., Matsuoaka, 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 in Rheumatoid Arthritis Specifically Recognize IgG Heavy Chain Complexed with HLA-DR, Which is Strongly Associated with Rheumatoid Arthritis Susceptibility. The 15th Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2014, Paris (France), Jun. 13<sup>th</sup>, 2014
  19. 金暉、荒瀬規子、平安恒幸、香山雅子、末永忠広、松岡須美子、斉藤隆、Lewis L. Lanier、荒瀬尚、MHC クラス II 分子によって細胞外へ輸送された細胞内ミスフォールド蛋白質が自己抗体の標的分子である、第 24 回 Kyoto T cell Conference、京都大学 (京都)、2014年5月17日
  20. Hisashi Arase, Regulation of Immune Response by Paired Receptors, The 3rd NIF Winter School on Advanced Immunology (招待講演), Awaji (Japan), Jan. 23<sup>th</sup>, 2014
  21. Jin Hui, Arase Noriko, Kohayama Masako, Saito Fumiji, Hirayasu Kouyuki, Matsumoto Maki, Shida Kyoko, Suenaga Tadahiro, Saito Takashi, Katayama Ichiro, Lanier Lewis L., Arase Hisashi, Rheumatoid factor binding to IgG heavy chain presented on HLA-DR is associated with Rheumatoid Arthritis susceptibility, 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ (千葉)、2013年12月13日
  22. Tanimura Kenji, Suenaga Tadahiro, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Arase Noriko, Kohayama Masako, Ebina Yasuhiko, Yasuda Shinsuke, Horita Tetsuya, Katayama Ichiro, Atsumi Tatsuya, Yamada Hideo, Arase Hisashi,  $\beta$  2-glycoprotein I presented on MHC class II molecules are recognized by autoantibodies in antiphospholipid syndrome, 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ (千葉)、2013年12月13日
  23. Kohyama Masako, Wang Jing Kishida Kazuki, Arase Hisashi, PILR $\alpha$  negatively regulates monocyte mobility, 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ (千葉)、2013年12月13日
  24. Kishida Kazuki, Kohyama Masako, Kurashima Yosuke, Wang Jing, Hirayasu Kouyuki, Suenaga Tadahiro, Kiyono Hiroshi, Kunisawa Jun, Arase Hisashi, PILR $\alpha$  negatively regulates DSS induced experimental colitis, 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ (千葉)、2013年12月12日
  25. Arisawa Fuminori, Arase Hisashi, Thymic epithelial cell-derived exosomes are responsible for MHC class II expression on thymocytes, 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ (千葉)、2013年12月12日
  26. Hisashi Arase, Misfolded proteins complexed with MHC class II molecules are targeted by autoantibodies, 日独免疫セミナー (招待講演), 日本平ホテル (静岡), Dec. 6<sup>th</sup>, 2013
  27. 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 (招待講演)、ザ・ルイガンズ (福岡)、2013年8月1日
  28. 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
  29. 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

30. 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

〔図書〕 (計 4 件)

1. 荒瀬尚、秀潤社、細胞工学、2013、5 (1215-1219)
2. 王静、荒瀬尚、科学評論社、臨床免疫・アレルギー科、2013、6 (492-497)
3. 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)
4. 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 2 件)

名称：免疫用ペプチド、それを含む免疫疾患用医薬組成物、および免疫疾患の予防または治療方法

発明者：荒瀬尚、岸田一輝

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-068043

出願年月日：2015 年 3 月 30 日

国内外の別：国内

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, PCT/JP2014/050796

出願年月日：2013 年 7 月 17 日

国内外の別：国内、国外

〔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

(3) 連携研究者

香山 雅子 (KOHYAMA, Masako)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：40598885

末永 忠広 (SUENAGA, Tadahiro)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20396675

平安 恒幸 (HIRAYASU, Kouyuki)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：30585170