

受賞者

星野 真理

独立行政法人 理化学研究所 免疫アレルギー総合科学研究センター
感染免疫応答研究チーム

研究テーマ

新規膜結合型E3ユビキチンリガーゼファミリーの機能解析およびその臨床応用

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスにより産生され、抗原提示に関与するMHCクラスI(MHC I)やB7-2の発現抑制により宿主免疫からの回避を行うと考えられているE3ユビキチンリガーゼ(E3)、MIR1, MIR2は、c-MIR等哺乳類ホモログとともにMIR(Modulator of Immune Recognition)ファミリーを形成する。その哺乳類E3の一つc-MIR(MARCH VI)はMHC II, B7-2をユビキチン化することにより、免疫機能を抑制する事ができることを明らかにした。さらにc-MIRのホモログ、MARCH I(c-MIR2)欠損マウスB細胞ではMHC II, B7-2の発現が亢進しており、免疫担当細胞の中で抗原提示細胞に分化異常が生じていることが明らかになってきている。そこで、哺乳類MIRの特性(すなわち、MHC II、副刺激分子(B7-2)の発現抑制作用)による生体での免疫制御機構を明らかにし、その異常によって引き起こされる疾病の予防・治療法の開発の発端としたい。

2. 方法

(I) 哺乳類MIRのMARCH I欠損(KO)マウスの解析

現在、MARCH I KO マウスの解析を行っており、これまで抗原提示細胞の中で樹状細胞に分化異常が生じていることを明らかにしてきているのでさらに細かく解析する。

また、そのMARCH I KOマウスでの抗原特異的抗体産生の低下、抗原提示細胞での分化異常の分子機序を明らかにするために以下の実験を行う。

(II) MHC II, B7-2が単独に高発現しているマウスの作成と解析

MARCH I KOマウスで観察されている免疫学的異常は、MHC II, B7-2によるものか、さらには、現在見出されていない標的分子の発現異常によるものかを明らかにする。従って、現在判明している標的分子であるMHC II, B7-2の発現異常によるものかを明らかにするため、次の方法にて詳細に検討する。

(A) MARCH I・MHC II 二重KOマウス, MARCH I・B7-2 二重KOマウスの作成と解析

MHC IIの発現をなくし、B7-2が高発現しているMARCH I・MHC II 二重KOマウス, B7-2の発現をなくし、MHC IIが高発現しているMARCH I・B7-2二重KOマウスを作製し、MARCH I KOにて認められた抗原提示細胞分化異常について検討する。

(B) 変異型I-A beta(MHC II) ノックインマウスの作成と解析

現在までに、MARCH IによるI-A beta細胞内領域、K225のユビキチン化がMHC IIの消化に重要である事を見出している。このリジン残基をアルギニンに置換し、MARCH I KOマウスの一つの表現系であるMHC IIが過剰発現するマウスを作成し、MARCH I KOマウスにて認められた抗原提示細胞分化異常について検討する。

(B) 変異型B7-2 ノックイン マウスの作成と解析

B7-2についても、MHC IIと同様に、conditional 変異マウスを作成し、B7-2高発現由来の免疫学的異常をMHC IIの場合と同様に検討する。

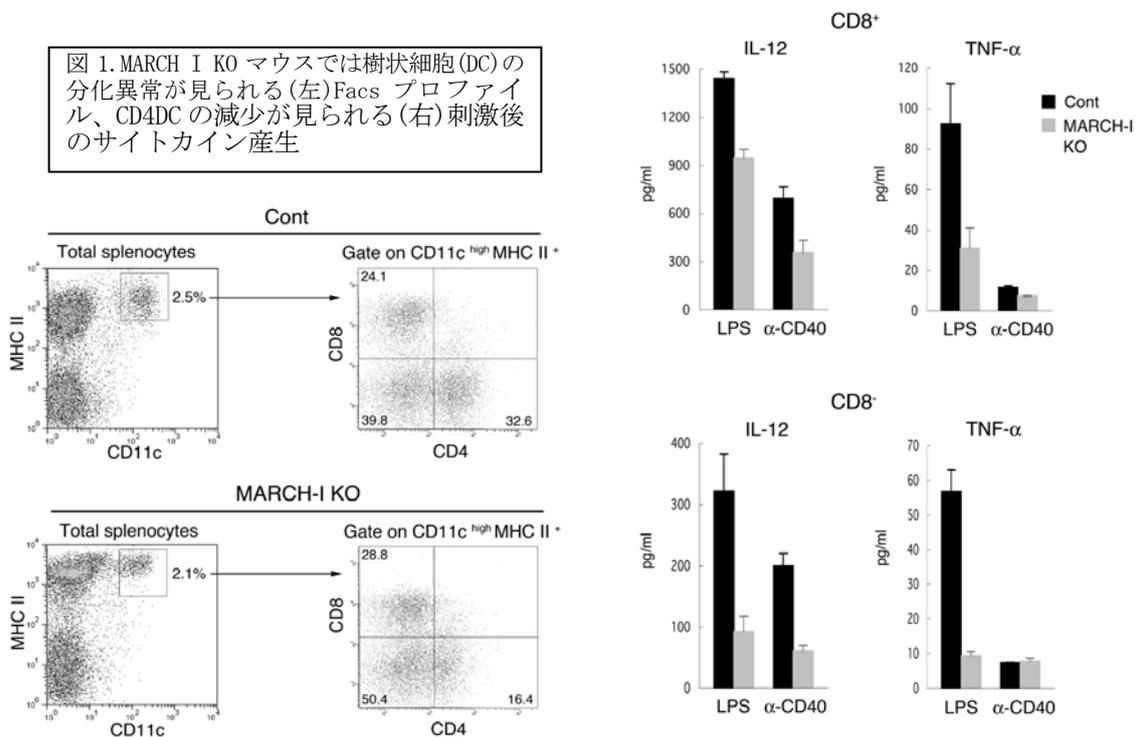
3. 結果 研究成果

MARCH I KOマウスのT細胞依存性抗原特異的抗体反応を調べるため、KOマウス、コントロールマウスに0週、2週目にOVAとAlumを腹腔内投与し、1週、2週、3週間後の抗原特異的抗体反応を調べた。初期免疫後KOマウスでは抗原特異的抗体産生の低下がみられ、それと同時に抗原特異的T細胞反応も低下していた。

Facsプロファイル、in vitroの実験でもT細胞、B細胞には異常が見られなかったため、樹状細胞(DC)について検討を行った。DCの細胞数を調べるとKOマウス、コントロールマウス間で違いはなかったが、Facs解析したところ、KOマウスではCD4DCの比率が減少していた。そこで、KOマウスの樹状細胞のサイトカイン産生、抗原提示能を調べたところ、コントロールの樹状細胞より低く、分化異常が認められることが示唆された。(図1参照)

次にこのDCの異常分化のメカニズムを明らかにするために、DCの分化異常がまずMARCH Iにより高発現しているMHC IIによるものか、B7-2によるものかを調べた。まずMARCH I KOマウスとMHC II KOマウスを掛け合わせ、MHC IIの発現を無くしたMARCH I・MHC II 二重KOマウスで同様な異常が生じるか調べたところ、MARCH I KOマウスで見られるCD4 DCの割合の減少、サイトカイン産生の減少は見られず、MHC II KOマウスと同レベルに戻っていた。次にB7-2の関与を同様に調べたところ、MARCH I・B7-2二重KOマウスではMARCH I KOマウスで見られるCD4 DCの割合の減少、サイトカイン産生の減少は回復していなかった。このことからMHC IIの発現がDCの分化異常に関与している可能性が示唆される。

図1. MARCH I KOマウスでは樹状細胞(DC)の分化異常が見られる(左)Facsプロファイル、CD4DCの減少が見られる(右)刺激後のサイトカイン産生



更にB7-2ではなくMHC IIの高発現によりDCの分化異常が生じることを証明するためにMHC II, B7-2それぞれのMARCH Iによるユビキチン化を不活性化したMHC IIだけでもしくはB7-2だけが高発現しているマウス, MHC II KIマウスとB7-2 KIマウスを作成し、そのDCを調べた。するとMHC IIがユビキチン化されずMHC IIが高発現しているMHC II KI マウスではMARCH I KOマウスと同様にCD4DCの比率が低く、樹状細胞のLPSもしくはanti-CD40 Ab刺激後のサイトカイン産生、抗原提示能も、コントロールの樹状細胞より低く、分化異常が認められた(図2参照)。B7-2がユビキチン化されずB7-2が高発現しているB7-2 KI マウスではMARCH I KOマウスで見られた分化異常が認められなかった。この結果からMHC IIの高発現により樹状細胞の分化異常が生じることが明らかとなった。

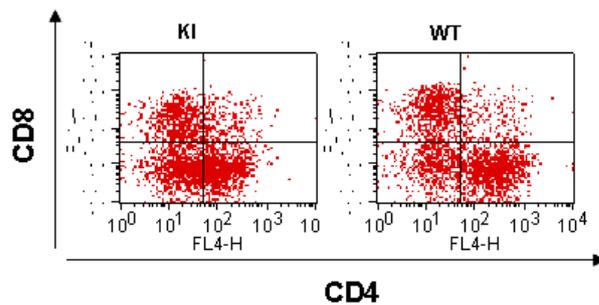
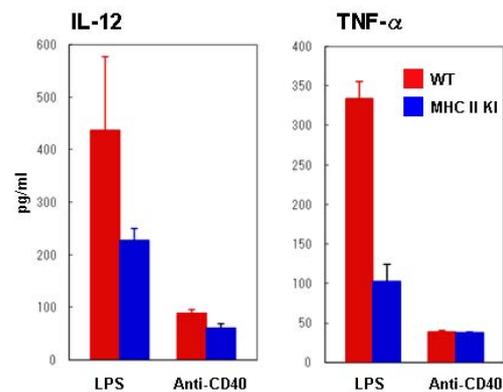


図2. MHC II が高発現しているKI マウスでは樹状細胞(DC)の分化異常が見られる(左)Facs プロファイル、CD4DCの減少が見られる(下)刺激後のサイトカイン産生

4. 考察 まとめ

以上の結果を要約すると、MARCH I KO マウスではCD4 DCの分化異常がみられ、T細胞依存性免疫反応が低下していた。MARCH I KO マウスのCD4 DCの分化異常が高発現しているMHC IIと関係していることから、MARCH IはMHC II代謝を通してDCのメンテナンスに関与している可能性が示唆された。現在この分化異常のメカニズムの解析を行っている。



5. 発表論文、参考文献

- (1) Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, Proietto A, ten Broeke T, Matsuki Y, Mount AM, Belz GT, O'Keefe M, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Stoorvogel W, Heath WR, Shortman K, Villadangos JA. Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. Nat Immunol. 2008 Nov;9(11):1244-52.
- (2) Ishido. S, Goto, E, Matsuki, Y, Ohmura-Hoshino, M,. E3 ubiquitin ligases and antigen presentation. Current Opinion in Immunology. In press.
- (3) 松木洋平, 星野真理, 後藤栄治, 石戸聡 ユビキチン化によるクラスII主要組織適合高原複合体の発現調節メカニズム、免疫2008: 50-56, 2007.