



Title	MHC class IIタンパク質発現を制御するユビキチンリガーゼの機能解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	井上, 綾乃
Description	配架番号 : 2749
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15431号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89878
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	INOUE_Ayano_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 井上 綾乃

学 位 論 文 題 名

MHC class II タンパク質発現を制御するユビキチンリガーゼの機能解析
(Functional analysis of a ubiquitin ligase that regulate MHC class II expression)

【背景と目的】近年、がん治療は目覚ましい発展を遂げ、中でも免疫チェックポイント阻害療法が注目されている。その治療効率を高めるために、がん細胞において主要組織適合抗原 (Major histocompatibility complex : MHC) class II 量を上昇させ、CD4⁺T 細胞を活性化させることが重要であるとわかってきた。MHC class II は通常、マクロファージや樹状細胞 (Dendritic cell: DC)、B 細胞などの特定の細胞でのみ定常的に発現しているが、IFN γ 刺激が加わると多くの細胞に発現誘導される。一方、RING 型ユビキチンリガーゼのサブファミリーである Tripartite motif-containing (TRIM) ファミリーは、さまざまなウイルスに対して防御的に働くことが知られており、そのメカニズムの多くは自然免疫の制御を介しているものと理解されており、獲得免疫との関連についてはあまり焦点が当てられてこなかった。さらに、IFN γ シグナルが MHC 分子の発現を制御している一方で、多くの TRIM タンパク質もまた IFN γ シグナルによって発現制御を受けていることから、IFN γ シグナルは TRIM タンパク質を介して MHC 分子の発現を制御する可能性が考えられた。MHC の発現制御に関するこれまでの研究では、そのマスター遺伝子である NLRC5 や CIITA に焦点が置かれ、これらがメインの制御機構と考えられていたが、転写後の過程における制御機構についてはあまり注目されてこなかった。以上を踏まえて本研究では、IFN γ 刺激によって誘導される TRIM ファミリー遺伝子を網羅的に探索し、TRIM ファミリータンパク質が MHC class II 抗原提示を調節する可能性について検討することとした。

【材料と方法】網羅的な TRIM 遺伝子群の mRNA の検証および MHC class II 関連因子の mRNA の検証について、リアルタイム PCR 法で解析を行った。レトロウイルスを用いて TRIM22 を過剰発現する U87MG 細胞、あるいは CRISPR-Cas9 法を用いてノックアウトした U87MG 細胞を作製し、ウェスタンブロット法で細胞内タンパク質量、フローサイトメトリー法で細胞表面タンパク質量、蛍光免疫染色法で細胞内・細胞表面双方のタンパク質量について解析を行った。MHC class II タンパク質の分解速度を測定するために、Cycloheximide を用いた分解アッセイを行った。TRIM22 過剰発現 HEK293T 細胞を作製し、免疫沈降・質量分析法により結合タンパク質の網羅的な検索を行った。

【結果】HEK293T 細胞と U 87MG 細胞を IFN γ で刺激後、TRIM 遺伝子群の mRNA レベルをリアルタイム PCR 法により網羅的に検証した結果、特に TRIM22 が IFN γ 刺激により最も強く発現上昇していることが明らかとなったため、主に TRIM22 に着目して以降の実験を進めることとした。TRIM22 過剰発現 U87MG 細胞を用いたウェスタンブロット法、フローサイトメトリー法により、MHC class II の細胞内タンパク質量や細胞表面発現量が大きく減少していることが明らかとなった。一方 IFN γ 刺激で TRIM22 に次いで発現が上昇した TRIM21 を過剰発現する U87MG 細胞では、MHC class II タンパク質量に変動は見られなかった。さらに、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞を用いたウェスタンブロット法、フローサイトメトリー法、蛍光免疫染色法により、MHC class II の細胞内タンパク質量や細胞

表面発現量が増加することが明らかとなった。その一方でリアルタイム PCR 法では、MHC class II ならびに、そのマスター制御因子である class II transactivator (CIITA) の mRNA 量は TRIM22 による影響を受けていなかった。Cycloheximide を用いた分解アッセイでは TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞において MHC class II タンパク質は不安定化しており、TRIM22 はむしろ MHC class II の分解を抑制していることが明らかとなった。また質量分析では TRIM22 と mTOR、mTOR 複合体構成因子である Raptor、Rictor、GβL との結合が認められた。

【考察】 TRIM22 による MHC class II 発現量の制御は、少なくとも CIITA による転写制御を介していないことが示された。加えて、cycloheximide を用いた分解アッセイでも MHC class II タンパク質の分解を促進することではなく、TRIM22 は翻訳の過程で MHC class II を制御している可能性が考えられた。翻訳の過程で、開始段階を制御している翻訳開始因子 eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E) は、eIF4G、eIF4A とともに、eIF4F と呼ばれる複合体を形成してキャップ依存的翻訳を開始する。mTOR を含む分子複合体 mTORC1 はこのキャップ依存的翻訳を促進するが、TRIM22 は mTOR 複合体と結合することから、mTOR/4E-BP1/eIF4E 経路を介して MHC class II の mRNA 翻訳を調節する可能性が示唆された。近年注目を集めている免疫チェックポイント阻害療法が効果を発揮するためには、CD4⁺ T 細胞の活性化も重要であることが明らかになってきた。抗原を CD4⁺ T 細胞に提示する MHC class II が発現しているがん細胞では、その発現量と免疫チェックポイント阻害療法の効果の間には正の相関があることが示唆されており、がん細胞において MHC class II 量を上昇させることが治療戦略として注目されている。TRIM22 阻害により MHC class II 量を上昇させることが可能であることから、TRIM22 は免疫チェックポイント阻害療法における潜在的な創薬標的となるものと考えられる。留意しなければならない点として、TRIM22 過剰発現細胞において、TRIM58 や TRIM54、TRIM50 など、いくつかの他の TRIM 遺伝子発現が増強していたことが挙げられる。TRIM22 過剰発現による MHC class II 発現減少が他の TRIM ファミリー遺伝子の発現変動を介して影響を及ぼしている可能性については今後の検討課題であると考えられた。

【結論】 TRIM タンパク質の一つである TRIM22 が、MHC class II の発現量を負に制御することを発見した。これまで多くの自己免疫疾患やがんにおいて、抗原提示メカニズム、特に T 細胞の関与が明らかにされている。MHC class II 分子は CD4 と結合し T 細胞を活性化させることから、今後、TRIM22 の機能を活性化あるいは抑制することによる、自己免疫疾患やがんに対する治療法の開発が期待できる。とりわけ免疫チェックポイント阻害療法において、TRIM22 がよい創薬標的となりうると考えられた。