



|                     |                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | MHC class IIの発現制御機構に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]                                                                 |
| Author(s)           | 春日, 優介                                                                                                  |
| Description         | 配架番号 : 2822                                                                                             |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                   |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                                  |
| Dissertation Number | 甲第15888号                                                                                                |
| Issue Date          | 2024-03-25                                                                                              |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/92013">https://hdl.handle.net/2115/92013</a>                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                         |
| File Information    | KASUGA_Yusuke_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    春   日   優   介

## 学 位 論 文 題 名

MHC class II の発現制御機構に関する研究

(Studies on the regulatory mechanism of MHC class II expression)

### 【背景と目的】

主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex: MHC）class II（MHC-II）は抗原提示と呼ばれる、微生物や病原体などの外来抗原情報を免疫細胞間で伝達するために必須の分子である。MHC-II は主に樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞と呼ばれる特定の免疫細胞に発現しており、これらの細胞内に取り込まれた細胞外抗原タンパク質は分解され、その一部が抗原として MHC-II と結合して複合体を形成する。抗原と結合した MHC-II 複合体は細胞表面に移動して CD4+T 細胞に抗原情報を伝達する。この刺激によって CD4+T 細胞が活性化し、以降の獲得免疫の活性化に繋がる。MHC-II は細胞種ごとに複雑な発現パターンを示すが、この発現調節を行なっているのが class II transactivator（CIITA）というマスター制御因子である。CIITA は免疫細胞に高発現しており、IFN- $\gamma$  によって誘導される。CIITA は獲得免疫が活性化する際に誘導されて中心的役割を果たすにもかかわらず、CIITA タンパク質量がどのように制御されているかは不明であった。本研究では CIITA タンパク質量の調整メカニズムを解明して、獲得免疫に重要な MHC-II 経路のブレーキとなるシステムに迫ることを目指した。

### 【対象と方法】

FLAG タグ付き CIITA 安定発現 HeLa 細胞を樹立し、免疫沈降法とそれに続く質量分析によって CIITA 結合タンパク質を同定した。FBXO11 の機能解析について、プロモーター活性評価はルシフェラーゼレポーターアッセイを、mRNA 発現は定量 PCR を、タンパク質発現はイムノブロットング法を、細胞表面発現はフローサイトメトリーをそれぞれ用いて評価した。FBXO11 の発現解析に用いた生検サンプルの RNA-seq による遺伝子発現データと、対応する患者の生存データは UNSC XENA

(<https://xenabrowser.net/datapages/>) より入手した。RNA-seq の  $\log_2(x+1)$  変換 RSEM 正規化カウントを z スコア正規化し、各遺伝子が患者の生存と関連するかどうかを解析した。全生存期間は R の `survminer` パッケージにより Kaplan-Meier 曲線で可視化した。

### 【結果】

FLAG タグ付き CIITA 安定発現細胞を用いた免疫沈降法及びそれに続く質量分析により、ユビキチン化酵素である FBXO11 が CIITA 特異的な結合タンパク質候補として同定された。また、免疫沈降に続くイムノブロットング解析により FBXO11 は CIITA に特異的に結合することが確認された。FBXO11 の過剰発現により、CIITA 依存的な MHC-II プロモーター活性の抑制が認められ、また CIITA タンパク質量の減少も認められた。さらに、FBXO11 過剰発現によって MHC-II の転写レベル及び表面発現レベルの低下が認められ、FBXO11 が CIITA タンパク質量調節を介した MHC-II の抑制性制御因子であることが示唆された。

次に FBXO11 が MHC-II を負に制御することをさらに確かめるため、マウス由来マクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用いて Fbxo11 欠損細胞株を樹立した。Fbxo11 欠損 RAW264.7 細胞では、MHC-II および関連遺伝子の発現レベルが上昇していた。他のグループが行なったヒト FBXO11 ノックアウト細胞と野生型細胞を比較した RNA-seq データを再解析したところ、MHC-II 及び関連遺伝子は FBXO11 ノックア

ウトによって発現量が上昇したが、CIITA の発現量の変化は認められなかった。これらの結果から FBXO11 が CIITA の翻訳後調節に関与することが示唆され、その結果として MHC-II 発現経路を制御していると推測された。

次に FBXO11 がユビキチンリガーゼであることより、FBXO11 が CIITA をユビキチン化依存的な分解に導くかどうかを確認した。タンパク質の半減期を調べるシクロヘキシミドチェイスアッセイおよびユビキチン化アッセイにより、CIITA の分解は主にユビキチン-プロテアソーム系を介して FBXO11 により制御されていることが示された。FBXO11 による CIITA タンパク質量の制御を患者検体でも確認するために、ヒトの FBXO11 と CIITA および MHC-II 遺伝子の発現量を解析した。正常組織および癌組織において、FBXO11 の発現レベルは CIITA とは相関関係を示さず、MHC-II と負の相関があることが明らかになった。興味深いことに、FBXO11 と CIITA の発現レベルの組み合わせは、乳癌患者の MHC-II 発現と患者予後と関連していた。

これらの結果から、FBXO11 は CIITA を分解するユビキチンリガーゼであり、MHC-II の発現量を決定する重要な負の制御因子であることが示唆され、MHC-II 経路のブレーキとなるシステムが明らかになった

#### 【考察】

MHC-II の制御は獲得免疫の理解に重要である。CIITA は 1993 年に発見されて以来、MHC-II 遺伝子発現のマスター制御因子として知られている。タンパク質量の制御には大きく分けて遺伝子からの転写レベルと、翻訳後のタンパク質レベルにおける制御の 2 つが関わっている。MHC-II のマスター制御因子である CIITA はこれまで転写レベルの研究が多くなされてきた。CIITA タンパク質の制御に関しては、その分解速度が速いことは報告されていたが、その仕組みに関しては未解明であった。CIITA 分子はタンパク質として機能するため、転写レベルの制御よりもタンパクレベルでの制御が、免疫細胞での CIITA の働きにより重要であると考えた。本研究では、偏りのないプロテオミクスのアプローチを用いて CIITA との結合タンパク質をスクリーニングし、FBXO11 を CIITA の結合パートナーとして同定した。FBXO11 は CIITA と相互作用し、ユビキチン化とプロテアソーム依存性分解を促進する。本研究によって FBXO11 が CIITA のタンパク質レベルと MHC-II の発現レベルの制御に重要な役割を果たしていることが示された。

また FBXO11 と癌患者の生存率との相関も観察された。MHC-II の異所性発現は、通常は MHC-II が発現しない複数の固形癌で観察されるが、このような MHC-II 発現の腫瘍における役割はまだ完全には解明されていない。しかし、腫瘍特異的 MHC-II と呼ばれる腫瘍における MHC-II 発現は、様々な腫瘍型において癌免疫の重要な役割の一端を担っており、腫瘍特異的 MHC-II の高発現は良好な予後や免疫チェックポイント阻害剤に対する反応性と関連している可能性があることが報告されている。我々の解析によって FBXO11 と CIITA の発現レベルの組み合わせは MHC-II 発現と大きく相関し、乳癌患者の予後バイオマーカーとして有用となる可能性があることを示唆している。

冒頭に述べたように、MHC-II は病原体から生体を守るために欠かせない分子であり、その MHC-II の発現を司る CIITA の制御メカニズムは獲得免疫を完全に理解するために必須である。私が今回明らかにした MHC-II の抑制性制御メカニズムは、免疫系が正しく制御されていないことで発症する自己免疫疾患の病態解明や、癌免疫による腫瘍排除メカニズム、またこれらの疾患の創薬ターゲットとなる可能性がある。

#### 【結論】

我々は FBXO11 が CIITA の真のユビキチンリガーゼであることを同定した。FBXO11 は、翻訳後修飾により CIITA タンパク質量を決定することによって、MHC-II の発現制御に重要な役割を果たしている。今後、FBXO11 を介した CIITA の分解を研究することで、MHC-II が関与する様々な疾患や癌のバイオマーカーの治療標的となり得る可能性がある。