

熱ショックタンパク質と交差抗原提示機構

鵜殿 平一郎

これまでの熱ショックタンパク質 (HSP) 研究の主流は生化学的手法によるものあるいは特定の細胞株を用いた実験系が大多数であったが、遺伝子改変マウスの作製が進むにつれその意義が生体レベルでも明らかにされるようになってきた。HSPは細胞をストレスから防御する、ということがその第一義的な役割だが、免疫系においてはがん抗原やウイルス抗原の抗原プロセッシングについては主要組織適合抗原 (MHC) による抗原提示に重要な役割をもつことが示唆されている。凝集性を帯び始めたタンパク質は HSP に認識され、抗原プロセッシングの過程に組み込まれる。Hsp90 α KO マウス作製とそれを用いた研究により、これまでの「HSPと免疫研究」に確信と前進がもたらされた。遺伝子改変マウスを用いた実験結果と生化学的解析さらには分子イメージングから得られる HSP の免疫系、特に交差抗原提示機構における役割について最新の知見を論述・考察したい。

1. はじめに

ウイルス抗原, がん抗原, 自己抗原を含む全てのタンパク質はリボソームで合成されるが, そのうち 3% 近くのタンパク質は何らかの理由で正常な立体構造がとれない。この異常タンパク質は凝集性なので放っておくと細胞死を招くため, すぐさまユビキチン化されてプロテアソームで分解される。分解されてできたペプチドのほとんどはアミノ酸としてリサイクルされるが, 数パーセントが小胞体に入り MHC クラス I 分子と結合し, 抗原ペプチドとして CD8⁺ T 細胞に提示される¹⁾。これを内在性抗原提示と呼ぶ。つまり不良タンパク質の分解・除去過程でできた副産物が抗原ペプチドとして免疫系を活性化することになる。一方, 抗原が抗原提示細胞の外側に存在する場合 (これを外来性抗原という), 貪食という方法で細胞内に取り込まれエンドソームないしファゴソームの中に閉じ込めら

れた状態になり, 次の二つの分解経路に進んでいく。まずエンドソームはカテプシンなどのタンパク質分解酵素を含むリソソームと融合する。これにより抗原は酵素に触れ切断・分解される。できたペプチド断片は MHC クラス II 分子と結合し続いて細胞膜表面へ移行して CD4⁺ T 細胞に提示される。これが外来性抗原提示である。この経路では外から取り入れた抗原は細胞質から完全に隔離されている。他方, エンドソームがリソソームと融合する前に一部の抗原は細胞質へ漏出する。この抗原は内在性抗原と同様の運命をたどり, 最終的に MHC クラス I 分子により抗原提示される。これが交差抗原提示, すなわちクロスプレゼンテーションと呼ばれる^{2,3)}。

交差抗原提示はいわゆる抗原提示細胞の中でも樹状細胞に特徴的な機能であり, 次の項目で述べるように免疫学的に非常に重要な意味をもつ。クロスプレゼンテーション機構を用いて, *in vivo* において T 細胞を感作することをクロスプライミングといい, その現象自体が報告されたのは 1970 年代に遡る⁴⁾。1980 年代後半には MHC とそこにめり込むように結合した抗原ペプチドの結晶構造が明らかにされ, T 細胞の抗原認識における MHC 拘束性の意味が構造的に理解されるようになった^{5,6)}。1990 年代に入り内在性, 外来性の抗原提示機構の分子機構が解明されるにつれ, 交差抗原提示機構の異様さがますます注目されるようになり, 免疫学における最後のミステリーの一つとまで言

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態科学専攻腫瘍制御学講座免疫学分野 (〒700-8558 岡山市北区鹿田町二丁目 5 番 1 号)

Heat shock protein and antigen cross-presentation
Heiichiro Udono (Department of Immunology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, Japan)

われるようになった。それはエンドソームの中に入った抗原がどのようにして内在性抗原提示経路に入るのか、換言すれば抗原の細胞質へ漏れ出るメカニズムは何かということであり、いまだ十分に解明されないまま今日に至っている。筆者らはこの分子機構に熱ショックタンパク質、それも HSP90 が大きな役割を担っていることを明らかにした。

2. T細胞プライミングには樹状細胞が必須である

2-1 がん細胞は直接 T細胞を感作できない

がん細胞は MHC クラス I 分子によりがん抗原ペプチドを提示している。細胞傷害性 T 細胞（感作 CD8⁺ T 細胞）はこれを認識しがん細胞を破壊する。ではナイーブ CD8⁺ T 細胞がこれを認識した場合は活性化され、成熟した細胞傷害性 T 細胞に分化するのであろうか。答えは NO である。この問題はほんの数年前まで論争の種であったが、今では樹状細胞、それも CD8⁺ 樹状細胞がなければ外来性抗原によるナイーブ CD8⁺ T 細胞の感作は不可能とされている⁷⁾。転写因子 *Batf3* 欠損マウスではこの CD8⁺ 樹状細胞が欠損しており、このノックアウト (KO) マウスでは極めて免疫原性の高い腫瘍（正常同系マウスに移植して一旦生着した後に自然退縮する）でも拒絶ができなくなってしまう⁸⁾。 *in vitro* での解析の結果、脾臓細胞による抗原の CD4⁺ T 細胞への抗原提示は正常だが、CD8⁺ T 細胞への抗原提示は消失した。すなわち、外来性抗原の MHC クラス II による抗原提示は正常だが、MHC クラス I による交差抗原提示機能が消失したことになる⁸⁾。この事実は CD8⁺ 樹状細胞が交差抗原提示に必須であることを示している。免疫原性の非常に高い腫瘍であっても、それ自体がナイーブ CD8⁺ T 細胞を活性化できるわけではなく、CD8⁺ 樹状細胞の関与が必要ということになる。がん細胞はアポトーシスにより断片化される。また壊死により細胞内タンパク質が外へ湧出する。これらはタンパク質としてのがん抗原を含んでおり、CD8⁺ 樹状細胞に貪食されてエンドソームに入り、細胞質に漏出しプロテアソームで分解されてペプチドになり、MHC クラス I 分子へ渡される。この過程はすなわち交差抗原提示そのものである。ウイルス感染細胞の場合も同様のプロセスを経て交差抗原提示に与る (図 1)。

2-2 なぜ CD8⁺ 樹状細胞なのか？

同じ樹状細胞でもなぜ CD8⁺ 樹状細胞は交差抗原提示でき、CD8⁻ 樹状細胞はできないのか？ 両者の貪食効率と同じである。それには初期エンドソームから後期エンドソームさらにはリソソームとの融合までの成熟過程（これは空胞内の pH の低下でモニターできる）が CD8⁺ 樹状細胞では CD8⁻ 樹状細胞に比較して緩やかなことが関係していると考えられている。抗原を取り込んだ CD8⁺ 樹状細胞

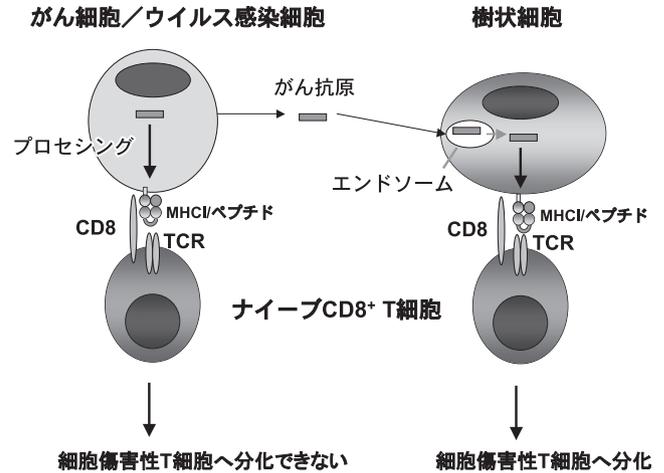


図 1 交差抗原提示には樹状細胞が必須である。

がん細胞ではがん抗原ペプチドが、またウイルス感染細胞ではウイルス抗原ペプチドが細胞膜表面の MHC I 分子により抗原提示されている。これは内在性抗原のプロセッシング機構による。この抗原ペプチドをナイーブ CD8⁺ T 細胞は認識することができるが、その場合はアポトーシスや不応答性 T 細胞に陥り、決して成熟した細胞傷害性 T 細胞には分化できない。一方、がん細胞やウイルス感染細胞が何らかの原因で壊死やアポトーシスに陥った場合、細胞内部に存在する抗原タンパク質が遊離してくる。これを樹状細胞はエンドソーム内に取り込み、さらに抗原の一部は細胞質へ移行する。細胞質に出てきた抗原は内在性抗原そのものであり、内在性抗原のプロセッシング機構により MHC I 分子により抗原提示される。この場合はナイーブ CD8⁺ T 細胞は細胞傷害性 T 細胞に分化する。これは樹状細胞のもつ様々な細胞膜分子により MHC 以外からの副刺激がナイーブ CD8⁺ T 細胞へ入るためである。

のエンドソームの pH は高いままであり、CD8⁻ 樹状細胞のそれは急速に低下していく。これは NOX2 (NADPH oxidase complex) または Rac2 欠損細胞で確認された^{9,10)}。つまり CD8⁺ 樹状細胞では低分子量 GTPase である Rac2 は NOX2 のファゴソーム (エンドソーム) への会合に関与しており、これが pH の低下防止に一役かっている。一方 CD8⁻ 樹状細胞では Rac1 が NOX2 の、ファゴソームではなく細胞膜への会合に関与する。Rac2 欠損細胞では NOX2 のファゴソームへの会合がうまくいかないため、ファゴソーム中の活性酸素の産生が低下し、また pH も低下する。これにより抗原の分解が促進され、細胞質への漏出の可能性が低くなる。マクロファージの交差抗原提示効率が低い理由も CD8⁻ 樹状細胞のそれと同様である。pH が高い状態に維持されると抗原はリソソーム酵素による分解から逃れやすくなり、その反面エンドソームから細胞質へ移行する確率が高くなる。このような現象を見るにつけ、交差抗原提示の本質は抗原の細胞質移行そのものであるということがより鮮明に理解される。ではその分子機構は一体どうなっているのだろうか。

3. 交差抗原提示は HSP90 阻害剤によって完全に抑制される

抗原がエンドソームから細胞質へ移行する際に真っ先に問題になるのは、その通る孔は何かということである。エンドソームは本来細胞膜に由来するものであり、通常ではいかなる孔も存在しないし、簡単に破れて孔が開くようなものでもない。免疫学者は大いに悩んだが、共焦点顕微鏡を巧みに使用した実験においてエンドソーム膜と小胞体膜が一部交錯する部分が見え、このことから双方のオルガネラは融合し一体となることが考えられた¹¹⁻¹⁵⁾。本来小胞体膜に存在するはずの transporter associated with antigen processing (TAP) 分子がエンドソーム膜にも存在するように見えるのである。de novo 合成されたタンパク質は翻訳と同時に Sec61 トランスロコン (小胞体膜に存在する分子で小孔を形成する) より小胞体の中へ入るが、小胞体内腔で凝集性タンパク質に陥った場合にはタンパク質品質管理機構としてやはり Sec61 トランスロコンから細胞質側へ逆輸送され、ポリユビキチン化された後にプロテアソームで分解される。この逆輸送に使用されるトランスロコンがエンドソーム内抗原の細胞質への漏出にも使用されるというのである。しかしながら、この知見が正しいのか否かについてはいまだ決着がついておらず、むしろ小胞体については Sec61 を介していない可能性の方が高いとも言われている¹⁶⁾。この孔に関する分子構成の全貌が明らかになるにはもう少し時間を要するだろう。

話を展開する上でいきなりつまづいた感があるが、それ

でも抗原の細胞質移行について研究する方法は存在する。仮にトランスロコンのような小さな孔から抗原が細胞質へ移行するのであれば、抗原はヒモ状に近い状態になる必要がある。そのままの構造で通過するには小孔は小さすぎるためである。この仮説を検証するために、筆者らは抗原をパラホルムアルデヒドで固定し *in vitro* における交差抗原提示実験を行った。その結果、固定したタンパク質抗原では抗原提示能が著しく低下し、また細胞質移行が妨げられていることがわかった (未発表)。すなわち、抗原の小孔通過時には構造が変化している可能性が高いのである。そのようなタンパク質を好んで捕捉するのは HSP の得意技である。そこで、特異的阻害剤として認められている複数の HSP90 阻害剤で樹状細胞を予め処理した後に実験を行った。その結果、濃度依存性にはほぼ完全に交差抗原提示が抑制されることがわかった。用いた阻害剤はゲルダナマイシン、ラディシコール、17AAG とノボピオシンである¹⁷⁾。前3者は HSP90 の N 末端にある ATP 結合部位を占拠しシャペロンサイクルを止めてしまう (図 2)。一方、ノボピオシンは HSP90 の C 末端に結合しホモ二量体形成を阻害する¹⁸⁾。これにより HSP90 は仕事ができなくなる。次に、樹状細胞による内在性抗原提示にこれらの阻害剤が及ぼす影響を検討した。その結果、若干の抗原提示抑制はあるものの交差抗原提示の抑制に比較すれば無視できる程度であった。さらに、ユビキチン化反応の最初のステップを担当するユビキチン活性化酵素 E1 の阻害剤では内在性抗原提示、交差抗原提示の両方が完全に抑制される。また、プロテアソーム阻害剤でも双方の完全阻害が観察され

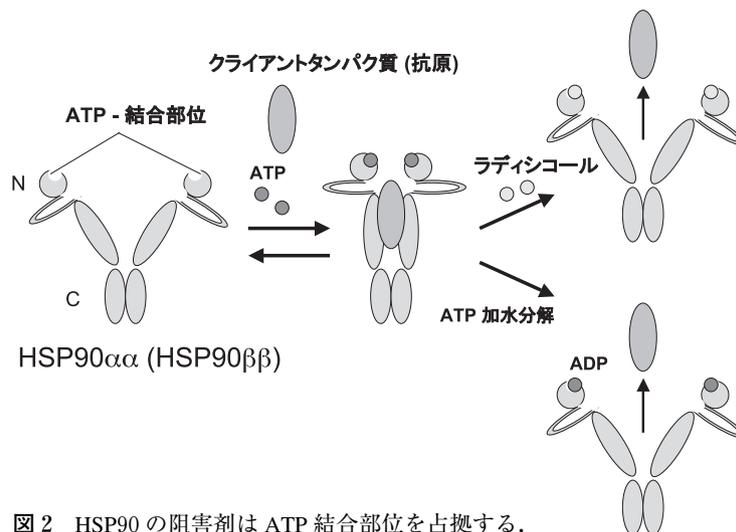


図 2 HSP90 の阻害剤は ATP 結合部位を占拠する。

図はラディシコール (radicicol) が HSP90 の ATP 結合部位に結合した場合を表す。ラディシコールは ATP よりも結合力が強いいため、クライアントタンパク質の捕捉ができない状態になってしまう。生理的条件下では HSP90 に結合した ATP は加水分解されて ADP になり、その後にはずれて再度 ATP が結合できる状態になる。

た。HSP90 阻害剤は樹状細胞による抗原の取り込みには影響を与えないので、阻害剤は恐らく抗原のエンドソームから細胞質への移行を抑制していると考えられた。ところで HSP90 は細胞膜表面にも存在することが最近示唆されている^{19,20}。その場合エンドソームの中にも HSP90 が存在しうることになり、細胞質 HSP90 と区別しなければならない。そのために、細胞膜非透過性のゲルダナマイシン-FITC (フルオレセインイソチオシアネート) を用いて実験を行った。実際、ゲルダナマイシン-FITC は樹状細胞様株 DC2.4 の細胞表面を染色するので、細胞膜表面に HSP90 が存在する。ゲルダナマイシン-FITC は細胞膜表面 HSP90 の機能を抑制するが細胞質 HSP90 は抑制しない。この状況下では交差抗原提示は全く抑制されなかった²¹。つまり HSP90 阻害剤による交差抗原提示の抑制は細胞質 HSP90 の機能が抑制されたことが原因ということになる。

4. HSP90 α コンディショナル KO マウスの作成

上述のように、交差抗原提示は HSP90 阻害剤により抑制された。これは HSP90 α と HSP90 β のどちらの機能阻害によるのであろうか。これを明らかにするために低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) を用いた実験を行った。その結果、HSP90 α に対する shRNA が HSP90 β よりもより強く交差抗原提示を阻害した¹⁷。よって交差抗原提示には HSP90 α の関与が大と考えられた。shRNA を用いた実験が成功した大きな要因は筆者らが DC2.4 細胞株を用いたことであった。通常はマウスの骨髄細胞から顆粒球マクローファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) により樹状細胞を誘導して実験に使用する。しかし、この樹状細胞では shRNA の導入効率が十分でなくしたがってノックダウン効率が低い。また、DC2.4 細胞株を用いてもレンチウイルスベクターによる shRNA 導入効率はかなり低く、結局 AMAXA 社のヌクレオフェクター遺伝子導入装置によるプラスミドの導入がベストであった。この辺りが樹状細胞を用いた shRNA 導入実験の難しさである。しかしながら、たった一つの細胞株で得られた事実がどれほど普遍化されるのが重要である。そこで、HSP90 α コンディショナル KO マウスの作製にとりかかった。HSP90 α 欠損状態は間違いなく胎生致死になると予想し、HSP90 α のエクソン 9, 10 を *loxP* 配列で挟むように HSP90 $\alpha^{\text{lox/lox}}$ マウスを作製してこれを ER^{T2}Cre マウスと交配し、HSP90 $\alpha^{\text{lox/-}}$ ER^{T2}Cre を得た。ER^{T2}Cre マウスとはヒトのエストロゲン受容体 (ER) の一部と Cre リコンビナーゼの融合遺伝子を全身に発現させたトランスジェニックマウスである^{22,23}。タモキシフェンがエストロゲン受容体に結合すると同時に細胞内へ入り、続いて核内に入って Cre リコンビナーゼが *loxP* 配列を認識して *loxP* に挟まれた領域が除去されるしくみである。

HSP90 $\alpha^{\text{lox/-}}$ ER^{T2}Cre どうしを交配して HSP90 $\alpha^{\text{lox/lox}}$ ER^{T2}Cre を樹立した。ここにタモキシフェン投与を行いマウス個体からあるいは細胞から HSP90 α 遺伝子のエクソン 9, 10 を除去するという戦略で臨んだ。当初の予定通りにマウスを作製でき、タモキシフェン投与後 1 週間以内で脳を除く全ての臓器・細胞で HSP90 α 遺伝子が改変され、1 ヶ月後には HSP90 α タンパク質の欠損が確認された。驚いたことにマウスは元気になっていたので、今度は HSP90 $\alpha^{\text{lox/lox}}$ マウスを CAGCRE マウス (全身に Cre リコンビナーゼを発現) と交配し胎生期から HSP90 α のエクソン 9, 10 を除去することを試みた。その結果マウスは正常に生まれて成長速度も全く問題がなかった。唯一、精巣のサイズが小さく精子形成に異常が認められたくらいである。このいわゆる HSP90 α -null マウスが作製できたことに伴い (図 3)、実験速度を飛躍的に早めることができた。HSP90 $\alpha^{\text{lox/lox}}$ どうしを交配し 1/4 の確率で HSP90 $\alpha^{\text{-/-}}$ マウスを獲得できるようになったためである。

5. HSP90 α -null (HSP90 α KO) マウスの交差抗原提示能低下

得られた HSP90 α -null マウスを詳しく調べたところ、N 末端を認識する抗体を用いても分子量の小くなった HSP90 α タンパク質分子をウエスタンブロット上で検出することはできなかったが、エクソン 9, 10 を欠損した mRNA は容易に検出された。恐らく C 末端の一部を欠損する HSP90 はホモ二量体を形成することができず不安定なため、翻訳と同時にタンパク質分解を受けてしまうと考えられる。この HSP90 α KO マウスにシトクローム *c* を投与する実験を行った。ご存知のようにシトクローム *c* は本来ミトコンドリアに存在するタンパク質分子であるが、アポトーシス刺激が入ると細胞質へ放出され、カスパーゼ 3 の活性化を促す。このシトクローム *c* をマウス個体に投与すると貪食能をもつ細胞に取り込まれる。その中で CD8⁺樹状細胞のみがアポトーシスを引き起こし、そのために脾臓内の CD11c⁺CD8⁺細胞の数が減少する²⁴。これは CD11c⁺CD8⁺樹状細胞のみが交差抗原提示を行うことができることと関係する。つまりこのタイプの樹状細胞に限り、取り込まれたシトクローム *c* はエンドソームから細胞質へ移行するのである。その結果、細胞死を誘導する。ここで「おやっ」と思われる方もいると思う。ヒモ状になって細胞質へ出て来たタンパク質分子がなぜ活性を有しているのか。そこで説明を補足したい。ルシフェラーゼを用いた過去の実験がある。樹状細胞により取り込まれたルシフェラーゼはエンドソームから細胞質へ移行した直後は変性タンパク質に近い状態だが、HSP90 β の働きで折りたたみが行われ細胞質の中で再び活性を取り戻すことが証明されている²⁵。シトクローム *c* も同様の過程で本来の構造を

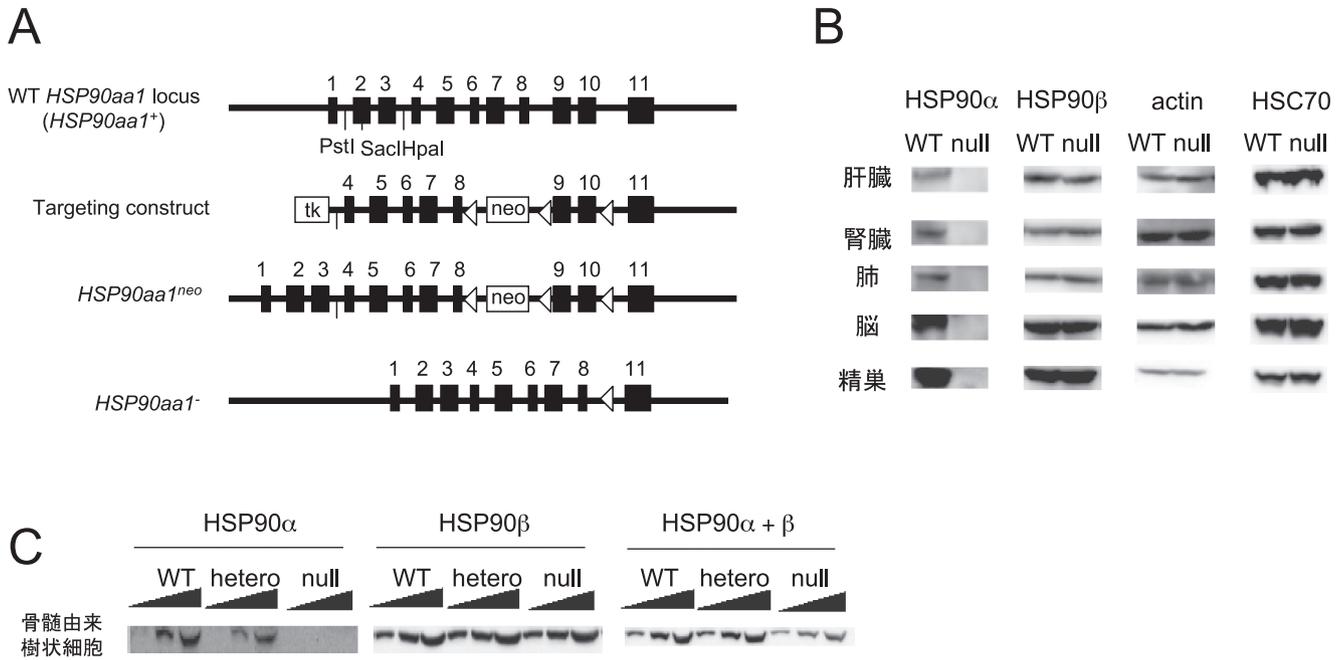


図3 HSP90α-null (*HSP90α*KO) マウスの作製。

(A) ターゲティングベクターの構築と遺伝改変の模式図を表す。

(B) *HSP90α*KO マウスの各臓器におけるタンパク質発現の確認。特異的抗体を用いたウエスタンブロット法による。

(C) 骨髓細胞から GM-CSF を用いて作製した樹状細胞における *HSP90α*, β の発現の確認。特異的抗体を用いたウエスタンブロット法による。

取り戻し機能性分子として細胞死を誘導すると考えられる。つまり *HSP90* によって細胞質に出て来たタンパク質は、折りたたまれて本来の活性を取り戻すものとそのままプロテアソームによる分解系へと運ばれるものに別れることになる。

さて、シトクローム *c* 投与実験を *HSP90α*KO マウスで行ったところ $CD11c^+CD8^+$ 樹状細胞の減少は完全にキャンセルされた²¹⁾。すなわち、シトクローム *c* の細胞質移行がなされていないことを示唆する。この実験系は貪食抗原の細胞質移行をモニターするのに最適の実験であるが、これをもって交差抗原提示が低下しているとは言えない。やはり、抗原をマウスに投与しこれを認識する $CD8^+$ T 細胞の数がどうなるのか、ということが免疫学的には重要になってくる。そこで、卵白アルブミン (OVA) を浸透圧ショック法にて導入した TAPIKO 脾臓細胞 (TAP1 がいないので同細胞自体は MHC クラス I で OVA を抗原提示できない) に紫外線照射シアポトーシスを誘導した。この処置を施したのはアポトーシス細胞が貪食されやすいからである。このアポトーシス細胞を WT 及び *HSP90α*KO マウスに投与し、1 週間後に脾臓細胞を取り出し $CD8^+$ T 細胞を精製して OVA₂₅₇₋₂₆₄ アミノ酸ペプチドで 24 時間 *in vitro* で刺激を行いエリスロット法 (T 細胞が産生するサイトカインをサンドイッチエライザ法にて検出する方法) にて $IFN\gamma$ 産生スポットの数を測定した。もし、体内で $CD8^+$ T 細胞が抗原

を認識し感作されていれば $IFN\gamma$ を産生する。*HSP90α*KO マウスに免疫した群では常に正常 (WT) マウスの半分のスプレット数しか検出されなかった (図 4 左)。一方、TAPIKO 脾臓細胞ではなく DC2.4 細胞に OVA₂₅₇₋₂₆₄ ペプチドをパルスしてマウスに投与しておいた実験群では、WT 及び *HSP90α*KO マウスはほぼ同数の $IFN\gamma$ 産生スポットを呈した (図 4 右)。つまり抗原ペプチドによる直接抗原提示能は障害されていないと解釈される。以上の結果は、*HSP90α*KO マウスにおいて交差抗原提示能が低下していることを示し、その分子機構は取り込んだ抗原 (タンパク質分子) の細胞質移行が障害されていることと結論づけられる。ただし、*HSP90α*KO マウスでは $IFN\gamma$ 産生スポット数が常に 50% ほどの低下しか認められないことから、残りの 50% は *HSP90β* の働きが細胞質移行に関与していることになる。

6. エンドソーム内抗原の細胞質移行の可視化

*HSP90α*KO マウスを用いた実験から、交差抗原提示において *HSP90α* が関与していることはまづもって間違いないと考えられたが、問題はそれをどう可視化するのか、ということである。思案の末、樹状細胞膜と抗原をそれぞれ別の蛍光色素で染色し、抗原を貪食させて観察するという手法をとった。抗原としての OVA を AF647 (赤色蛍光) でラベルし、細胞膜を PKH67 (緑色蛍光) でラベルした。

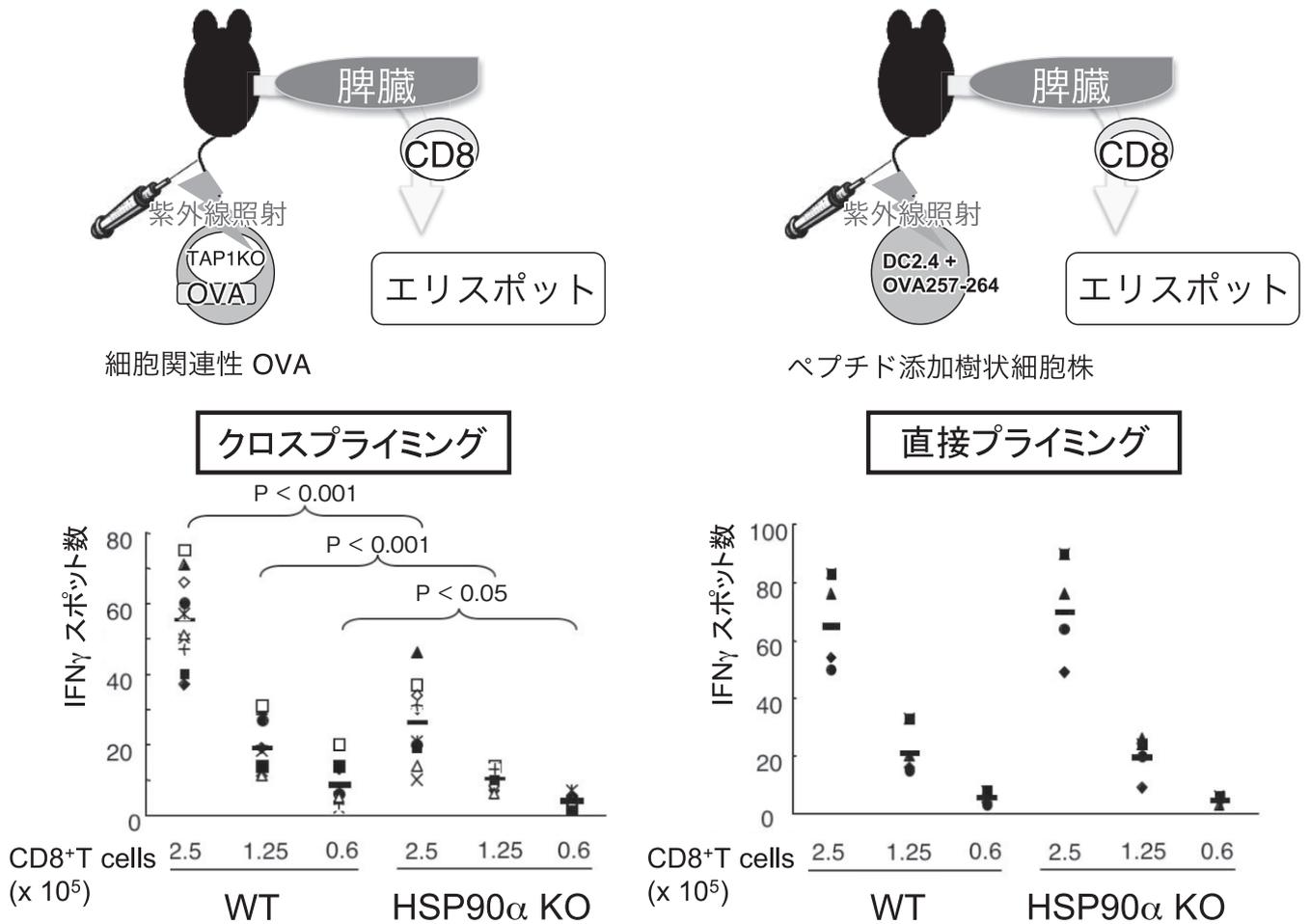


図4 HSP90 α KOではクロスプライミング効率が低下する。

(左) 正常マウス (WT) と HSP90 α KO マウスを OVA 導入 TAP1 欠損脾臓細胞で免疫する。その 1 週間後にマウス脾臓細胞を取り出し、OVA 抗原ペプチドで刺激を加えた後、エリスロット法にて IFN γ のスポット数を計測した。HSP90 α KO マウスでは WT の約半分のスプレット数しか認められなかった。

(右) 正常マウス (WT) と HSP90 α KO マウスを OVA 抗原ペプチドをパルスした DC2.4 細胞株で免疫し、左図と同様にエリスロット法を行った。その結果、両マウスに差は認められなかった。つまりマウス T 細胞の応答性は両マウス間で差がないことになる。

細胞膜のラベルは完全に氷上で行い、膜の可動性を最小限に止めた。こうして PKH67-樹状細胞と予め 37°C の溶液に浮遊させた AF647-OVA を混合し、5~20 分程観察すると、既に 5 分の段階で緑色のスポット、赤色のスポットが現れてくる。また両者の重なった黄色のスポットも多数観察された。エンドソームに取り込まれた OVA はエンドソーム膜 (緑色に染まった細胞膜に由来する) と重なって黄色を呈し、エンドソームから細胞質へ移行した OVA は赤色で観察されることになる。緑色のスポットは当然 OVA を含有していない空のエンドソームである。細胞質へ出てきた OVA のプロテアソームによる分解を抑制するために樹状細胞を予めプロテアソーム阻害剤 MG115 で処理しておく、その上で氷上に静置し膜の可動性を抑える。そして 37°C の AF647-OVA を添加し 5 分間貪食させ、ホルマリンで固定する。これを ImageStream という機器にて観察した。ImageStream は細胞形態と色素分布の微妙な違

いを蛍光顕微鏡観察のように識別し、さらにフローサイトメーターのように蛍光色素分布の違いをもとに細胞集団を分別して行く²⁶⁾。ImageStream は細胞どうしの癒合、抗原が単に細胞膜に付着しているだけで取り込まれていない細胞は予め排除し、単一の細胞でかつ抗原を細胞内に取り込んだもののみを解析できる。1 万個の細胞を取り込み、各細胞のイメージ像について赤のスポットが優勢なのかあるいは黄色のスポットが優勢なのかを瞬時に判断し、統計学的な数値分類の結果を出す (図 5)。これによってヒトの眼で観察するバイアスを排除した。その結果、HSP90 α KO 樹状細胞では WT 樹状細胞と比較して赤のスポットが少なく、黄色のスポットが多いことが繰り返し観察された。さらに HSP90 阻害剤で予め樹状細胞を処理しておく、赤のスポット数はさらに減少し黄色のスポット数が増加した²¹⁾。以上の結果はすなわち HSP90 α (HSP90 β も同様に) が OVA の細胞質移行に関与していることを示唆してい

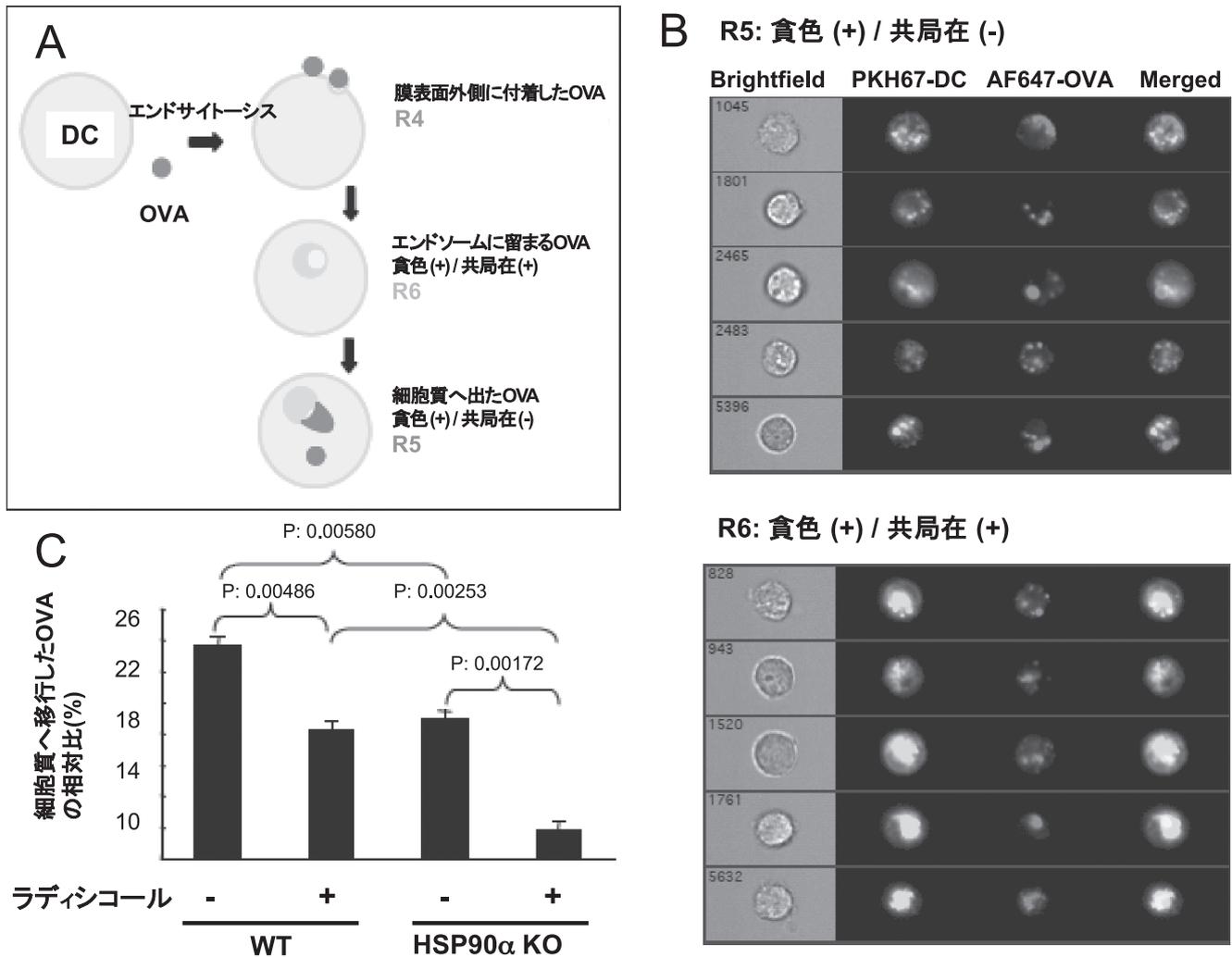


図5 ImageStreamによる細胞内抗原のイメージ解析。

(A) イメージ解析の原理。OVAを細胞内に取り込んだ樹状細胞のみをピックアップし、蛍光色素のパターン像を読み取る。

(B) 上段：OVAがエンドソームから細胞質へ出て来た場合の典型的なイメージ像。下段：OVAがエンドソーム内に留まっている場合の典型的なイメージ像。

(C) WTマウスとHSP90 α KOマウスの骨髄細胞由来の樹状細胞を用いた実験。HSP90がなければOVAの細胞質移行がWTに比較して低下する。HSP90阻害剤ラディシコールで樹状細胞を処理するとさらに低下する。

る。

ここでImageStreamの蛍光観察の z 軸の深さが4 μ mとかなり厚いことが問題となった。これでは複数個のエンドソームが重なった場合に正確な判定ができなくなる。この問題を解決するために、 z 軸の深さが0.3~0.4 μ mのBIOREVO(キーエンス, BZ-9000)を用いて個々の細胞の中の赤と黄色のスポット数を目視にてカウントした(通常の共焦点顕微鏡の z 軸の厚みは平均0.1~0.2 μ m)。合計2,000個の細胞中の50,000個以上に及ぶスポットをカウントした。その結果はImageStreamの結果を追認するものであった。いやむしろより正確な数が把握されたと考えられる。それによると、WT樹状細胞では細胞1個あたり平均26個の赤色スポットと16個の黄色スポット、一方HSP90 α KO樹状細胞では16個の赤色スポットと23個の

黄色スポットが観察された。これをさらにHSP90阻害剤で処理するとWT, HSP90 α KOともに11~12個の赤色スポットと32個の黄色スポットへと変化した²¹⁾。すなわち、OVAの細胞質移行は明らかにHSP90に依存していることが観察された(図6)。

7. エンドソーム内抗原の細胞質移行の生化学的解析

抗原の細胞質移行の可視化ができた以上、生化学的にもこれを解析する手段があるはずである。最も簡単なアプローチは抗原の貪食後、樹状細胞を即座に各細胞画分に分け、それぞれの画分に含まれる抗原を特異的抗体を用いてウェスタンブロット法で検出することである。しかしながらこの手法もオルガネラ膜成分を破壊せずに行うことは意外と難しい。筆者らは幾種類かの既に存在する細胞画分

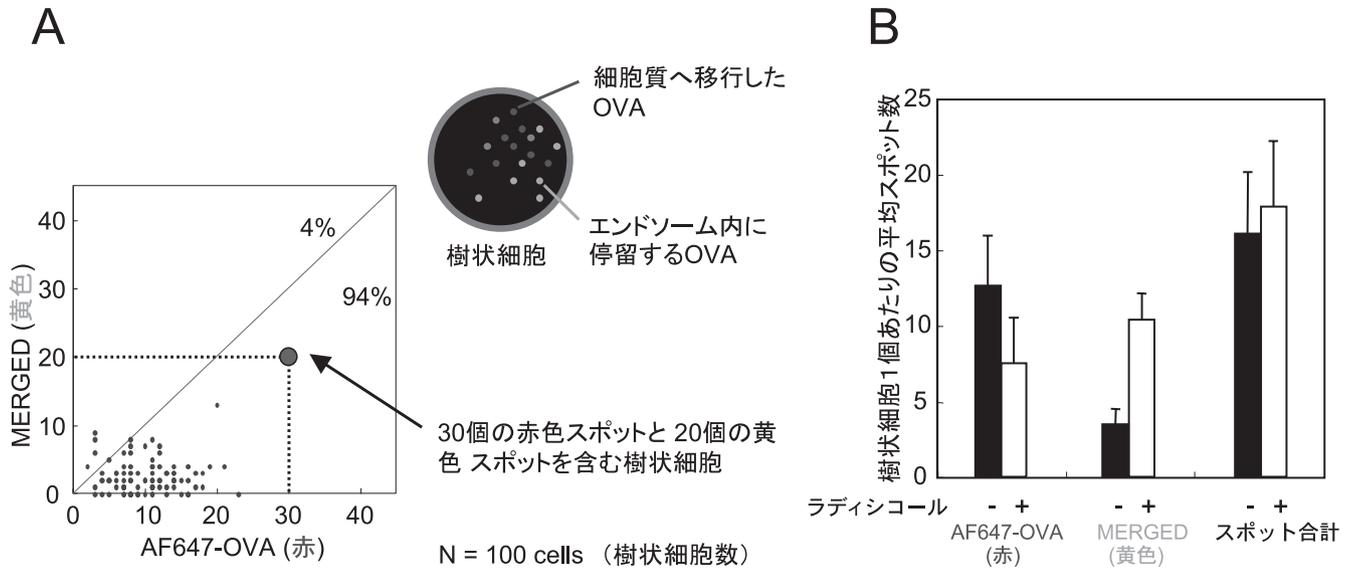


図6 蛍光顕微鏡を用いた細胞内抗原のイメージ解析。

(A) 図5のImageStreamで見られたようなスポットを蛍光顕微鏡(対物×100)で観察し、1個1個のカラーを識別・計測した。図はDC2.4細胞株100個を観察した結果を示す。OVA貪食5分間で多くのエンドソームは赤色蛍光が優位になっており、OVAの細胞質移行が進んでいることを示す。

(B) (A)の実験をラディシコール処理の有無で行った。その時のDC2.4細胞1個あたりに認められるスポット数の平均値を求めた。ラディシコール処理により黄色蛍光スポット(OVAはエンドソーム内に留まる)の数が増加し、赤色蛍光スポット(OVAは細胞質へ移行)の数は減少する。ラディシコール処理の有無は黄色及び赤色蛍光スポットの総和に影響を与えない。

キットを用いて同実験を試みた。いずれのキットも基本的に細胞質、膜成分、細胞骨格成分に分けることができる。その中でエンドソーム膜あるいは小胞体膜の破壊が起こりにくいキットを選別した結果、Caibiochem社のものが最も優れていた。

まずOVA取り込み開始5分で大容量の冷PBS緩衝液で樹状細胞を浮遊し、それ以後のプロセッシングを止める。樹状細胞は予めプロテアソーム阻害剤で処理しておく。こうして細胞質を回収してくるとすでに多くのOVAが認められる。そこでHSP90阻害剤にて樹状細胞を処理すると細胞質OVAの量は濃度依存的に減少する。一方、膜成分に残存するOVAの量はこれに逆比例して増加する。すなわち、細胞質移行が抑制されていることになる。この際小胞体マーカーであるgrp94、grp78が細胞質へ遊離していないことを同時に確認する必要がある。もしこれらのタンパク質分子が検出されれば膜が壊れていることを意味しており、その実験結果の信頼性はない。できればカテプシンの漏出が検出できないくらい上手に行えれば理想である。HSP90 α KOとWTの樹状細胞で細胞分画実験を行った場合、HSP90 α KOでは明らかに細胞質OVAの量が少ないことがわかった。やはり移行速度は遅いようである。もう一つ大切なことは、貪食されたOVAがHSP90の免疫沈降により一緒に落ちてくることである。そこで樹状細胞を膜成分と細胞質に分けてその後でHSP90の免疫沈降を行ったところ、どうやら膜成分の中で両分子は会合しているよう

である。さらに、樹状細胞を予めHSP90阻害剤で処理しておくると会合するOVAの量が有為に低下する。すなわち、抗原の細胞質移行の際、恐らくエンドソーム膜に埋没するような格好でHSP90とOVAは会合しているのかもしれない(図7)。

次にOVAを含むファゴソームを精製し、ここにHSP90分子を加えることによって外へ遊離してくるOVAを観察した。まず0.8 μ mのラテックスビーズ(LB)にOVAを吸着させ、これをLBごと樹状細胞に貪食させる。そしてスクロースを用いた超遠心分離法にてLBを含むファゴソームを精製する²⁷⁾。これにHSP90、BSA、緩衝液のみを添加し37°Cで30分インキュベーションする。これを遠心機でファゴソームと上清に分ける。BSA、緩衝液のみではOVAは出てこないが、HSP90を加えることにより濃度依存的にOVAが出てくるようになる²¹⁾。4°CではOVAは出てこない。またATPを加えなくても良いようである。さらに外部から加えたのはHSP90のみであるため、OVAの遊離のためにはHSP90だけで十分と解釈される。しかし、細胞内では恐らくその他の分子と協調しながら抗原の引き出しに参与する可能性がある。この実験で大切なことは、いわゆるリコンビナントHSP90にはこの遊離活性が低いか、ほとんど検出されないことである。これは恐らくリコンビナントHSP90(α 、 β 双方とも)はホモ二量体形成率が低いことが原因ではないかと考えている。筆者らは通常、生きた細胞(マウスがん細胞など)からHSP90

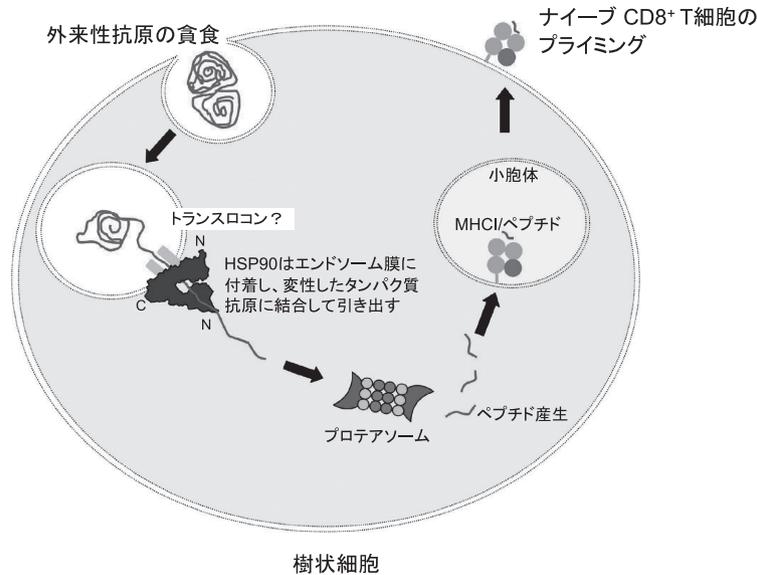


図7 交差抗原提示における細胞質 HSP90 の関与。

取り込まれた外来性抗原は何らかの機構で構造が変化し、ヒモ状になってトランスロコン様小孔を通過するが、その際細胞質 HSP90 がエンドソーム膜にめり込むように吸着し抗原と結合して細胞質側への引き出しに貢献する。抗原はユビキチン化されてプロテアソームでペプチドへと分解され MHCII により抗原提示される。

を精製して実験に使用している。この場合、精製度が問題になるが HSP90 を予め HSP90 阻害剤で処理しておけば OVA の遊離活性が消失するので、シャペロン活性が不可欠であるのは間違いない。

8. 諸々の事象との整合性について

8-1 交差抗原提示と ERAD, HSP

小胞体タンパク質の品質管理機構としての小胞体関連分解 (ERAD) については特に酵母の系でよく解析がなされている。小胞体タンパク質の中でも可溶性タンパク質の場合、その細胞質への逆移送のためには小胞体内腔の分子シャペロン Bip (HSP70 ファミリーに属する) と J-ドメインを有するコシャペロン分子 Jem1p, Scj1p が必須である。さらには E3 ユビキチンリガーゼ Hrd1p 及び E2 酵素 Ubc7p の関与も示唆される。Bip は小胞体内腔の凝集性タンパク質の可溶性を保持するのみでなく、多くのタンパク質の逆移送を促進する^{28~30)}。一方、小胞体膜タンパク質の逆移送の際にはむしろ細胞質 HSP70 (Ssa1p) と J-ドメインを含むコシャペロン分子 Hlj1p, Ydj1p が必要であり、さらには E3 ユビキチンリガーゼ Doa10p 及び E2 酵素 Ubc6p, Ubc7p の関与が指摘される^{31~33)}。いずれのタンパク質もポリユビキチン化されて初めて細胞質へ移行すると考えられ、このポリユビキチン化タンパク質が cdc48/p97 により捕捉されて小胞体から細胞質側へ引きずり出され、26S プロテアソームに受け渡しされる³⁴⁾、と考えられている。これと同様のことが哺乳類細胞の樹状細胞における交

差抗原提示機構に利用されているのかは現時点でわからない。しかし、筆者らのデータによれば細胞質へ移行した外来性抗原は少なくともすぐにはユビキチン化されておらず、またユビキチン化の最初のステップである E1 酵素阻害剤でも抗原の細胞質移行は抑制されていない。交差抗原提示には小胞体成分の関与はあるものの、もしかすると ERAD とは別の機構が働いているかもしれない。筆者らは抗原の細胞質移行過程に HSP90 の関与を認めたが HSP70 の関与については今後慎重に検討する必要があると思われる。

8-2 cdc48 (p97) と HSP90 の関係はどうなるのか

ERAD における小胞体タンパク質の Sec61 トランスロコンを介した細胞質への逆移送は *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (Exo A) によりブロックされる。この時は Sec61 を阻害していると考えられた³⁵⁾。一方で、交差抗原提示が Exo A で抑制されることが明らかになり、この場合は Sec61 ではなく cdc48/p97 が標的分子であることが示唆された¹⁵⁾。Exo A の標的分子が何であるかも大切であるが、筆者らは当初この cdc48/p97 と HSP90 が会合して外来性タンパク質の細胞質移行に関与するのではないかと予想したが、免疫沈降の結果、両者の会合を認めることはできなかった。すなわち両分子は別々に独立して機能しており、恐らくは HSP90 の働きで細胞質へ移行しつつある抗原が続いてユビキチン化を受け、これが cdc48/p97 によって捕捉されるのではないかと考えている³⁴⁾。この辺りは抗

原の種類によっても経路に多様性の存在することも十分に考えられる。

8-3 交差抗原提示以外のタンパク質の細胞質移行

樹状細胞による交差抗原提示に HSP90 が必須であり、貪食された抗原の細胞質輸送へ関与することを述べてきた。一方で免疫の世界の外に眼を向けると、様々な局面で HSP90 によるタンパク質分子の細胞質移行の可能性が指摘されている。例えば、細胞増殖因子である線維芽細胞増殖因子 FGF-1/2 やジフテリア毒素などは細胞膜受容体に結合した後に受容体依存性にエンドサイトーシスで細胞内に入り、続いて細胞質へ移行してその生理学的機能を発揮する^{36,37)}。この細胞質移行に際して HSP90 が必要であることが示唆されてきた^{38,39)}。またコレラ菌毒素の A1 サブユニットの小胞体から細胞質への移送にも HSP90 の関与が認められる。この場合は A1 サブユニットと細胞質 HSP90 の直接的な会合が輸送に必須であることが示唆されている⁴⁰⁾。このように見ると HSP90 によるタンパク質分子の細胞質移行という現象は、多くの細胞に普遍的な事象である可能性が高く、樹状細胞の場合はたまたま交差抗原提示に利用されていると考えた方がよさそうである。

9. おわりに

8 節に同研究の今後の進め方に対するヒントがあるかと思われるが、やはりエンドソームに存在するであろう抗原の通過する小孔の分子構造の解明がなされない限り交差抗原提示の研究は終わらない。これは世界中の関係する研究者が取り組んでいるが、なかなか真実がみつからない。もしかしたら小孔は存在しないのかもしれない。何らかの因子がエンドソーム膜にやってきて初めて孔が開くような動的開閉システムの検討も今後必要になってくるかもしれない。この開閉機構に HSP90 が関与することも考えられる。また、本稿を書きながら痛感するのは抗原提示/抗原プロセッシングという研究分野がいかに敷居が高くなってしまったかということである。今回の筆者らの研究でも HSP90 α KO マウスの作製と *in vitro*, *in vivo* におけるクロスプレゼンテーション効率の定量的解析とシトクローム *c* 投与実験、ImageStream と蛍光顕微鏡による抗原可視化、細胞分画と精製ファゴソームを用いた抗原の遊離実験、など極めて多方面での実験が要求され、やりながら辟易する思いであった。しかしとにかく HSP90 α 遺伝子改変マウスの作製ができ、それを用いて初めてクロスプライミングの生体における実験ができた。同遺伝子改変マウスは HSP と免疫研究を行う上で強力なツールとなることは間違いなく、今後さまざまな研究にこのマウスが役に立てばよいと願っている。

謝辞

HSP と免疫研究をここまで継続することができたのは、筆者の留学時代の恩師である Dr. Pramod K. Srivastava の永きにわたる暖かい励ましと当時の仲間達との親密な交流の御陰である。心より感謝したい。また、HSP と抗原提示研究の世界に入ったのは 2000 年前後であり、とりわけ筆者が(独)理化学研究所 RCAI の免疫シャペロン研究チームを主宰していた時期とその多くの時期が重なっており、同研究チームに在籍し献身的に研究を継続してくれた多くのスタッフの方々に心より御礼申し上げたい。

文 献

- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., & Bennink, J.R. (2000) *Nature*, 404, 770-774.
- Carbone, F.R., Kurts, C., Bennett, S.R., Miller, J.F., & Heath, W.R. (1998) *Immunol. Today*, 19, 368-373.
- Heath, W.R. & Carbone, F.R. (2001) *Annu. Rev. Immunol.*, 19, 47-64.
- Bevan, M.J. (1976) *J. Exp. Med.*, 143, 1283-1288.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., & Wiley, D.C. (1987) *Nature*, 329, 512-518.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., & Wiley, D.C. (1987) *Nature*, 329, 506-512.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A., & Kurts, C. (2007) *Science*, 316, 612-616.
- Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsu-shita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., Schreiber, R.D., Murphy, T.L., & Murphy, K.M. (2008) *Science*, 322, 1097-1100.
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guernonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Dumenil, A.M., Seabra, M.C., Raposo, G., & Amigorena, S. (2006) *Cell*, 126, 205-218.
- Savina, A., Peres, A., Cebrian, I., Carmo, N., Moita, C., Hacohen, N., Moita, L.F., & Amigorena, S. (2009) *Immunity*, 30, 544-555.
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J., & Desjardins, M. (2002) *Cell*, 110, 119-131.
- Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R., & Cresswell, P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 12889-12894.
- Guernonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., & Amigorena, S. (2003) *Nature*, 425, 397-402.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., & Desjardins, M. (2003) *Nature*, 425, 402-406.
- Ackerman, A.L., Giodini, A., & Cresswell, P. (2006) *Immunity*, 25, 607-617.
- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R.E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., Moore, H.P., van der Wel, N., Houben, D., Peters, P.J., de Chastellier, C., Mellman, I., & Grinstein, S. (2005) *Cell*, 123, 157-170.
- Ichiyangi, T., Imai, T., Kajiwara, C., Mizukami, S., Nakai, A., Nakayama, T., & Udonon, H. (2010) *J. Immunol.*, 185, 2693-2700.
- Marcu, M.G., Chadli, A., Bouhouche, I., Catelli, M., & Neckers, L.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 37181-37186.

- 19) Tsutsumi, S. & Neckers, L. (2007) *Cancer Sci.*, **98**, 1536–1539.
 - 20) Tsutsumi, S., Scroggins, B., Koga, F., Lee, M.J., Trepel, J., Felts, S., Carreras, C., & Neckers, L. (2008) *Oncogene*, **27**, 2478–2487.
 - 21) Imai, T., Kato, Y., Kajiwara, C., Mizukami, S., Ishige, I., Ichihyanagi, T., Hikida, M., Wang, J.Y., & Udono, H. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 16363–16368.
 - 22) Sakai, K. & Miyazaki, J. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 318–324.
 - 23) Hikida, M., Casola, S., Takahashi, N., Kaji, T., Takemori, T., Rajewsky, K., & Kurosaki, T. (2009) *J. Exp. Med.*, **206**, 681–689.
 - 24) Lin, M.L., Zhan, Y., Proietto, A.I., Prato, S., Wu, L., Heath, W.R., Villadangos, J.A., & Lew, A.M. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3029–3034.
 - 25) Giodini, A. & Cresswell, P. (2008) *EMBO J.*, **27**, 201–211.
 - 26) Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martinez, D., Hernanz-Falcon, P., Rosewell, I., & Reis e Sousa, C. (2009) *Nature*, **458**, 899–903.
 - 27) Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., & Griffiths, G. (1994) *J. Cell Biol.*, **124**, 677–688.
 - 28) Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, J.S., & Brodsky, J.L. (2001) *Annu. Rev. Genet.*, **35**, 149–191.
 - 29) Kabani, M., Kelley, S.S., Morrow, M.W., Montgomery, D.L., Sivendran, R., Rose, M.D., Gierasch, L.M., & Brodsky, J.L. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 3437–3448.
 - 30) Nishikawa, S.I., Fewell, S.W., Kato, Y., Brodsky, J.L., & Endo, T. (2001) *J. Cell Biol.*, **153**, 1061–1070.
 - 31) Huyer, G., Piluek, W.F., Fansler, Z., Kreft, S.G., Hochstrasser, M., Brodsky, J.L., & Michaelis, S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 38369–38378.
 - 32) Vashist, S. & Ng, D.T. (2004) *J. Cell Biol.*, **165**, 41–52.
 - 33) Han, S., Liu, Y., & Chang, A. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 26140–26149.
 - 34) Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D.H., & Sommer, T. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 134–139.
 - 35) Koopmann, J.O., Albring, J., Huter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Neefjes, J., Hammerling, G.J., & Momburg, F. (2000) *Immunity*, **13**, 117–127.
 - 36) Wesche, J., Malecki, J., Wiedlocha, A., Skjerpen, C.S., Claus, P., & Olsnes, S. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 11405–11412.
 - 37) Ratts, R., Zeng, H., Berg, E.A., Blue, C., McComb, M.E., Costello, C.E., vanderSpek, J.C., & Murphy, J.R. (2003) *J. Cell Biol.*, **160**, 1139–1150.
 - 38) Sandvig, K. & Olsnes, S. (1980) *J. Cell Biol.*, **87**, 828–832.
 - 39) Haug, G., Leemhuis, J., Tiemann, D., Meyer, D.K., Aktories, K., & Barth, H. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 32266–32274.
 - 40) Taylor, M., Navarro-Garcia, F., Huerta, J., Burrell, H., Massey, S., Ireton, K., & Teter, K. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 31261–31267.
-