

平成 27 年度 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		ヒートショックタンパク質による自然免疫応答制御機構
新規・継続の別		☐ 新規 ・ 継続
研究代表者	所属	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
	職名・氏名	教授・鵜殿平一郎
研究分担者 (適宜行を追加して下さい)	所属	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
	職名・氏名	助教・山崎千尋
	所属	
	職名・氏名	
受け入れ教員	職名・氏名	教授・高岡晃教
研究目的 (300 字程度)		ウイルス、がんに対する生体防御機構では CD8T 細胞は必須の細胞集団である。まず樹状細胞によりウイルス等の外来性抗原はエンドソーム内に取り込まれ、エンドソーム膜を通過して細胞質に移行し、プロテアソームによってペプチドへ分解される。この生成ペプチドが小胞体に運ばれ MHC クラス I 分子と結合し、細胞膜表面に出た後に CD8T 細胞がこれを認識する。外来性抗原が細胞質へ移行する際に細胞質シャペロン HSP90 が必要なことを鵜殿らは証明したが、通過する小孔の実態は不明である。一方、小胞体膜に局在する DNA センサーSTING 分子が、HSP90 と会合する事実を高岡教授らの研究グループは突き止めており、この STING 分子が前述の小孔の一構成成分である可能性を想定し、その仮説の真偽を検証する。
研究内容・成果 (1000 字程度)		小胞体に局在する STING 分子は特にウイルスなどに由来する DNA 成分を認識する自然免疫分子である。細胞質内での DNA 認識に関与し、IRF3 のリン酸化キナーゼである TBK1 の活性化を介して DNA 依存的な自然免疫シグナルが制御される。一方で獲得免疫系において重要な役割を担う樹状細胞は外来性ウイルス抗原を貪食し、これを内在性抗原提示経路に導くことのできる唯一の細胞集団であるが、このクロスプレゼンテーション（交差抗原提示）は I 型インターフェロン、とりわけ IFNα の存在により亢進される。したがって、樹状細胞における STING 分子と細胞質シャペロン HSP90 の会合の有無はまず行うべき実験の一つである。樹状細胞をその都度骨髓細胞から誘導するのは大変であるため、マウス樹状細胞株の一つである DC2.4(H-2b) を用いて実験を行う。 次に、卵白アルブミン（OVA）を DC2.4 に外来性抗原として取り込ませ、交差抗原提示により H-2Kb+OVA257-264 を認識する OTI マウス由来 CD8T 細胞と共培養して、分泌する IFNγ の産生量を ELISA 法により定量することで交差抗原提示能を評価する系を立

	ち上げる。この交差抗原提示における STING 分子の役割を調べるために、既存の STING 分子阻害剤あるいは siRNA 処理により DC2.4 細胞の STING 分子の機能抑制ないし発現抑制を行い、その際の交差抗原提示能を定量する。仮に低下すれば STING 分子は何らかの関与をしていると判断される。 DC2.4 細胞膜を緑色蛍光物質 PKH67 でラベルし、赤色の蛍光物質 AF647 で標識した外来性抗原 OVA を取り込ませる(貪食させる)。貪食 5 分後に DC2.4 細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、細胞内に取り込まれた OVA がエンドソーム内に局在するのか(黄色)、あるいは細胞質へ既に漏出しているのか(赤)を蛍光顕微鏡で観察し、イメージストリームによる解析で細胞質移行効率を定量的に解析する。仮に、STING 分子が外来性抗原の小孔通過に関与するのであれば、STING 分子阻害剤あるいは siRNA 処理により赤色に見える細胞内 OVA は少なくなるはずである。 最後に、STING 分子と取り込んだ OVA の局在を観察し、互いに重なり合う部分を検出する。また、生化学的に OVA と STING 分子との会合を証明する。 大凡以上のような流れで、実験を進めている。
成果	【学会報告】 なし。
	【論文発表】 なし。
	【新聞報道】