

Title	Transport of cellular misfolded proteins by HLA-B27 free heavy chain
Author(s)	依藤, 秀樹
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/73449
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 依藤 秀樹

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査 大阪大学教授	荒瀬 高
	副 査 大阪大学教授	山崎 晶
	副 査 大阪大学教授	鈴木 一博

論文審査の結果の要旨

HLA class I の一つである HLA-B27 は強直性脊椎炎の強いリスクアレルとして知られている。HLA class I は重鎖、ペプチド、 $\beta 2$ ミクログロブリンからなる通常の構造の他に、重鎖のみからなる構造 (free heavy chain, FHC) をとる。FHC に対する抗体が強直性脊椎炎の動物モデルの関節炎を抑えるという報告や実際の強直性脊椎炎の患者さんから FHC が検出されるといった報告があるため、HLA-B27 FHC は強直性脊椎炎の発症に関与していると考えられている。今回、HLA-B27 FHC が細胞内のミスフォールド蛋白質を細胞表面へ輸送するという新たな機能を報告した。さらに、ヒト $\beta 2$ ミクログロブリンの存在下で HLA-B27 FHC の細胞表面の発現量が増加し、同時にミスフォールド蛋白質の輸送も増加することがわかった。これまで考えられていた FHC 自体が誘因となる炎症ではなく、FHC とミスフォールド蛋白質の複合体が疾患の発症に関与している可能性がある。HLA-B27 の新たな知見に関する報告であり、学位に値すると考えられる。

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	依藤 秀樹
論文題名 Title	Transport of cellular misfolded proteins by HLA-B27 free heavy chain (HLA-B27重鎖によるミスフォールド蛋白質の輸送)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>HLA class I分子は細胞障害性T細胞にペプチドを提示することで生体防御に重要な役割を果たしている。通常のHLA class I分子はβ2ミクログロブリン(β2m)、ペプチド、重鎖から構成されるが、ある細胞では重鎖のみでも安定して発現することが知られている。重鎖のみで発現するHLA class I分子(free heavy chain, FHC)はHLA-B27分子が代表的である。HLA-B27は強直性脊椎炎の発症と強く関連しているが、発症機序にどう関わるかは完全には解明されていない。</p> <p>また我々は細胞内のミスフォールド蛋白質がHLA class II分子とペプチド収容溝を介して結合し、細胞表面へ輸送されることを報告した。その上、疾患感受性のHLA class II分子とミスフォールド蛋白質の複合体は自己免疫疾患に関連する自己抗体の標的であった。</p> <p>HLA-B27はHLA class Iである。通常の構造のHLA class I分子はペプチド収容溝が閉じているために、蛋白質と結合しないと予測される。しかしHLA-B27 FHCはマルチマーを形成する。マルチマーはペプチド収容溝を介さずに他の蛋白質と結合する。そこで我々はHLA-B27 FHCもミスフォールド蛋白質を輸送する性質があるのではと仮説をたて、解明を試みた。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>ミスフォールド蛋白質のモデルとして、プラスミドに人工的に変異をいれたhen egg lysozyme(mutant HEL)を作成した。またIgGは重鎖と軽鎖が結合して通常の構造をとるが、IgG重鎖のみを細胞にトランスフェクションしてfoldingを障害し、ミスフォールド蛋白質のモデルとした。</p> <p>内在性のclass Iの影響を除くためにHLA class I欠損293T細胞を作成した。HLA class I欠損293T細胞にmutant HEL、IgG重鎖を単独でトランスフェクションしても細胞表面で検出できないが、HLA-B27分子を共発現させると、ミスフォールド蛋白質が細胞表面で検出することができた。しかし、HLA-B40を共発現しても細胞表面で検出できなかった。続いて、様々なHLA class Iのアリルを用いて、ミスフォールド蛋白質の輸送能の強さを比較した。通常のHLA class Iの構造とFHCの構造は抗体で見分けることができるが、それぞれの構造とミスフォールド蛋白質の発現量が相関するかを解析した。ミスフォールド蛋白質の発現とFHCの発現は相関するが、通常のHLA class Iの構造とは殆ど相関しなかった。またHLA-B27はその性質が強いアリルであった。以上からHLA-B27分子はミスフォールド蛋白質を輸送すると示唆される。</p> <p>続いてHLA-B27分子とmutant HELの結合を証明する実験を行った。HLA class I欠損293T細胞にHLA-B27とmutant HELをトランスフェクションした上でmutant HELを免疫沈降し、western blottingを行うと、HLA-B27分子が検出できた。またFHCを認識する抗体で免疫沈降し、western blottingを行うと、mutant HELを検出できた。対して通常の構造のHLA class Iを認識する抗体で免疫沈降を行った場合、mutant HELを検出できなかった。mutant HELと結合するHLA-B27分子はFHCと示唆される。</p> <p>またHLA-B27トランスジェニックマウスは関節炎を発症しない。しかし、マウスβ2mをヒトβ2mに変えることで、FHCが増加し、関節炎を発症するという報告がある。ヒトβ2mがミスフォールド蛋白質の輸送に関与しているかを調べるにあたり、内在性のβ2mの影響を除くためにβ2m欠損293T細胞を作成した。β2m欠損293T細胞にHLA-B27とmutant HELをトランスフェクションし、マウスβ2m、ヒトβ2m存在下で輸送能が変化するかを検討した。マウスモデルと同様にヒトβ2m存在下ではFHCの発現が増加し、同時にmutant HELの輸送が増加した。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>HLA-B27 FHCはミスフォールド蛋白質を細胞表面へ輸送する。ヒトβ2m存在下において、細胞表面のFHCの発現は増加し、同時にミスフォールド蛋白質の輸送も増加する。mutant HELが関節炎の発症と関連する可能性は低いですが、疾患特異的なミスフォールド蛋白質とHLA-B27 FHC複合体が関節炎を惹起する可能性がある。</p>	