

令和元年6月1日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09872

研究課題名(和文) STAPアダプター分子群による免疫調節・腫瘍化シグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of regulation of signals by STAP adaptor protein in immune system and tumorigenesis

研究代表者

織谷 健司 (ORITANI, KENJI)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：70324762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： STAPアダプター蛋白の作用機序を解析するとともに病態形成に及ぼす影響を解析した。

STAP蛋白がCD3-ITAMドメインやLCKとの結合を介してT細胞受容体シグナルを増強することを見出した。また、STAP-1が慢性骨髄性白血病幹細胞の生存・維持に関与していることを明らかにした。さらに、STAPトランスジェニックあるいは野生型マウス由来骨髄細胞を移植するGVHDモデル実験から、Tリンパ球に発現するSTAPは移植片対宿主病を増強させることも見出した。

以上、STAP蛋白の新しい機能を見出すとともに、慢性骨髄性白血病や移植片対宿主病の治療・予防に関してSTAP阻害剤の臨床応用の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

STAPアダプター蛋白の免疫応答への関与を明らかにするとともに、慢性骨髄性白血病や移植片対宿主病の病因・病態へのSTAPの関与を明らかにした。このことは、自己免疫疾患などの難治性疾患や一部の腫瘍において、STAP人為的操作による治療の可能性を示唆するものである。STAP阻害剤開発後の治療対象疾患の縛り込みに成功した。

研究成果の概要(英文)： We analyzed functional mechanisms of adaptor protein STAP and possible involvement in disease development.

We newly found positive regulation of T-cell receptor signals by STAP through its binding to LCK and CD3-ITAM. We also showed that STAP is involved in maintenance of chronic myelocytic leukemia stem cells. We established GVHD experimental model using STAP-transgenic mouse, and found that over-expression of STAP in T-lymphocytes highly enhanced clinical symptoms of graft-versus-host disease.

Therefore, we could show potential of clinical utilities of STAP-inhibitors in the fields of the elimination of chronic myelocytic leukemia stem cells and the prevention and treatment of graft-versus-host disease after allogenic hematopoietic stem cell transplantation.

研究分野：血液内科学

キーワード：STAP アダプター蛋白 免疫応答 慢性骨髄性白血病 移植片対宿主病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Signal transducing adaptor protein (STAP)分子は、PH ドメイン・SH2 様ドメイン・proline-rich 領域を持つアダプター蛋白である。BCR-ABL, LMP-1, STAT3, MyD88, IKK-beta, Cbl, Vav1, caspase8 などシグナル伝達の鍵分子と結合することで、STAP が、(1) IL-6 刺激時の急性期蛋白誘導を増強する (2) TLR 刺激時の NF-kappaB 活性化を促進する (3) T リンパ球の fibronectin 接着を減弱する (4) SDF-1 へのリンパ球遊走を促進する (5) Fas 刺激後の細胞死を促進する (6) BCR-ABL 由来シグナルを増強する (7) EB ウイルス産物 LMP-1 依存性増殖を抑制することを報告してきた。これら事実は、STAP 蛋白が免疫応答・炎症反応や一部腫瘍化に関与する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

STAP 蛋白人為的操作による慢性骨髄性白血病や造血幹細胞移植後 Graft-versus-host disease (GVHD) に対する新しい治療法開発の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞株への遺伝子導入

HEK293T 細胞への遺伝子導入はリン酸カルシウム法で行った。Jurkat 細胞への遺伝子導入は電気穿孔法で行った。恒常発現株は、1 mg/mL G418 を含む培養メディウムを用いて2週間薬剤選別した上で、限外希釈法の手法でG418 耐性細胞株を単クローン化した。

(2) STAP-1/2 トランスジェニック/ノックアウトマウス

既に作製されている LCK および E μ エンハンサー下流で遺伝子を過剰発現するマウス (Tg マウス) および遺伝子欠損マウス (KO マウス) を用いた。

(3) 免疫沈降法とウエスタンブロット解析

50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.15 M NaCl、1% NP-40、1 mM PMSF、1 mM Na₃V0₄にて細胞を可溶化し、遠心分離後の上清を細胞可溶化物とした。細胞ライセートに目的タンパク質に対する抗体と担体 (Protein A sepharose or Protein G sepharose) 加えて、免疫沈降を行った。SDS-PAGE にてタンパク質を分離した後、タンパク質を PVDF 膜に転写した。1%ウシ血清アルブミンで30分間ブロッキングした後に、一次抗体に続いて HRP 標識二次抗体と反応させ化学発光により X 線フィルム上に検出した。

(4) T 細胞受容体シグナル活性化

抗 CD3 抗体 (5-10 μ g/mL) と抗 CD28 抗体 (3 μ g/mL) を加えた後、37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。

(5) フローサイトメトリー解析

目的細胞を FACS バッファー (2% FCS/0.05% NaN₃/PBS) に懸濁し、蛍光標識モノクローナル抗体と反応させた。洗浄した後に、フローサイトメーター Gallios (Beckman Coulter) によりデータを取得し FlowJo (Version 10) で解析した。

(6) 慢性骨髄性白血病モデル実験

STAP 欠損マウスおよび野生型マウスから造血幹細胞 (HSC) 分画 (Lineage⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺) を採取して、BCR-ABL 発現ウイルスベクター (GFP 産生あり) を導入した。GFP 陽性細胞を FACS Aria にて回収し、放射線照射した免疫不全マウスに静脈内接種した後の CML 発症を観察する。末梢血への白血病細胞出現・脾腫・生存率を評価した。

(7) 移植片対宿主病 (GVHD) モデル実験

移植細胞として C57BL/6 マウス由来血球細胞、レシピエントとして BALB/C マウスを用いる同種骨髄移植実験系を確立した。リンパ球除去骨髄をドナー細胞として、致死量の放射線を全身照射した BALB/C マウスに尾静脈から 5x10⁶ 移植細胞を輸注した。移植後 90 日までの生存、GVHD 症状を経時的に評価した。

GVHD 症状については、体重減少 (day0 に対する減少率%)、姿勢、活動性、毛並み、皮膚強度を基にスコア化し、総合的な重症度を測定した。

4. 研究成果

(1) リンパ造血細胞における STAP 遺伝子発現解析

STAP1 および STAP2 遺伝子は、造血幹細胞レベルから成熟リンパ球の段階までユビキタスに発現していた。STAP1 遺伝子は B 細胞で発現が高い傾向を認めるのに対し、STAP2 は T リンパ球系統

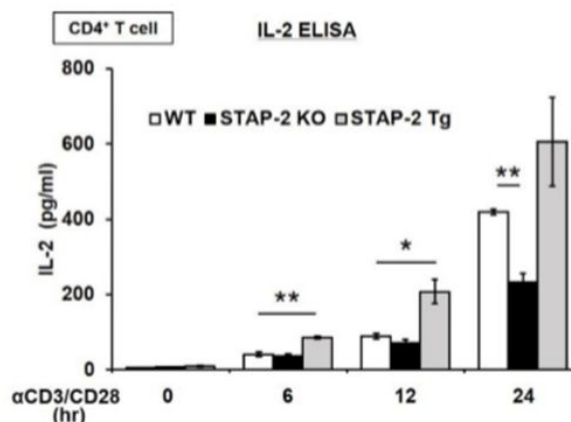


図1 ICR 刺激による IL-2 産生における STAP-2 の機能

WT、STAP-2 KO マウス、STAP-2 Tg マウス由来 CD4⁺ T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で経時的に刺激後、培養上清を回収し、ELISA 法により IL-2 産生量の測定を行った。

Mean \pm SEM * : p < 0.05 ** : p < 0.01

で発現が上昇していた。

(2) STAP による T 細胞受容体活性化機構の解明

CD4+ T 細胞を脾臓から分離し、抗 CD3 抗体および補助シグナル分子である CD28 に対する抗体で刺激した後に培養上清に含まれる IL-2 量を ELISA 法により測定した。結果、STAP-2 欠損マウス由来 CD4+ T 細胞からの IL-2 産生量は、野生型マウス由来 CD4+ T 細胞と比較して有意に減少した。一方、STAP-2 トランスジェニックマウス由来 CD4+ T 細胞からの IL-2 産生量は、WT マウス由来 CD4+ T 細胞と比較して有意に増加していた (図 1)。抗 CD3/CD28 抗体刺激における TCR シグナル下流分子の活性化をチロシンリン酸化型シグナル分子に対する抗体を用いたウエスタンブロット法にて検討した。結果、T 細胞受容体シグナル伝達を介する IL-2 の産生において重要な役割を担っているキナーゼ分子 ZAP-70 のリン酸化が STAP-2 欠損マウス由来 CD4+ T 細胞では減弱、STAP-2 トランスジェニックマウス由来 CD4+ T 細胞では亢進していた。また、刺激に伴う下流のシグナル分子 PLC-1 や ERK のリン酸化も STAP-2 欠損マウス由来 CD4+ T 細胞では減弱、STAP-2 トランスジェニックマウス由来 CD4+ T 細胞では増強していた。これらの結果から、STAP-2 が、T 細胞受容体シグナルを正に制御することで T 細胞活性化を増強することが示唆された。

TCR シグナル伝達は、T 細胞受容体刺激により、CD4 または CD8 と会合しているキナーゼ分子 LCK が活性化されて T 細胞受容体複合体構成分子である CD3 にリクルートされる。その後、LCK が CD3 内の ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) をチロシンリン酸化することで下流分子に対するシグナル

伝達が誘導される。STAP-2 が CD3 及び LCK と直接相互作用するかどうか免疫沈降法による解析を行った (図 2)。結果、STAP-2 を発現させた Jurkat 細胞において未刺激時では両分子との相互作用が観察されなかった。しかし、T 細胞受容体刺激により STAP-2 と CD3 との結合が誘導された。さらに、T 細胞受容体刺激により STAP-2 は LCK と強く結合するようになった。これらの結果から、STAP-2 は、T 細胞受容体刺激依存的に LCK 及び CD3 両分子と相互作用することで、LCK による CD3 リン酸化を増強すると考えられた。

(3) STAP による慢性骨髄性白血病の発症・病態への関与

STAP は、慢性骨髄性白血病の原因遺伝子異常である BCR-ABL と結合し、BCR-ABL の自己リン酸化や下流シグナルを亢進させる。そこで、STAP による慢性骨髄性白血病の発症・病態への関与を解析するために、慢性骨髄性白血病モデルを確立した。STAP-1 欠損マウスおよび野生型マウスから造血幹細胞分画 (Lineage⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺) を採取して、BCR-ABL 発現ウイルスベクターを導入し、

放射線照射した免疫不全マウスに静脈内接種した。結果、STAP-1 を欠損する BCR-ABL 造血幹細胞を移植したレシピエントマウスは、STAP を発現する BCR-ABL 造血幹細胞を移植したマウスと比較して、より長い生存が認められた。STAP-1 を欠損する BCR-ABL 造血幹細胞を移植したレシピエントマウスでは、慢性骨髄性白血病幹細胞の絶対数が著明に減少していた (図 3)。また、その原因として、STAP-1 を欠損する慢性骨髄性白血病幹細胞では強いアポトシスが誘導

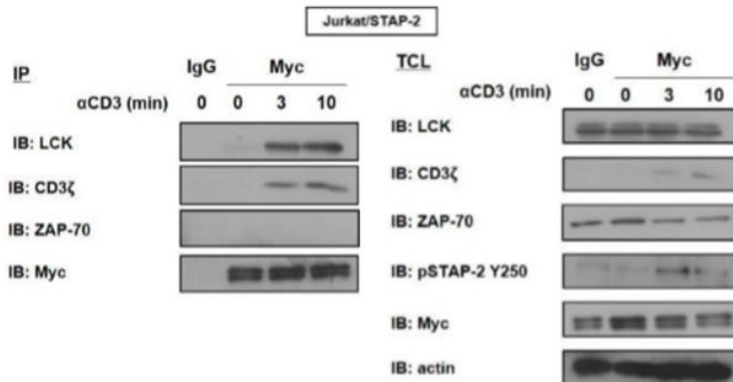


図2 STAP-2とLCK/CD3と相互作用

Myc-STAP-2を発現させたJurkat細胞を抗 CD3/28 抗体で経時的に刺激を行った。細胞溶解液を作製してコントロール抗体及び抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降を行い、WB 法にて相互作用の解析を行った。

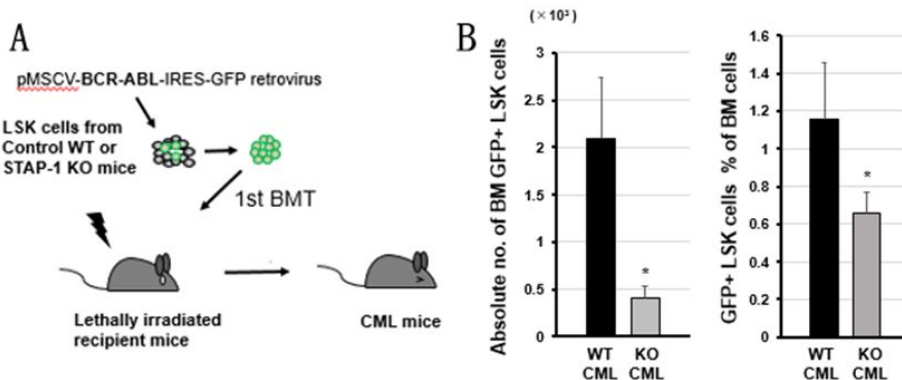


図3 慢性骨髄性白血病幹細胞へのSTAP-1の作用

(A) 慢性骨髄性白血病モデル実験の手順

(B) 移植後11日の時点で、骨髄を採取した。慢性骨髄性白血病幹細胞

(GFP+ LSK) を解析した。

また、その原因として、STAP-1 を欠損する慢性骨髄性白血病幹細胞では強いアポトシスが誘導

され、生体内での白血病幹細胞を維持できないことが明らかとなった。これらの結果から、造血幹細胞に発現している STAP-1 が慢性骨髄性白血病幹細胞の生体内維持に重要であると考えられた。

(4) 移植後 GVHD に対する STAP 蛋白の意義

GVHD モデルとして、移植細胞として C57BL/6 マウス由来血球細胞、レシピエントとして BALB/C

マウスを用いる同種骨髄移植実験系を用いた。本検討での GVHD モデルではリンパ球除去骨髄を用いたため、移植後急性期に強い免疫応答は認めなかった。BALB/C マウスをドナーとした場合は、放射線照射による一過性の体重減少が出現した後、体重は徐々に回復するが、C57BL/6 WT マウスをドナーとした同種移植

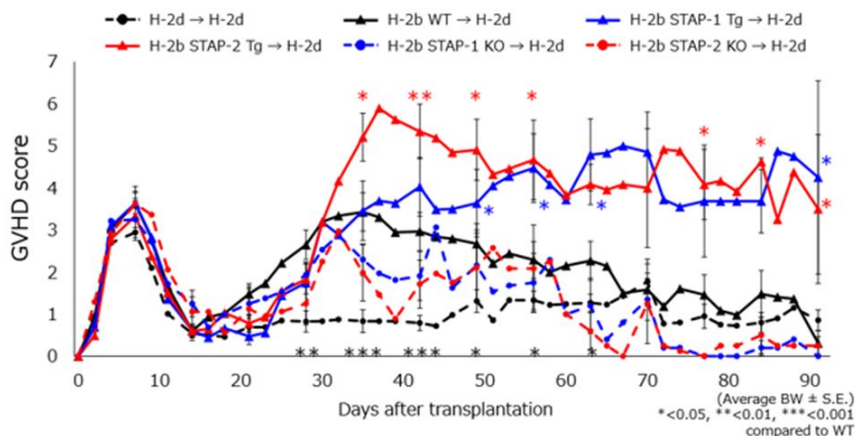


図4 移植後GVHD症状の推移

血球生着後のday20-30以降においてGVHD scoreの悪化を認めた。STAP-1 /2欠損細胞移植マウスでは、GVHD症状は軽微であった。STAP-1/2トランスジェニック細胞移植マウスでは、GVHD症状は重度であり、そのGVHD score悪化は長期にわたり持続した。

モデルでは、移植後 30 日頃より体重はやや低下し、同種免疫応答が起きている事が示唆された。ただし、明らかな腸炎や皮膚炎といった GVHD 症状は認めなかった。STAP-2 トランスジェニックマウスをドナーとした場合、移植後 30 日頃より腸炎・皮膚炎を伴う体重減少が出現した。WT ドナーでの移植では、ほぼ全例が生存する (91.7%) のに対し、STAP-2 トランスジェニックドナー移植の場合は、day60 生存率は 22.2%に低下した。移植後の体重減少率、GVHD スコアについて

も、有意に STAP-2 トランスジェニックマウスドナー群で有意に悪化した (図 4)。同様の検討を、STAP-1 トランスジェニックマウスを用いて行ったところ、生存率は WT と同等であったが、GVHD 症状を示す指標はいずれも統計学的有意差を持って増悪した。一方、STAP-1/2 欠損マウスを用いた検討では、STAP-1 欠損、STAP-2 欠損ともに、WT に比して GVHD 症状は軽微であった。移植後 60 日および 90 日の時点で、移植マウスから各臓器を回収し、病理学的検討を行った。観察所見と一致して、皮膚、腸管組織はリンパ球浸潤を伴う炎症所見を示し、GVHD を発症している事が確認された (図 5)。また、トランスジェニックマウスを移植したレシピエントの胸腺は、STAP-1、STAP-2 とともに著明に萎縮していた。末梢血での CD4⁺ CD25⁺ 細胞数をフローサイトメトリーで解析したところ、制御性 T リンパ球は、特に STAP-2 トランスジェニックドナーの場合に低下していた (移植後 60 日での細胞数 WT vs STAP-2 Tg; 44.0 / μ L vs 18.2 / μ L; p<0.05)。これらの結果から、移植後にレシピエント造血器内で再構築されたリンパ球での STAP-1 および STAP-2 が、同種免疫反応調整に大きな役割を担っている事が明らかになった。

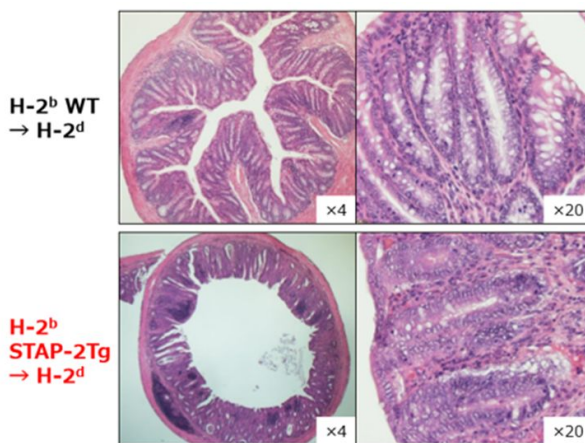


図5 腸管DVHD

WT細胞移植マウスではほぼ正常な粘膜だが、STAP-2トランスジェニック細胞移植マウスでは腸陰窩の消失、杯細胞の減少を認めた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

- (1) Kashiwakura JI, Yamashita S, Yoshihara M, Inui K, Saitoh K, Sekine Y, Muromoto R, Kitai Y, Oritani K, Matsuda T: STAP-2 positively regulates Fc ϵ R1-mediated basophil activation and basophil-dependent allergic inflammatory reaction. Int Immunol. In press doi: 10.1093/intimm/dxz013
- (2) Kitai Y, Iwakami M, Saitoh K, Togi S, Isayama S, Sekine Y, Muromoto R, Kashiwakura JI, Yoshimura A, Oritani K, Matsuda T: STAP-2 protein promotes prostate cancer growth

by enhancing epidermal growth factor receptor stabilization. J Biol Chem. 2017;292(47):19392-19399. doi: 10.1074/jbc.M117.802884

- (3) Saitoh K, Tsuchiya T, Kashiwakura JI, Muromoto R, Kitai Y, Sekine Y, Oritani K, Matsuda T: STAP-2 interacts with Pyk2 and enhances Pyk2 activity in T-cells. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Jun 17;488(1):81-87. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.010

〔学会発表〕(計 39 件)

- (1) Toda J, Ichii M, Oritani K, Saito H, Kitai Y, Muromoto R, Kashiwakura JI, Saitoh K, Matsuda T, Kanakura Y: Role of signal transducing adaptor protein-1 (STAP-1) in chronic myelogenous leukemia. The American Society of Hematology 60th Annual Meeting, 2018
- (2) Saito H, Ichii M, Toda J, Kitai Y, Muromoto R, Kashiwakura JI, Saitoh K, Shibayama H, Matsuda T, Oritani K, Kanakura Y: Signal transducing adaptor protein (STAP) family accelerates gut and thymic graft-versus-host-disease in murine model. The American Society of Hematology 60th Annual Meeting, 2018
- (3) 一井倫子, 織谷健司, 柴山浩彦, 戸田 淳, 西東秀晃, 北井勇一, 室本竜太, 柏倉淳一, 齋藤浩大, 松田 正, 金倉 讓: 骨髄内 B 細胞分化における STAP-2 蛋白の役割 第 80 回日本血液学会学術集会、2018
- (4) 戸田 淳, 一井倫子, 西東秀晃, 鍛代悠一, 室本竜太, 柏倉淳一, 齋藤浩大, 柴山浩彦, 松田 正, 織谷健司, 金倉 讓: 慢性骨髄性白血病における STAP ファミリー蛋白の役割 第 80 回日本血液学会学術集会、2018
- (5) 西東秀晃, 一井倫子, 戸田 淳, 鍛代悠一, 室本竜太, 柏倉淳一, 齋藤浩大, 柴山浩彦, 松田 正, 織谷健司, 金倉 讓: Signal transducing adaptor protein-2(STAP-2)はマウスモデルで慢性 GVHD を悪化させる 第 80 回日本血液学会学術集会、2018
- (6) Tsuchiya T, Saitoh K, Kashiwakura JI, Oritani K, Matsuda T: Functional analysis of the adaptor protein STAP-1 in TCR-mediated T cell activation 第 47 回日本免疫学会学術集会、2018
- (7) Saitoh K, Kashiwakura JI, Sekine Y, Muromoto R, Kitai Y, Yoshimura A, Oritani K, Matsuda T: STAP-2 act as a positive regulator in TCR-mediated T cell activation 第 47 回日本免疫学会学術集会、2018
- (8) Toda J, Ichii M, Oritani K, Saito H, Kitai Y, Muromoto R, Kashiwakura J, Saitoh K, Matsuda T, Kanakura Y: Signal transducing adaptor protein-1(STAP-1) maintains chronic myeloid leukemic stem cells. 22nd Congress of the European Hematology Association, 2017
- (9) Ichii M, Oritani K, Shibayama H, Toda J, Saito H, Kitai Y, Muromoto R, Kashiwakura J, Saitoh K, Matsuda T, Kanakura Y: Signal-transducing adaptor protein-2 blocks B cell recovery under hematological stress at pre-B stage via TLR4 signaling. The American Society of Hematology 59th Annual Meeting, 2017
- (10) Toda J, Ichii M, Shibayama H, Saito H, Kitai Y, Muromoto R, Kashiwakura J, Saitoh K, Matsuda T, Oritani K, Kanakura Y: Role of signal transducing adaptor protein (STAP) family in chronic myelogenous leukemia. The American Society of Hematology 59th Annual Meeting, 2017
- (11) Toda J, Ichii M, Oritani K, Saito H, Kitai Y, Muromoto R, Kashiwakura J, Saitoh K, Matsuda T, Kanakura Y: 慢性骨髄性白血病の進展におけるアダプター蛋白 STAP-1 の役割 第 79 回日本血液学会学術集会、2017
- (12) Kashiwakura JI, Yamashita S, Saitoh K, Oritani K, Matsuda T: STAP-2 is an adopter molecule to positively regulate basophil activation 第 46 回日本免疫学会学術集会、2017

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 移植片対宿主病モデル動物、及び移植片対宿主病の治療剤のスクリーニング方法

発明者: 松田 正、織谷 健司、一井 倫子、金倉 讓

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願 2018-170771

出願年: 2018

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ：<https://www.iuhw.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：金倉 譲

ローマ字氏名：KANAKURA, YUZURU

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：20177489

研究分担者氏名：一井 倫子

ローマ字氏名：ICHI, MICHIKO

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：寄附講座助教

研究者番号（8桁）：30633010

研究分担者氏名：戸田 淳

ローマ字氏名：TODA, JUN

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学部附属病院

職名：医員

研究者番号（8桁）：90770834

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。