

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790368

研究課題名（和文）B細胞におけるSTIM1依存的カルシウム流入機構の解析

研究課題名（英文）Analysis for mechanism of STIM1-mediated calcium influx in B cells

研究代表者

馬場 義裕 (YOSHIHIRO BABA)

独立行政法人理化学研究所・分化制御研究グループ・客員研究員

研究者番号：20415269

研究成果の概要：STIM1 ノックアウトマウスを作製し、本マウス由来胎仔肝細胞から分化させた STIM1 欠損肥満細胞を用いる事により、STIM1 が IgE 依存的な抗原刺激によるカルシウム流入に必須であることを明らかにした。さらに、STIM1 が肥満細胞の脱顆粒、サイトカイン産生、そしてアナフィラキシー反応において重要な役割を果すことを見出しました。B 細胞特異的 STIM1 ノックアウトマウスの樹立に成功し、解析の準備が整った。また、STIM1 に結合するタンパク質の同定に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：STIM1, カルシウム、ストア作動性カルシウム流入、肥満細胞、アレルギー、B細胞

## 1. 研究開始当初の背景

免疫細胞におけるカルシウムシグナルは、免疫反応の重要な誘因として知られている。定常状態における $Ca^{2+}$ 濃度は細胞外 $Ca^{2+}$ 濃度のおよそ 10,000 分の 1 とされ（細胞外 $[Ca^{2+}]$ ： $-10^{-3}M$ 、細胞内 $[Ca^{2+}]$ 定常状態： $-10^{-7}M$ ）、種々の刺激により活性化された細胞においては小胞体に蓄積された $Ca^{2+}$ が細胞質に放出されることにより細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の急激な上昇が認められる（細胞内 $[Ca^{2+}]$ 活性化状態：

$-10^{-6}M$ ）。この細胞内 $Ca^{2+}$ のソースは細胞内に貯蔵されたもの、および細胞外から $Ca^{2+}$ チャネルを通じて流入してくるもの、である。特に、細胞外からのカルシウム流入は長時間の持続的シグナルを維持する上で重要であると考えられている。B細胞レセプター刺激による持続的なカルシウムシグナルは細胞内カルシウムストアである小胞体からのカルシウム放出が引き金となって引き起こされる細胞外からのカルシウム流入（ストア作動性カルシウム流入：SOCE）が主要なソースと

なるが、そのメカニズムは不明であった。最近同定されたSTIM1 (stromal interaction molecule 1) が小胞体Ca<sup>2+</sup>センサーとして働き、また細胞膜のカルシウムチャネル関連分子との相互作用によりカルシウム流入を制御していることが明らかになった。しかし、STIM1 がどのように、カルシウム枯渇を感知するのか？また、どのようにカルシウム流入を活性化するのかという分子メカニズムは不明であった。さらに、カルシウム流入が*in vivo*における生理的役割は何かということも不明であった。我々は世界に先駆けてSTIM1 欠損DT40B細胞株を樹立し、STIM1 がB細胞レセプター刺激で誘導されるSOC流入に必須であることを明らかにし、また、STIM1 の小胞体での恒常的挙動及びBCR刺激が誘導する細胞膜直下での点状構造形成が重要であること、さらに、SOC活性化に必須のSTIM1 の機能ドメインの同定にも成功していた。

## 2. 研究の目的

STIM1 の関与するSOC流入メカニズムの分子基盤の解明と免疫細胞（特に、B細胞と肥満細胞）におけるSTIM1 の生理的意義を明らかにすることを目的とする。これら成果が免疫不全症、自己免疫疾患、アレルギーといった免疫病の理解、さらには免疫系をコントロールするための新規薬剤の創製にもつながるものと期待して研究を進める。

## 3. 研究の方法

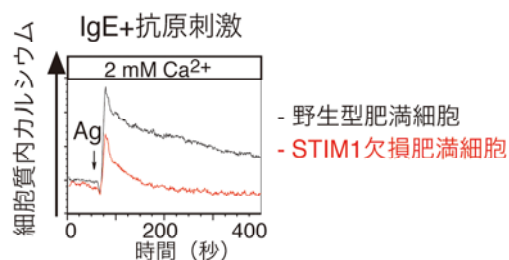
(1) STIM1 に会合する新規分子の同定と解析。STIM1 の恒常的な動きと、B細胞レセプター刺激後に見られる細胞膜直下での点状構造がSOC流入に重要であるが、これらの分子機序は全く不明である。我々はSTIM1 のダイナミクスが微小管に依存していることを見出しており、STIM1 との結合タンパク質の重要性が示唆される。そこで、STIM1 の機能が如何にして制御されているのか、また、持続的カルシウムがどのような下流シグナルを伝えるのかという重要かつ未解決の疑問にアプローチするため、STIM1 に会合する新規分子の同定を質量分析により試みる。さらに同定遺伝子の欠損DT40細胞を樹立し、STIM1 との関連性を直接的に解析する。

(2) STIM1 ノックアウトマウスの作製と解析。Null型ノックアウトマウスを樹立し、全血液細胞の分化、肥満細胞の機能解析を行う。具体的には、肥満細胞の分化、脱顆粒、サイトカイン産生、*in vivo*におけるアナフィラキシー反応を検討する。また、B細胞特異的ノックアウトマウスを樹立し、B細胞の分化、活性化、免疫応答における役割を解析する。

## 4. 研究成果

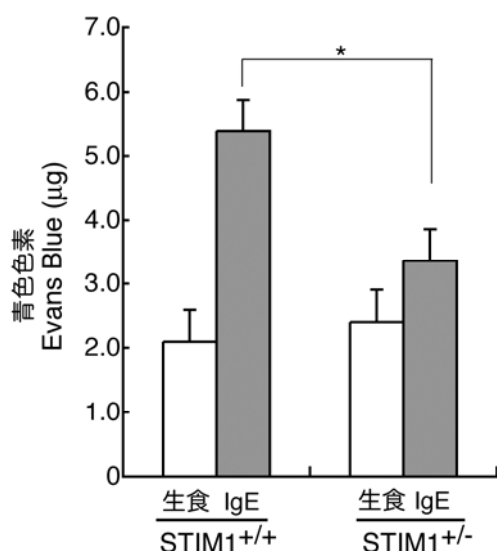
(1) STIM1 に会合する分子を3つ同定した。一つはキナーゼであり、STIM1 が本キナーゼでリン酸化されることを見出している。さらに本キナーゼ欠損DT40細胞株のカルシウム流入が亢進していることも明らかにした。今後、本キナーゼによるSTIM1 のリン酸化がどのようにSOC流入を制御しうるかを検討する。残り2つの分子はタンパク質-タンパク質相互作用ドメインを持っていることから、STIM1 との会合がSOC流入をどのように制御するのかを検証していく。

(2) STIM1 ノックアウトマウスの作製に成功し、nullホモノックアウトマウスは出生前後で致死となり、STIM1 が個体発生において重要な役割を担うことがわかった。胎生15日の胎仔肝より細胞を採取し、IL-3存在下で誘導した肥満細胞 (fetal liver-derived mast cells: FLMCs) を用いて解析を行ったところ、*Stim1*<sup>-/-</sup>マウスもしくは対照である野生型 *Stim1*<sup>+/+</sup>マウスの胎仔肝より誘導した肥満細胞、*Stim1*<sup>-/-</sup>FLMCsと *Stim1*<sup>+/+</sup>FLMCs、は形態学および表面抗原の発現などに関して同様であり、また *Stim1*<sup>+/+</sup>と *Stim1*<sup>-/-</sup>胎仔における背部皮膚単位面積当たりの肥満細胞の数にも相違が認められない。さらに *Stim1*<sup>-/-</sup>胎仔肝細胞の移植実験の結果からもSTIM1 の欠損は肥満細胞の分化自体には影響しないことが明らかとなった。小胞体カルシウムポンプの阻害剤であるタプシガルギン処理、あるいはあらかじめ抗DNP-IgE抗体で感作しておいた肥満細胞を対応する抗原 (DNP-HSA) で刺激する系のいずれにおいても *Stim1*<sup>-/-</sup>FLMCsでは野生型 *Stim1*<sup>+/+</sup>FLMCsに比してCa<sup>2+</sup>流入が著明に抑制されており、また細胞外Ca<sup>2+</sup>存在下で上記のようにFcεR1を刺激した際、*Stim1*<sup>+/+</sup>FLMCsはCa<sup>2+</sup>スパイクに続く持続的なCa<sup>2+</sup>プラトーが認められるが、*Stim1*<sup>-/-</sup>FLMCsにおいてはスパイクの値ならびにその後の細胞質Ca<sup>2+</sup>濃度は著しく低下していた (図1)。このようなSOCEの欠失はGFP標識STIM1を *Stim1*<sup>-/-</sup>FLMCsに発現させることにより回復させることができる。従って肥満細胞においてもSTIM1はSOCEに必須のエLEMENTと考えられる。



(図1) STIM1 欠損肥満細胞における抗原刺激時の細胞内カルシウム動員

さらに、STIM1 が肥満細胞の脱顆粒に必須の分子であることも発見した。抗原刺激後のサイトカイン産生においても *Stim1*<sup>-/-</sup>FLMCsではIL-6、TNFならびにIL-13の産生が著明に低下しており（タンパクレベルおよびmRNAレベル）、これはNF-κBやNFATの活性化不全に因ることが判明した。従って、STIM1 依存性SOCEはNF-κBやNFATの活性化とサイトカインの産生にも必須であることが結論付けられた。生体応答であるアレルギー反応におけるSTIM1/SOCEの関与をFcεR1を介する受身皮膚アナフィラキシー反応（passive cutaneous anaphylaxis: PCA、あるいはIgE依存性アナフィラキシー反応、IgE抗体を動物の皮膚に注射後、対応する抗原を全身投与するとIgE抗体投与部の血管透過性が亢進する現象である）により測定した。*Stim1*<sup>-/-</sup>マウスは胎生致死であり、またヘテロ *Stim1*<sup>+/-</sup>マウス由来のFLMCsは野生型 *Stim1*<sup>+/+</sup>マウスのFLMCsに比べSTIM1 タンパクの発現が著明に低下していることが判明している。従ってin vivoのこの実験ではSTIM1 不全のモデルとしてヘテロ *Stim1*<sup>+/-</sup>マウスを用いた。血管透過性(青色色素 Evans blueの滲みだし)を指標にしたPCA反応において、野生型 *Stim1*<sup>+/+</sup>マウスに比べヘテロ *Stim1*<sup>+/-</sup>マウスは反応が有意に低下しており、STIM1/SOCEが生体内の肥満細胞を介するアレルギー反応に必須であることが示唆された（図2）。



(図2) 生体アナフィラキシー反応

また、B細胞特異的 STIM1 ノックアウトマウスの樹立に成功し、B細胞分化を調べたところ、各臓器におけるB細胞分化は正常であることがわかった。これはSTIM1がB細胞分化には重要でないことを示している。B細胞レセプターによるカルシウム流入を調べると、野生型に比べ抑制されており、B細胞においてもSOC流入がSTIM1に依存していることがわかった。これは以前、我々が報告したDT40 B細胞株の実験データを支持している。さらに、STIM1 ノックアウト B細胞を in vitro で B細胞レセプター刺激すると、野生型に比べ、細胞増殖やサバイバルが低下していた。このことから、B細胞レセプターによるB細胞活性にSTIM1 依存的カルシウム流入が関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① Baba Y & Kurosaki T. Physiological function and molecular basis of STIM1-mediated calcium entry in immune cells. *Immunological Review* (in press). 査読なし

② Kurosaki T, Shinohara H & Baba Y. B Cell Signaling and Fate Decision. *Annu. Rev. Immunol.* (in press). 査読なし

③ Baba Y (12名中8番目) STIM protein coupling in the activation of Orai channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106, 7391-7396 (2009). 査読あり

④ Baba Y (5名中3番目) A Stim1-dependent, noncapacitative Ca<sup>2+</sup>-entry pathway is activated by B-cell-receptor stimulation and depletion of Ca<sup>2+</sup>. *J. Cell Sci.* 122, 1220-1228 (2009). 査読あり

⑤ Baba Y et. al. Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat. Immunol.* 9, 81-88 (2008). 査読あり

[図書] (計4件)

① 馬場義裕, 黒崎知博: 羊土社; 実験医学増刊シグナル伝達研究 2008-2009 (2008年): 26-33

② 馬場義裕, 黒崎知博: 医薬の門社: 感染・

炎症・免疫（2008年）78-81

③ 馬場義裕、黒崎知博：日本生化学会；生化学（2008年）：1123-1128.

④ 馬場義裕：羊土社；実験医学 vol 26, No. 8 カレントトピックス（2008年）：1253-1256

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：肥満細胞の脱顆粒抑制剤

発明者：黒崎知博、馬場義裕

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：特許権

番号：特願2007-273055

出願年月日：平成19年10月19日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬場 義裕 (BABA YOSHIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・分化制御研究グループ・研究員

研究者番号：20415269