

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790050

研究課題名（和文）STAP-2 による活性化 T 細胞排除機構の解明

研究課題名（英文）STAP-2 modulates activation-induced cell death in T-cell

研究代表者

関根 勇一 (SEKINE YUICHI)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：20396295

研究成果の概要（和文）：アダプター分子 STAP-2 は、炎症反応時に様々な免疫系細胞において細胞内シグナルを正または負に制御する多機能性分子である。本研究では、T 細胞の活性制御における STAP-2 の機能的役割、特に制御機構の破綻が重篤な免疫疾患の原因と考えられる、活性化増殖した T 細胞の排除機構 AICD:activation-induced cell death(活性化誘導性細胞死)に焦点を絞り機能解析を行った。その結果 STAP-2 は T 細胞におけるアポトーシスを促進する機能を有することが明らかとなった。つまり STAP-2 は T 細胞 AICD を制御する重要な分子であることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：Adaptor protein STAP-2 is a multifunctional molecule which regulates cellular signaling negatively or positively in immune responses. In this study, I investigated the functional mechanisms of STAP-2 in T-cell activation-induced cell death(AICD). It is revealed that STAP-2 enhances T-cell apoptosis, so STAP-2 plays a role in T-cell AICD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：(1) T 細胞 (2) アポトーシス (3) AICD(活性化誘導性細胞死) (4) アダプター分子 (5) STAP-2 (6) 自己免疫疾患 (7) Caspase (8) シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体防御反応時に T 細胞は抗原刺激を受けると活性化し増殖するが、その後炎症反応

の終焉として、一部の細胞を記憶 T 細胞として残し、活性化した多くの T 細胞はアポトーシスにより体内から除去される。この現象は AICD: activation-induced cell death(活性化

誘導性細胞死)として知られているが、このアポトーシス機構の破綻は活性化T細胞の異常増殖を引き起こし、自己免疫疾患を引き起こすと考えられている。

(2)炎症反応時にアダプター分子 STAP-2 (Signal-Transducing Adaptor Protein-2)は、様々な免疫系細胞において、それぞれの細胞内シグナルを正または負に制御する多機能性分子であることがこれまでに明らかになっている。

2. 研究の目的

本申請研究では、STAP-2の生理作用が確認されているT細胞において、その活性制御機構に着目して研究を行う。特に、制御機構の破綻が自己免疫疾患等の重篤な免疫疾患の原因と考えられる、活性化増殖したT細胞の排除機構に焦点を絞りSTAP-2の機能解析を行う。

3. 研究の方法

T細胞AICD誘導時におけるSTAP-2の機能解析を下記に示すように行う。

平成20年度

(1) Jurkat 細胞 STAP-2 発現株を用いた AICD の解析

Jurkat 細胞において、T細胞を活性化するレクチン(PHA)刺激によりAICDが誘導できることが知られている。予備実験より、Jurkat/STAP-2 細胞は、PHA 刺激によりコントロール細胞に比べ細胞死が亢進することがすでに確認できている。そこで、この細胞死がアポトーシスの亢進によるものか、ネクローシス(壊死)によるものであるかを確認する。

(2) アポトーシス(細胞死)誘導シグナル伝達分子への STAP-2 の機能的な作用解析

細胞死誘導時に引き起こされる細胞内シグナル伝達分子の活性を、Jurkat/STAP-2 細胞とコントロール細胞とを比較し、細胞死亢進メカニズムの解明を行う。具体的には、FasL や TNF- α を Jurkat 細胞に処理することで活性化する細胞死シグナル伝達分子、Caspase8、3/7 の活性を比較し、細胞死シグナルの亢進メカニズムの解明を行う。

(3) 細胞死誘導に関与する STAP-2 機能ドメインの同定

STAP-2 は、PH ドメイン、SH2-like ドメイン、プロリンリッチ領域といった、多くのアダプター分子に共通して見られる機能ドメインを有している。これらドメインのうち、細胞死に関与するドメインを同定する。

平成21年度

(4) STAP-2 ノックアウト(KO)マウスにおける T 細胞アポトーシスの解析

STAP-2 KO マウスよりT細胞を分離・培養し、TCR(T細胞レセプター)刺激やIL-2刺激によりAICDを誘導し、T細胞の生存率・アポトーシス細胞数を野生型マウスと比較する。また、マウスより分離したT細胞にFasLなどによりアポトーシスを誘導し、STAP-2 KOの影響を解析する。さらに、より生体内での生理状態に近い条件で解析するため、マウスに抗原を反復投与することでin vivoでT細胞のAICDを誘導し、脾臓細胞又は抹消血を採取しFACSによりアポトーシスの検出を行うことでSTAP-2の関与を検討する。

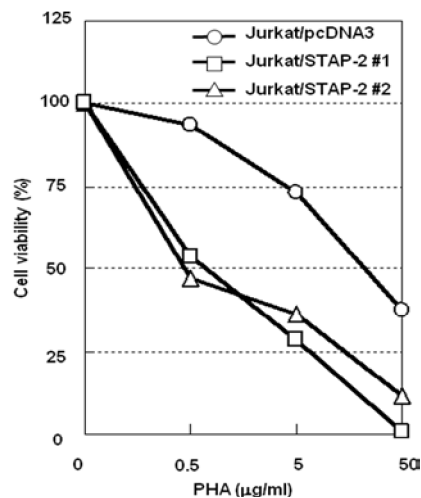
(5) STAP-2 トランスジェニック(Tg)マウスにおける T 細胞アポトーシスの解析

現在 E μ プロモーター制御下に STAP-2 を発現する STAP-2Tg コンストラクトを作成中である。このコンストラクトを用いることによりリンパ系細胞に STAP-2 を過剰発現する Tg マウスを作成する。その中から発現の高い Tg ラインを樹立し、AICD における STAP-2 の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) STAP-2 発現による AICD への影響

Jurkat 細胞において AICD を誘導すると、STAP-2 発現細胞ではコントロール細胞に比べ細胞死が亢進することが確認されたが、これがアポトーシスの亢進によることを AnnexinV 染色、TUNEL 法、DNA ラダーの検出により確認した。これらの結果、STAP-2 は Jurkat 細胞においてアポトーシスを亢進することが明らかになった。

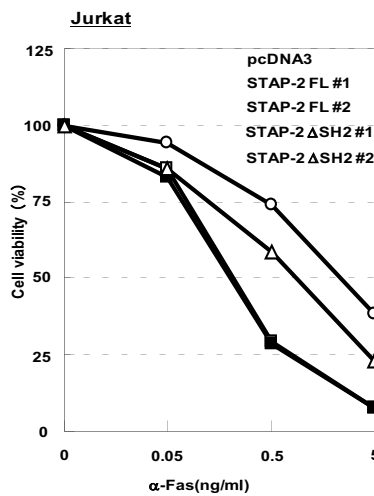


(2) アポトーシス誘導シグナル伝達分子への STAP-2 の機能的作用解析

AICD 誘導時に働くシグナル伝達分子の発現量・活性を、STAP-2 発現細胞とコントロール細胞とを比較した。Jurkat/Vector 株と Jurkat/STAP-2 株において、細胞死を引き起こすサイトカイン FasL、TNF- α やそれらレセプターの発現量に顕著な差は認められず、Caspase8、3/7 等のアポトーシス関連分子の活性化が STAP-2 発現細胞で顕著に増強していた。つまり、STAP-2 はアポトーシス時に細胞内シグナル伝達を増強していることが示唆された。

(3) 細胞死誘導に関与する STAP-2 機能ドメインの同定

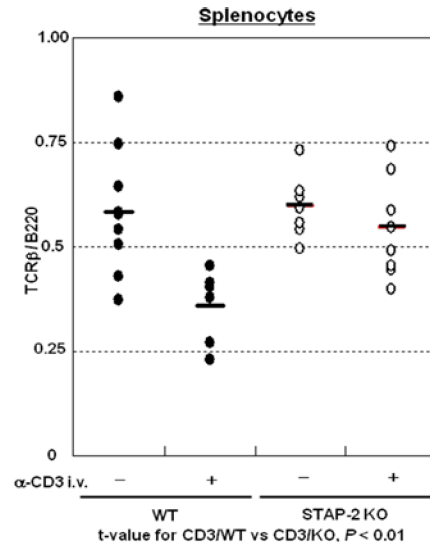
STAP-2 は、PH ドメイン、SH2-like ドメイン、プロリンリッチ領域といった機能ドメインを有している。これら各ドメインの欠失ミュータントを用いた解析から、細胞死誘導に重要なドメインは SH2 ドメインであることを同定した。以上より STAP-2 は Jurkat 細胞において AICD を亢進させる分子であることが明らかとなった。



(4) STAP-2 ノックアウト(KO)マウスにおける T 細胞アポトーシスの解析

In vivo における STAP-2 の機能を解析するため、T 細胞抗原レセプター(TCR)刺激によりマウス生体内で T 細胞 AICD を誘導する実験系を確立した。野生型及び STAP-2 ノックアウト(KO)マウスを用いて in vivo において TCR 刺激による AICD を誘導したところ、STAP-2 KO により AICD の誘導が有意に抑制された。またこの時、TCR 刺激により誘導される T 細胞のアポトーシスが STAP-2 KO により抑制されることも観察された。さらに、マウス T 細胞を分離し Fas によりアポトーシスを誘導すると、STAP-2 KO 細胞では有意に細胞死が抑制され、アポトーシスの誘導に

重要なカスパーゼ活性が減弱していることも確認できた。このことは、Jurkat 細胞を用いた研究と一致する結果であり、アポトーシス誘導時に生体内でも STAP-2 はカスパーゼの活性を亢進させることで細胞死を促進させることが強く示唆された。



(5) STAP-2 Tg マウスにおける T 細胞アポトーシスの解析

リンパ球系に STAP-2 を過剰発現する Tg マウスの作成に成功し、現在、STAP-2 の発現が強い系統を樹立中である。今後、STAP-2 高発現マウスを用いて AICD に対する影響を検討していく。STAP-2 は炎症反応時に強く誘導されることが明らかになっているため、STAP-2 の発現異常が自己免疫疾患の発症原因となることも考えられる。今後の Tg マウスの表現系の解析は多くの免疫疾患の病理解明につながることを期待される。

以上の研究成果より、STAP-2 は T 細胞 AICD を制御していることが明らかになり、STAP-2 が T 細胞の恒常性維持に重要な役割を担っていることを明らかにした。自己免疫疾患の発症メカニズムには不明な点が多く残されており、最近同定されその機能がほとんど解明されていない STAP-2 が AICD を制御していることから、今後の研究により自己免疫疾患発症メカニズム解明の手がかりになることが期待される。STAP-2 の機能解析は申請者らのグループが世界で率先して行っており、今後の研究展開により様々な疾患との関連が明らかになることを期待している。

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 15 件, 全て査読有り)

- ① Sekine, Y., O. Ikeda., S. Tsuji., C. Yamamoto, R. Muromoto, A. Nanbo, K. Oritani, A. Yoshimura and T. Matsuda. Signal-transducing adaptor protein-2 regulates stromal cell-derived factor-1 α -induced chemotaxis in T cells. *J. Immunol.* 183: 7966-7974. 2009
- ② Sekine, Y., C. Yamamoto, O. Ikeda, R. Muromoto, A. Nanbo, K. Oritani, A. Yoshimura and T. Matsuda. The protein content of an adaptor protein, STAP-2 is controlled by E3 ubiquitin ligase Cbl. *Biochem. Biophys. Res.* 384: 187-192. 2009
- ③ Ikeda, O., Y. Miyasaka, Y. Sekine, A. Mizushima, R. Muromoto, A. Nanbo, A. Yoshimura and T. Matsuda. STAP-2 is phosphorylated at tyrosine-250 by Brk and modulates Brk-mediated STAT3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384: 71-75. 2009
- ④ Ikeda, O., Y. Sekine, R. Muromoto, N. Ohbayashi, A. Yoshimura and T. Matsuda. Enhanced c-Fms/M-CSF receptor signaling and wound-healing process in bone marrow-derived macrophages of STAP-2 deficient mice. *Biol. Pharm. Bull.* 31: 1790-1793. 2008
- ⑤ Ikeda, O., Y. Sekine, T. Yasui, K. Oritani, K. Sugiyama, R. Muromoto, N. Ohbayashi, A. Yoshimura and T. Matsuda. STAP-2 negatively regulates both canonical and non-canonical NF-kappaB activation induced by Epstein-Barr virus-derived LMP1. *Mol. Cell. Biol.* 28: 5027-5042. 2008

[学会発表] (計 23 件)

- ① Y. Sekine, C. Yamamoto, T. Matsuda. STAP-2 modulates activation-induced cell death by influencing caspase-8 activation. Cell death pathways: Apoptosis, Autophagy and Necrosis, Keystone

Symposia, March, 15, 2010, Vancouver, British Columbia, Canada

- ② C. Yamamoto, Y. Sekine, O. Ikeda, A. Yoshiura, T. Matsuda

STAP-2 modulates activation-induced cell death by influencing caspase-8 activation
第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会
2009 年 12 月 4 日 大阪

- ③ Y. Miyasaka, O. Ikeda, Y. Sekine, A. Mizushima, A. Yoshimura, T. Matsuda

Physical and functional interactions among STAT3, STAP-2 and Brk
第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会
2009 年 12 月 3 日 大阪

- ④ A. Mizushima, O. Ikeda, Y. Miyasaka, Y. Sekine, A. Yoshimura, T. Matsuda.

STAP-2 regulates the Brk-mediated STAT5 activation
第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会
2009 年 12 月 3 日 大阪

- ⑤ 上野祐輔、山本千香子、関根勇一、松田正

T 細胞抗原受容体(TCR)シグナルにおけるアダプター分子 STAP-2 の機能解析
第 133 回 日本薬学会北海道支部例会
2009 年 11 月 28 日 札幌

- ⑥ 山本千香子、関根勇一、松田正

STAP-2 による AICD(activation induced cell death)制御機構の解析
第 133 回 日本薬学会北海道支部例会
2009 年 11 月 28 日 札幌

- ⑦ 宮坂優人、池田 収、水嶋明宏、関根勇一、室本竜太、南保明日香、松田正

乳癌特異的チロシンキナーゼ Brk とアダプター分子 STAP-2 の機能的相互作用の解析
第 56 回 北海道薬学大会 2009 年 5 月 30 日 札幌

- ⑧ O. Ikeda, Y. Sekine, M. Kakisaka, T. Yasui, A. Yoshimura, T. Matsuda

STAP-2 negatively regulates both canonical and noncanonical NF- κ B activation induced by Epstein-Barr virus-derived latent membrane protein 1
第 38 回 日本免疫学会総会・学術集会
2008 年 12 月 3 日 京都

- ⑨ M. Kakisaka, Y. Sekine, O. Ikeda, A.

Yoshimura, T. Matsuda

STAP-2 is involved in activated-induced cell death in Jurkat T cell

第 38 回 日本免疫学会総会・学術集会
2008 年 12 月 3 日 京都

⑩ 柿坂道範、関根勇一、池田 収、松田 正
STAP-2 による AICD(activation induced cell death)制御機構の解析

日本生化学会北海道支部第 45 回例会 2008
年 8 月 8 日 札幌

⑪ 池田 収、関根勇一、柿坂道範、松田 正
アダプター分子 STAP-2 による EB ウイルス
遺伝子産物 LMP1 の活性制御機構の解析

日本生化学会北海道支部第 45 回例会 2008
年 8 月 8 日 札幌

⑫ T. Matsuda, O. Ikeda, Y. Sekine.

STAP-2 regulates integrin-mediated T-cell
adhesion through protein degradation of
FAK

Experimental Biology 2008(April 5-9) San
Diego, California, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 勇一 (SEKINE YUICHI)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：20396295

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし