

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：31603  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21590527  
 研究課題名（和文）  
 STAM/HrsによるTLRシグナル伝達制御  
 研究課題名（英文）  
 Signal transduction of TLR by STAM/Hrs  
 研究代表者  
 村田 和子（MURATA KAZUKO）  
 いわき明星大学・薬学部・教授  
 研究者番号：20137631

研究成果の概要（和文）：リソソームへの輸送ならびに分解に関与する分子であるSTAM1/2のTLR分解における役割について、STAM1/2コンディショナル遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。その結果、STAM1/2はTLR4のリソソームへの輸送ならびに分解に関与して、TLR4を介する自然免疫を負に制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of STAM1/2 on innate immunity, in particular, on the degradation of Toll-like receptor (TLR) family members TLR4. STAMs may play an important role in the lysosomal degradation and translocation of TLR4 upon stimulation with LPS. These observations suggest that STAMs function as negative regulators of innate immunity mediated by TLR4.

## 交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らが、サイトカインシグナル伝達機構を解析する過程で単離同定したSTAM1、STAM2、Hrsは、酵母で同定されていた小胞輸送関連蛋白複合体「ESCRT0」に相当することが明らかとなった。この酵母での知見を足がかりに、申請者らは、STAMs/Hrs複合体がユビキチン化されたEGF受容体、TGFβRII、E-カドヘリン、IL-6受容体gp130等の膜タンパク質を認識して、容体のリソソームへの輸送と分解に必須に関わることを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

Toll-like receptors (TLRs)はマクロファージや樹状細胞などの免疫細胞に発現し、細菌やウイルスなどの病原体を感知して炎症反応を惹起するとともに、その抗原提示機能を介して獲得免疫の活性化に関与する。申請者は自然免疫系でのSTAMs/Hrsの機能を解明する目的で、マクロファージ特異的にSTAM1/2を欠損させたLysM-Cre / STAM1<sup>fllox/fllox</sup> / STAM2<sup>-/-</sup> (LysM-Cre / STAMs-cDKO)マウスを樹立し、STAMs/Hrs依存的

タンパク質分解のTLRsシグナル制御における役割を明らかにし、その免疫シグナル制御の意義を確立する。

### 3. 研究の方法

野生型マウスならびにマクロファージ特異的にSTAM1/2を欠損させたLysM-Cre/STAMs-cDKOマウス、および各マウスのマクロファージ（チオグリコレート誘導マクロファージ）を用いてTLRsシグナル制御におけるSTAM1/2依存的タンパク質分解ならびに免疫機能を調べる。

(1) LysM-Cre/STAMs-cDKOマウスの樹立  
*stam2*遺伝子のexon3をloxp siteを付けたneo cassetteで置き換えることによりSTAM2欠損マウスを作成する。そして、以前に樹立しているSTAM1<sup>flox/flox</sup>マウスと交配することにより、STAM1<sup>flox/flox</sup>/STAM2<sup>-/-</sup>マウスを作成し、その後、さらにLysM-Creマウスと交配して、LysM-Cre / flox/flox /STAM2<sup>-/-</sup>マウスを樹立する。マウスの尾または耳組織を用いて、PCR法にてgenomic DNAを調べることによりマウスの確認を行う。

(2) TLRシグナル制御の解析 (in vitro)

#### ① サイトカイン産生

野生型マウスならびにLysM-Cre/STAMs-cDKOマウスの腹腔マクロファージをLPSで刺激し、培養上清中のサイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6)をELISA法にて測定する。

#### ② TLR4の分解

マウス由来腹腔マクロファージの膜表面分子をビオチンで標識した後、LPSで刺激し、ビオチン化されたTLR4の量を測定することにより、リガンド依存的なTLR4の分解を調べる。細胞を回収・溶解した後、ウェスタンブロット法にてTLR4のタンパク量を測定し、分解の程度を調べる。

#### ③ TLR4の細胞内局在

MEF細胞にGFP-fused TLR4を導入したMEF-GFP-TLR4クローンを樹立し、LPS刺激後のTLR4の細胞内移動ならびに局在を共焦点顕微鏡を用いて調べる。

#### ④ シグナル伝達分子の解析

マウス由来腹腔マクロファージをLPSで刺激し、TLR4のシグナル伝達分子であるERK、p38のリン酸化ならびにタンパク量の変化についてウェスタンブロット法にて解析を行う。

(3) in vivoにおける免疫制御

#### ① サイトカイン産生

マウスにLPSを腹腔内投与して、0、3、6時間後に血液を採取し、血清中のサイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6) 量をELISA法にて測定する。

#### ② エンドトキシンショック

マウスにLPSを腹腔内投与して、投与後のマウスの生存率を求める。

### 4. 研究成果

(1) LysM-Cre/STAMs-cDKOマウスの樹立。

*stam2*遺伝子のexon3をloxp siteを付けたneo cassetteで置き換えることによりSTAM2欠損マウスを樹立し、PCRで確認を行った。

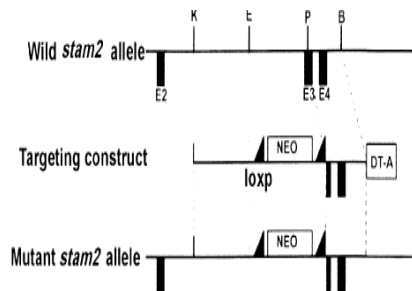


図1 STAM2遺伝子欠損マウスの作成

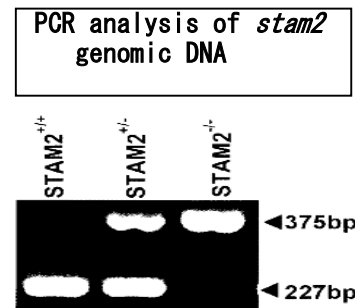


図2 STAM2遺伝子欠損マウスの確認

(2) サイトカイン産生はSTAMs-cDKOマウスで増加する。  
野生型マウスならびにSTAM1-cDKOマウス、STAM2-KOマウス、STAMs-cDKOマウス由来腹腔マクロファージをLPSで刺激し、培養上清中のサイトカインを測定した結果、TNF- $\alpha$ ならびにIL-6は野生型マウスに比べて、STAMs-cDKOマウスにおいて増加していた。

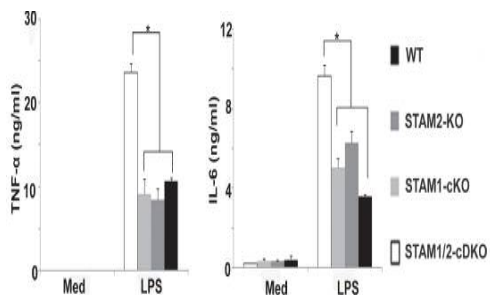


図3 LPS刺激によるサイトカイン産生

(3) TLR4の下流シグナル伝達分子はSTAMs-cDKOで増強する。  
野生型マウスならびにSTAMs-cDKOマウス由来腹腔マクロファージにLPSを添加・培養後、細胞を回収して、ERKとp38のリン酸化、ならびにタンパク量を測定したところ、野生型に比べ、STAMs-cDKOにおいて、ERKとp38のリン酸化の遅延化が認められた。

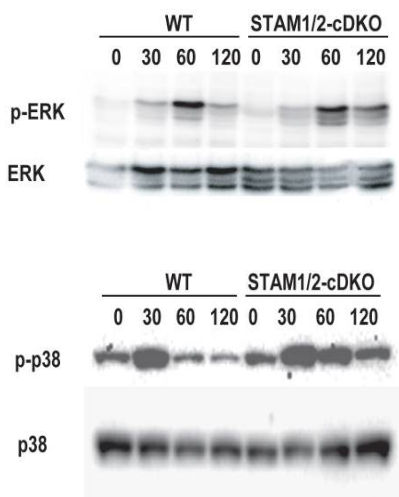


図4 LPS刺激によるERKとp38のリン酸化

(4) TLR4の分解はSTAMs-cDKOマウスで遅延していた。  
マウス由来腹腔マクロファージをLPSで刺激し、リガンド依存的なTLR4分解を誘導したところ、野生型マウスに比べSTAMs-cKOマウスではTLR4の分解が遅延していた。また、TLR4は野生型ではリソソームに局在していたが、STAMs-cKOではリソソームの周辺に局在していた。

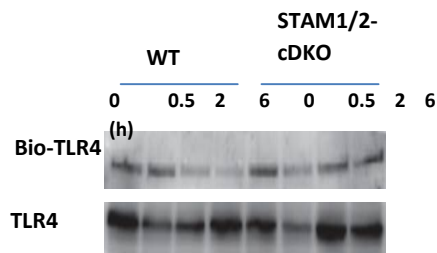


図5 TLR4の分解

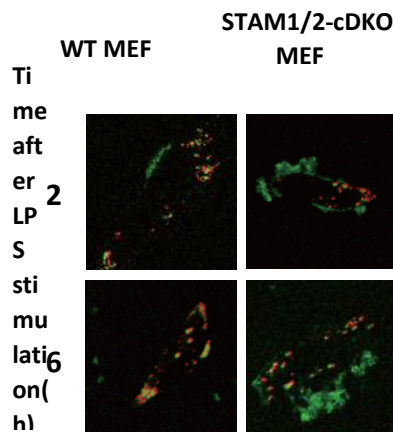


図6 TLR4の細胞内局在

(5) 血清中のサイトカインはSTAMs-cDKOマウスで増加する。  
野生型マウスならびにSTAMs-cDKOマウスにLPSを腹腔内投与後、血清を採取し、血清中のTNF- $\alpha$ ならびにIL-6を測定したところ、野生型マウスに比べてSTAMs-cDKOマウスのTNF- $\alpha$ とIL-6は共に増加していた。

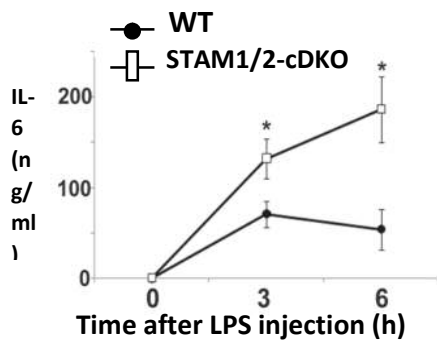


図7 in vivoにおけるIL-6産生

(6) STAMs-cDKOマウスではエンドトキシンショックが増悪する。

野生型マウスならびにSTAMs-cDKOマウスにLPSを投与し、7日目までの生存率を調べたところ、STAMs-cDKOマウスは野生型に比べ、エンドトキシンショックによる死亡率の増加が認められた。

以上の結果から、STAM1ならびにSTAM2はTLR4のリソソーム輸送、分解を抑制することにより、自然免疫系のシグナル抑制機構として働いていることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

【学会発表】 (計2件)

1. 井草龍太郎、STAM1/2ノックアウトマウスは免疫反応を増強する、第37回日本免疫学会、平成19年11月21日、東京
2. IGUSA Ryouitaro, STAM1/2 regulate the innate immunity through TLR4 and TLR9 signaling. 第38回日本免疫学会、平成21年12月2日、京都

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 和子 (MURATA KAZUKO)  
いわき明星大学・薬学部・教授  
研究者番号：20137631

(2) 研究分担者

菅村 和夫 (SUGAMURA KAZUO)  
宮城県立がんセンター研究所・特任部長  
研究者番号：20117360

永田 隆之 (NAGATA TAKAYUKI)  
いわき明星大学・薬学部・助手  
研究者番号：50553202