

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570173

研究課題名(和文)チロシンホスファターゼによる新しい細胞死の制御機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of novel cell death regulated by protein tyrosine phosphatase

研究代表者

有村 裕 (ARIMURA, Yutaka)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：10281677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、チロシン脱リン酸化酵素PTP-PESTを免疫系T細胞に遺伝子導入した際に新しいタイプの細胞死が誘導されているのではないかと観察から、その分子機序を明らかにするために研究を開始した。細胞死、細胞分裂、細胞数の測定、導入遺伝子の部分的欠失および責任部位の探索、結合分子の共発現などの様々な解析を行った。結果的にPTP-PESTは細胞死を誘導しているというよりもベクターのLTRに向かうシグナル伝達のうちの何処かを抑制することでベクターマーカーの発現を抑え、見かけ上細胞が減少していると解釈される結果を得た。従って過去の論文でも細胞死を誤解している可能性を検証する必要が生じた。

研究成果の概要(英文)：In the beginning, we obtained a result suggesting that protein tyrosine phosphatase named PTP-PEST induced a novel type of cell death upon its gene transduction into immune T cells, in this study. To clarify the underlying molecular mechanisms, we started exploration, and conducted various experiments such as cell death, cell division, cell number counting, gene introduction of partially deleted gene to define the responsive position within the gene, co-transfection of associating molecules. As the results, our initial observation was interpreted as follows: PTP-PEST does not seem to induce cell death, but suppress expression of internal vector markers by inhibiting one of possible pathways of signal transduction to LTR promoter of retrovirus vector used here, and thus the gene-introduced cells appear to decrease in number superficially. Accordingly, possibility that some past reports have also misunderstood cell death was raised.

研究分野：機能生物化学

科研費の分科・細目：免疫生化学

キーワード：チロシンホスファターゼ 免疫シグナル 細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の生と死が適切に行われることは、生体の恒常性にとって極めて重要であり、その制御異常は、さまざまな病態を引き起こす。細胞死の研究では、Fas/TNF から Caspase の活性化に至るアポトーシスについては、だいぶ前に大方のことが明らかになったと思われていた。ところが最近、ネクロトーシス Necroptosis という炎症反応に直結する新しいタイプの細胞死が、Toll 様レセプター等の自然免疫システムの研究の発展と重なって、にわかに注目を集めるようになった。一方、タンパク分子の可逆的リン酸化反応は翻訳後修飾の中で今なお最も重要な位置を占めている。我々は最近、脱リン酸化を担うチロシン脱リン酸化酵素(チロシンホスファターゼ、PTP)の1つである PTP-PEST が上述のネクロトーシスを制御しているらしいことを見出したので、この現象を検証することにした。

## 2. 研究の目的

本研究は、新しいタイプの細胞死の分野に、別の主要なシグナル分子であるチロシンホスファターゼがクロストークしている可能性を探る研究である。上記のように PTP-PEST によって誘導される現象を丁寧に確かめながら、その分子機序の詳細と生理学的意義とを明らかにすることで、細胞死の理解、恒常性の維持に新たな視点を付け加えることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) PTP-PEST によって誘導される細胞死の分類。

細胞死の判定のための一般的な方法を用いることによって PTP-PEST によって誘導される現象が、どの細胞死に分類されるか解析した。例えば、フローサイトメトリーの FS/SS のゲート、7-AAD、Annexin V、Propidium Iodide (PI) で染色して細胞死を判定した。

(2) サイトカイン、FCS の影響

培地中のサイトカインや FCS からの生存シグナルを PTP-PEST が抑制している可能性について解析した。サイトカイン IL-2 の存在下、非存在下、FCS の存在下、非存在下で上記の現象が変化するか、その影響を調べた。

(3) 細胞増殖・細胞分裂のモニタリング

PTP-PEST を発現させた細胞では細胞増殖または分裂は正常に行われるかについて [3H]チミジン取込み、または CFSE 試薬による染色によって細胞分裂をモニターした。

(4) 細胞数の測定

PTP-PEST 遺伝子導入細胞は見かけ上減

少するが、細胞の絶対数自体も果たして減少しているかを確認するために、フローサイトメトリーとビーズを組合せて厳密に細胞数を測定した。

(5) PTP-PEST の点変異、欠失変異による責任ドメイン/領域の決定

PTP-PEST は N 末側の触媒ドメインと C 末側のタンパク相互作用領域に分けられる。タンパク相互作用領域には、P1~P4 というプロリンに富んだモチーフ、NPLH 配列、CTH モチーフがあり、さまざまな分子と特異的に結合することが分かっている。PTP-PEST の発現コンストラクトを細分化して、それぞれの領域の役割を推測した。

(6) 結合分子のうち、どれが細胞死を担うか、共発現によるレスキュー解析

上の(5)の裏返しの実験を行う。即ち、既に報告されている PTP-PEST 結合分子を共発現させて、PTP-PEST による細胞死が阻止できるものがあるか見る。Csk、p52Shc、p46Shc、Grb2、PSTPIP1 などのコンストラクトを作成し導入して現象がキャンセルされるかどうか検証した。

(7) 細胞の生死を制御する分子の発現調節による効果の検証

よく知られた一般的な細胞生存に関連する分子 Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1、Akt などのコンストラクトを作成し、細胞に導入する。予備実験では、Akt によって、PTP-PEST による細胞死が阻止される傾向が見られていた。

## 4. 研究成果

(1) PTP-PEST によって誘導される細胞死の分類。

この研究では、チロシンホスファターゼ PTP-PEST を T 細胞に遺伝子導入した際に新しいタイプの細胞死が誘導されているのではないかという観察から、その分子機序を明らかにするために研究を開始した。すなわち、遺伝子導入 2 日後にベクターの内因性マーカーである GFP や Thy1.1 を検出することが出来るが、T 細胞の刺激を止めて IL-2 を含む培地で 2 日間休ませると、マーカー陽性細胞が大幅に減少するという結果を得て、PTP-PEST の過剰発現により細胞死が誘導されていることが示唆された。

そこで死細胞を染め分ける Annexin V や 7-AAD で染色したが、今のところ PTP-PEST 導入細胞で死細胞の増加は見られなかった。さらに Propidium Iodide (PI) による染色も行ったが、細胞周期の遅延も死細胞の増加も見られなかった。これらの結果を合わせると、期待に反して、細胞死を積極的に示す傍証は得られなかった。

(2) サイトカイン、FCS の影響

上記の結果を踏まえた仮説としては、細胞培養中に恒常的に入る刺激によってベクターマーカーの発現が維持されていて、それを

PTP-PEST が抑制することで、見かけ上細胞が減少するかも知れないという可能性が考えられた。PTP-PEST の導入によって影響を受けている、または抑制されている細胞内シグナル経路としては、細胞培養系に添加されている IL-2 や FCS によって恒常的に入るシグナル経路が筆頭候補として挙げられる。FCS や IL-2 の存在下と、非存在下でその影響を比較した。死細胞をフローサイトメトリーの FS/SS を用いて追跡したところ、PTP-PEST 導入細胞 (GFP+) では生細胞のゲートを外れる (死細胞と思われる) 細胞の割合が、空ベクターに比べて多い傾向が見られた。くわえて細胞生存を促進すると言われているセリン・スレオニンキナーゼ Akt では死細胞の割合が明らかに少なく、この手法の信頼性を裏付けるように見えた。少なくとも FS/SS の結果は PTP-PEST による細胞死を支持するものであり、(1)の結果とは一致しない結果であった。

### (3) 細胞増殖・細胞分裂のモニタリング

細胞が死滅ないし消失する過程をより慎重に調べる目的で、細胞分裂をモニターするための CFSE 試薬により細胞を蛍光染色しその動態を追跡した。即ち、CFSE で染色した T 細胞に刺激を開始して1日目または1日目+2日目に PTP-PEST 発現レトロウイルスに感染させて追跡した。PTP-PEST 導入細胞はそのベクターのマーカである Thy1.1 を見る限り、分裂が遅れる様子は見られず、1日目および1日目+2日目の両方の感染細胞においていずれも刺激を止めると Thy1.1 はやがて消失して見かけ上 PTP-PEST 導入細胞が減少する様子が追試できた。その一方で、フローサイトメーター上での CFSE と Thy1.1<sup>PE</sup> の蛍光補正が、Thy1.1 の発現が少し下がってからは充分できなくて後半は正確に追跡できたとは言えなかった。この問題を何とか上手く補正する必要がある。

### (4) 細胞数の測定

上記のようにいくつかの細胞死の検出方法において一致しない結果が得られたので、さらに別の手法で細胞死を確認する必要性が生じた。即ち、24well プレートで PTP-PEST を導入した well と、対照 well とで正確に細胞の絶対数を比較することにした。上の実験と同様に、細胞数についても刺激後1日目および1日目+2日目に感染させたものに対して慎重にリポートしながら検討した。その結果、PTP-PEST 感染細胞の絶対数の変化は、コントロールに比較して有意差は見られなかった。何度かこの実験を繰り返したが、ここでも予想に反して両者に差は見られなかった。この結果から細胞死が実は誘導されていない可能性が強まってきた。もしかすると

PTP-PEST は、サイトカインや成長因子を受け取って生じるシグナルのうち、ベクター上の LTR プロモーターに至るシグナル経路か、またはその後の翻訳のいずれかの段階を抑制しているのではないかという可能性について生じた。

さらに、細胞周期の障害分子である Kip1 を導入して同じ実験を試みた。Kip1 導入細胞では、細胞数の明らかな減少が観察されて、これに対し、PTP-PEST 導入細胞では減少しなかった。この結果より PTP-PEST は細胞死を誘導しないという観察を補強する結果になった。

### (5) PTP-PEST の点変異、欠失変異による責任ドメイン・領域の決定

つぎに、ここで見られている現象における PTP-PEST の責任部位を探ることにした。作成したコンストラクトは、まず全長を N 末側の触媒ドメインと C 末側のタンパク相互作用領域の2つに分けて、C 末側をさらに特定のモチーフ配列ごとに削って行った。即ち、長いものから順に CTH 領域、P4、NPLH 配列、P3、P2 まで削ったものをそれぞれ用意して全てのコンストラクトの影響を比較した。その結果、PTP-PEST 導入で見られる現象は、全長のもので最も顕著な効果を示し、短くなるに連れてその効果を失うという傾向を確かめることが出来た。この結果は、この現象を担う責任分子はモチーフの1ヶ所のみで結合するというよりも複数ヶ所で相互作用している可能性を示唆していた。

### (6) 結合分子のうち、どれが細胞死を担うか 共発現によるレスキュー解析

さらに既知の PTP-PEST 結合分子を共発現させて、PTP-PEST による影響を阻止できるものがあるか検討を試みた。上記のように PTP-PEST の C 末側領域には特徴的な配列 P1~P4、NPLH、CTH が存在する。そこで、CTH に結合する PSTPIP1、P4 に結合する Csk、NPLH 配列に結合する p52Shc、p46Shc、主として P3 に結合する Grb2、さらに Lck のコンストラクトを作成して導入した。しかしながら、予想に反して顕著なレスキュー効果を示す分子はなかった。現在のところ、効果を見るには発現させるタイミングをずらす必要があるかも知れないと考えている。その一方で、P1 や P2 に結合する Cas、Paxillin、Pyk2 のコンストラクトは用意できなかったため、今後作成して本実験を試みたい。

### (7) 細胞の生死を制御する分子の共発現による効果の検証

つぎに PTP-PEST の結合分子ではなく、よく知られたアポトーシス関連分子を導入して、これまで観察している現象を解除できるか検討した。抗アポトーシス分子の Bcl-2、Bcl-XL、Akt (E40K 活性化型) を PTP-PEST と同時にそれぞれ導入した細胞で、陽性細胞の

割合の推移、ベクターマーカーの GFP または Thy1.1 の発現レベルの変化を追った。その結果、Bcl-2, Bcl-XL では特に効果が見られなかったが、Akt の場合のみ PTP-PEST の効果を打ち消す様子が観察された。Bcl-2 や Bcl-XL は新規の細胞死であるネクロプトーシスにおいても抑制効果を示すことが報告されているので、これらの結果を合わせると、PTP-PEST が細胞死を誘導している可能性はさらに低くなった。恐らく、恒常的な細胞生存シグナルのうちの何処かを抑制することでベクターマーカーの発現を抑え、見かけ上、細胞が減少しているのではないかと解釈された。

#### (8) 今後の研究方針

上記したように PTP-PEST の遺伝子導入によって T 細胞で起きる現象は、細胞内のいずれかのシグナル経路が抑制されていることによってもたらされていると推測された。現在のところ、その作用点として細胞培養系に添加されている IL-2 や FCS から恒常的に入るシグナル経路が有力な候補と考えている。つまり恒常的に入る刺激によってベクターマーカーの発現が維持されていて、これを PTP-PEST が抑制すると、見かけ上細胞が減少するように見えると考えられるからである。今後、IL-2 や FCS の下流に位置する正のシグナル因子である Pyk2 や STAT5 などに対する影響を細胞内染色や抗リン酸化抗体によるウエスタンブロットで解析すべきであると考えている。

また PTP-PEST による影響を解除する Akt の経路の解析も行いたい。Akt の上下のシグナルのうち、どの経路またはどの分子を伝わっているのかを、PI3K、Akt、mTOR、Gsk-3b、NF-kB などに対する阻害剤を用いて調べたい。

現在、本研究に関する論文は、途中までのデータをもとに既に投稿作業に入っており、さらに残りの実験結果を得て続報も出したいと考えている。

#### 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 1 件)

(1) Ando K, Kato H, Kotani T, Ozaki M, Arimura Y, Yagi J. Plasma leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is associated with the severity of systemic inflammation in patients with sepsis. *Microbiology and Immunology* (2012) 56, 708-718. 査読有 (doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00488.x.)

##### [学会発表](計 3 件)

(1) 有村裕、八木淳二: "T 細胞におけるチロシンホスファターゼ PTP-PEST の役割" 日本免疫学会総会・学術集会. (2011 年 11 月 29 日). 千葉

(2) 有村裕、八木淳二: "T 細胞における PTP-PEST の役割の研究" 日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会. (2012 年 1 月 20 日). 大阪

(3) 有村裕、八木淳二: "Analysis of a role of key molecules expressed in follicular helper T cells." 日本免疫学会総会・学術集会. (2012 年 12 月 5 日). 神戸

##### [図書](計 0 件)

##### [産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

##### 取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

##### [その他]

ホームページ等

<http://www.nvlu.ac.jp/animal/members/012.html/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

有村裕 (ARIMURA Yutaka)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・動物科学科・動物生体防御学教室・准教授  
研究者番号: 10281677

##### (2) 研究分担者

八木淳二 (YAGI Junji)

東京女子医科大学・医学部・微生物学免疫学教室・教授  
研究者番号: 70182300

##### (3) 連携研究者 なし

研究者番号: