

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 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：14101
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23800031
 研究課題名（和文）STAP2 のメモリー CD8 陽性 T 細胞における機能解析と癌免疫療法への応用
 研究課題名（英文）Functional analysis of STAP2 in the CD8 positive T cells, and application to cancer immunotherapy
 研究代表者
 村岡 大輔（MURAOKA DAISUKE）
 三重大学・大学院医学系研究科・リサーチアソシエイト
 研究者番号：20608955

研究成果の概要（和文）：

STAP2 は、様々な免疫系細胞において細胞内シグナルを正および負に制御するアダプター分子である。本研究では、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞（CTL）における STAP2 の機能に焦点を当て、メモリー CTL 誘導における STAP2 の機能的役割の解明を行った。その結果、STAP2 は抗原特異的メモリー CTL に高発現し、メモリーフェノタイプへの分化を制御する事を明らかにした。つまり、STAP2 はメモリー CTL の分化誘導を制御する重要な分子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

STAP2 is an adapter molecule which controls an intracellular signal positively or negatively in various immunological cells. In this study, I investigated the functional mechanism of STAP2 in the differentiation phase of memory CTL. As a result, we revealed that an expression of STAP2 was highly related to the memory phenotype of CTL and STAP2 control the differentiation of memory CTLs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 24 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：医歯薬学・腫瘍免疫学

キーワード：(1) 腫瘍免疫 (2) T 細胞 (3) メモリー細胞

1. 研究開始当初の背景

がん細胞を破壊する CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞（CTL）が認識する癌抗原ペプチドの発見以来、これらの抗原を用いて CTL を活性化す

ることで、癌を駆逐しようとする種々の試みがなされてきたが、満足のいく効果が得られた試験は限られている。その原因の一つとしてワクチンなどで誘導される抗原特異的 CTL は、適切なフェノタイプを獲得できていない

という事が挙げられる。近年、腫瘍縮小効果と関連した CTL フェノタイプとして、メモリー CTL に多くの関心が寄せられている。しかし、これらの分化機構については未だ不明な点が多く明らかになっていない。

2. 研究の目的

我々は、メモリー CTL に高発現する遺伝子の一つとして STAP2 を見出した。本申請研究では当分子に注目し、メモリーフェノタイプの獲得、及び抗腫瘍免疫応答における STAP2 の働きを明らかにし、CD8 陽性 T 細胞を中心とした癌免疫治療の更なる発展に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

メモリー CTL 誘導時の STAP2 の機能解析を下記に示す様に行った。

平成 23 年度

(1) In vitro 系を用いた、メモリー CTL における STAP2 の発現解析

In vitro 細胞培養系において、培養液中の IL-2 濃度に依存してメモリー CTL への分化が制御可能なことは知られている。また、メモリー CTL の分化が、AKT シグナルにより制御されていることも報告されている。そこで、これらの系を利用し、メモリー CTL への分化と STAP2 発現の相関について解析した。

(2) In vivo 系を用いた、メモリー CTL における STAP2 の発現解析

生体内にて CTL がメモリーへと分化する際の STAP2 の発現を検討した。具体的には 9m (mERK2 における H2-K^d 拘束性 CTL エピトープ) 特異的 TCR を発現させた遺伝子操作マウス DUC18 マウスより CD8 陽性 T 細胞を分離し、同系の BALB/c マウスへと移入を行った。移入 2 時間後に mERK2 プラスミドを用いて免疫を行い、メモリー CTL 分化に伴う STAP2 の発現を解析した。

平成 24 年度

(3) STAP2 発現減少による抗腫瘍免疫応答への影響の検討

9m 抗原特異的 TCR 遺伝子導入マウス DUC18 マウスより CD8 陽性 T 細胞を分離し、In vitro にて抗原刺激を与えた後、STAP2 siRNA もしくは陰性対照 siRNA (スクランブル siRNA) を電気穿孔法にて導入し、マウスへと移入した。移入 50 日後、BALB/c マウス由来のメチルコラントレン誘発肉腫である CMS5a を皮下移植し腫瘍系を計測、CTL による腫瘍拒絶反応に

おける STAP2 の機能を検討した。

(4) STAP2 ノックアウト (KO マウス) におけるメモリー CTL 分化誘導の解析

野生型マウスおよび STAP2 KO マウスに β ガラクトシダーゼ (β gal) - アデノウイルスにてワクチンを施し β gal 特異的メモリー CTL 誘導を比較した。抗原特異的メモリー CTL の指標としては、ワクチン抗原特異的エピトープ刺激時の IFN- γ 産生細胞の割合を用いた。

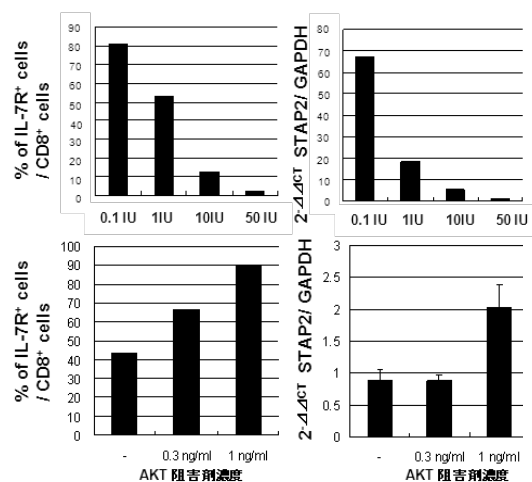
(5) STAP2 ノックアウト (KO マウス) におけるメモリー CTL 分化誘導の解析

野生型マウスおよび STAP2 KO マウスに β ガラクトシダーゼ (β gal) - アデノウイルスにてワクチンを施し β gal 特異的メモリー CTL 誘導を比較した。抗原特異的メモリー CTL の指標としては、ワクチン抗原特異的エピトープ刺激時の IFN- γ 産生細胞の割合を用いた。

4. 研究成果

(1) In vitro 系において、STAP2 の発現はメモリー CTL 分化誘導に伴い上昇する

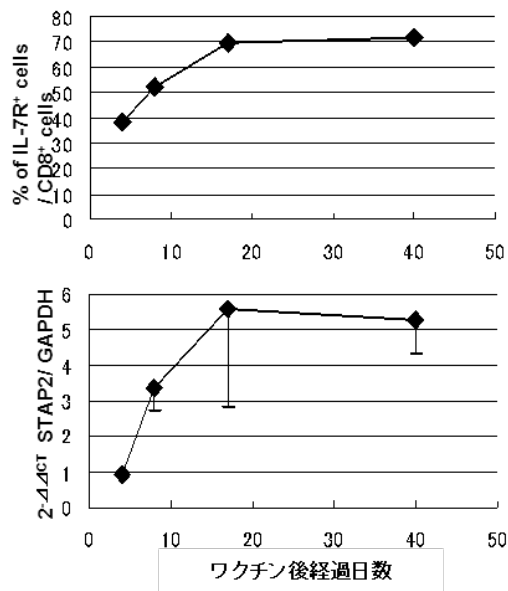
In vitro 細胞培養系で、IL-2 濃度の制御および AKT シグナルの阻害にてメモリー CTL が誘導できた。メモリー CTL の指標としては、細胞表面上の IL-7R の発現を用いた。各培養細胞を回収し STAP2 の発現を解析した結果、メモリー CTL への分化に伴って STAP2 の発現が上昇することが明らかになった。



(2) マウス生体内において、メモリー CTL 分化誘導に伴って STAP2 の発現は上昇する

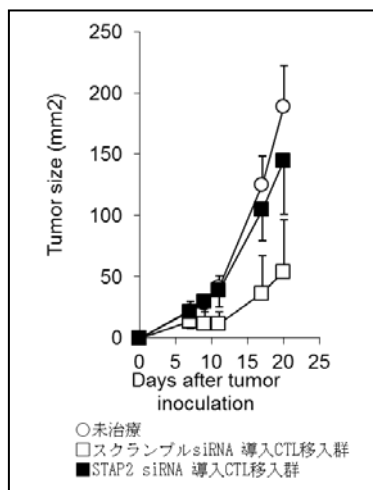
DNA ワクチンにより誘導されるメモリー CTL の分化に伴い STAP2 の発現が上昇することを確認した。CTL 上の IL-7R の発現をメモリー CTL の指標として、ワクチン抗原刺激後のメモリー CTL への分化誘導を観察した。そ

の結果、抗原刺激後4日、7日、18日、40日と時間経過に伴いメモリーCTLへの分化が進むことが確認された。さらに、各タイムポイントの抗原特異的CTLを回収してSTAP2の発現を解析した。その結果、抗原特異的CTLのメモリー分化に伴って、STAP2の発現が上昇することが明らかになった。



(3) CTLにおけるSTAP2の発現減少は腫瘍拒絶効果の著しい減弱を導く

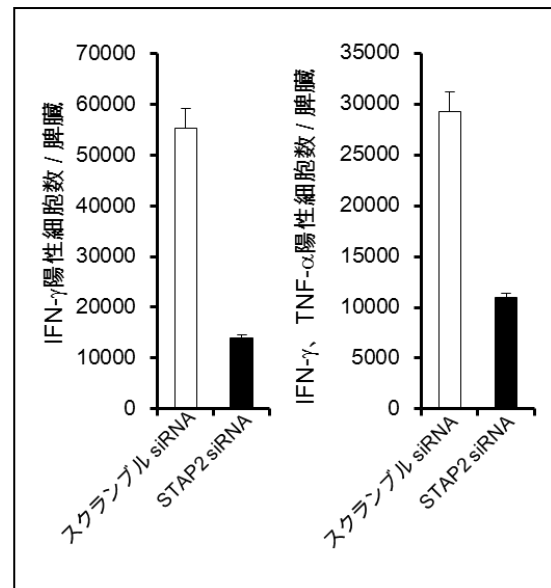
CTL機能におけるSTAP2の働きを解析する為、細胞移入系による腫瘍拒絶効果を検討した。この時STAP2 siRNAを用いてSTAP2の発現を減少させた。その結果、CTLにおけるSTAP2が減少することで、皮下移植腫瘍に対する腫瘍拒絶能力が消失するのを明らかにした。



(4) CTLにおけるSTAP2の発現減少はCTL機能の著しい減弱を導く

CTL機能におけるSTAP2の働きを解析する為、細胞移入系によるIFN- γ およびTNF- α の産生能を検討した。(3)と同様にSTAP2の発現

はSTAP2 siRNAを用いて減少させた。その結果、CTLにおけるSTAP2が減少することで、2次応答能が減少することを明らかにした。



以上の研究成果より、STAP2はCTLのメモリーフェノタイプへの分化を制御していることが明らかになった。つまり、STAP2が免疫記憶において重要な役割を果たしている可能性が示唆され、本研究成果を基盤として研究を進展させることで、免疫記憶の成立機構、特にメモリーCTLの分化誘導機構の全容が明らかになることが期待される。メモリーCTLの分化機構の解明は、がん免疫療法のみならず多くのワクチンおよび細胞移入療法などに応用が可能であり、幅広い免疫療法の開発にも大きく貢献することが期待される。現在我々も、STAP2の発現制御を基盤としてがんワクチン及びその他がん免疫療法の治療効果の改善を試みており、更なる発展を期待している。

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2件、全て査読あり)

① Muraoka D, Nishikawa H, Noguchi T, Wang L, Harada N, Sato E, Luescher I, Nakayama E, Kato T, Shiku H. Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8⁺ T cells. *Vaccine*. 31(17):2110-8. 2013

② Muraoka D, Kato T, Wang L, Maeda Y, Noguchi T, Harada N, Takeda K, Yagita H, Guillaume P, Luescher I, Old LJ, Shiku H, Nishikawa H. Peptide vaccine induces enhanced tumor growth associated with apoptosis induction in CD8⁺ T cells. *J Immunol*. 185(6):3768-76. 2010

[学会発表] (計3件)

① Daisuke Muraoka, Naozumi Harada, Tae Hayashi, Shin-ichi Sawada, Kazunari Akiyoshi, Hiroshi Shiku. Control of in vivo spatiotemporal dynamics of antigen and adjuvant by a delivery system CHP nanogel markedly improves the immunogenicity and antitumor efficacy of long peptide cancer vaccine, An AACR Special Conference on TUMOR IMMUNOLOGY, December 2-5, 2012, InterContinental Miami Miami Florida.

② 村岡 大輔、原田 直純、林 妙、吉見 公志、澤田 晋一、秋吉 一成、珠玖 洋
ワクチン抗原の CHP ナノゲル複合体化によるリンパ節輸送の促進と抗腫瘍免疫応答の改善
第16回日本がん免疫学会総会
2012年7月26日 北海道

③ Daisuke Muraoka, Naozumi Harada, Kazunari Akiyoshi, Hiroshi Shiku. Antigen delivery system CHP nanogel improves the effect of adjuvants on long peptide cancer vaccines
第70回日本癌学会学術総会
2011年10月3日 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村岡 大輔 (MURAOKA DASUKE)
三重大学・大学院医学系研究科・リサーチ
アソシエイト
研究者番号：20608955