

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461444

研究課題名(和文) リンパ造血器疾患の病態形成におけるシグナル調節分子STAP-2の関与

研究課題名(英文) The role of STAP-2 in hematological diseases

研究代表者

前田 哲生 (MAEDA, Tetsuo)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00403064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：STAP蛋白はEpstein-Barr(EB)ウイルスのLatent membrane protein 1、Bcr-Abl融合蛋白と結合することを以前報告した。本研究において、造血幹細胞移植後にEpstein-Barr(EB)ウイルス再活性化により惹起されるリンパ増殖性腫瘍(EBウイルス関連びまん性大細胞型B細胞リンパ腫；EBV-DLBCL)の生検検体「慢性骨髄性白血病マウスモデル」を用いてSTAP蛋白の作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Previously, we have reported that Signal transducing adaptor protein (STAP) binds latent membrane protein-1 in Epstein-Barr virus (EBV), and Bcr-Abl fusion protein, which causes chronic myeloid leukemia (CML). In this study we studied the role of STAP family in various hematological diseases. We found that STAP-1 is down-regulated in EBV-induced post transplantation lymphoproliferative disorder compared with EBV-negative de novo DLBCL. Regarding the effect on CML, STAP-1 deficiency improved the survival of CML model mouse. Further study would clarify the precise molecular mechanisms.

研究分野：血液内科

キーワード：STAP蛋白 アダプター蛋白

1. 研究開始当初の背景

Signal transducing adaptor protein (STAP)ファミリーは、リン脂質結合モチーフである Pleckstrin homology (PH)ドメイン、リン酸化チロシンとの親和性が知られる Src homology (SH)2 ドメインに類似した構造を有するアダプター蛋白である。ファミリーとして、STAP-1、STAP-2 が含まれる。STAP-2 は、その C 末側に STAT との結合部位と考えられている YXXQ モチーフを有し、様々な受容体の細胞膜内側でシグナルを制御して免疫応答、すなわち、リンパ球、マクロファージの炎症部位への遊走・浸潤、リンパ球増殖、サイトカイン産生を調整している。

興味深いことに、マウス・エンブリオの cDNA ライブラリーを用いたスクリーニングで、慢性骨髄性白血病(Chronic myeloid leukemia; CML)や急性リンパ性白血病の原因融合遺伝子 Bcr-ABL のパートナー遺伝子である Bcr が STAP-2 と結合する事が確認された。詳細に解析を行ったところ、STAP-2 蛋白が Bcr と共に Abl に結合しリン酸化を促進する事が分かった。さらに、CML 細胞株である K562 細胞を用いて STAP-2 をノックダウンする実験を行ったところ、細胞増殖が抑制されるだけでなく、Imatinib への薬剤感受性が亢進した。これらの検討から、STAP-2 が CML の進展と TKI 感受性に影響を与えている事が示された(Sekine, Oritani et al. Oncogene. 2012)。

STAP 蛋白ファミリーメンバーである STAP-1 については、機能解析はまだほとんど行われていないが、STAP-2 の Bcr および Abl との結合部位である SH2 ドメインを有する事から、STAP-2 と同様に Bcr-Abl と結合する事が予想される。また、cKit 結合蛋白としてクローニングされた経緯より造血幹・前駆細胞の分化や増殖に何らかの役割を担っている可能性が推測される。

また、STAP-2 は EB ウイルスにより誘導

される細胞増殖増強にも関与する事が知られている。

これらの知見は、細胞株を用いた実験により得られており、生体内における STAP ファミリーの役割については明らかになっていない。

2. 研究の目的

血液内科関連疾患、すなわち Bcr-Abl 関連造血器疾患(CML、急性リンパ性白血病)、EBV 関連疾患(免疫抑制に伴うリンパ増殖性疾患、慢性活動性 EBV 感染症)、同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病(graft versus host disease; GVHD)における、STAP ファミリーの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Bcr-Abl 関連造血器疾患における STAP ファミリーの意義

STAP 欠損マウスおよび野生型マウスから造血幹細胞(HSC)分画 (Lineage⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺)を採取して、BCR-ABL 発現ウイルスベクター (GFP 産生あり) を導入する。GFP 陽性細胞を FACS Aria にて回収する (HSC^{-/-}BCR-ABL, HSC^{+/+}BCR-ABL)。HSC^{-/-}BCR-ABL や HSC^{+/+}BCR-ABL を放射線照射した野生型マウスに静脈内接種した後の造血器腫瘍発症を観察する。末梢血への白血病細胞出現や脾腫、臓器浸潤を評価する。

(2) EBV 関連疾患(免疫抑制に伴うリンパ増殖性疾患、慢性活動性 EBV 感染症)における STAP ファミリーの意義

患者生検標本を抗ヒト STAP-1 または 2 抗体を用いて免疫染色し、腫瘍部と非腫瘍部での STAP 発現を比較する。

(3) GVHD における STAP ファミリーの意義

造血幹細胞と STAP 遺伝子操作を施したり

リンパ球をドナー細胞として acute or chronic GVHD model 実験を行う。GVHD スコア、組織学的検討（リンパ球浸潤や臓器障害）、サイトカイン（IL-6, TNF, IFN など）測定などを評価する。DSS 摂食誘導による腸炎など免疫疾患モデル実験系を用いた炎症反応の程度を STAP-2 欠損マウスと野生型マウスにおいて解析する。

4. 研究成果

(1) Bcr-Abl 関連造血器疾患における STAP ファミリーの意義

STAP-2 欠損マウスおよび野生型マウスから造血幹細胞(HSC)分画 (Lineage⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺) を採取して、BCR-ABL 発現ウイルスベクター (GFP 産生あり) を導入し、放射線照射した野生型マウスに静脈内接種したところ、いずれも同程度の重症度を有する CML を発症し、生存期間の差は認めなかった。興味深い事に、同様の実験を STAP-1 欠損マウスを用いて行った場合には、野生型マウスに比べて生存期間が有意に延長する事が明らかになった。

(2) EBV 関連疾患における STAP ファミリーの意義

造血幹細胞移植治療後に発症した EBER 陽性の EB ウイルス関連びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) 患者の生検標本を用いて免疫染色を行った。EB ウイルス感染と関連のない de novo DLBCL と比較したところ、STAP-1 蛋白量が低下していた。

(3) GVHD における STAP ファミリーの意義

T リンパ球における STAP 蛋白の機能を解析するため、ドナーとして C57BL/6 マウス、レシピエントとして BALB/c マウスを用いた急性 GVHD モデル実験系を確立した。C57BL/6 マウス由来リンパ球および T・B 細胞除去骨髓細胞を BALB/c マウスに輸注すると、day30

前後に腸管病変を中心とした急性 GVHD を発症する。STAP-2 遺伝子を過剰発現したマウス由来の脾臓リンパ球細胞を輸注すると、野生型マウス由来のリンパ球を輸注したコントロール群に比べ、下痢・下血といった腸管 GVHD 所見が増悪し、生存期間が短縮する事が明らかとなった

DSS 摂食誘導による炎症性腸疾患モデルマウスの検討では、STAP-2 の腸管上皮細胞での発現が重症化に関わっており、免疫担当細胞だけでなく、様々な細胞種で作用している事を明らかにし、報告した。

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 9 件)

Kida T, Tanimura A, Ono A, Matsui T, Honma K, Fujita J, **Maeda T**, Shibayama H, **Oritani K**, Morii E, **Kanakura Y**. Lymphoplasmacytic lymphoma accompanied by transformed diffuse large B-cell lymphoma with the MYD88(L265P) mutation. Rinsho Ketsueki. 2017;58(2):155-160. (査読あり)

Hayashi Y, Sata H, Akuta K, Toda J, Kusakabe S, Ueda T, Ueda Y, Fujita J, Tadokoro S, **Maeda T**, Nishimura J, Shibayama H, **Oritani K**, **Kanakura Y**. Diffuse large B-cell lymphoma occurring in a Waldenström macroglobulinemia patient with central nervous system infiltration. Rinsho Ketsueki. 2015;56(11):2351-2356. (査読あり)

Fujita N, **Ichii M**, **Maeda T**, Saitoh N, Yokota T, Yamawaki K, Kakitani M, Tomizuka K, **Oritani K**, **Kanakura Y**. Identification of osteoblast stimulating factor 5 as a negative regulator in the B-lymphopoietic niche. Exp Hematol. 2015;43(11):963-973. (査読あり)

Sata H, Shibayama H, Maeda I, Habuchi Y, Nakatani E, Fukushima K, Fujita J, Ezoe S, Tadokoro S, **Maeda T**, Mizuki M, Kosugi S, Nakagawa M, Ueda S, Iida M, Tokumine Y, Azenishi Y, Mitsui H, **Oritani K**, **Kanakura Y**. Quantitative polymerase chain reaction analysis with allele-specific oligonucleotide primers for individual IgH VDJ regions to evaluate tumor burden in myeloma patients. *Exp Hematol.* 2015;43(5):374-381. (査読あり)
〔学会発表〕(計 8 件)

Ichii M, **Oritani K**, Toda J, Saito H, Matsuda T, **Kanakura Y**. Suppression of normal B lymphopoiesis in bone marrow induced by myeloma progression. 16th International Myeloma Workshop. (March 1-4, 2017) (New Delhi, India)

Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, **Ichii M**, Sudo T, Satoh Y, Doi Y, Tanimura A, Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, **Oritani K**, **Kanakura Y**. Endothelial cell-selective adhesion molecule is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias. The 44th Annual Scientific Meeting of International Society of Experimental Hematology. (Sep 17-19, 2015) (Kyoto)

Ichii M, **Oritani K**, Fujita N, Saitoh N, Sekine Y, Muromoto R, Kon S, Saitoh K, Matsuda T, **Kanakura Y**. REGULATION OF B LYMPHOPOIESIS BY SIGNAL-TRANSDUCING ADAPTOR PROTEIN-2, STAP-2. 19th Congress of the European Hematology Association. (2014.6.12-15) (Milan, Italy)

〔その他〕

大阪大学血液・腫瘍内科学ホームページ
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/bldon/www/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 哲生 (MAEDA, Tetsuo)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00403064

(2) 研究分担者

一井 倫子 (ICHI, Michiko)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
助教
研究者番号：30633010

織谷 健司 (ORITANI, Kenji)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70324762

金倉 譲 (KANAKURA, Yuzuru)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20177489

齋藤 則充 (SAITOH, Norimitsu)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30597399
(平成 26 年度まで分担者として参画)