

平成21年4月3日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590488
 研究課題名（和文）
 STAM1/2 を介する抗原提示機能制御
 研究課題名（英文）
 Regulation of APC function by STAM1/2.
 研究代表者
 村田 和子（MURATA KAZUKO）
 東北大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：20137631

研究成果の概要：野生型に比べ STAM1/2 二重欠損マウス由来の樹状細胞においては、抗原提示能の増強ならびに MHC classII の細胞表面での発現の亢進が見られた。mRNA 測定ならびに蛋白分解実験から MHC classII の発現増強は蛋白合成の亢進によるものではなく、蛋白質分解の抑制によるものであることが明らかとなった。また、電子顕微鏡による観察から、STAM1/2 二重欠損樹状細胞では MHCII 貯蔵小胞である MVB の形成異常みられ、MHC classII の分解異常を指示するデータが得られた。以上のことから、STAM1/2 は、MHC classII の分解を制御することにより、MHC classII を介する抗原提示に重要な機能を果たす分子であることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者らがサイトカイン情報伝達機構を解析する過程で同定した STAM1、STAM2 は、その後、酵母の細胞内小胞輸送関連タンパク質の哺乳類ホモログであることが明らかになった。申請者は哺乳類における STAM1、STAM2 の機能的役割を解明するために、それら遺伝子を T 細胞で特異的に欠損するダブル欠損マウスを作出したところ、T 細胞の分化障害がみられた。さらに申請者らの研究室

において、STAMs と Hrs が複合体を形成し、EGF 受容体などのサイトカイン受容体のダウンレギュレーションの制御に関わることが明らかにされた。

2. 研究の目的

抗原提示細胞の MHCII による抗原提示には、抗原の捕捉・取り込み、ライソソームへの輸送・分解、MVB (multivesicular body) での抗原-MHC 複合体形成とそれらの細胞膜上への

輸送、など抗原提示機構と細胞内小胞輸送系との密接な関わりが想定される。申請者らは、樹状細胞等で特異的にSTAM1/2を欠損させたマウス (STAM1/2cDKO) を樹立し、それら由来の樹状細胞の抗原提示能を測定した。その結果、STAM1/2欠損樹状細胞の抗原提示能が野生型に比し、異常に増強していることが分かった。しかし、STAM1/2欠損樹状細胞の抗原貪食能と抗原分解能は増強していないことから、抗原ペプチドとMHCIIとの複合体形成以降の過程にSTAM1/2が作用すると考えられた。そこで、細胞膜上のMHCIIの発現を比較したところ、STAM1/2欠損樹状細胞ではLPSあるいはCD40刺激後に極めて迅速に、且つ、より強い発現がみられることが分かった。これらの結果は、STAM1/2が細胞膜上のMHCII発現制御を介して、抗原提示機能を制御している可能性を示唆している。従来、抗原提示制御に関わる小胞輸送関連分子については未解明であり、上記の実験結果は、抗原提示の新たな制御機構の存在を示唆するものである。そこで、抗原提示機構における小胞輸送系関連タンパク質STAM1/2の機能的役割を解明する。

3. 研究の方法

STAM1とSTAM2はそれぞれ独立した遺伝子にコードされる極めて類似性の高いアイソフォームである。STAM1/STAM2ダブル欠損マウスは胎生致死であるため *in vivo* の機能解析を目的として、コンディショナルSTAM1/2ダブル欠損マウス (*stam1^{floxP/floxP}stam2^{-/-}*) を作出し、免疫系 (抗原提示細胞) 特異的な LysM-Cre 発現マウスと交配し、STAM1/2-cDKO マウスを作出し、これらのマウスの骨髄細胞をGM-CSF存在下で培養した骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を抗原提示細胞として使用する。抗原提示能を調べるために、野生型とSTAM1/2-cDKO、各マウス由来BMDCに抗原としてOVAを加えて培養した後、OVA特異的TCRを有するOT-IIマウスのCD4⁺T細胞と *in vitro* にて共培養を行い、CD4⁺T細胞の増殖ならびにサイトカイン産生を測定する。これらのT細胞の反応性を調べることにより、樹状細胞の抗原提示能を解析する。

また、これまでの電子顕微鏡による観察から、申請者はSTAM1、STAM2の各欠損細胞ならびにSTAM1/STAM2ダブル欠損細胞株において、MVB (multivesicular body) の形態が異常になることを明らかにしている。そこで、野生型ならびに欠損細胞を用いて抗原刺激後のMVBにおけるMHC classIIの動き、また、MHC classII-抗原ペプチド複合体のMVBから細胞膜表面への動きを中心に共焦点顕微鏡にて解析する。

MHC classIIがユビキチン修飾を受けるか否かを調べる。そして、MHC classIIとSTAM1、STAM2、との会合を免疫沈降を駆使して解析する。

*in vivo*における抗原提示能を調べるために、マウスの実験的脳脊髄膜炎

(EAE : Experimental allergic encepharomyelitis) の実験系を用いて解析を行う。抗原として脳炎惹起抗原であるミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白質 (myelin-oligodendrocyte glycoprotein, MOG) をフロイント完全アジュバンドとともに感作する。MHC classII上に提示されたMOGペプチドに反応するエフェクターT細胞が活性化されて脳脊髄膜炎 (四肢麻痺症状を呈する) が発症する。EAEの度合いは四肢麻痺症状をスコア化して判定する。また、免疫組織学的手法により脳組織における組織変化ならびに所属リンパ節におけるサイトカイン産生についても調べる。これらの実験を野生型、STAM1/2-cDKOの各マウスで行い、比較する。

4. 研究成果

野生型とSTAM1/2-cDKOマウス由来BMDCに抗原としてOVAを加えて培養した後、OVA特異的TCRを有するOT-IIマウスのCD4⁺T細胞と *in vitro* にて共培養を行い、CD4⁺T細胞の増殖ならびにサイトカイン産生を測定したところ、野生型に比べ、STAM1/2-cDKOマウス由来BMDCを抗原提示細胞として用いたときに、CD4⁺T細胞の増殖ならびにIL-2とIFN- γ のサイトカイン産生の増強が見られた。また、*in vivo*における抗原提示機能を調べるために、マウスの実験的脳脊髄膜炎 (EAE) の実験系を用いて解析を行った。抗原とし

て脳炎惹起抗原であるミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白質 (myelin-oligodendrocyte glycoprotein, MOG) をフロイント完全アジュバンドとともに感作して、四肢の麻痺を観察したところ、野生型に比べ、STAM1/2-cDKO マウスにおいて EAE の悪化が認められた。すなわち、*in vivo* においても抗原提示機能の亢進が認められた。

そこで、STAM1/2-cDKO マウス由来 BMDC における抗原提示能の亢進のメカニズムを明らかにするために、細胞表面上の MHC classII、CD80、CD86 の発現を調べたところ、野生型に比べ、STAM1/2-cDKO マウス由来 BMDC 上の MHC classII の発現増強が見られた。しかしながら、活性化マーカーである CD80、CD86 の発現には野生型と STAM1/2-cDKO マウス由来 BMDC との間に差は見られなかったことから、STAM1/2-cDKO マウス由来 BMDC 上の MHC classII の発現増強は活性化によるものではないことが明らかになった。そこで、次に MHC classII の蛋白量ならびに mRNA 量を測定したところ、MHC classII の蛋白量が STAM1/2-cDKO マウス由来 BMDC で著しく増加していた。しかしながら、MHC classII の mRNA 量は野生型と差がみとめられなかった。これらのことから、STAM1/2-cDKO マウス由来 BMDC 上の MHC classII の発現増強は蛋白合成後の調節機構によるものであることが示唆された。そこで、MHC classII 蛋白質の分解を蛋白合成阻害剤存在下において調べたところ、野生型にくらべ、STAM1/2-cDKO マウス由来 BMDC において、MHC classII の蛋白質分解の遅延が認められた。

また、電子顕微鏡を用いて、野生型と STAM1/2-cDKO マウス由来 BMDC の MHC classII を免疫電顕法により染色して観察したところ、STAM1/2-cDKO マウス由来 BMDC において、MHCII の貯蔵小胞である MVB(multivesicular body) の形成異常が見られた。野生型マウス由来の BMDC においては MHC classII が MVB の中に認められたが、STAM1/2-cDKO マウス由来の BMDC においては、MVB が形成されず、MHC classII は野生型に比べ約 11% であった。MHC classII は MVB に一時的に貯蔵され、その後リソソームにおいて分解を受けるこ

とがわかっている。

これらのことから、STAM1/2 分子は MVB の形成ならびにリソソームにおける MHCII の分解を制御することにより、MHCII の発現を制御して、抗原提示機能に重要な働きをしていることが明らかとなった。

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 3 件)

- ①. Tamai, K., Toyoshima, M., Tanaka, N., Yamamoto, N., Owada, Y., Kiyonari, H., Murata, K., Ueno, Y., Ono, M., Shimosegawa, T., Watanabe, M., Yaegashi, N., and Sugamura, K.: Loss of Hrs in the Central Nervous System Causes Accumulation of Ubiquitinated Proteins and Neurodegeneration. *Am. J. Pathol.* 173,1806-1817,2008
- ②. Chen, S., Ndhlovu, L.C., Takahashi, T., Takeda, K., Ikarashi, Y., Kikuchi, T., Murata, K., Pandolfi, P.P., Riccardi, C., Ono, M., Sugamura, K., and Ishii, N.: Co-inhibitory roles for Glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR) in CD1d-dependent natural killer T cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 2229-2240, 2008.
- ③. Toyoshima, M., Tanaka, N., Aoki, J., Tanaka, Y., Murata, K., and Sugamura, K.: Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by depletion of a Vesicular Sorting Protein Hrs: Its regulatory role on E-cadherin and b-catenin. *Cancer Res.*, 67: 5162-5171, 2007.

[学会発表] (計 5 件)

- ①. 入江正寛: マウス炎症性腸疾患感受性遺伝子候補としての HVEM の同定、第 38 回日本免疫学会、平成 20 年 12 月 1 日、京都
- ②. 井草龍太郎: STAM1/2 regulate the innate immunity through TLR4 and TLR9 signaling. 第 38 回日本免疫学会、平成 20 年 12 月 2 日、京都
- ③. 井草龍太郎: STAM1/2 double knockout mice

enhance inflammatory reaction、第 37 回日本免疫学会、平成 19 年 11 月 22 日、東京

④.青木淳：BTLA, HVEM に対するモノクローナル抗体の作製、第 37 回日本免疫学会、平成 19 年 11 月 22 日、東京

⑤.村田和子：Regulation of MHC class II function by ESCRT proteins, STAM1/2Regulation of MHC class II function by ESCRT proteins, STAM1/2. 第 37 回日本免疫学会、平成 19 年 11 月 20 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 和子 (MURATA KAZUKO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20137631

(2) 研究分担者

高橋 武司 (TAKAHASHI TAKESHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80335215