

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461417

研究課題名(和文) BCR-ABL関連造血器腫瘍に対するSTAP-2を標的とした新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel treatment for patients with BCR-ABL-related diseases

研究代表者

織谷 健司 (ORITANI, KENJI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70324762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Signal transducing adaptor protein-2 (STAP-2)は、シグナル伝達あるいは転写因子と結合するアダプター蛋白である。本研究において、生体内炎症反応を増強すること、アレルギー反応を抑制すること、BCR-ABL活性増強を介してケモカイン受容体発現を変化させること、メラノーマ細胞増殖に必須であること、抗原刺激後のT細胞免疫応答を正に制御すること、を見出した。本研究成果により、STAP-2阻害剤開発後の治療対象疾患が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Signal transducing adaptor protein-2 (STAP-2) is an adaptor protein, which interacts with several signaling or transcriptional molecules. In this study, we found that STAP-2 enhances in vivo inflammatory (DSS-induced colitis) and immune responses (T-cell responses after the stimulation of T-cell receptor) as well as tumorigenesis of chronic myelogenous leukemia and melanoma. In BCR-ABL-mediated signals, STAP-2 expression changed the expression patterns of chemokine receptors, resulting in unique proliferation via interactions between CCR7 and its ligands (CCL19 or CCL21). Our results clearly indicate possible diseases for a novel STAP-2-targeting therapy.

研究分野：血影内科学

キーワード：アダプター蛋白 シグナル 腫瘍化 炎症反応 免疫応答

1. 研究開始当初の背景

Signal transducing adaptor protein-2 (STAP-2) は、N 端側から Pleckstrin homology (PH)ドメインと Src homology 2 (SH2)ドメインが、C末端部に STAT3 結合部位である YXXQ モチーフが存在する。アダプターファミリー蛋白の構造上の特徴を有しており、我々は、STAP-2 が多くのシグナル伝達あるいは転写因子と結合することを以下のように報告してきた。(1) 肝細胞において、STAP-2 は YXXQ モチーフを介して STAT3 と結合し、IL-6 や IL-1 刺激による急性期蛋白誘導を正に制御している。(2) マクロファージ細胞株 RAW264.7 において、STAP-2 は SH2 ドメインを介して MyD88 や IKK-β と結合し、TLR からの NF-κB 活性化を促進させる。(3) Tリンパ腫細胞株 Jurkat において、STAP-2 は SH2 ドメインを介してユビキチンリガーゼ Cbl と結合することにより focal adhesion kinase 蛋白の分解を亢進させる結果として、Jurkat 細胞の fibronectin への接着を減弱させる。(4) STAP-2 は SH2 ドメインを介して guanine-nucleotide exchanging factor である Vav1 と結合し Rac1 や Cdc42 の活性を抑制する結果として、Jurkat 細胞の stromal cell-derived factor-1αへの遊走能を減弱させる。(5) STAP-2 は SH2 ドメインを介して caspase8 と結合し、Fas 刺激後の細胞死を著明に促進する。(6) STAP-2 の PH ドメインは、Epstein-Barr virus の Latent membrane protein 1 と結合しウイルス依存性増殖抑制に関与している。さらに、STAP-2 の新しい結合蛋白として BCR と ABL 蛋白に加え BCR-ABL 融合蛋白を同定し、BCR-ABL 由来シグナルに STAP-2 が深く関与することを報告した。即ち、STAP-2 の SH2 ドメインは BCR-ABL と結合すること、STAP-2 は BCR-ABL 自己リン酸化を促進し BCR-ABL 下流のシグナルを増強すること、p210BCR-ABL と STAP-2 を共発現した Ba/F3 細胞株は BCR-ABL 単独発現するものより悪性度が高いこと、STAP-2 をノックダウンした慢性骨髄性白血病細胞株 K562 はヌードマウスに接種した際の腫瘍形成能を消失すること、などの現象を見出した。

2. 研究の目的

腫瘍化シグナルに対する STAP 蛋白による調節作用を解析することで、STAP 蛋白を治療標的とする対象疾患を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

- IL-3 依存性造血細胞株 : BaF3
- メラノーマ細胞株 : B16F10
- T細胞リンパ腫細胞株 : Jurkat

(2) マウス

- STAP-2 欠損マウス

コントロール : C57BL/6

(3) マウスモデル実験

・デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導腸炎症 : 1.75% DSS を自然飲水させたときの体重変化・下痢の程度・大腸の短縮などを評価した。

・アナフィラキシーショックモデル : 抗 DNP-IgE 抗体により感作したマウスに DNP-BSA を注射することでアナフィラキシーを誘発した。

・腫瘍形成 : 腫瘍細胞を注射した後に形成する腫瘍を臓器別に観察した。

(4) Western blot

シグナル伝達分子のリン酸化および免疫沈降物に含まれる蛋白は、それぞれ対応する抗体を用いて同定した。

(5) Real time PCR

該当する細胞から RNA を抽出し、cDNA を作成した後に PCR を行った。

4. 研究成果

(1) 生体内炎症に対する STAP 蛋白の役割

デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 経口摂取により慢性炎症性腸炎 (クローン病や潰瘍性大腸炎) 様の消化管病変が惹起される。STAP-2 欠損マウスでは、DSS により惹起される体重減少や下痢・下血などの腸炎症状および消化管組織変化が減弱していた (図 1)。消化管病変部への炎症細胞浸潤が軽微であったことから、その原因を解析したところ、STAP-2 欠損マウスでは、DSS 摂取による腸管上皮細胞からのケモカイン分泌が低下していることやマクロファージのケモカイン遊走能が低下していることなどが判明した。このことから、生体内において、STAP-2 は炎症反応を増強する役割があると考えられた。

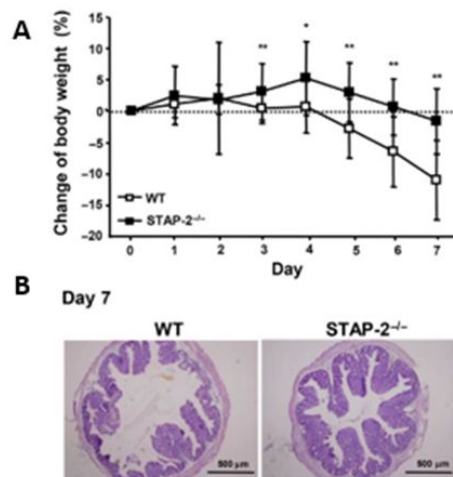


図1 STAP-2欠損マウスはDSS誘導腸炎が軽微である (A) 経時的体重変化 (B) 大腸組織 (H-E染色)

(2) アレルギー反応に対する STAP 蛋白の役割

STAP-2 は、肥満細胞に発現が認められ、FcεRI からのシグナルを減弱させた。抗 DNP-IgE 抗体で感作した後に DNP-BSA で刺激したときに認められるアナフィラキシー反応（体温低下や血管外体液漏出）は、STAP-2 欠損マウスで著明に亢進していた（図 2）。その一因として、STAP-2 が FcεRI と結合することを示した。このことから、生体内において、STAP-2 はアレルギー反応を抑制すると考えられた。

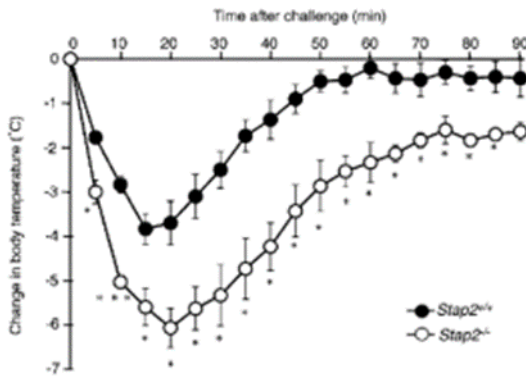


図2 STAP-2欠損マウスは強いアナフィラキシーショックが認められる

(3) STAP 蛋白による BCR-ABL 依存性増殖増強作用の分子メカニズム

STAP-2 は、慢性骨髄性白血病原因遺伝子変異である BCR-ABL と結合し、BCR-ABL 自己リン酸化およびその下流シグナルを促進する。興味深いことに、STAP-2 と BCR-ABL の相互作用はケモカイン受容体発現に大きな影響を及ぼした。即ち、STAP-2 を過剰発現させた BCR-ABL 陽性細胞では、CXCR4 発現が低下し CCR7 発現が増強した（図 3）。その結果、マウスに接種した場合の腫瘍形成部位が STAP-2 発現量により変化した。CCR7 発現誘導は MAPK/ERK シグナル経路の活性化によるものであった。また、CCR7 のリガンドである CCL19 や CCL21 発現も STAP-2 と BCR-ABL の相互作用に依存していた。さらに、STAP-2 による BCR-ABL 依存性細胞増殖促進作用には、CCL19/CCR7 経路が一部関与していることが明らかになった。

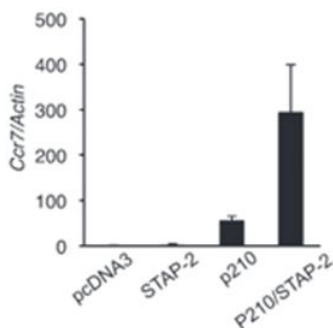


図3 STAP-2はBCR-ABLによるCCR7発現誘導を増強させる

(4) メラノーマ細胞増殖に対する STAP 蛋白の役割

STAP-2 発現をノックダウンすることで、メラノーマ細胞株 B16F10 をマウスに接種したときの腫瘍形成部位が変化した（図 4：野生型：肺浸潤、STAP-2 欠損：肝・腎臓浸潤）。さらに、STAP-2 による効果は tyrosinase を介することを明らかにした。以上、STAP-2 がメラノーマ細胞の増殖や遊走に必須であり、腫瘍化に重要であると考えられた。

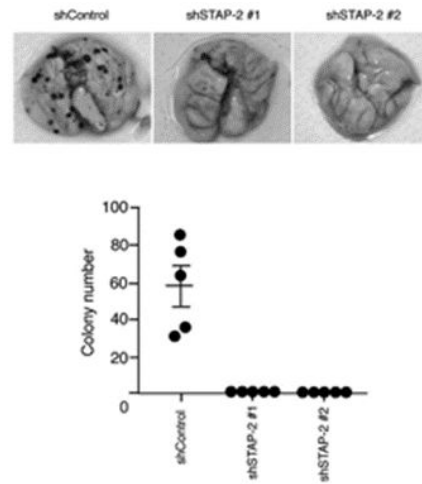


図4 STAP-2をノックダウンしたB16F10細胞は肺転移能が低下している

(5) T 細胞免疫応答に対する STAP 蛋白の役割

T 細胞受容体 (TCR) 刺激後のサイトカイン (IL-2) 分泌に STAP-2 が関与することを見出した。即ち、TCR 刺激による IL-2 産生誘導は、STAP-2 発現を減弱させると低下し、STAP-2 発現を亢進させると増加した（図 5）。さらに、STAP-2 を過剰発現させた Jurkat 細胞株では、抗 CD3 抗体で刺激した後の NFAT-LUC 活性が著明に亢進した（図 6）。以上、STAP 蛋白は抗原刺激後の T 細胞反応を正に制御すると考えられた。

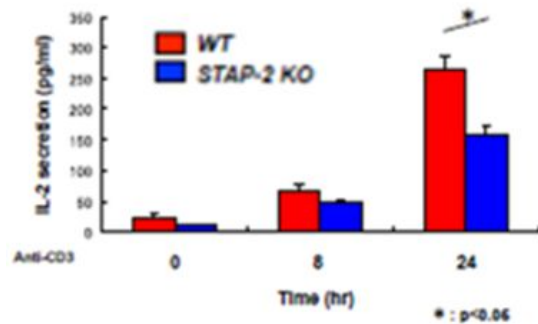


図5 STAP-2欠損脾臓細胞においてTCR活性化後のIL-2分泌が低下する

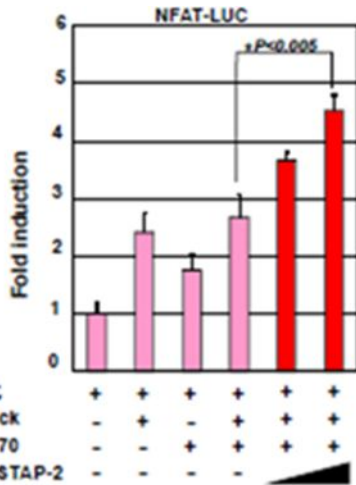


図6 STAP-2はLck, ZAP70によるNFAT転写活性を正に制御する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Kubo K, Iwakami M, Muromoto R, Inagaki T, Kitai Y, Kon S, Sekine Y, Oritani K, Matsuda T: CCR7 is involved in BCR-ABL/STAP-2-mediated cell growth in hematopoietic Ba/F3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 463(4):825-831, 2015
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.020

Sekine Y, Togi S, Muromoto R, Kon S, Kitai Y, Yoshimura A, Oritani K, Matsuda T: STAP-2 Protein Expression in B16F10 Melanoma Cells Positively Regulates Protein Levels of Tyrosinase, Which Determines Organs to Infiltrate in the Body. *J Biol Chem.* 290(28):17462-17473, 2015
doi: 10.1074/jbc.M115.658575

Fujita N, Oritani K, Ichii M, Yokota T, Saitoh N, Okuzaki D, Sekine Y, Kon S, Muromoto R, Saitoh K, Yoshimura A, Matsuda T, Kanakura Y: Signal-transducing adaptor protein-2 regulates macrophage migration into inflammatory sites during dextran sodium sulfate induced colitis. *Eur J Immunol.* 44(6):1791-1801, 2014
doi: 10.1002/eji.201344239

Sekine Y, Nishida K, Yamasaki S, Muromoto R, Kon S, Kashiwakura J, Saitoh K, Togi S, Yoshimura A, Oritani K, Matsuda T: Signal-transducing adaptor protein-2 controls the IgE-mediated, mast cell-mediated anaphylactic responses. *J Immunol.* 192(8):3488-3495, 2014

doi: 10.4049/jimmunol.1300886

Ichii M, Oritani K, Kanakura Y: Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse. *World J Stem Cells.* 6(4):421-431, 2014
doi: 10.4252/wjsc.v6.i4.421

〔学会発表〕(計 9 件)

第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会, (2015.12.1-4, 神戸ポートアイランド, 神戸市) 齋藤 浩大、今 重之、小澤 清貴、伊原 建、関根 勇一、室本 竜太、鍛代 悠一、吉村 昭彦、織谷 健司、松田 正: T 細胞活性化における STAP-1 及び STAP-2 の役割

第 44 回日本免疫学会学術集会 (2015.11.18-20, 札幌コンベンションセンター, 札幌市) Saitoh K, Kon S, Sekine Y, Muromoto R, Kitai Y, Yoshimura A, Oritani K, Matsuda T: Analysis of signal transducing adaptor protein-2(STAP-2) in T cell activation

第 44 回日本免疫学会学術集会 (2015.11.18-20, 札幌コンベンションセンター, 札幌市) Inagaki T, Iwakami M, Kitai Y, Muromoto R, Kon S, Sekine Y, Oritani K, Matsuda T: CCR7 is involved in BCR-ABL/STAP-2-mediated cell growth in hematopoietic cells

19th Congress of the European Hematology Association (2014.6.13, Mico Milano Congressi, Milan, Italy) 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

The American Society of Hematology 56th Annual Meeting (2014.12. 9, Moscone Center, San Francisco, CA, USA) Ichii M, Fujita N, Maeda T, Okuzaki D, Sekine Y, Kon S, Muromoto R, Oritani K, Matsuda T, Kanakura Y: The role of Signal-Transducing Adaptor Protein-2 in early T lymphopoiesis in thymus

第 43 回日本免疫学会総会・学術総会 (2014.12.11, 国立京都国際会館, 京都) Saitoh K, Kon S, Sekine Y, Muromoto R, Yoshimura A, Oritani K, Matsuda T: Functional significance of signal transducing adaptor protein-2 in TCR-mediated signaling

〔その他〕

ホームページ

<http://www.hematology.pro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

齊藤則充 (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)

(3) 連携研究者

なし