

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 5 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591062

研究課題名（和文） 遺伝子改変マウスによる宿主免疫調節候補分子の解析：免疫機構の人為的操作を目指して

研究課題名（英文） Analysis of in vivo effects of possible immune regulatory molecules for artificial management of immune systems

研究代表者

織谷 健司 (ORITANI KENJI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70324762

研究成果の概要（和文）：

申請者らが研究を進める新規アダプター蛋白 signal-transducing adaptor protein-2 (STAP-2)、および、DNA array 法や Signal trap 法などの手法を用いて選別した新しいリンパ球調節候補分子 proliferin, pleiotrophin, osteoblast stimulating factor (OSF)-5 について、生体内役割を明らかにすることを目指して研究を行った。各分子を過剰発現するノックインキメラマウスを作製・解析した結果、OSF-5 過剰発現マウスのみ、骨髄・脾臓・末梢血中の B リンパ球の減少を認め、特に pre-B 細胞以降の B リンパ球が減少していた。また、DSS 誘導腸炎モデルを確立し、STAP-2 欠損マウスを用いて検討した。結果、STAP-2 欠損マウスは DSS 誘導腸炎に対し抵抗性を示すことが明らかになった。この際、腸管上皮細胞における STAP-2 欠損が重要であり、DSS 誘導腸炎時のケモカイン産生などに STAP-2 が関与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed in vivo effects of signal-transducing adaptor protein-2 (STAP-2) as well as proliferin, pleiotrophin, and osteoblast stimulating factor (OSF)-5. We established knock-in chimera mice to produce proliferin, pleiotrophin, or OSF-5, respectively. Only OSF-5-KI chimera mice showed lymphocytopenia in peripheral blood, spleen, and bone marrow. The mice had few B lymphocytes after pre-B cell differentiation. In addition, OSF-5 was produced by stromal cells. We also evaluated DSS-induced colitis in signal-transducing adaptor protein-2 (STAP-2)-knockout mice. STAP-2 deficiency resulted in less body weight loss and colon shortening. Colon cells had responsibility to less phenotypes of colitis, and production of chemokines was impaired in STAP-2-knockout mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：免疫、炎症、リンパ球、分化、増殖、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

骨髄微小環境はリンパ造血細胞産生の制御に重要である。ストローマ細胞膜蛋白やマトリックス構成因子・サイトカインは、リンパ造血幹/前駆細胞に分化・増殖・死のシグナルを与えるとともにそれらの骨髄での定着あるいは分化に伴う移動を調節している。このリンパ球調節機構は、日々のリンパ造血を支持するだけでなく、必要に応じ産生を亢進し、或いは過剰反応に対し産生を低下させ、一定の状態の保持に重要な役割を果たしている。また、リンパ球調節に関わる分子の異常が種々の疾患の病因あるいは病態に深く関わっていると考えられている。

我々は、免疫応答における重要な構成細胞である B, T リンパ球の産生や機能を制御する分子の同定を進めてきた。現在までに、新規インターフェロン様サイトカイン IFN-zeta/Limitin や新規脂肪組織特異的蛋白 Adiponectin はじめ CD44, CD9, TGF-beta, secreted Frizzled-related protein family などの膜蛋白や分泌蛋白をリンパ球調整候補分子として報告してきた。また、新規アダプター蛋白 signal-transducing adaptor protein-2 (STAP-2) が FAK, IKKs, MyD88, STAT3 などの機能に影響を及ぼし、T リンパ球の増殖や遊走を制御すること、Toll-like receptor からのシグナルを調節すること、EB ウイルスの latent membrane protein-1 からのシグナルを抑制すること、などを見出している。

我々は、新たなリンパ球産生制御分子の同定を試みた。即ち、リンパ球増殖支持能が高いストローマ細胞株 (MS-5, HESS-5) と低い細胞株 (MS-K, SSCL Cl.1) 計 4 株における遺伝子発現を DNA アレイにより比較した。結果、リンパ球増殖支持能が高いストローマ細胞株特異的に高い遺伝子発現が認められる分泌蛋白として、proliferin を同定した。proliferin は、分泌糖タンパクであり、prolactin-growth hormone ファミリーに属している。本蛋白は、IGF-II/M6P receptor と結合すること、子宮細胞の増殖を促進すること、血管新生促進因子であること、などが知られている。さらに、proliferin は、bFGF や Wnt 刺激による標的遺伝子でもある。一方、リンパ球増殖支持能が高いストローマ細胞株 MS-5 が産生する分泌蛋白を Signal trap 法を用いて網羅的な解析も行った。同定した個々の分子について、種々のストローマ細胞株における Northern blot 解析を追加し、リンパ球増殖支持能が高いストローマ細胞株特異的に発現が認められる分子を探索した。

結果、本スクリーニングにより、proliferin, pleiotrophin, osteoblast stimulating factor (OSF)-5 を選出した。pleiotrophin は、分泌蛋白であり、ヘパリンやコンドロイチンと結合能を有し、midkine と高い相同性を示す。本蛋白は、RPTPbeta/zeta 受容体と結合することによりその働きを不活性化する。結果、骨髄腫細胞・乳がん細胞をはじめとする多くの腫瘍細胞の増殖を促進させること、血管新生促進因子であること、ストローマ細胞に作用し微小環境を修飾すること、などの作用を発揮する。さらに、pleiotrophin が anaplastic lymphoma kinase の活性化にも関与することが報告されている。pleiotrophin と OSF-5 は、造血幹細胞ニッチの主要構成細胞である骨芽細胞に作用することも明らかにされている。

2. 研究の目的

免疫調節システムに関する理解が深まればヒト免疫状態を人為的に操作することが可能となり、自己免疫疾患や重症感染症の新しい治療戦略展開をはじめとして新しい GVHD 制御法開発に繋がると思われる。独自の研究成果に基づき申請者らが提唱してきたリンパ造血調節候補分子の生体内役割を明らかにすることを旨とする本研究を通じて、新しいヒト免疫制御法確立の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) リンパ球調整候補分子のトランスジェニック キメラマウスの作製 (図 1 参照)

(手順 1) Ig \cdot promoter 制御下で目的遺伝子が誘導される vector を用い、研究対象遺伝子の cDNA を Ig \cdot -chain promoter と polyA 配列の間にサブクローニングする。

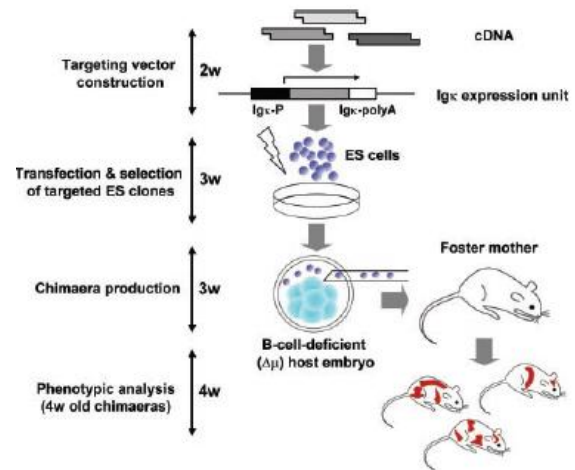


図 1 トランスジェニック キメラマウスの作製

(手順2) 作製した vector を電気閃光法にてマウス ES 細胞株に導入する。

(手順3) 遺伝子導入された ES 細胞株を 8 細胞期の B リンパ球欠損マウス受精卵に注入し、キメラ個体を作製する。作製されたキメラ個体では、生後、成熟 B リンパ球が産生・蓄積されてくると目的蛋白質が多量に分泌される。

(手順4) 生後適切な時期にキメラ個体の形質を解析する。興味深い形質異常が見出された場合、キメラマウスを交配し permanent な transgenic model を作製する。

(2) DSS 誘導腸炎モデル

1. 75% デキストラン硫酸ナトリウムを自由引水させることにより腸炎を誘導する。腸炎の評価は、体重減少・消化管出血・消化管短縮により評価した。

4. 研究成果

我々が選別してきたリンパ球産生制御候補分子 proliferin, pleiotrophin, OSF-5 について、KI キメラマウス (免疫グロブリン kappa 鎖プロモーターの下流に目的遺伝子を導入することにより成獣マウスのみが目的タンパクを産生する) を作製した。IFN-zeta/Limitin の KI キメラマウスに関しては、高キメラ率のマウスを作製することができなかった。OSF-5-KI-キメラマウスでは、骨髄・脾臓・末梢血中のリンパ球が減少しており、特に pre-B 細胞以降の B リンパ球が特異的に減少していた (表 1、図 2)。一方、proliferin や pleiotrophin の過剰産生は、リンパ造血には影響を及ぼさなかった。新しいリンパ球産生調節候補分子 OSF-5 には細胞内型と分泌型の 2 つの splicing variant が存在する。PCR による検討では、ストローマ細胞は主に分泌型 OSF-5 を産生していると考えられた。以上、OSF-5 を新しい B リンパ球産生抑制因子として同定した。

DSS 誘導腸炎モデルを確立し、STAP-2 欠損マウスを用いて検討した。STAP-2 欠損マウスでは、DSS 誘導腸炎に対し抵抗性を示した。また、マクロファージの炎症巣への浸潤には STAP-2 が必要であった。骨髄移植を行い、血球あるいは消化管のみが STAP-2 を欠損するマウスを作製し、同様の DSS 誘導腸炎を解析した。結果、消化管細胞が STAP-2 を欠損する場合のみに DSS 誘導腸炎に対する抵抗性が認められた。そこで、STAP-2 欠損/野生型マウス間の DSS 投与後の遺伝子発現を DNA アレイにて比較した結果、ケモカインや Antimicrobial proteins の発現が STAP-2 欠損マウスで低値であった。ケモカイン低下がマクロファージ浸潤低下の一因として考えられた。

表1 OSF-5 KIキメラマウスの血球数

weeks old		WBC in PB (/ μ l)	MNC in BM ($\times 10^6$ /bone)
10	Chimera 70%		
	control	6770	20.7
	OSF5	3930	14.8
20	Chimera 70%		
	control	6100	22.5
	OSF5	3300	9.5
	Chimera 50%		
	control	7300	20.8
	OSF5	1800	11.8

(n=2)

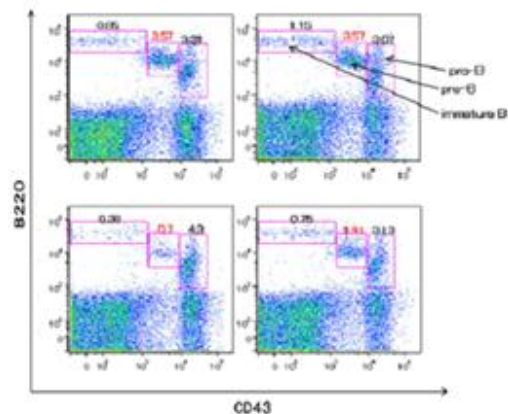
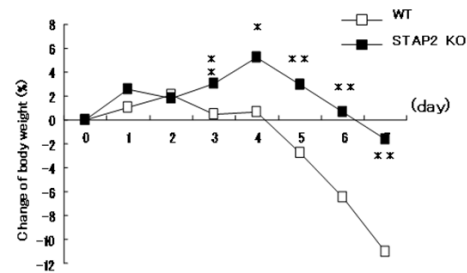
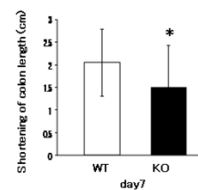


図2 Bリンパ球前駆細胞の解析

体重の変化



大腸の短縮



肛門出血

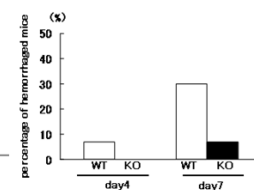


図3 DSS給水時の体重変化・大腸短縮・肛門出血

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 17 件)

- ① Sudo T, Yokota T, Oritani K, Satoh Y, Sugiyama T, Ishida T, Shibayama H, Ezoe S, Fujita N, Tanaka H, Maeda T, Nagasawa T, Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM monitors hematopoietic stem cell status between

- quiescence and self-renewal. *J Immunol* 189:200-210, 2012 (査読：有)
- ② Sekine Y, Ikeda O, Mizushima A, Ueno Y, Muromoto R, Yoshimura A, Kanakura Y, Oritani K, Matsuda T. STAP-2 interacts with and modulates BCR-ABL-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 31:4384-4396, 2012 (査読：有)
- ③ Matsui K, Ezoe S, Oritani K, Shibata M, Tokunaga M, Fujita N, Tanimura A, Sudo T, Tanaka H, McBurney MW, Matsumura I, Kanakura Y. NAD-dependent histone deacetylase, SIRT1, plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 418:811-817, 2012 (査読：有)
- ④ Sekine Y, Yamamoto C, Kakisaka M, Muromoto R, Kon S, Ashitomi D, Fujita N, Yoshimura A, Oritani K, Matsuda T. Signal-transducing adaptor protein-2 modulates Fas-mediated T cell apoptosis by interacting with caspase-8. *J Immunol* 188:6194-6204, 2012 (査読：有)
- ⑤ Usuki K, Tojo A, Maeda Y, Kobayashi Y, Matsuda A, Ohyashiki K, Nakaseko C, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Okamoto S, Oritani K, Okada M, Usui N, Nagai T, Amagasaki T, Wanajo A, Naoe T. Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph+ CML or relapsed/refractory Ph+ ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study. *Int J Hematol* 95:409-419, 2012 (査読：有)
- ⑥ 織谷健司. 細胞表面マーカー 造血器腫瘍学：基礎と臨床の最新研究動向. *日本臨床* 70:171-175, 2012 (査読：無)
- ⑦ 織谷健司. リンパ球の発生分化システム. *臨床血液* 53:354-364, 2012 (査読：無)
- ⑧ Shibata M, Ezoe S, Oritani K, Matsui K, Tokunaga M, Fujita N, Saito Y, Takahashi T, Hino M, Matsumura I, Kanakura Y. Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via in vitro analysis of Bcr-Abl phosphorylation. *Leuk Res* 35:1205-1211, 2011 (査読：有)
- ⑨ Saitoh N, Oritani K, Saito K, Yokota T, Ichii M, Sudo T, Fujita N, Nakajima K, Okada M, Kanakura Y. Identification of functional domains and novel binding partners of STIM proteins. *J Cell Biochem* 112:147-156, 2011 (査読：有)
- ⑩ Ikeda O, Mizushima A, Sekine Y, Yamamoto C, Muromoto R, Nanbo A, Oritani K, Yoshimura A, Matsuda T. Involvement of STAP-2 in Brk-mediated phosphorylation and activation of STAT5 in breast cancer cells. *Cancer Sci* 102:756-761, 2011 (査読：有)
- ⑪ Togi S, Ikeda O, Kamitani S, Nakasuji M, Sekine Y, Muromoto R, Nanbo A, Oritani K, Kawai T, Akira S, Matsuda T. Zipper-interacting protein kinase (ZIPK) modulates canonical Wnt/beta-catenin signaling through interaction with Nemo-like kinase and T-cell factor 4 (NLK/TCF4). *J Biol Chem* 286:19170-19177, 2011 (査読：有)
- ⑫ Kamitani S, Togi S, Ikeda O, Nakasuji M, Sakauchi A, Sekine Y, Muromoto R, Oritani K, Matsuda T. Krüppel-associated box-associated protein 1 negatively regulates TNF- α -induced NF- κ B transcriptional activity by influencing the interactions among STAT3, p300, and NF- κ B/p65. *J Immunol* 187:2476-2483, 2011 (査読：有)
- ⑬ 織谷健司, 金倉 讓. 造血器腫瘍に対する分子標的治療薬同士の併用化学療法 (造血器癌). *医薬ジャーナル* 47:96-100, 2011 (査読：無)
- ⑭ Ichii M, Oritani K, Yokota T, Zhang Q, Garrett KP, Kanakura Y, Kincade PW. The density of CD10 corresponds to commitment and progression in the human B lymphoid lineage. *PLoS One* 5:e12954, 2010 (査読：有)
- ⑮ Ichii M, Oritani K, Yokota T, Schultz DC, Holter JL, Kanakura Y, Kincade PW. Stromal cell-free conditions favorable for human B lymphopoiesis in culture. *J Immunol Methods* 359:47-55, 2010 (査読：有)
- ⑯ Ikeda O, Sekine Y, Mizushima A, Nakasuji M, Miyasaka Y, Yamamoto C, Muromoto R, Nanbo A, Oritani K, Yoshimura A, Matsuda T. Interactions of STAP-2 with Brk and STAT3 participate in cell growth of human breast cancer cells. *J Biol Chem* 285:38093-38103, 2010 (査読：有)
- ⑰ Ikeda O, Miyasaka Y, Yoshida R, Mizushima A, Oritani K, Sekine Y, Kuroda M, Yasui T, Fujimuro M, Muromoto R, Nanbo A, Matsuda T. BS69 cooperates with TRAF3 in the regulation of Epstein-Barr virus-derived LMP1/CTAR1-induced NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 584:865-872,

2010 (査読: 有)

[学会発表] (計 20 件)

- ① Fujita N, et al: Identification of osteoblast stimulating factor-5 as a novel regulator of early lymphocyte development. The 17th Congress of the European Hematology Association (2012. 6. 14-17, Amsterdam, Netherlands)
- ② Tanimura A, et al: An anti-apoptotic molecule, Anamorsin, is essential for erythropoiesis through the regulation of cellular labile iron pool. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting (2012. 12. 8-11, Atlanta, USA)
- ③ Oritani K, et al: Involvement of STAP-2 in BCR-ABL-mediated signals for CML development. 第 3 回日本血液学会 (JSH) 国際シンポジウム (2012. 5. 26-27, 埼玉)
- ④ Sudo T, et al: The endothelial antigen ESAM monitors hematopoietic stem cell status between dormancy and self-renewal. 第 10 回幹細胞シンポジウム (2012. 5. 31-6. 2, 兵庫)
- ⑤ 一井倫子 ら: 多発性骨髄腫の予後予測解析ツールとしてのマルチカラー・フローサイトメトリーの可能性、第 22 回日本サイトメトリー学会 学術集会 (2012. 6. 29-30, 大阪)
- ⑥ 一井倫子 ら: 多発性骨髄腫患者における骨髄内 B リンパ球前駆細胞評価の臨床的意義、第 37 回日本骨髄腫学会学術集会 (2012. 7. 7-8, 京都)
- ⑦ 松井崇浩 ら: 癌細胞の PSF1 発現レベルは薬剤耐性能および腫瘍再燃に関連する、第 71 回日本癌学会学術総会 (2012. 9. 19-21, 北海道)
- ⑧ 織谷健司: リンパ球の発生・分化システム、第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都)
- ⑨ Tanimura A, et al: An anti-apoptotic molecule, Anamorsin, functions in both Fe/S cluster assembly and iron homeostasis. 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都)
- ⑩ Sudo T, et al: Role of endothelial antigen ESAM in hematopoietic stem cells status. 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都)
- ⑪ Hamanaka Y, et al: Detection of change in LIC by MRI in a transfusion dependent MDS patient treated with deferasirox. 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都)
- ⑫ Ishibashi T, et al: Significance of novel HSC marker ESAM expression in cord blood. 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都)
- ⑬ Sudo T, et al: The endothelial antigen ESAM level distinguishes HSC status between quiescence and self-renewal. 第 41 回日本免疫学会学術集会 (2012. 12. 5-7, 兵庫)
- ⑭ Togi S, et al: A RNA binding protein, Y14 regulates TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and IL-6 expression. 第 41 回日本免疫学会学術集会 (2012. 12. 5-7, 兵庫)
- ⑮ Ishizaki M, et al: Tyk2 has a critical role in psoriasis-like skin inflammation in mice. 第 41 回日本免疫学会学術集会 (2012. 12. 5-7, 兵庫)
- ⑯ Matsui K, et al: Energy metabolism of glucose and ATP affects the growth and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells. The 16th Congress of the European Hematology Association (2011. 6. 9-12, London, UK)
- ⑰ Satoh Y, et al: Satb1 promotes hematopoietic stem cell differentiation toward the lymphoid lineages. The American Society of Hematology 53rd Annual meeting (2011. 12. 10-13, San Diego, USA)
- ⑱ Tanimura A, et al: An anti-apoptotic molecule, Anamorsin, functions in both iron-sulfur protein assembly and cellular iron homeostasis. The American Society of Hematology 53rd Annual meeting (2011. 12. 10-13, San Diego, USA)
- ⑲ Sudo T, et al: The endothelial antigen ESAM monitors reversible conversion of hematopoietic stem cells between dormancy and self-renewal. The American Society of Hematology 53rd Annual meeting (2011. 12. 10-13, San Diego, USA)
- ⑳ Satoh Y, et al: A chromatin modifier SATB1 promotes lymphocyte production from primitive hematopoietic stem/progenitor cells. The American Society of Hematology 52nd Annual meeting (2010. 12. 4-7, Orlando, USA)

[図書] (計 1 件)

- ① Yokota T, Oritani K, Butz S, Ewers S, Vestweber D, Kanakura Y. Advances in Hematopoietic Stem Cell Research, Intech Open Access Publisher, 2012, pp77-88

[その他]

ホームページ等

<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・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・医学系研究科・教授

研究者番号：20177489

江副 幸子 (EZOE SACHIKO)

大阪大学・医学部附属病院・特任講師（常勤）

研究者番号：90379173

(3) 連携研究者

なし