



Title	STAP-2によるT細胞活性化制御機構の解明と自己免疫疾患への寄与の検証 [全文の要約]
Author(s)	齋藤, 浩大
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 甲第13614号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/73854">http://hdl.handle.net/2115/73854</a>
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：薬学部図書室】
Note(URL)	<a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a>
File Information	Kodai_Saitoh_summary.pdf



[Instructions for use](#)

# 学位論文の要約

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏名 齋藤浩大

## 学位論文題名

### STAP-2によるT細胞活性化制御機構の解明と自己免疫疾患への寄与の検証

免疫系の中核を担うT細胞は貪食した細菌等異物を抗原提示する樹状細胞により活性化され、B細胞の抗体産生や感染細胞に対する細胞傷害活性を誘導することで、異物の排除を担う。T細胞活性化はT細胞表面に発現するT細胞受容体(TCR)がMHC/抗原ペプチド複合体を認識することにより誘導される。MHC/抗原ペプチドとTCRが結合すると、会合するキナーゼ分子LCKによりCD3 $\zeta$ 分子中のITAMモチーフのチロシンリン酸化が誘導される。ITAMがリン酸化されるとZAP-70がリクルートされ一連のTCRシグナル下流分子のチロシンリン酸化を促進し、NF- $\kappa$ B、NFAT等の転写因子の活性化を介してIL-2の産生とそれに引き続くT細胞の増殖や活性化反応が引き起こされる。従って、TCRシグナル伝達によるT細胞活性化は免疫応答において重要な役割を担い、その機能低下は免疫不全を誘発する一方、異常亢進は自己免疫疾患やアレルギーの発症を促進することが報告されている。しかしながら、TCRシグナル伝達の制御機構の全体像は未だ不明な点が多く、詳細なメカニズムの解明がこれらの疾患の発症機序の解明や新規治療法の開発に大きく貢献すると考えられる。TCRシグナル伝達には、細胞内シグナル伝達を制御するアダプター分子が重要な役割を担い、機能異常は様々な疾患の原因となることから、疾患標的として近年注目される分子群である。当研究室ではアダプタータンパク質STAP-2(Signal-Transducing Adaptor Protein-2)を同定し、マクロファージやマスト細胞などの種々の免疫細胞におけるシグナル伝達の重要性を見出している。T細胞においては細胞接着、細胞遊走、活性化細胞死に関与することを報告しているが、未だSTAP-2によるTCRシグナル制御機構、そしてT細胞を介する自己免疫疾患を含めた免疫応答への詳細な機能は不明である。そこで、本研究では自己免疫疾患の発症機序の解明を目的としてSTAP-2によるT細胞活性化制御機構の解明と、自己免疫疾患におけるSTAP-2の機能解析を行った。

まず、STAP-2がT細胞の活性化を制御するかどうかを明らかにするためにヒト白血病由来T細胞株Jurkat細胞に対してpcDNA3ベクター恒常発現Jurkat細胞(Jurkat/pcDNA3)及びSTAP-2恒常発現Jurkat細胞(Jurkat/STAP-2)を作製した。これらの細胞に抗CD3/CD28抗体を用いて刺激し、TCRシグナル下流分子の活性化及びIL-2の産生をウェスタンブロット法及びELISA法により検討した。またSTAP-2欠損(KO)マウスCD4陽性T細胞を用いて同様の検討を行い、野生型(WT)マウスCD4陽性T細胞と比較した。その結果、Jurkat/STAP-2においてTCR刺激によるZAP-70、PLC- $\gamma$ 1等のリン酸化やIL-2の産生がSTAP-2発現により亢進した一方、KO由来CD4陽性T細胞ではこれらの応答の抑制が観察された。これらの結果から、STAP-2がTCRシグナル伝達を介したT細胞の活性化を正に制御する機能を有することが示唆された。

STAP-2がTCRシグナル伝達を亢進することが考えられたため、次にその分子機構の解析を目的としてSTAP-2とTCRシグナル分子との分子間相互作用の検討を行った。Fig.2の結果からSTAP-2によってZAP-70以下のシグナル分子の活性化の亢進が観察された一方でLCKの活性化では差が見られなかった。そこでSTAP-2の相互作用分子がLCKからZAP-70の間にあると考え、

Jurkat/STAP-2 細胞に抗 CD3 抗体刺激を行い、STAP-2 がこれらの分子と相互作用するか免疫沈降法により検討した。その結果、STAP-2 と ZAP-70 の相互作用は認められなかった。しかし、TCR 刺激に伴って STAP-2 が ZAP-70 より上流に存在する LCK 及び CD3 $\zeta$  と相互作用する様子が観察された。TCR シグナルは TCR 複合体の構成分子の一つである CD3 $\zeta$  が LCK によってリン酸化されることによって開始される。このことから STAP-2 が LCK 及び CD3 $\zeta$  と 3 分子複合体の形成を介して TCR シグナルの開始に関わるという新規の分子機序が考えられた。

次に STAP-2 による TCR シグナルの制御が自己免疫応答に寄与するかどうかを調べるため自己免疫疾患モデルとして多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE) における STAP-2 の機能解析を行い、自己免疫疾患における STAP-2 の寄与を検証した。EAE は多発性硬化症の研究のために広く利用され、この自己免疫応答は T 細胞の活性化に強く依存することが知られている。まず病変部位で STAP-2 の発現に変化があるかどうかを確かめるために EAE の脊椎内での STAP-2 発現をリアルタイム PCR により解析した。その結果、EAE の発症に伴い STAP-2 mRNA 発現が亢進することが分かった。次に、STAP-2 KO マウス及びリンパ球特異的に STAP-2 を発現するトランスジェニック(Tg)マウスに EAE を誘導させ WT と病態を比較した結果、STAP-2 KO マウスでは症状の増悪化が抑制する傾向が観察、STAP-2 Tg マウスでは有意な病態の増悪化が観察された。この結果から、リンパ球における STAP-2 の機能が EAE 増悪化に強く関与することが分かった。

多発性硬化症を含めた自己免疫疾患にはヘルパー T 細胞(Th 細胞)のサブセットの一つである Th17 細胞の役割が非常に重要であり、Th17 細胞が産生する炎症性サイトカイン IL-17 が病態の増悪化を誘導する。そこで、発症時における脾臓及び症状のピーク時における中枢神経系(CNS)浸潤細胞中の Th17 細胞、関与が報告されている IFN- $\gamma$  を産生する Th1 細胞の割合に変化が起こっているかフローサイトメトリー解析で比較を行った。その結果、どちらの組織においても Th1 細胞の割合に変化は見られなかったが Th17 細胞の割合が STAP-2 Tg マウスで有意に増加していた。また、MOG ペプチドに対する抗原特異的な T 細胞の活性化に STAP-2 が関与しているかどうかを調べるため、MOG ペプチドを特異的に認識する TCR を発現している Tg マウス (2D2) と STAP-2 Tg マウスを交配し、2D2/STAP-2 Tg マウスを作製した。2D2 Tg マウスでは MOG ペプチドによる免疫と百日咳毒素の投与を行わない状態でも EAE を自然発症するという報告があり<sup>9)</sup>、当研究室でも約 5%とわずかではあるが EAE の自然発症が観察された。しかし、驚くべきことに約 50%の 2D2/STAP-2 Tg マウスは EAE を自然発症し、発症したマウスのほとんどが死亡する結果が得られた。これらの結果から、STAP-2 は MOG ペプチド応答による Th17 細胞の活性化を介して EAE の増悪化を正に制御することが明らかになった。

本研究から STAP-2 が足場となって形成される LCK/STAP-2/ CD3 $\zeta$  の 3 分子間相互作用が TCR シグナル伝達を正に制御することで T 細胞の活性化及び活性化を介した自己免疫疾患の増悪化に関与することが示唆された。本結果から新規 TCR シグナル伝達制御機構の存在が示唆され、将来的には STAP-2 の発現と自己免疫の関連性を詳細に解析することで自己免疫疾患の新たな診断マーカーの獲得や STAP-2 を介するタンパク質間相互作用を阻害する化合物の同定による治療薬開発に繋がることを期待する。