



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
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
DOI	10.14943/doctoral.k13614
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/91899">http://hdl.handle.net/2115/91899</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Kodai_Saitoh.pdf



[Instructions for use](#)

博士学位論文

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

北海道大学大学院生命科学院  
生命科学専攻 生命医薬科学コース  
衛生化学研究室

齋藤 浩大

2019年3月

## 目次

略語表	3
序章	6
第1章 TCR シグナル伝達を介した T 細胞活性化制御機構における STAP-2 の機能解析	
1-1 はじめに	10
1-2 実験方法	11
1-3 実験結果	17
1-4 考察	29
第2章 自己免疫疾患における STAP-2 の寄与の検証	
2-1 はじめに	34
2-2 実験方法	35
2-3 実験結果	39
2-4 考察	44
終章	48
参考文献	49
謝辞	

## 略語表

2-Me	2-Mercaptethanol
Ab	Antibody
AICD	Activation induced cell death
APC	Antigen presenting cell
AP-1	Activator protein 1
BKS	Substrate of Brk
BSA	Bovine serum albumin
BRK	Breast tumor kinase
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CFA	Complete Freund's adjuvant
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
Dw	Distilled water
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G3PDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H&E	Hematoxylin & eosin
HRP	Horseradish peroxidase
IB	Immunoblot
Ig	Immunoglobulin
IFN	Interferon
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
IP	Immunoprecipitation
IL	Interleukin
KO	Knock out
LAT	Linker for activation of T cell
LCK	Leukocyte-specific protein tyrosine kinase

LFB	Luxol fast blue
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
MHC	Major histocompatibility complex
MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
mRNA	Messenger RNA
MS	Multiple sclerosis
NFAT	nuclear factor of activated T cell
NF- $\kappa$ B	nuclear factor- $\kappa$ B
NP-40	Nonidet P-40
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
OD	Optical-densitometry
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	R-Phycoerythrin
PH	Pleckstrin homology
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
Pro	Proline
Ptx	Pertussis toxin
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rotation per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SH2	Src homology 2
SLE	Systemic lupus erythematosus
SLP-76	SH2 domain-containing leukocyte protein of 76kDa
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPF	Specific-pathogen-free
Src	Sarcoma
STAP	Signal-Transducing Adaptor Protein
TBS-T	Tris-buffered saline containing tween 20
TCL	Total cell lysate
TCR	T cell receptor
Tg	Transgenic
TGF	Transforming growth factor
Th	helper T cell

TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tween 20	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
WT	Wild-type
ZAP-70	Zeta-chain associated protein kinase of 70kDa

# 序 章

## 序章

免疫系は外部から侵入するウイルスや細菌などの様々な病原菌からの身体を守るうえで欠かせない生体防御機構である。免疫には、マクロファージや樹状細胞等の抗原提示細胞 (APC) が異物を認識してただちに排除する「自然免疫」と、抗原提示細胞が異物の情報を T 細胞に伝え、その情報に基づいて特定の異物を排除する「獲得免疫」の 2 種類に分類される。特に、獲得免疫は APC が細菌などの異物を認識・貪食し、そのペプチド断片を抗原として、APC の MHC クラス II 分子上に提示することで開始する。T 細胞は免疫応答時の機能や細胞表面分子によりヘルパー T 細胞 (Th 細胞)、もしくはキラー T 細胞に分類され、T 細胞受容体 (TCR) を介してペプチド-MHC 複合体を認識すると活性化し、B 細胞の抗体産生補助や感染細胞に対する細胞傷害活性機能を獲得することで、異物の排除を担う。また、TCR とペプチド-MHC 複合体の結合のみでは T 細胞は十分に活性化されず、アナジーなどの不応化状態に陥る。そのため、機能的な T 細胞活性化を誘導するためには CD28/B7 ファミリーに代表される補助刺激シグナルも必要とされる。一方、T 細胞の異常な活性化や機能不全は生体の恒常性破綻を引き起こし、クローン病や多発性硬化症などの自己免疫疾患やアレルギー、免疫不全症等様々な免疫疾患の原因となることが知られている<sup>1,2,3,4,5</sup>。

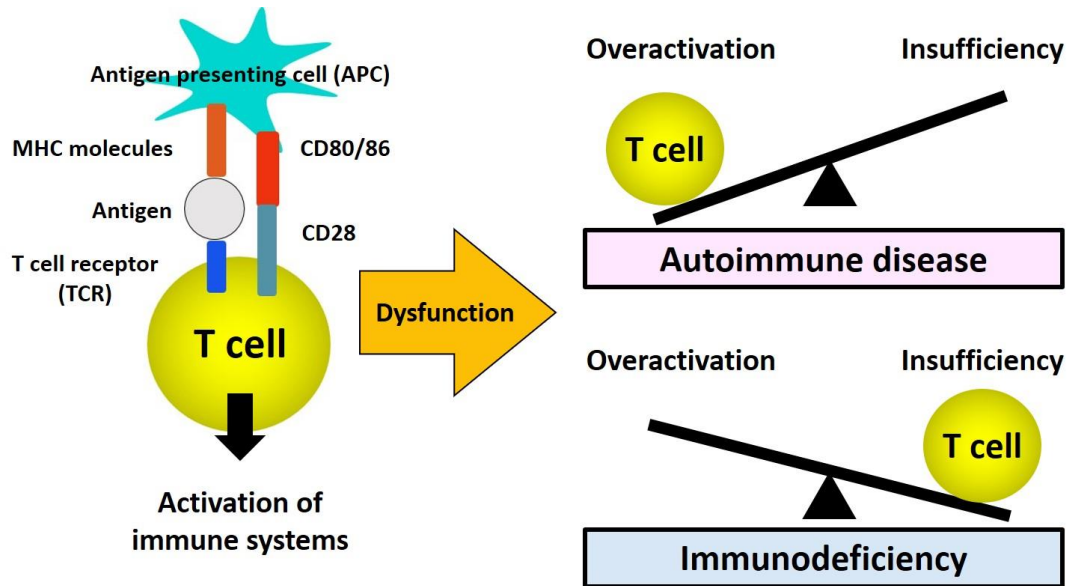


Fig.1 T 細胞活性化機構と機能異常による疾患

T 細胞の活性化は TCR シグナル伝達により調節されている。ペプチド-MHC 複合体と TCR が結合すると、CD4/CD8 に会合しているキナーゼ分子 LCK が活性化され、活性化された LCK が CD3 $\zeta$  にリクルートした後に CD3 $\zeta$  分子中の ITAM のチロシンリン酸化が誘導される。リン酸化 ITAM へ ZAP-70 がリクルートされると、ZAP-70 は LCK によるチロシンリン酸化を受けて活性化する。活性化された ZAP-70 は一連の TCR シグナル下流分子のチロシ



リン酸化を促進し、AP-1 や NF- $\kappa$ B、NFAT 等の転写因子を介した IL-2 の産生や T 細胞増殖等の T 細胞活性化反応が引き起こされる(Fig.2)<sup>5</sup>。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<sup>6</sup>。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い。TCR シグナル伝達には上述のチロシンリン酸化酵素のみならず、LAT、SLP-76 などのアダプター分子が重要な役割を担っていることが報告され<sup>7,8,9</sup>、細胞内シグナル伝達を制御するアダプター分子の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。そこで TCR シグナル伝達の制御に関わる新規制御分子を探索し、その詳細な制御機構を解明することは自己免疫疾患を含めた免疫疾患に対する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。

本研究では免疫細胞において様々なシグナル伝達に関与することが報告されているアダプタータンパク質 STAP-2 による TCR 依存性 T 細胞活性化制御における新たな機能を見出した。第 1 章では TCR シグナル伝達制御機構における STAP-2 の機能について、第 2 章では自己免疫疾患における STAP-2 の機能についての結果を報告する。

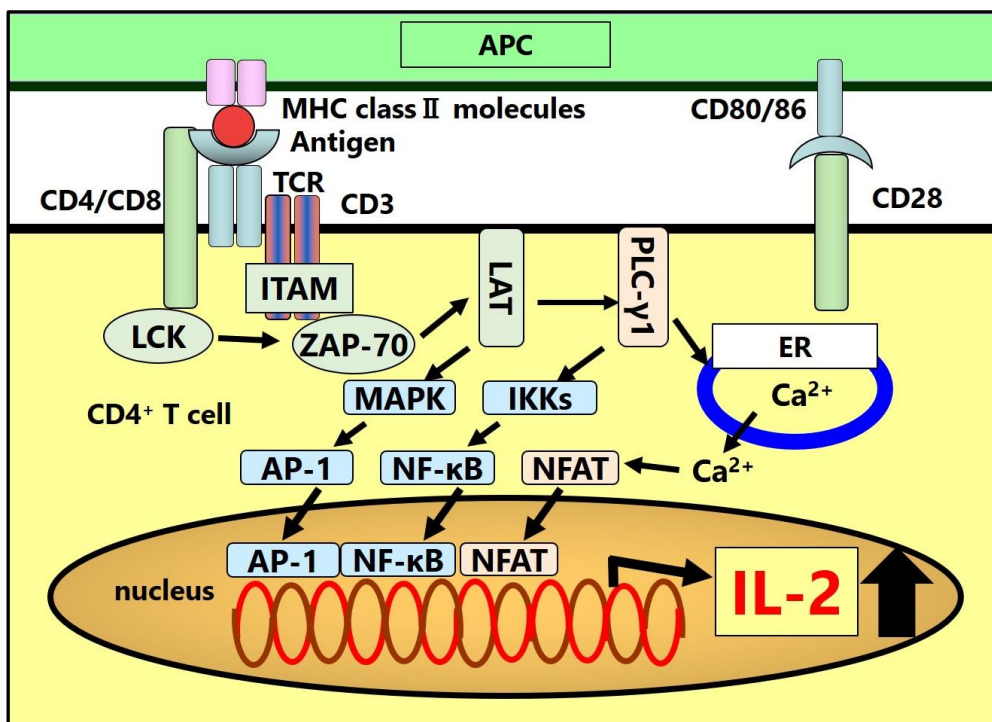


Fig.2 TCR シグナル伝達の概略図

## 第 1 章

# TCR シグナル伝達を介した T 細胞活性化制御 機構における STAP-2 の機能解析

## 第 1 章

### TCR シグナル伝達を介した T 細胞活性化制御機構における STAP-2 の機能解析

#### 1-1 はじめに

STAP-2 (Signal-Transducing Adaptor Protein-2)は、2003 年に当研究室で同定されたアダプタータンパク質であり、酵母 two-hybrid 法により M-CSF の受容体である受容体型チロシンキナーゼ *c-fms* 細胞内ドメインを基質としてマウス胎児肝臓 cDNA ライブラリーからクローニングされ、乳癌特異的 Src 型チロシンキナーゼ BRK の基質としてヒトでクローニングされたアダプター分子 BKS のマウスホモログである<sup>10, 11</sup>。マウス STAP-2 は 411 アミノ酸、ヒト STAP-2 では 403 アミノ酸より構成されており、N 末端側からリン脂質指向性を持つ PH ドメイン、リン酸化チロシンを認識する SH2 ドメイン、C 末端側に SH3 ドメイン保有分子との結合性を示すプロリンに富むドメイン (プロリンリッチドメイン)を有している (Fig.3)。STAP-2 は様々な組織や細胞に発現し<sup>11</sup>、これまで当研究室では B 細胞やマクロファージ、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における STAP-2 の機能を見出している<sup>12, 13, 14</sup>。T 細胞においては STAP-2 がインテグリンシグナルを介した細胞接着やケモカインシグナルによる細胞遊走、Fas シグナルを介した活性化細胞死に関与することを報告している<sup>15, 16, 17, 18</sup>。しかしながら、TCR シグナル制御機構における STAP-2 の機能は不明である。STAP-2 は T 細胞において多くの細胞内シグナル伝達で機能していることから、TCR シグナル制御機構においても STAP-2 は何らかの機能を有している可能性が考えられる。

そこで、本研究では T 細胞の活性化におけるより詳細な制御機構の解明を目的として TCR シグナル伝達の活性化制御機構における STAP-2 の機能解析を行った。

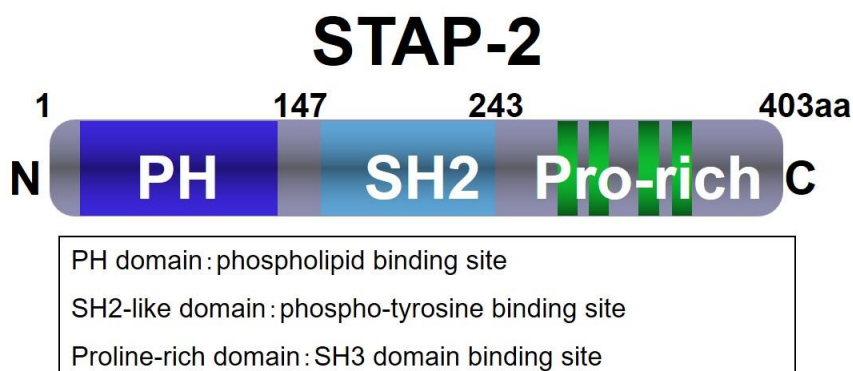


Fig3. STAP-2 のドメイン構造

## 1-2 実験方法

本研究で用いた実験手法及び試薬類を以下に示す。

### 1-2-1 実験材料及び試薬類

実験に用いた試薬の入手元は以下の通りである。

DMEM	SIGMA
RPMI 1640	SIGMA
FCS	GIBCO
Polyscreen PVDF transfer membrane	PerkinElmer
PMSF	nacalai tesque
7-Cyclopentyl-5-(4-phenoxyphenyl)-7H-pyrrolo[2, 3-d]pyrimidin-4-ylamine (LCK inhibitor)	SIGMA
抗ラビット IgG コントロール抗体	MBL
HRP 標識抗マウス IgG 抗体	GE Healthcare Life Science
HRP 標識抗ラビット IgG 抗体	GE Healthcare Life Science
FITC 標識抗ヒト CD3 抗体	eBioscience
FITC 標識抗マウス CD4 抗体	BioLegend
PE 標識抗マウス CD8 抗体	BioLegend
PerCPCy5.5 標識抗マウス CD3 抗体	BioLegend
抗 Myc 抗体 (9E10)	SIGMA
抗 Myc 抗体 (9B11)	Cell Signaling
抗 FLAG モノクローナル抗体 (M2)	SIGMA
抗 FLAG ポリクローナル抗体	SIGMA
抗 GST ポリクローナル抗体	Santa Cruz
抗 HA モノクローナル抗体 (F-7)	SIGMA
抗 phospho-Lck (Tyr394)抗体	Santa Cruz
抗 Lck 抗体	Santa Cruz
抗 phospho-ZAP-70 抗体 (Tyr319)	Cell Signaling
抗 ZAP-70 抗体	Cell Signaling
抗 phospho-PLC- $\gamma$ 1 (Tyr783) 抗体	Cell Signaling
抗 PLC- $\gamma$ 1 抗体	Santa Cruz
抗 phospho-ERK (T202/Y204) 抗体	Cell Signaling
抗 ERK 抗体	Santa Cruz
抗 phospho-CD3 $\zeta$ (Y83) 抗体	Epitomics
抗 CD3 $\zeta$ 抗体	Santa Cruz
抗 $\beta$ -actin モノクローナル抗体	SIGMA

抗ヒト CD3 抗体 (OKT3)	eBioscience
抗ヒト CD28 抗体 (9.3)	BioXCell
抗マウス CD3 抗体 (2C11)	ATCC
抗マウス CD28 抗体 (PV-1)	BioXCell
FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体	Invitrogen
Rhodamine 標識抗マウス IgG 抗体	CHEMICON
DAPI	Wako
Protein A Sepharose 4 fast flow	GE Healthcare Life Science
Protein G Sepharose 4 fast flow	GE Healthcare Life Science
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare Life Science
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	MILLIPORE
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
Fluo-4	DOJINDO
Mirus TransIT-LT1 Transfection Reagent	Mirus Bio LLC
ELISA MAX™ Standard Sets	BioLegend

その他の試薬は、特に断らない限り市販の特級試薬を用いた。

#### 1-2-2. 細胞の培養

ヒト胎児由来腎上皮細胞株 HEK293T 細胞は 10%ウシ血清 (FCS、56°Cで 30 分間非働化处理)、100 U/mL ペニシリン G、100 µg/mL 硫酸ストレプトマイシン及び 0.15% NaHCO<sub>3</sub> を含む DMEM を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で継代培養した。

ヒト T 細胞白血病細胞株 Jurkat 細胞は 10%ウシ胎児血清 (FCS、56°Cで 30 分間非働化处理)、100 U/mL ペニシリン G、100 µg/mL 硫酸ストレプトマイシン、0.15% NaHCO<sub>3</sub> 及び 50 µM 2-ME を含む RPMI を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で継代培養した。マウス CD4 陽性 T 細胞は 10%ウシ胎児血清 (FCS、56 °C、30 分間非働化处理)、100 U/mL ペニシリン G、100 µg/mL 硫酸ストレプトマイシン、0.15%NaHCO<sub>3</sub> 及び 50 µM 2-ME を含む RPMI を用いて、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

#### 1-2-3. マウス脾臓細胞の精製

マウス脾臓からホモジナイザーを用いて脾臓細胞を含む懸濁液を作製し、1,500 rpm、5 分間遠心した細胞ペレットを、PBS 10 mLで2回洗浄し、溶血バッファー[ 150 mM NH<sub>4</sub>Cl 、12 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.1mM EDTA、10mM Tris-HCl (pH7.4) ]にて溶血処理を行った。溶血処理は溶血バッファー 2 mLを用いて5分間行った。その後、10% FCSを含むRPMI 10 mLで1回洗浄した細胞集団を脾臓細胞として実験に用いた。

#### 1-2-4. CD4陽性T細胞の精製

CD4 陽性 T 細胞の精製は Easy SEP® Mouse CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (STEMCELL)を用いて添付のプロトコールに従って行った。精製した脾臓細胞を  $1 \times 10^8$  cells/mL の割合になるように RPMI に懸濁した。以下、1 mL の細胞懸濁液を用いたプロトコールを示す。正常ラット血清を 50  $\mu$ L、CD4<sup>+</sup> T cell Isolation Cocktail を 50  $\mu$ L 加えて穏やかに懸濁後、室温で 10 分間反応させ、Streptavidin RapidSphere を 75  $\mu$ L 加えて穏やかに懸濁後、室温で 2.5 分間反応させた。液量を約 2.5 mL になるように培地を加えて穏やかに懸濁後、magnet に 5 分間静置し、magnet に結合しなかった細胞を適量のメEDIUMで洗浄後計数し、実験に用いた。

#### 1-2-5. 細胞への発現プラスミドの導入

##### (1) リン酸カルシウム法

HEK293T 細胞へのトランスフェクションはリン酸カルシウム法で行った。必要量のプラスミド DNA に 0.25 M CaCl<sub>2</sub> 溶液 500  $\mu$ L を加え、激しく攪拌しながら 2×HBS、PO<sub>4</sub> buffer [42 mM HEPES (pH 7.10)、290 mM NaCl、14 mM NaHPO<sub>4</sub>]を 500  $\mu$ L 加えた後、15 分間室温にて静置し DNA-リン酸カルシウム共沈殿を形成させた。この溶液を 10 cm ディッシュで培養した 50%コンフルエントの HEK293T 細胞に滴下し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 36 時間培養し解析に用いた。

##### (2) エレクトロポレーション法

Jurkat 細胞へのトランスフェクションはエレクトロポレーション法で行った。Jurkat 細胞を回収し RPMI (FCS 及び抗生物質不含) で 3 回洗浄した。  $1 \times 10^7$  個の細胞を Mirus TransIT-LT1 Transfection Reagent 80  $\mu$ L に懸濁し直ちに、プラスミド DNA 20  $\mu$ g を加えた電極間隔 2 mm のエレクトロポレーションキュベットに移し、Gene Pulser II (Bio-Rad) を用いて 150 V、950  $\mu$ F の条件でパルスをかけプラスミド DNA を細胞内に導入後、細胞を 10 cm ディッシュに移し、通常培養条件下で 48 時間培養して解析に用いた。

##### (3) 恒常発現株の樹立

Jurkat 細胞へのプラスミド DNA の導入はエレクトロポレーション法で行った。Jurkat 細胞を回収して RPMI (FCS 及び抗生物質不含) で 3 回洗浄し、  $1 \times 10^7$  cells の細胞を 500  $\mu$ L の RPMI (FCS 及び抗生物質不含)に懸濁した。電極間隔 4 mm のエレクトロポレーションキュベットにプラスミド DNA 20  $\mu$ g 及び細胞を移し、氷上に 10 分間放置した後、Gene PulserII (Bio-Rad) を用いて 300 V、975  $\mu$ F の条件でパルスをかけプラスミド DNA を細胞内に導入し、さらに氷上に 10 分間放置した。1 mg/mL G418 を含む培養メEDIUMで 2 週間薬剤選別し、さらに限外希釈法にて G418 耐性 Jurkat 細胞を単クローン化した。得られた複数の単クローンの目的タンパク質発現をウエスタンブロット法にて確認し、恒常発現株を樹立した。

## 1-2-6. 免疫沈降法とウエスタンブロット解析

### (1)細胞可溶化物の調製

細胞を 6,000 rpm、4°C で 1 分間遠心分離し、PBS で洗浄後の細胞ペレットを細胞可溶化液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.15 M NaCl、1% NP-40、1 mM PMSF、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>]にて 4 °C、30 分間穏やかに攪拌して可溶化させ、4 °C、15,000 rpm で 60 分間遠心分離後の上清を細胞可溶化物とした。

### (2) 免疫沈降

細胞ライセートに目的タンパク質に対する抗体を加え、4°C で 90 分間穏やかに攪拌後、担体(Protein A sepharose or Protein G sepharose)を添加し、さらに 4°C で 30 分間穏やかに攪拌した。その後、6,000 rpm、4°C で 30 秒間遠心分離することでビーズを沈降させた。ビーズを Lysis buffer 1 mL で 3 回洗浄し、SDS sample buffer [ 281 mM Tris-HCl (pH 7.8)、30 % グリセロール、15 % 2-ME、7.5 % SDS ] 20 μL を加え、100°C で 5 分間インキュベートすることでウエスタンブロット用のサンプルを調製した。

### (3)ウエスタンブロット法による解析

SDS-PAGE にてタンパク質を分離した後、タンパク質を PVDF 膜に転写した。この膜を 5%スキムミルクを含む TBS-T (0.05% Tween-20 を含む TBS)、または 1%ウシ血清アルブミンを含む TBS-T を用いて室温にて 30 分間ブロッキングし、TBS-T で 15 分間×2 回洗浄後、一次抗体と室温で 1 時間または 4 °C で一晩反応させた。続いてその膜を室温にて TBS-T で 10 分間×3 回洗浄後、HRP 標識二次抗体を室温で 1 時間反応させ、TBS-T で 10 分間×3 回洗浄、Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate と反応させ、化学発光により X 線フィルムにて検出した。膜をリプローブする際は 6 M 塩酸グアニジンで 15 分間処理し、TBS-T を用いて室温で 15 分間×2 回洗浄し、再び一次抗体処理以降の操作を行った。

## 1-2-7. プルダウンアッセイ

細胞可溶化物に Glutathione Sepharose (GSH プルダウンアッセイ)、または ITAM、リン酸化 ITAM ペプチドを付加させたセファロースビーズ (ITAM ペプチドを用いたプルダウンアッセイ) を加え、4 °C で 1 時間半穏やかに攪拌した。反応後は免疫沈降と同様にウエスタンブロット用のサンプルを作製した。使用した ITAM ペプチドの配列を以下に示す。

ITAM : QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR

pITAM : QQGQNQLpYNELNLGRREEpYDVLDKRRGR

## 1-2-8. 抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体による TCR シグナル活性化

Jurkat 細胞 2×10<sup>6</sup> 個/mL もしくは 5×10<sup>6</sup> cells/mL に対して抗 CD3 抗体を 5 μg/mL もしくは 10 μg/mL、抗 CD28 抗体を 3 μg/mL の終濃度になるように加えた後、37 °C でインキュベートし、図に示す時間に細胞を回収した。CD4 陽性 T 細胞 2×10<sup>6</sup> cells/mL もしくは 1×10<sup>6</sup> cells/mL に対して抗 CD3 抗体を 10 μg/mL、抗 CD28 抗体を 3 μg/mL の終濃度になるように

加えた後、37℃でインキュベートし、図に示す時間に細胞を回収した。

#### 1-2-9. ルシフェラーゼアッセイによる転写活性の測定

NFAT 転写活性の評価にはホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に NFAT 結合配列を組み込んだレポーターコンストラクト NFAT-Luc と内部標準としてウミシイタケルシフェラーゼ phRL-TK を用い、Dual Luciferase Assay System によるレポーター遺伝子アッセイを行った。

##### (1) 遺伝子導入

NFAT-Luc 遺伝子 8 µg、phRL-TK 2 µg 及び各タンパク質発現プラスミド 10 µg をエレクトロポレーション法 (2-1-3(2)) により導入した。37℃、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で 48 時間培養後解析に用いた。

##### (2) レポータールシフェラーゼ活性及びウミシイタケルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性は Dual Luciferase Assay System を用い、添付のプロトコールに従って行った。ルミネッセンサー JNR-II AB2300 (ATTO) を用いてそれぞれの蛍光強度を測定し、レポータールシフェラーゼ活性及びウミシイタケルシフェラーゼ活性とした。

##### (3) 相対活性の算出

サンプル間の相対活性は次の手順で算出した。まず、レポータールシフェラーゼ活性の測定値をウミシイタケルシフェラーゼ活性の測定値で割り、各サンプルの比活性を求めた。次に、コントロールサンプルにおける未刺激時の相対値の平均を 1 として各サンプルの測定値の平均から相対活性を算出した。同一サンプルに対して Duplicate で実験を行い、平均値と標準偏差を求めた。上記の Duplicate の実験を独立に 3 回以上繰り返して行い、再現性を確認した。

#### 1-2-10. 細胞内カルシウム濃度測定

細胞内カルシウム濃度の測定は Calcium Kit II - Fluo 4 を用い、添付のプロトコールに従って行った。測定にはマイクロプレートリーダー Infinite M200 (TECAN) を用い励起波長 495 nm、蛍光波長 518 nm で検出し、解析には i-control を用いた。

#### 1-2-11. 免疫細胞染色法

##### (1) 免疫細胞蛍光染色

Jurkat 細胞を回収した後、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で 10 分間処理することで細胞を固定した。PBS で洗浄後、1% TritonX-100 を含む PBS で 10 分間処理することで細胞膜を可溶化させ、その後 PBS で洗浄し、PBS で 200 倍に希釈した一次抗体を 4℃で一晩反応させ、PBS で洗浄した。続いて、二次抗体として PBS で 200 倍に希釈した Rhodamine 標識抗マウス IgG 抗体、または 100 倍に希釈した FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体を室温で 1 時間反応させた。さらに PBS で洗浄した後、DAPI で細胞の核を染色した。細胞をスライドガラスに滴下し、その上からカバーガラスを被せ、蛍光退色防止剤を含むグリセロールを用いてスライドガラスを接着し、顕微鏡サンプルとした。



## (2) タンパク質の細胞内局在の観察

作製した顕微鏡サンプルは共焦点レーザー顕微鏡 FLUOVIEW FV10i (OLYMPUS) により各種励起波長 (DAPI : 359 nm、Rhodamine : 572 nm、FITC : 474) のレーザーを照射し、得られる蛍光から目的タンパク質の細胞内局在を観察した。

### 1-2-12. フローサイトメトリー解析

細胞を FACS バッファー(2% FCS/0.05 % NaN<sub>3</sub>/PBS) に懸濁し、Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (1:100)を加えて室温で 15 分間静置し、抗体の非特異的結合をブロッキングした。細胞懸濁液を 2,000rpm で 1 分間遠心し、FACS バッファーで洗浄した。細胞を再び 100 μL の FACS バッファーで懸濁し、各蛍光標識抗体【FITC anti-human CD3 (1:200)、FITC anti-mouse CD4 (1:200)、 PE anti-mouse CD8 (1:100)、 PerCP Cy5.5 anti-mouse CD3 (1:100)】を加えて冷暗所で 20 分間静置した。細胞を FACS バッファーで 2 回洗浄し、フローサイトメーターGallios (Beckman Coulter)によってデータを取得し、FlowJO (Version 10)で解析した。

### 1-2-13. ELISA

IL-2 の測定は ELISA MAX™ Standard Sets を用い、添付のプロトコールに従って行った。

### 1-2-14. 使用動物及び飼育条件

C57BL/6 系統バックグラウンドの STAP-2 遺伝子欠損マウスは吉村 昭彦博士 (慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室教授)より恵与され、SPF (Specific pathogen free)条件下で飼育、使用した。

### 1-2-15. STAP-2 遺伝子導入マウスの作製

STAP-2 cDNA を p1026x ベクターの BamHI クローニングサイトへサブクローニングし、遺伝子導入用プラスミドとした。p1026x ベクターはマウス *lck* 近位プロモーター、免疫グロブリン重鎖エンハンサー、ヒト成長ホルモン(*hGH*)遺伝子カセットを含むベクターである<sup>19</sup>。STAP-2 導入遺伝子は C57BL/6 マウスの受精卵に導入、STAP-2 の発現をジェノタイプニング及び PCR による mRNA 解析にて確認してラインを確立した。

### 1-2-16. 統計処理

最低 3 回以上実験して得られたデータを用いて統計処理を行い、平均値±SEM で表記した。異なるグループ間の統計学的有意差は student の *t* 検定あるいは Mann-Whitney の U 検定を用いて計算し、 $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)のとき、統計学的に有意であるとされた。

### 1-3 実験結果

#### 1-3-1. STAP-2 の T 細胞活性化における作用の解析

IL-2 は活性化 T 細胞及びエフェクター T 細胞により産生され、免疫応答において様々な免疫細胞の増殖や分化を制御する主要なサイトカインである。そこで始めに STAP-2 が TCR 依存性 T 細胞活性化反応に関わっているかを明らかにするために TCR 複合体構成因子の一つである CD3 に対する抗体 (抗 CD3 抗体) を用いて TCR 複合体を架橋し、T 細胞活性化の指標として IL-2 産生量の変動を解析した。野生型 C57BL/6 マウス (以下 WT マウス)、STAP-2 欠損マウス (以下 KO マウス)、リンパ球特異的に STAP-2 を過剰発現させた STAP-2 トランスジェニックマウス (以下 Tg マウス) 由来 CD4<sup>+</sup> T 細胞を脾臓から分離し、抗 CD3 抗体および補助シグナル分子である CD28 に対する抗体 (以下、抗 CD3/CD28 抗体) で刺激後の培養上清に含まれる IL-2 量を ELISA 法により測定した。その結果、STAP-2 KO 由来 CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-2 産生量は WT マウス由来 CD4<sup>+</sup> T 細胞と比べて有意に減少した。一方で STAP-2 Tg マウス由来 CD4<sup>+</sup> T 細胞の IL-2 産生量は WT マウス由来 CD4<sup>+</sup> T 細胞と比べて有意に増加した (Fig.4)。このことから STAP-2 は TCR シグナルの活性化による IL-2 産生を亢進することが分かった。

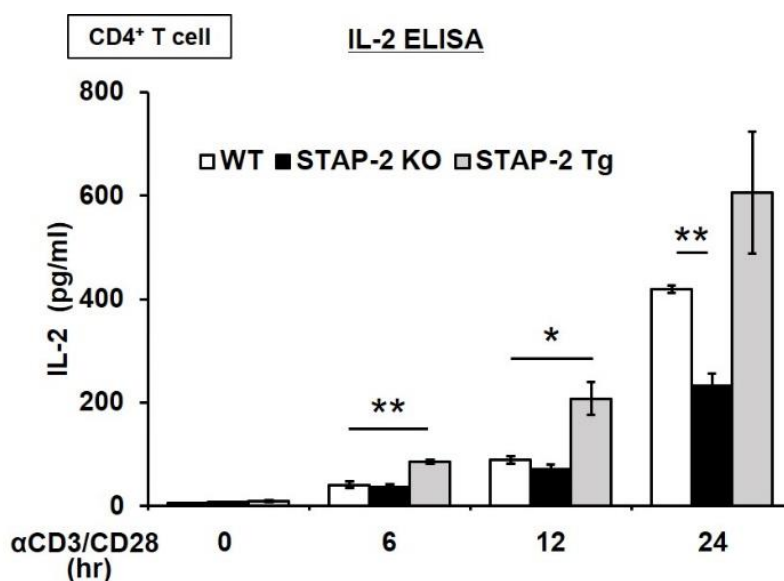
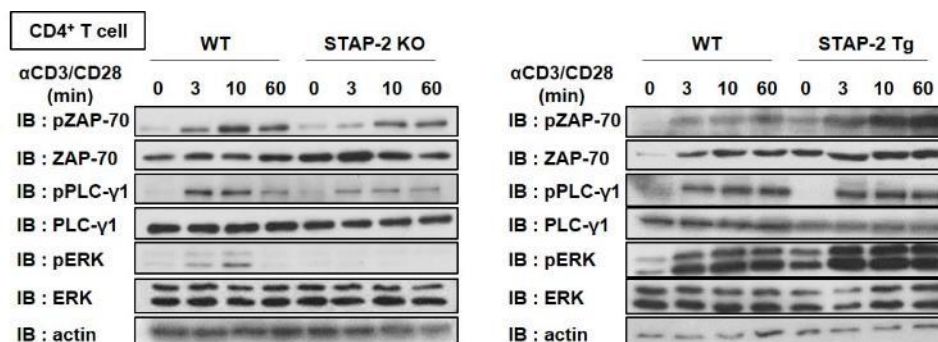


Fig.4 TCR 刺激による IL-2 産生における STAP-2 の機能

WT、STAP-2 KO マウス、STAP-2 Tg マウス由来 CD4<sup>+</sup> T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で経時的に刺激後、培養上清を回収し、ELISA 法により IL-2 産生量の測定を行った。

Mean ± SEM \* : p < 0.05 \*\* : p < 0.01

T細胞活性化を STAP-2 が正に制御することから STAP-2 は TCR シグナル伝達制御に機能を有することが考えられた。TCR と CD28 による共刺激は TCR 近傍に存在するシグナル分子のチロシンリン酸化を誘導することで複数の下流シグナル分子や転写因子の活性化を促進する。そこで、STAP-2 による TCR シグナル伝達への寄与を解析するために WT マウス及び STAP-2 KO マウス、STAP-2 Tg マウスの抗 CD3/CD28 抗体刺激時における TCR シグナル下流分子の活性化をチロシンリン酸化型シグナル分子に対する抗体を用いたウエスタンブロット法にて検討した。その結果、TCR シグナル伝達を介する IL-2 の産生において非常に重要な役割を担っているキナーゼ分子 ZAP-70 のリン酸化が STAP-2 KO マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞では減弱、STAP-2 Tg マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞では亢進することが分かった。また、刺激に伴う下流のシグナル分子 PLC- $\gamma$ 1、ERK のリン酸化も同様に STAP-2 KO CD4<sup>+</sup>T 細胞では減弱、STAP-2 Tg CD4<sup>+</sup>T 細胞では増強された(Fig.5)。これらの結果から STAP-2 が TCR シグナル伝達を制御することで T 細胞の活性化を増強する分子であることが示唆された。



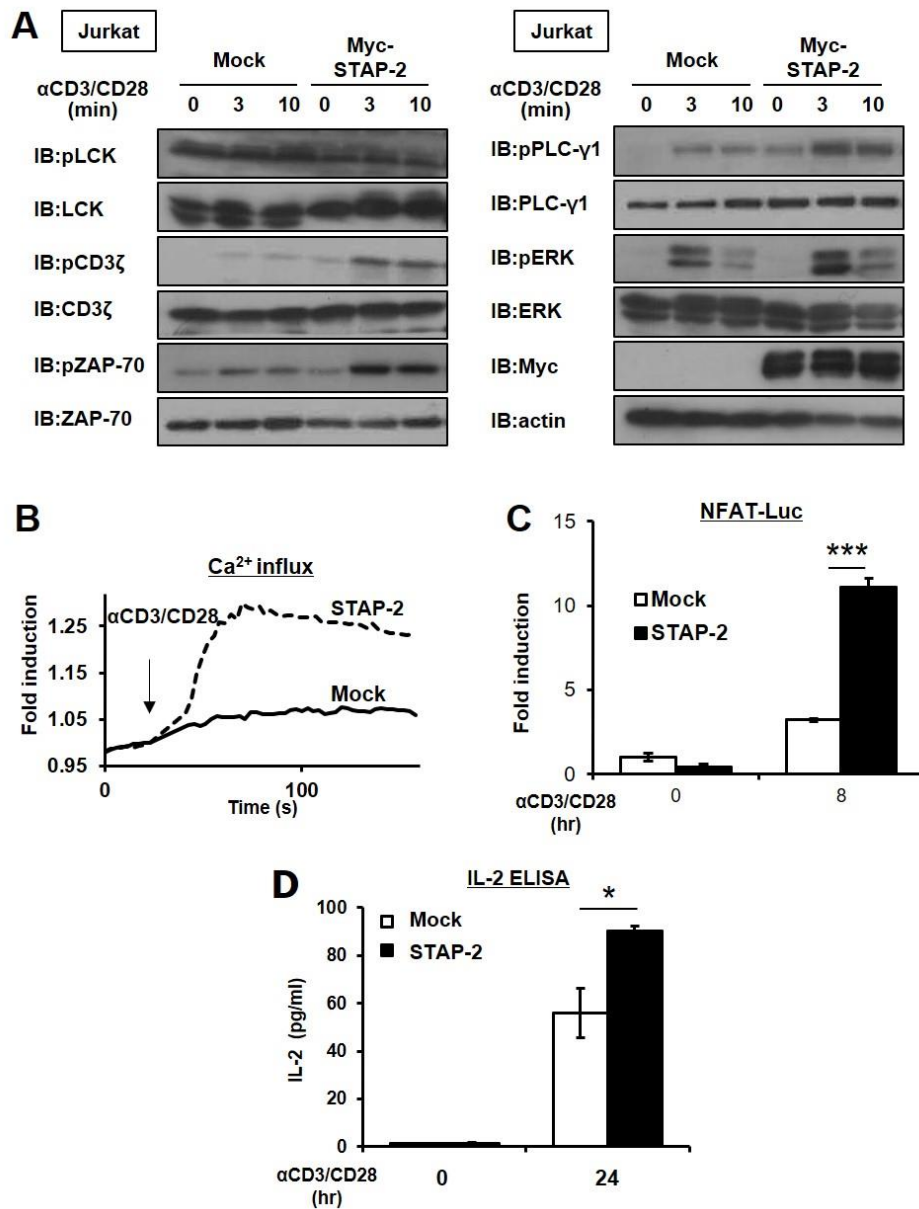
**Fig.5 TCR 刺激によるシグナル分子のチロシンリン酸化における STAP-2 の機能**

WT、STAP-2 KO マウス、STAP-2 Tg マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で経時的に刺激後、細胞溶解液を作製してウエスタンブロットにより各分子特異的抗体及びリン酸化抗体を用いて検出した。

### 1-3-2. TCR シグナル伝達における STAP-2 の機能

次に STAP-2 を介した TCR シグナル伝達の活性化機構をより詳細に解析するためにヒト白血病由来 T 細胞株 Jurkat 細胞に対して pcDNA3.1 ベクター恒常発現 Jurkat 細胞 (Jurkat/Mock) 及び Myc-STAP-2 恒常発現 Jurkat 細胞 (Jurkat/STAP-2) を作製した。これらの細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、TCR シグナル下流分子のチロシンリン酸化がマウス T 細胞を用いた結果と同様に STAP-2 の発現上昇に伴い増強されるかどうか確認した。その結果、Jurkat/STAP-2 において TCR 刺激による ZAP-70、PLC- $\gamma$ 1 等のチロシンリン酸化が亢進した (Fig.6 A)。

Jurkat/STAP-2 細胞では PLC- $\gamma$ 1 のリン酸化亢進が観察された。PLC- $\gamma$ 1 シグナルは T 細胞カルシウム流入に関わり、NFAT を介した IL-2 産生に重要なシグナルである。そこで次に、PLC- $\gamma$ 1 のチロシンリン酸化によって誘導される細胞内応答である T 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  流入、IL-2 を含めた標的遺伝子の発現を誘導する転写因子 NFAT の活性化についても検討を行った。TCR 及び共刺激受容体からの刺激は小胞体や細胞外からの細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こし、T 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させる<sup>20</sup>。カルシウムプローブ Fluo-4 を用いて TCR 刺激に伴う T 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  の流入量を測定したところ、Jurkat/STAP-2 において非常に強い  $\text{Ca}^{2+}$  流入量の上昇が観察された (Fig.6 B)。さらに、Jurkat 細胞に対し NFAT ルシフェラーゼを発現させ、レポーターアッセイを行った結果、STAP-2 の発現によって TCR 刺激で誘導される NFAT の転写活性が有意に亢進されることが分かった (Fig.6 C)。また、TCR 刺激時の IL-2 産生量についても Jurkat/STAP-2 で有意な増加が観察されたことからヒト T 細胞でも STAP-2 が T 細胞活性化を正に制御することが確認された (Fig.6 D)。これらの結果から STAP-2 が TCR を介したシグナル分子のチロシンリン酸化及び活性化に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  流入、NFAT の転写活性を上昇させることで TCR シグナル伝達を正に制御する機能を有することが示唆された。



**Fig.6 TCR シグナル伝達活性化における STAP-2 の寄与**

(A)各細胞株(Jurkat/Mock、Jurkat/STAP-2)を抗 CD3/CD28 抗体で経時的に刺激後、細胞溶解液を作製して WB 法により各分子特異的抗体及びリン酸化抗体を用いて検出した。

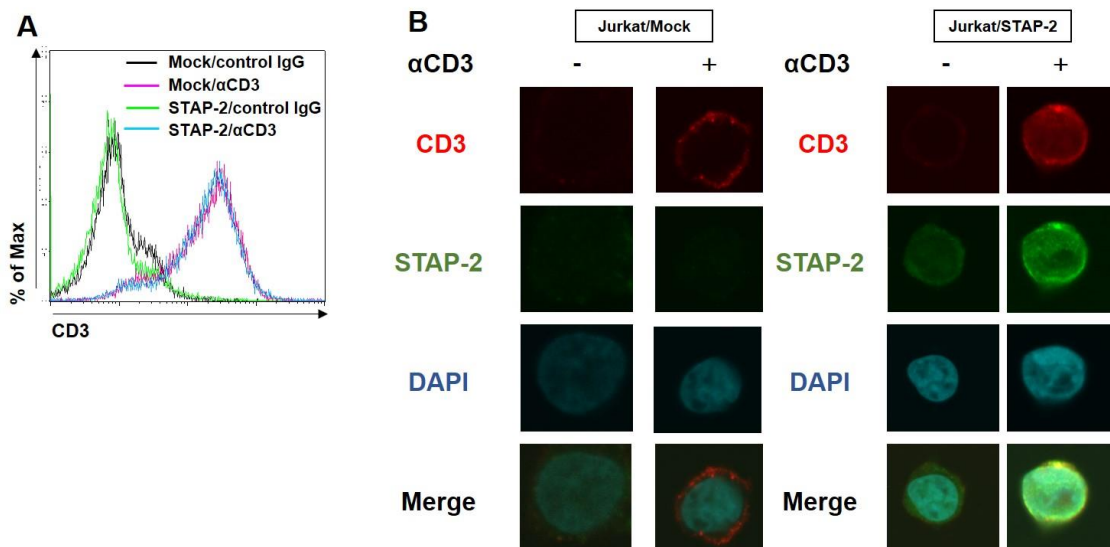
(B) 蛍光プローブをロードした Jurkat/Mock 及び Jurkat/STAP-2 細胞株を抗 CD3/CD28 抗体で刺激しカルシウム流入の変動をマイクロプレートリーダーで測定した。矢印は刺激開始時を示す

(C)各細胞株に NFAT-Luc、phRL-TK を発現させ抗 CD3/CD28 抗体で 8 時間刺激後にルシフェラーゼ活性を測定した。

(D)各細胞株に抗 CD3/CD28 抗体で刺激を行い、24 時間後に培養上清を回収、ELISA 法により IL-2 産生量を測定した。

### 1-3-3. STAP-2 と CD3 の相互作用と細胞内局在の解析

STAP-2 がアダプタータンパク質であることから様々なタンパク質と相互作用し機能を調節することが考えられる。そこで、STAP-2 が TCR シグナル伝達を亢進するその分子機構の解明を目的として 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 CD3 $\zeta$  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 の作用点が LCK の活性化から CD3 $\zeta$  の活性化の間にあると考えられた。まず始めに STAP-2 が CD3 の発現量を調節しているかを明らかにするために T 細胞表面上の CD3 $\zeta$  の発現量をフローサイトメトリーによる解析を行ったところ Jurkat/Mock 株及び Jurkat/STAP-2 株の間で発現量は同程度であった(Fig. 7 A)。次に免疫細胞蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いることで T 細胞内における STAP-2 と CD3 $\zeta$  の細胞内局在を観察した。すると、TCR 未刺激時では細胞全体に発現している STAP-2 が TCR 刺激によって細胞膜近傍へと局在移動し、CD3 $\zeta$  と共局在する様子が観察された(Fig. 7 B)。

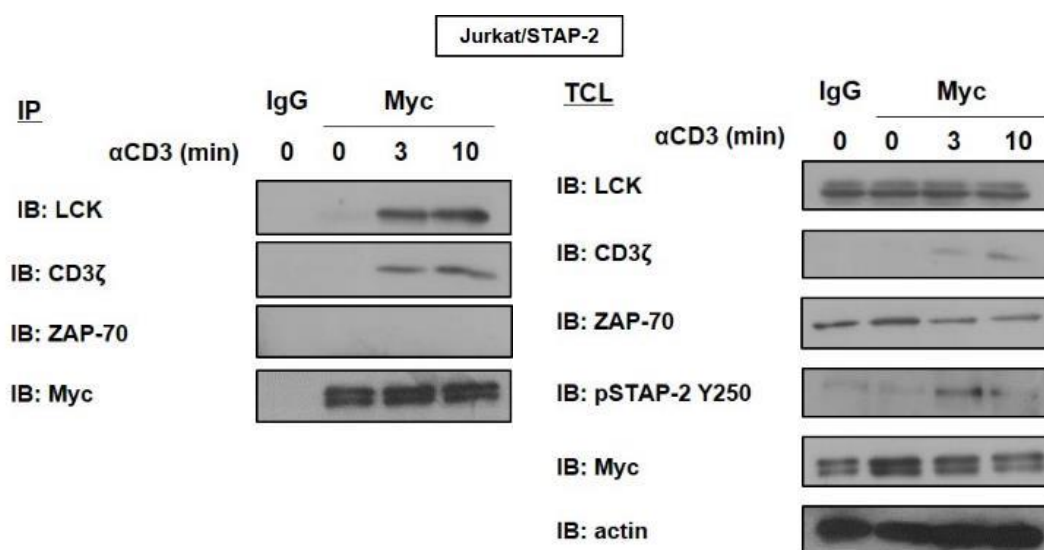


**Fig.7 STAP-2-CD3 間相互作用**

(A)各細胞株(Jurkat/Mock、Jurkat/STAP-2)を FITC 標識抗 CD3 抗体で蛍光染色後、フローサイトメトリー解析を行った。

(B) 各細胞株(Jurkat/Mock、Jurkat/STAP-2)を抗 CD3 抗体で刺激を行い、抗 CD3 抗体(赤)、抗 Myc 抗体(緑)及び DAPI で染色後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

TCR シグナル伝達は TCR 刺激によって CD4 または CD8 と会合しているキナーゼ分子 LCK は活性化され、TCR 複合体構成分子である CD3 $\zeta$  にリクルートされる。そして LCK が CD3 $\zeta$  内の ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) をチロシンリン酸化することで下流分子に対するシグナル伝達が誘導される。STAP-2 が TCR 刺激依存的に細胞膜に移動することから (Fig. 7 B)、STAP-2 が TCR 刺激によって LCK 依存性 CD3 $\zeta$  リン酸化反応を増強する可能性が示された。そこで、まず STAP-2 が CD3 $\zeta$  及び LCK と直接相互作用するかどうか免疫沈降法による解析を行った。すると、Jurkat/STAP-2 細胞において未刺激時では両分子との相互作用が観察されなかった。しかし TCR 刺激により STAP-2 と CD3 $\zeta$  との相互作用が観察された。(Fig. 8)。また、興味深いことに CD3 $\zeta$  のみならず、TCR 刺激によって STAP-2 は LCK とも強く相互作用することが分かった (Fig. 8)。これらの結果から STAP-2 は TCR 刺激依存的に LCK 及び CD3 $\zeta$  両分子と相互作用することで LCK による CD3 $\zeta$  リン酸化を増強する可能性が示された。

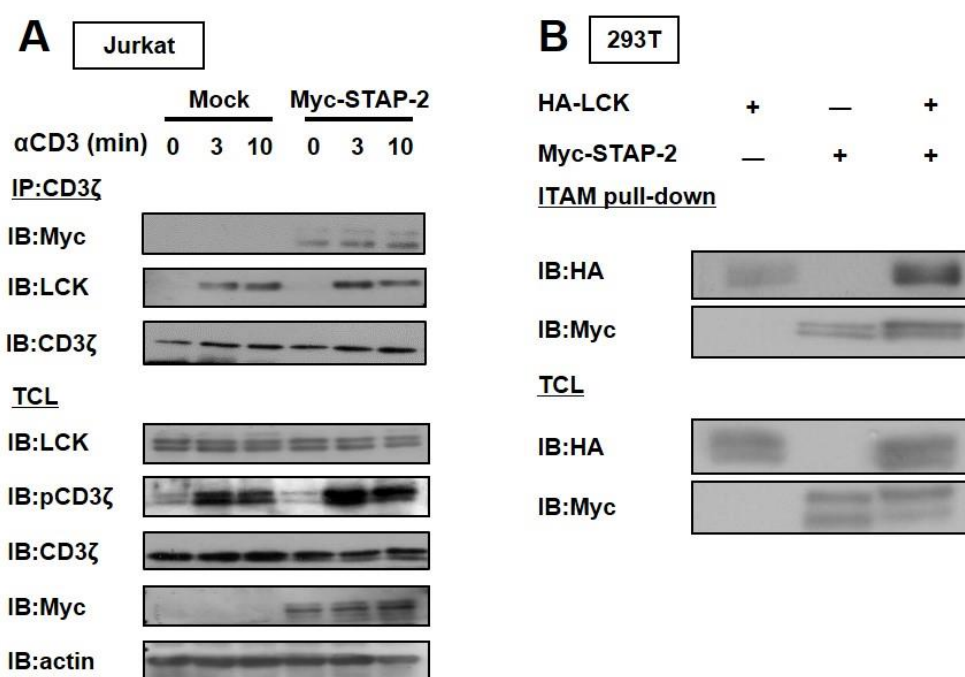


**Fig.8 STAP-2 と LCK/CD3 $\zeta$  相互作用の解析**

Jurkat/STAP-2 を抗 CD3 抗体で経時的に刺激を行い、細胞溶解液を作製してコントロール抗体及び抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降を行い、WB 法にて相互作用の解析を行った。

### 1-3-4. LCK-CD3 $\zeta$ 間の相互作用における STAP-2 の機能ドメインの同定及び機能解析

これまでの結果から STAP-2 が LCK 及び CD3 $\zeta$  とそれぞれ相互作用することが明らかとなった。STAP-2 が TCR シグナル活性化において CD3 $\zeta$  の活性化を亢進する一方で LCK の活性化には影響しないことから、STAP-2 は LCK の CD3 $\zeta$  へのリクルート効率を増強することによって LCK による CD3 $\zeta$  のチロシンリン酸化を正に制御しているのではないかと考えた。そこで、TCR 刺激時における LCK-CD3 $\zeta$  間の相互作用における STAP-2 の機能を解析した。Jurkat/mock においても TCR 刺激後の LCK-CD3 $\zeta$  間の相互作用が誘導されるが Jurkat/STAP-2 では LCK-CD3 $\zeta$  間の相互作用がより増強された(Fig. 9 A)。さらに 293T 細胞で LCK によってリン酸化される CD3 $\zeta$  の ITAM にセファロースビーズを付加させた ITAM ペプチドを用いたプルダウンアッセイを行うことで LCK-CD3 $\zeta$  ITAM 間の相互作用に対する STAP-2 の寄与を解析した。その結果、LCK と ITAM の相互作用が STAP-2 の存在下で増強することが分かった(Fig. 9 B)。また、STAP-2 と ITAM の相互作用が確認されたことから T 細胞においても STAP-2 が CD3 $\zeta$  の ITAM に結合することが示唆された(Fig. 9 B)。



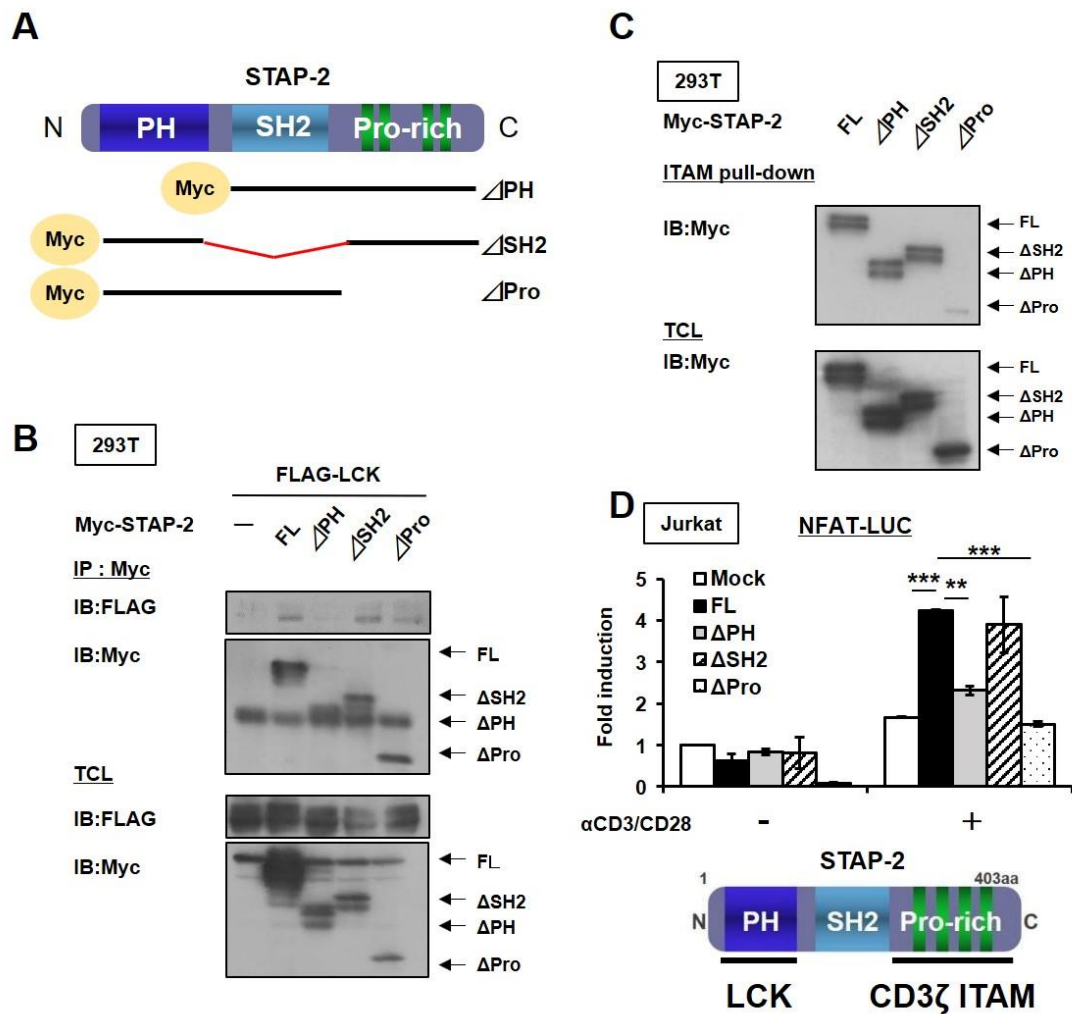
**Fig.9 LCK-CD3 $\zeta$  間相互作用における STAP-2 の機能解析**

(A)各細胞株(Jurkat/Mock、Jurkat/STAP-2)を抗 CD3 抗体で経時的に刺激を行い、細胞溶解液を作製して抗 CD3 $\zeta$  抗体を用いて免疫沈降を行い、WB 法にて相互作用の解析を行った。

(B) 293T 細胞に各プラスミドを導入し、48 時間後に可溶物を作製し、可溶物に CD3 $\zeta$  ITAM ペプチドを用いてプルダウンした。WB 法にて相互作用の解析を行った。



STAP-2 が LCK-CD3 $\zeta$  ITAM 間の相互作用を増強することが明らかになったので次に STAP-2 分子内のどの部位がそれぞれの分子との相互作用に必要なか検討した。STAP-2 は PH ドメイン、SH2 ドメイン、Proline-rich ドメインによって構成されているが、Myc-STAP-2 各ドメイン欠損体を作製し(Fig. 10 A)、293T 細胞に FLAG-LCK と共発現させ、免疫沈降法を行った。その結果、STAP-2 分子内の PH ドメインが LCK との結合に必要であることが分かった(Fig. 10 B)。また、ITAM ペプチドを用いたプルダウンアッセイを行った結果、STAP-2 は Proline-rich ドメインを介して CD3 $\zeta$  ITAM と結合することが分かった(Fig. 10 C)。これらの結果から STAP-2 の PH ドメイン、Proline-rich ドメインが LCK-CD3 $\zeta$  ITAM 間の相互作用の促進とそれに伴う TCR シグナル伝達の活性化に重要であることが考えられた。そこでこの仮説を検証するために Jurkat 細胞に各 STAP-2 ドメイン欠損株を作成し TCR 刺激による NFAT 転写活性をルシフェラーゼアッセイで検討を行った。すると、全長 STAP-2 発現株でみられた TCR 刺激による NFAT 転写活性の亢進が LCK 及び CD3 $\zeta$  との結合に重要な PH ドメイン、Proline-rich ドメイン欠損株では減弱した(Fig. 10 D)。これらの結果から STAP-2 は TCR 刺激後に LCK 及び CD3 $\zeta$  と結合し、それに伴い STAP-2 が LCK-CD3 $\zeta$  間の足場となって 3 分子複合体を形成することによって LCK による CD3 $\zeta$  のリン酸化を効率的に誘導し TCR シグナル伝達の活性化及び IL-2 産生反応に関与していることが明らかとなった。



**Fig.10 LCK/CD3 $\zeta$  相互作用における STAP-2 分子内結合部位の同定及びその機能解析**

(A) STAP-2 各ドメイン欠損体の模式図

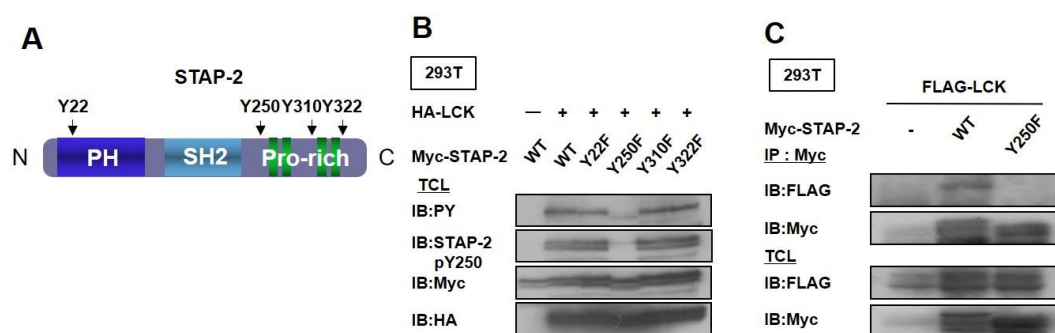
(B) 293T 細胞に各プラスミドを導入し、48 時間後に可溶物を作製し、可溶物に抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降法を行った。その後、WB 法にて相互作用の解析を行った。

(C) 293T 細胞に各プラスミドを導入し、48 時間後に可溶物を作製し、可溶物に CD3 $\zeta$  ITAM ペプチドを用いてプルダウンした。WB 法にて相互作用の解析を行った。

(D) 各細胞株に NFAT-Luc、phRL-TK を発現させ抗 CD3/CD28 抗体で 8 時間刺激後にルシフェラーゼ活性を測定した。

### 1-3-5. STAP-2 Y250 のリン酸化による TCR シグナル伝達制御機構への影響

当研究室ではこれまでに STAP-2 には 4 ヶ所のチロシン残基がキナーゼによってリン酸化を受けることが推定されていること<sup>11</sup>、STAP-2 が細胞内シグナル伝達を制御する際に自身のチロシンリン酸化が重要であることを報告している<sup>17,21</sup>(Fig. 11 A)。STAP-2 がチロシンリン酸化酵素である LCK と結合することから、STAP-2 に存在する 4 ヶ所のチロシン残基が LCK によってリン酸化を受けるかどうかを検討した。まず、リン酸化を受けると予想される STAP-2 のチロシンをフェニルアラニンにそれぞれ置換した STAP-2 YF 変異体を作製した。293T 細胞にこれら STAP-2 YF 変異体と LCK を共発現させ、抗リン酸化チロシン抗体と当研究室で作製した STAP-2 の 250 番目のリン酸化したチロシンを認識する抗 STAP-2 Y250 抗体を用いて STAP-2 のチロシンリン酸化の検討を行った。その結果、STAP-2 WT 及び Y22F、Y310F、Y322F 変異体では LCK によるチロシンリン酸化を受け一方、Y250F 変異体では STAP-2 のリン酸化は検出されなかった(Fig. 11 B)。この結果から STAP-2 は LCK によって 250 番目のチロシン残基がリン酸化をうけることが明らかとなった。様々なシグナル伝達において STAP-2 が機能するうえで自身の 250 番目のチロシン残基のリン酸化が関与することが明らかになっている<sup>21,22</sup>。LCK による STAP-2 チロシンリン酸化反応が Y250F 変異体では観察されなかったため、次に LCK によって STAP-2 がリン酸化を受けることの意義を明らかにするために 293T 細胞に LCK と STAP-2 WT、Y250F 変異体を発現させ免疫沈降法を行うことで LCK と STAP-2 Y250F 変異体の結合能を評価した。その結果、LCK と STAP-2 WT では直接相互作用する一方で STAP-2 Y250F 変異体は LCK との相互作用が観察されなかった(Fig. 11 C)。これらの結果から LCK による STAP-2 の 250 番目のチロシン残基に対するリン酸化が両者の相互作用に重要であることが明らかとなった。



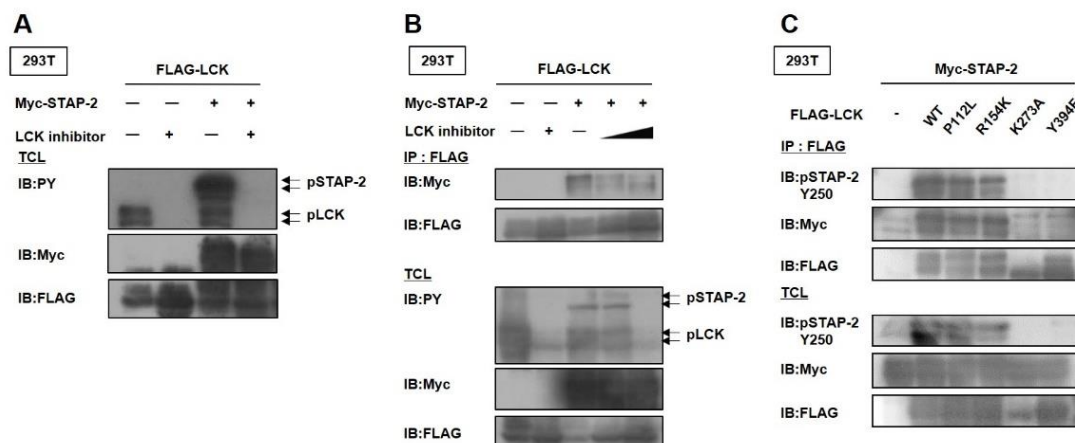
**Fig.11 LCK による STAP-2 のチロリンリン酸化の影響**

(A) STAP-2 各点変異体の模式図

(B) 293T 細胞に各プラスミドを導入し、48 時間後に可溶物を作製し、WB 法にて STAP-2 のリン酸化の解析を行った。

(C) 293T 細胞に各プラスミドを導入し、48 時間後に可溶物を作製した。可溶物に抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降法を行った後、WB 法にて相互作用の解析を行った。

次に STAP-2 と LCK の相互作用に対する LCK のキナーゼ活性に着目して解析を行った。まず、LCK 阻害剤を用いて LCK による STAP-2 のチロシンリン酸化への寄与を検討した。すると両者を発現させた状態で検出された STAP-2 のチロシンリン酸化が LCK 阻害剤の処理によって観察されなくなった(Fig. 12 A)。このことから STAP-2 が LCK 特異的にリン酸化を受けることが確認できたので LCK-STAP-2 間の相互作用に対する LCK のキナーゼ活性の機能を検討するために免疫沈降法を行った。すると、LCK の酵素活性を抑制する阻害剤の未処理時では LCK と STAP-2 間で見られた相互作用がキナーゼ阻害剤処理によって減弱した(Fig. 12 B)。この結果から LCK と STAP-2 の相互作用には LCK のキナーゼ活性の重要性が示唆された。そこで、LCK を構成する SH3 ドメイン、SH2 ドメイン、キナーゼドメインのそれぞれの機能を担うアミノ酸の点変異体(P112L、R154K、K273A、Y394F)を用いて STAP-2 との結合能を確認した<sup>23</sup>。その結果、キナーゼ活性を欠失させた LCK K273A 変異体、自己リン酸化能を欠失させることで活性化型への移行ができない LCK Y394F 変異体では STAP-2 との結合能が大きく減弱した(Fig. 12 C)。これらの結果は LCK と STAP-2 の相互作用において最初の反応として LCK による STAP-2 の 250 番目のチロシン残基のリン酸化が起これ、リン酸化された STAP-2 が LCK との結合能を有することを示唆する結果となった。TCR 刺激によって STAP-2 と LCK の結合が誘導された結果(Fig. 8)と総合すると、TCR シグナル伝達によって STAP-2 が細胞膜近傍の LCK を含めた TCR クラスターに集積し、250 番目のチロシン残基のリン酸化を受けた STAP-2 が LCK と結合し、さらに CD3 $\zeta$  とも結合することで足場を構成し、LCK-CD3 $\zeta$  間の相互作用を増強するという分子機序が考えられた。



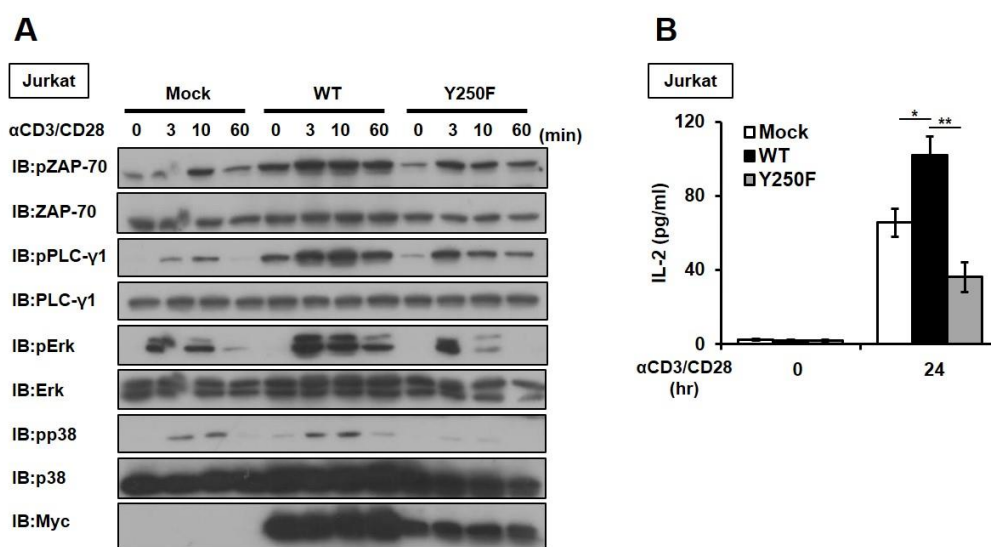
**Fig.12 LCK-STAP-2 間相互作用における LCK の機能解析**

(A) 293T 細胞に各プラスミドを導入し、48 時間後に可溶物を作製し、WB 法にて STAP-2 のリン酸化の解析を行った。また、回収 5 時間前に LCK 阻害剤(5  $\mu$ M)処理を行った。

(B) 293T 細胞に各プラスミドを導入し、48 時間後に可溶物を作製した。抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降法を行った後、WB 法にて相互作用の解析を行った。また、回収 5 時間前に LCK 阻害剤(0.5  $\mu$ M、5  $\mu$ M)処理を行った。

(C) 293T 細胞に各プラスミドを導入し、48 時間後に可溶物を作製し、可溶物に抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降法を行った。その後、WB 法にて相互作用の解析を行った。

STAP-2 の 250 番目のチロシン残基のリン酸化が TCR シグナル伝達にどのような影響を及ぼすかを解析するため、STAP-2 Y250F 変異体を恒常的に発現させた Jurkat 細胞株 (Jurkat/STAP-2 Y250F) を作製し、Jurkat/STAP-2 と比較検討を行った。その結果、Jurkat/STAP-2 で見られた TCR 刺激によって誘導される TCR シグナル分子のチロシンリン酸化及び IL-2 産生の亢進能が Jurkat/STAP-2 Y250F では観察されなかった (Fig. 13 A-B)。これまで得られた本結果から STAP-2 は LCK による 250 番目のチロシン残基のリン酸化を受けることで、TCR シグナルの開始段階で非常に重要な LCK の CD3 $\zeta$  へのリクルート効率の増強を介して T 細胞活性化を正に制御する機能を有することが明らかとなった。



**Fig.13 STAP-2 Y250 リン酸化による TCR シグナル活性化制御の機能解析**

(A)各細胞株(Mock、STAP-2 WT、STAP-2 Y250F)を抗 CD3/CD28 抗体で各時間刺激後、可溶物を作製して WB 法により各分子特異的抗体及びリン酸化抗体を用いて検出した。(B)各細胞株に抗 CD3/CD28 抗体で刺激を行い、24 時間後に培養上清を回収、ELISA 法により IL-2 産生量を測定した。

Mean  $\pm$  SEM \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$

#### 1-4. 考察

本研究では TCR シグナルを介した T 細胞の活性化制御機構におけるアダプタータンパク質 STAP-2 の機能解析を行った。STAP-2 は種々の免疫細胞においてシグナル分子と結合することで細胞内シグナル応答を制御することが報告されているが TCR シグナル伝達を制御するかどうかは明らかにされていなかった。T 細胞株 Jurkat 細胞あるいはマウス由来 CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いて解析を行った結果、STAP-2 は TCR 刺激依存的に TCR シグナル伝達の開始に重要な LCK-CD3 $\zeta$  間の相互作用を増強することで TCR シグナル伝達の活性化を正に制御する分子であることが示された(Fig. 14)。本研究で得られた知見は T 細胞の活性化シグナルを伝達するうえで極めて重要な LCK-CD3 $\zeta$  間の相互作用を調節する STAP-2 の機能と未だ十分に明らかにされていない TCR シグナル伝達の初期段階の分子機構の解明の一助となる。

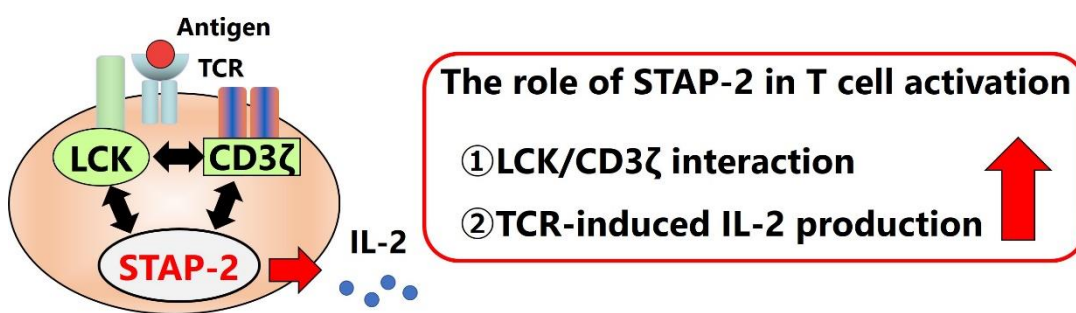


Fig.14 STAP-2 による TCR シグナル伝達制御機構

TCR シグナル伝達は 6 つの鎖で構成される T 細胞受容体が MHC 分子によって提示される抗原ペプチドの認識から開始される。TCR による抗原認識後、細胞膜に存在する Src ファミリーチロシンキナーゼである LCK が活性化され、細胞質へと露出された CD3 $\zeta$  の ITAM へとリクルートされ、ITAM をリン酸化する。リン酸化された ITAM にリクルートされた ZAP-70 は LCK によって活性化されるとアダプタータンパク質 LAT のチロシンリン酸化を介して複数のシグナル経路に情報を伝達する。しかしながら LCK が CD3 $\zeta$  へとどのようにリクルートされるかについては不明な点が多い。本研究から細胞全体に発現している STAP-2 が TCR シグナル伝達の開始に合わせて細胞膜に移動すること(Fig. 7 B)、さらに LCK 及び CD3 $\zeta$  と結合し足場タンパク質として機能することで(Fig. 8)、LCK による CD3 $\zeta$  リン酸化反応の亢進、それに伴う TCR シグナル下流分子のリン酸化と Ca<sup>2+</sup>流入、NFAT の転写活性を上昇させることで IL-2 産生を亢進することを明らかにした(Fig. 6)。また、LCK による ZAP-70 のリン酸化も TCR シグナル伝達には必須であるが、LCK-ZAP-70 の相互作用及びリン酸化に STAP-2 は影響しないことも明らかにしている(データ未掲載)。これらのことから STAP-2 は LCK の CD3 $\zeta$  に対するリクルートを増強する機能を有する重要な分子ではあるが、TCR シグナル伝達において必須な分子である可能性は低いと考えられる。本研究では STAP-2 の欠損による LCK-CD3 $\zeta$  間の相互作用の検討を行えていないため STAP-2 の非存在下で LCK-CD3 $\zeta$  間の相互作用に影響があるのかどうかを解析する必要がある。STAP-2 の欠損によっ

て TCR 刺激による IL-2 産生の減弱が観察されたが完全に産生能が失われることはなかった。本研究では TCR 刺激における IL-2 産生を比較する際に補助刺激である CD28 刺激も同時に行っている。補助刺激が入った際、CD28 は LCK によってリン酸化を受けることでアダプタータンパク質 Grb2 や PI3K のリクルートを誘導し、NF- $\kappa$ B 経路を介した IL-2 の産生に関わることが知られている<sup>24,25,26</sup>。抗 CD3/CD28 抗体刺激時における NF- $\kappa$ B の転写活性が Jurkat/STAP-2 株で有意に亢進されないことから（データ未掲載）、STAP-2 の NF- $\kappa$ B 経路を介した IL-2 産生への関与が弱いと推察される。しかしながら STAP-2 による LCK-CD28 間相互作用における寄与は不明であるため今後の検討課題である。

TCR シグナル伝達においては多数のアダプタータンパク質が関わっている。LAT は ZAP-70 にリン酸化されることによって PLC- $\gamma$ 1 や Grb2 などの複数のタンパク質の足場タンパク質として TCR シグナルを下流へ伝える機能を有する<sup>8,27</sup>。本研究から STAP-2 における TCR シグナル伝達制御機構への機能が明らかとなったが、STAP ファミリーに属するアダプタータンパク質として STAP-2 の他に STAP-1 がある。STAP-1 は酵素 two-hybrid 法により活性型 c-kit を基質に用いたマウス造血幹細胞 cDNA ライブラリーからクローニングされたアダプタータンパク質であり<sup>28,29</sup>、当研究室では STAP-1 が T 細胞活性化を正に制御する結果を得ている（データ未掲載）。多くの組織に発現が認められている STAP-2 とは異なり、STAP-1 は造血系特異的な発現パターンを有している。さらに STAP-1 は PH ドメイン、SH2 ドメインを有し STAP-2 とアミノ酸レベルで 33% のホモロジーを有している。これらの知見から T 細胞の活性化に関して STAP-1 と STAP-2 が同様の作用をもち、お互いに機能を補完している可能性が考えられる。STAP-2 KO CD4<sup>+</sup> T 細胞及び STAP-2 Tg CD4<sup>+</sup> T 細胞で STAP-1 の発現に変化が生じているかどうかは現在検討中である。さらに、STAP-2 と同様に STAP-1 も LCK と結合することが明らかになっていることから LCK と相互作用する際に STAP-1 と STAP-2 が競合しているのかも同様に解析を進めている。

STAP-2 はマスト細胞において CD3 $\zeta$  の類似分子である Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  と結合する一方で ZAP-70 の類似分子である Syk の活性化を抑制することで Fc $\epsilon$ RI を介したシグナルを負に制御することから T 細胞とマスト細胞においては STAP-2 が細胞膜受容体と結合する同一の機能を有しながらシグナル伝達の活性化に関しては相反する機能を有する<sup>14</sup>。ZAP-70 と Syk は ITAM との結合の際に 2 つの SH2 ドメインが ITAM の 2 つのリン酸化チロシンを認識する一方で ZAP-70 と Syk の活性化機序は異なる。ZAP-70 の活性化には Src ファミリー LCK との結合が必須であるのに対し Syk の活性化には Src ファミリー Lyn との結合が必ずしも必要ではなく Lyn 非存在時においても Syk は部分的に活性化される。さらに Syk はキナーゼドメインの自己リン酸化部位である 519 番目のチロシン残基が自身の活性化に必須であり ITAM と結合することによって活性化されることが知られている。STAP-2 が Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  のリン酸化 ITAM と結合するかどうかは不明であるが STAP-2 は CD3 $\zeta$  のリン酸化 ITAM と結合しないことを明らかにしている（データ未掲載）。このことから、マスト細胞においては STAP-2 が Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  のリン酸化 ITAM と結合し、Syk が認識する ITAM のリン酸化チロシンをマスクすることで Syk と ITAM との結合を阻害している可能性が考えられる。

近年、主に NFAT のホスファターゼとしての機能が報告されていたカルシニューリンが TCR シグナル伝達において活性化に伴い LCK 及び CD3 $\zeta$  と結合すること、LCK の CD3 $\zeta$  ITAM に対するリン酸化能を抑制する 59 番目のセリンを脱リン酸化することが報告された<sup>30</sup>。また、LCK には C 末端側のキナーゼドメインにある 505 番目のチロシン残基がキナーゼ分子 CSK によるリン酸化を受けると LCK 自身の SH2 ドメインと結合して不活化状態になる<sup>31, 32</sup>。本研究では STAP-2 がキナーゼ不活化状態の LCK とは結合しないことは明らかにしているが、LCK の 505 番目のチロシンリン酸化や 59 番目のセリンリン酸化に対する影響は解析していないため、これらに対して STAP-2 が関与する可能性を検討する必要がある。

当研究室では STAP-2 の 250 番目のチロシン残基が BRK によってリン酸化を受けることで BRK による STAT3 転写活性を調節していることを報告している<sup>33</sup>。また、T 細胞におけるケモカイン誘導性細胞遊走シグナルにおいても Pyk2 によって STAP-2 の 250 番目のチロシン残基がリン酸化を受けることで Pyk2 との相互作用を増強することを明らかにしている<sup>17</sup>。そこで、STAP-2 がチロシンキナーゼである LCK と刺激依存的に会合することから STAP-2 のチロシン残基が LCK によってリン酸化を受けるかどうか、また TCR シグナル伝達制御機能で STAP-2 のチロシンリン酸化が重要であるか解析を進めた。その結果、LCK によって STAP-2 の 250 番目のチロシン残基がリン酸化を受けること、LCK と STAP-2 の相互作用には 250 番目のチロシン残基が重要であることが分かった。さらに、LCK のキナーゼ活性が失われた状態では STAP-2 と相互作用しないこと、LCK との結合に STAP-2 の Y250 を含む Pro-rich ドメインが欠損すると LCK との相互作用が不完全であることから TCR シグナル伝達制御において STAP-2 の機能はリン酸化依存的であることが予想された。実際に Jurkat/STAP-2 細胞では TCR 刺激による 250 番目のチロシンリン酸化が確認できた(Fig. 8)。そこで STAP-2 ドメイン欠損体、STAP-2 Y250F 変異体発現 Jurkat 細胞を用いて TCR シグナル伝達の機能を解析した結果、NFAT 転写活性の解析で Pro-rich ドメインを欠損させると転写活性の亢進がコントロールと同程度であったこと、Y250F 変異体では TCR シグナル下流分子のチロシンリン酸化と IL-2 の産生が低下したことから STAP-2 の 250 番目のチロシンリン酸化が TCR シグナル伝達を制御するうえで極めて重要な意味合いを持つことが示された。

また、Jurkat 細胞を用いて STAP-2 の細胞局在を顕微鏡で観察したところ STAP-2 が TCR 刺激によって細胞膜近傍へと局在移動することが分かった。STAP-2 は N 末端側に膜指向性を持つ PH ドメインを有していることから刺激依存的に細胞膜付近で TCR シグナルを調節することが考えられる。実際、繊維芽細胞に対する EGF 刺激を行うことで STAP-2 の PH ドメイン依存的な細胞膜への局在移動が観察されている<sup>11</sup>。STAP-2 の PH ドメイン欠損 Jurkat 細胞では NFAT 転写活性の亢進が不十分であることは証明できているが STAP-2 が細胞膜に局在移動することが LCK との相互作用及び TCR シグナル伝達制御に必須であるかは検討を行う必要がある。翻訳後修飾の一つであるパルミトイル化タンパク質の局在や動



態制御に重要な役割を果たすことが知られており、LCK はパルミトイル化されることで細胞膜近傍に局在する<sup>34</sup>。STAP-2 がパルミトイル化を受ける基質タンパク質であるかどうか、もしパルミトイル化を受けるのであれば STAP-2 の機能にパルミトイル化依存的な局在・動態制御が影響を及ぼすか明らかにしていく必要がある。また、STAP-2 Y250F 変異体では TCR シグナル伝達の亢進能が不十分となることから STAP-2 の 250 番目のチロシンリン酸化も細胞内動態において機能する可能性がある。近年、T 細胞と抗原提示細胞あるいは標的細胞との接着面にできる二次元構造として「免疫シナプス」がシグナル伝達を促進するために重要な構造であることが明らかとなった<sup>35</sup>。また、刺激後早期に起こるタンパク質のチロシンリン酸化や細胞内カルシウムの上昇には「TCR マイクロクラスター」と呼ばれる TCR と MHC クラス分子+抗原ペプチドとの結合を機に形成される凝集体が TCR シグナル伝達に関与することも明らかとされた<sup>36,37</sup>。TCR マイクロクラスターには本研究で確認された STAP-2 と結合する LCK や CD3 $\zeta$ 、ZAP-70 がリクルートされることが報告されている。これらのことから STAP-2 のドメイン欠損体、点変異体発現株における STAP-2 の細胞内動態を観察することで STAP-2 の機能が細胞膜近傍でのみ発揮されるかどうか、TCR マイクロクラスターの形成にも関与しているかどうかを明らかにしたい。

## 第 2 章

### 自己免疫疾患における STAP-2 の寄与の検証

## 第2章

### 自己免疫疾患における STAP-2 の寄与の検証

#### 2-1 はじめに

自己免疫疾患は、本来身体に侵入した病原体(非自己)を排除する免疫系が、自己の分子を非自己として認識してしまう獲得免疫の異常によって引き起こされる。現在、自己免疫疾患にはヘルパーT細胞の役割が非常に重要であることが分かっている。ヘルパーT細胞は大きく4つに分類され<sup>38</sup>、細胞内細菌の排除やマクロファージ主体の炎症性疾患にはIFN- $\gamma$ を産生するTh1細胞、寄生虫の排除やアレルギーなどの好酸球主体の疾患にはIL-4を産生するTh2細胞、細胞外細菌や真菌の排除や自己免疫疾患にはIL-17を産生するTh17細胞、また、これらヘルパーT細胞機能を抑制するIL-10やTGF- $\beta$ を産生する制御性T細胞(Treg)が存在する<sup>39,40,41,42</sup>。ヘルパーT細胞の分化は、それぞれが産生するサイトカインにより厳密に制御されることから、免疫系の恒常性維持に密接に関わっている。

多発性硬化症(Multiple sclerosis : MS)は脊髄や脳などの中枢神経組織に炎症が生じることで脱髄性の病変が多発する中枢神経系の自己免疫疾患である<sup>43</sup>。病変部位ではT細胞などのリンパ球の浸潤が観察され、炎症性サイトカインの産生を介した組織炎症による四肢麻痺などを呈する。病因としては様々な要因が考えられるがミエリン鞘由来の抗原を特異的に認識する自己反応性のCD4<sup>+</sup>T細胞の過剰な活性化と神経組織への浸潤が主な要因と考えられている<sup>44,45</sup>。また、中枢神経系の炎症で主に炎症性サイトカインIL-17を産生するTh17細胞の寄与が大きいことが近年の研究から明らかになっている<sup>46</sup>。

STAP-2は様々な組織や細胞に発現し、多様なシグナル伝達への関与が考えられ、これまで当研究室ではT細胞やB細胞、マクロファージなどの免疫細胞におけるSTAP-2の機能を報告している。T細胞におけるSTAP-2機能として、インテグリンを介した細胞接着能亢進やケモカインによる細胞遊走をSTAP-2が亢進すること、T細胞活性化誘導性細胞死(AICD)の亢進に関与することを示してきた。また、第1章ではSTAP-2がTCRシグナル分子との相互作用によりT細胞活性化を亢進することを見出している。しかしながら、生体内におけるSTAP-2の炎症反応や免疫応答の機能に関しては、DSS誘導性大腸炎モデルにおけるマクロファージの機能制御、アナフィラキシーショックモデルにおけるマスト細胞の機能制御について報告しているものの<sup>14,47</sup>、T細胞の活性化による寄与が大きい自己免疫疾患におけるSTAP-2の機能はまだ不明な点が残されている。

本研究ではSTAP-2を介した自己免疫疾患の発症機序の解明を目的としてSTAP-2 KOマウスとSTAP-2 Tgマウスを用いて、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)モデルを用いて解析を進めた。

## 2-2. 実験方法

本研究で用いた実験手法及び試薬類を以下に示す。

### 2-2-1 実験材料及び試薬類

実験に用いた試薬の入手元は以下の通りである。

RPMI 1640	SIGMA
FCS	GIBCO
CFA	Difco
H37Ra	BD
MOG 35-55 peptide	SIGMA
Pertussis toxin	List Biological Laboratories
PMA	SIGMA
Ionomycin	MILLIPORE
Brefeldin A	BioLegend
Fixation buffer for cytokines	eBioscience
Fixation/permeabilization concentrate	eBioscience
Fixation/permeabilization diluent	eBioscience
Permeabilization Buffer	eBioscience
FITC 標識抗マウス TCR V $\alpha$ 3.2 抗体	BioLegend
PE 標識抗マウス TCR V $\beta$ 11 抗体	BioLegend
FITC 標識抗マウス CD4 抗体	BioLegend
PE 標識抗マウス IFN- $\gamma$ 抗体	eBioscience
APC 標識抗マウス IL-17A 抗体	eBioscience
PerCPCy5.5 標識抗マウス CD3 抗体	BioLegend
PE 標識抗マウス Foxp3 抗体	eBioscience
APC 標識抗マウス CD25 抗体	BioLegend
TRI-reagent	SIGMA
RBC Lysis/Fixation Solution (10 $\times$ )	BioLegend
Percoll	GE Healthcare Life Science
ReverTra Ace	TOYOBO
Random Primer	TOYOBO
KAPA SYBR <sup>®</sup> FAST qPCR Kit	KAPA BIOSYSTEMS

その他の試薬は、特に断らない限り市販の特級試薬を用いた。

### 2-2-2. 細胞の培養

マウス脾臓細胞及び中枢神経浸潤細胞は 10%ウシ胎児血清 (FCS、56 °C、30 分間非働化処理)、100 U/mL ペニシリン G、100 µg/mL 硫酸ストレプトマイシン、0.15%NaHCO<sub>3</sub>及び 50 µM 2-ME を含む RPMI を用いて、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

### 2-2-3. マウス脾臓細胞の精製

マウス脾臓からホモジナイザーを用いて脾臓細胞を含む懸濁液を作製し、1,500 rpm、5 分間遠心した細胞ペレットを、PBS 10 mL で2回洗浄し、溶血バッファー[ 150 mM NH<sub>4</sub>Cl、12 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.1mM EDTA、10mM Tris-HCl (pH7.4) ]にて溶血処理を行った。溶血処理は溶血バッファー 2 mLを用いて5分間行った。その後、10% FCSを含むRPMI 10 mLで1回洗浄した細胞集団を脾臓細胞として実験に用いた。

### 2-2-4.中枢神経浸潤細胞の単離

氷冷した PBS 中で脊髄及び脳をホモジナイザーで破碎することで細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を 7 mL にメスアップし、Percoll 溶液を 3 mL 加えて再懸濁して得られた 30 % Percoll 溶液を 70 % Percoll 溶液に添加した。500×g、30 分間遠心した後に界面の細胞を回収して溶血処理を行った後、解析に用いた。

### 2-2-5. RT-PCR 法による解析

#### (1)トータル RNA の調製

細胞もしくは臓器に TRI-Reagent を 1 mL を加えて溶解させ、さらにクロロホルムを 200 µL を加えて激しく攪拌した。室温で 5 分間静置した後に 4 °C、12,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上層(水層)を新しいチューブに移し、等量のイソプロパノールを加えて攪拌し、室温で 5 分間静置した後、4 °C、12,000 rpm で 15 分間遠心分離して RNA を沈殿させた。沈殿した RNA に 70%エタノールを加え、4 °C、12,000 rpm で 10 分間遠心分離することで洗浄を行い、得られた RNA を風乾後に適当量の DEPC 処理滅菌水に溶解させた。得られたトータル RNA は 260 nm の吸光度を NanoDrop Lite を用いて測定する事により定量した。

#### (2)逆転写酵素反応

逆転写酵素反応は ReverTra Ace を用いて行った。トータル RNA 1 µg に対して、ランダムプライマー 25 pmol、5×buffer 4 µL、2 mM dNTP mixture 10 µL、ReverTra Ace 0.5 µL、DEPC 処理滅菌水にて全量 20 µL とし、iCycler (BIO-RAD)にて、30 °Cで 10 分間、42 °Cで 20 分間、99 °Cで 5 分間反応させたものを PCR 反応のテンプレート cDNA として利用した。

#### (3)リアルタイム PCR 反応

リアルタイム PCR 反応は KAPA SYBR® FAST qPCR Kit を用いて行った。cDNA 0.5 µL に対して、10 µM Forward primer 0.3 µL、10 µM Reverse primer 0.3 µL、KAPA SYBR® FASTqPCRMasterMix (2×)Universal 5 µL、滅菌蒸留水 4.9 µL を混和し、全量 10 µL とした。これを Mx3005P™Q-PCR システムにて、95 °Cで酵素反応を 3 分間行った後、同じく 95 °C

で 3 秒間の変性反応、60 °Cで 20 秒間のアニーリング及び伸長反応を 40 サイクル行い、G3PDH を内部標準として相対定量した。使用したプライマーを以下に示す。

#### Mouse STAP-2

Fw: TGCCTCAGTTACCAGACACG

Rv: CTGGTCCAAACGCTGGTAAT

#### G3PDH

Fw: ACCACAGTCCATGCCATCAC

Rv: TCCACCACCCTGTTGCTGTA

### 2-2-6. フローサイトメトリー解析

#### (1) 細胞表面抗原の染色

細胞を FACS バッファー(2% FCS/0.05 % NaN<sub>3</sub>/PBS) に懸濁し、Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (1:100)を加えて室温で 15 分間静置し、抗体の非特異的結合をブロッキングした。細胞懸濁液を 2,000rpm で 1 分間遠心し、FACS バッファーで洗浄した。細胞を再び 100 µL の FACS バッファーで懸濁し、各蛍光標識抗体【FITC anti-mouse CD4 (1:200)、FITC mTCR Vα3.2(1:200)、PE mTCR Vβ11 (1:100)、PerCP Cy5.5 anti-mouse CD3 (1:100)、APC anti-mouse CD25 (1:100)】を加えて冷暗所で 20 分間静置した。細胞を FACS バッファーで 2 回洗浄し、フローサイトメーターGallios (Beckman Coulter)によってデータを取得し、FlowJO (Version 10)で解析した。2D2 マウスの MOG ペプチド特異的 TCR の検出は末梢血の細胞中に mTCR Vα3.2 及び mTCR Vβ11 ダブルポジティブの細胞集団が検出できたマウスを 2D2 マウスとした。

#### (2) 細胞内(サイトカイン及び転写因子)染色

サイトカイン染色を行う場合は単離した脾細胞及び中枢神経浸潤細胞を PMA (50 ng/mL)、Ionomycin (1 µg/mL)、Brefeldin A (1:1000)を含む培養培地で懸濁した。37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 5~6 時間刺激した。刺激した細胞を 4-1-13(1)の手法に従い細胞表面抗原の染色を行った。FACS バッファーで洗浄した後、各 Fixation buffer で懸濁し冷暗所で 30 分間静置した。細胞を Permeabilization バッファーで 2 回洗浄した後、各蛍光標識抗体【PE anti-mouse IFN-γ (1:100)、PE anti-mouse Foxp3 (1:100)、APC anti-mouse IL-17A (1:100)】を加えて冷暗所で 1 晩静置した。その後、細胞を FACS バッファーで 2 回洗浄し、フローサイトメーターGallios (Beckman Coulter)によってデータを取得し、FlowJO (Version 10)で解析した。

### 2-2-7. 使用動物及び飼育条件

C57BL/6 系統バックグラウンドの STAP-2 遺伝子欠損マウスは吉村 昭彦博士 (慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室教授)より恵与され、SPF (Specific pathogen free)条件下で飼育、使用した。

#### 2-2-8. STAP-2 遺伝子導入マウスの作製

STAP-2 cDNA を p1026x ベクターの BamHI クローニングサイトへサブクローニングし、遺伝子導入用プラスミドとした。p1026x ベクターはマウス *lck* 近位プロモーター、免疫グロブリン重鎖エンハンサー、ヒト成長ホルモン(*hGH*)遺伝子カセットを含むベクターである<sup>19</sup>。STAP-2 導入遺伝子は C57BL/6 マウスの受精卵に導入、STAP-2 の発現をジェノタイプニング及び PCR による mRNA 解析にて確認してラインを確立した。

#### 2-2-9. 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) 惹起

7~11 週齢マウスに MOG<sub>35-55</sub> ペプチド (アミノ酸配列 MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) (1 mg/ml) と CFA (H37Ra 結核死菌) (5 mg/ml) を 1:1 で混合して作製したエマルジョンを尾根部に左右 2 か所に分けて皮下投与 (200 µl/匹) し、ペプチド感作当日及び 2 日後に Ptx を尾静脈投与(400 ng/匹)をした。臨床症状評価に関しては以下のスコアを用いて評価した (0:臨床症状無し、1:尾部の軽麻痺、2:運動失調、3:後肢の軽麻痺、4:後肢の麻痺、5:四肢麻痺、6:瀕死、7:死亡)。中和抗体投与群はペプチド感作前日及び 3 日後に 400 µg/匹を腹腔内に投与した。脊髄組織の遺伝子発現解析は 4-1-6 の手法に従った。

#### 2-2-10. 組織染色と病理的評価

2D2 マウス、2D2 / STAP-2 Tg マウスの脊髄組織を 10%ホルマリン溶液中で固定、その後 HE 染色と LFB 染色を行った。HE 染色ではリンパ球の浸潤度合いを評価し、LFB 染色は炎症による脱髄領域を評価した。

#### 2-2-11. 統計処理

最低 3 回以上実験して得られたデータを用いて統計処理を行い、平均値±SEM で表記した。異なるグループ間の統計学的有意差は student の *t* 検定あるいは Mann-Whitney の U 検定を用いて計算し、 $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)のとき、統計学的に有意であるとした。グループ間の EAE のスコアにおける有意差は Mann-Whitney の検定を用いた。両側確率  $P < 0.05$ (\*)のとき、統計学的に有意であるとした。

## 2-3 実験結果

### 2-3-1. 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における STAP-2 の機能解析

実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)はヒトの多発性硬化症 (MS) と病態が類似することから、MS の治療法の解明における自己免疫疾患モデルとして広く用いられ、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<sup>48,49</sup>。EAE の発症メカニズムは末梢組織で活性化したリンパ球が脊髄や脳を含めた中枢神経系(CNS)に浸潤し、炎症性サイトカインの産生を介して炎症を誘導することで脱髄が起こり、四肢麻痺が観察される<sup>50</sup>。STAP-2 が TCR シグナル伝達において LCK/STAP-2/CD3 $\zeta$  の 3 分子複合体形成を介して TCR シグナルの活性化及び IL-2 の産生を正に制御することが *in vitro* の解析から示唆された。TCR シグナル伝達制御機構の機能異常は自己免疫疾患等の免疫疾患の発症や増悪化と深い関連性があることから STAP-2 による TCR シグナルの制御がこれらの疾患の免疫応答に寄与する可能性が考えられる。そこで、自己免疫疾患病態形成に対する STAP-2 の機能を明らかにするため EAE マウスモデルを用いて解析した。

まず病変部位である脊髄内における STAP-2 の mRNA 発現の変化を qPCR により解析した。その結果、STAP-2 mRNA 発現が未発症時と比較して EAE の発症に伴って亢進することが分かった(Fig. 14 A)。本結果により STAP-2 による EAE の病態への寄与が示唆されたため、STAP-2 KO マウス、STAP-2 Tg マウスに EAE を誘導し臨床スコアと体重減少率を WT と比較した。WT では免疫開始から 15 日後程度で臨床スコアがピークに達し体重減少率も最大となった(Fig. 14 B-C)。その後、症状の寛解と体重の回復が観察された(Fig. 14 B-C)。一方で、STAP-2 KO マウスではピーク時の病態スコアと体重減少が抑制し、STAP-2 Tg マウスでは症状の寛解が見られなかった(Fig. 14 B-C)。この結果から、STAP-2 が EAE の病態に関与することが分かった。

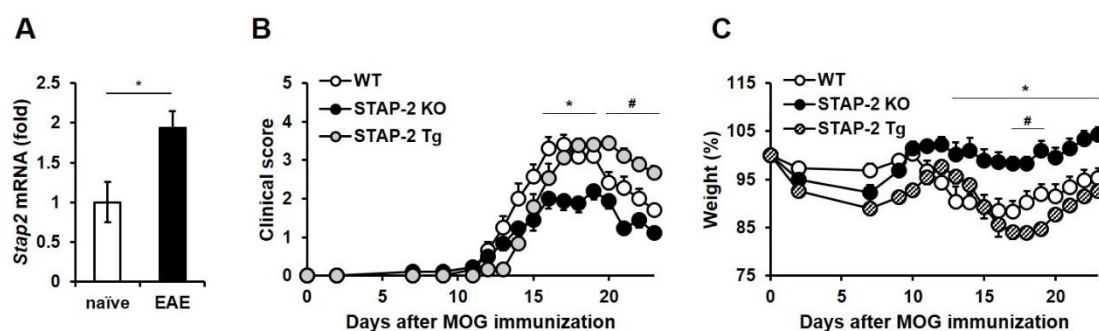


Fig.14 EAE における STAP-2 の機能

(A)EAE 非発症及び発症マウス脊髄組織の STAP-2 mRNA 発現量を qPCR 法にて比較した。  
(B), (C)WT マウス、STAP-2 KO マウス、STAP-2 Tg マウスに EAE を誘導させた際の病態スコアと体重減少率を示した

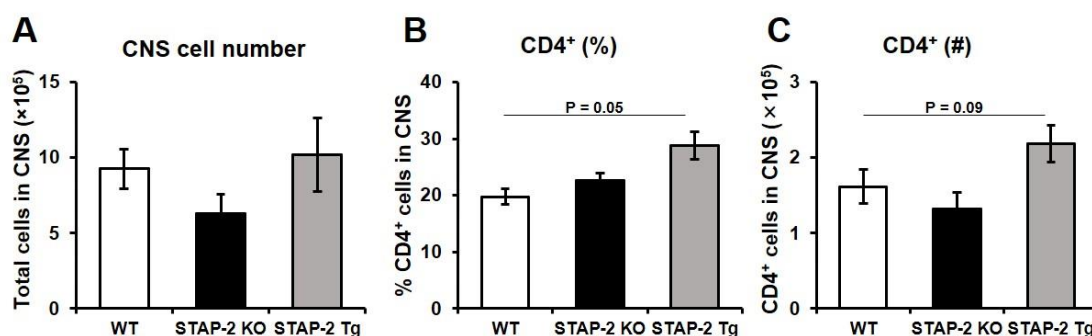
(A) Mean  $\pm$  SEM \* :  $p < 0.05$

(B), (C) Mean  $\pm$  SEM \* :  $p < 0.05$  (WT vs STAP-2 KO) # :  $p < 0.05$  (WT vs STAP-2 Tg)



### 2-3-2. EAE 発症における T 細胞内 STAP-2 の寄与の検証

Fig. 14 の結果から STAP-2 は EAE の病態に関与することが明らかとなったが STAP-2 Tg マウスではリンパ球特異的に STAP-2 が過剰発現していることから EAE の増悪化には B 細胞を含めた T 細胞以外のリンパ球内 STAP-2 が関与している可能性も考えられる。そこで、EAE の増悪化に対する T 細胞内 STAP-2 の寄与をより明確に解析するため、病態ピーク時のマウスより脊髄と脳を採取し、CNS 浸潤細胞数の比較を行った。総浸潤細胞数は WT マウスと比較して STAP-2 KO マウスにおいては減少傾向が見られ STAP-2 Tg マウスにおいては同程度であった(Fig. 15 A)。しかし、CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合と細胞数をフローサイトメトリー解析により比較したところ、STAP-2 KO では変化が見られなかったが STAP-2 Tg マウスでは CD4<sup>+</sup>T 細胞数と割合ともに増加する傾向が観察された(Fig. 15 B-C)。当研究室では過去に STAP-2 が T 細胞の遊走を正に制御する機能を報告しており<sup>16,17</sup>、今回の結果は STAP-2 の T 細胞遊走を亢進する機能が部分的に関与しているものと考えられる。



**Fig.15** 炎症局所(CNS)に対する CD4<sup>+</sup>T 細胞浸潤、遊走における STAP-2 の機能

(A)EAE 発症時のマウス脊髄及び脳組織に浸潤した細胞を計数した。

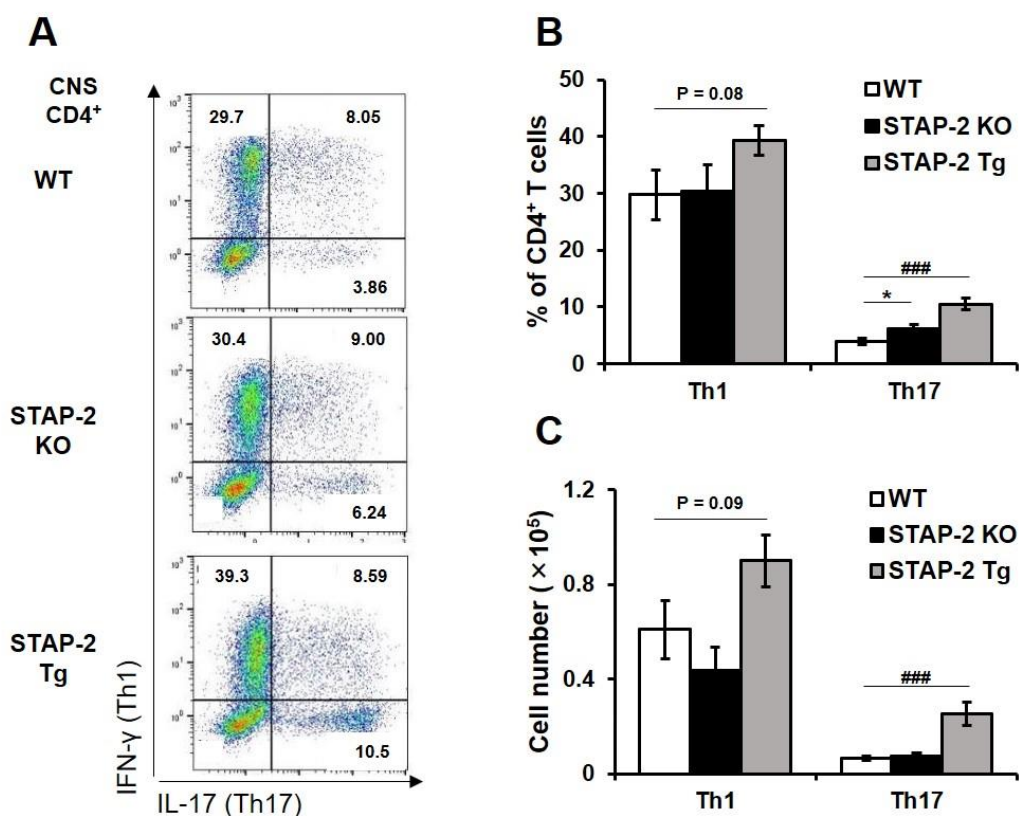
(B)フローサイトメトリー解析によって CNS 浸潤細胞中の CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合を比較した。

(C) CNS 浸潤細胞中の CD4<sup>+</sup>T 細胞数を比較した。

Mean  $\pm$  SEM

EAE の病態にはヘルパーT 細胞(Th 細胞)のサブセットの一つである Th17 細胞が産生する炎症性サイトカイン IL-17 が重要な役割を果たすと考えられる。IL-17 KO マウスや IL-17 中和抗体投与野生型マウスでは EAE の発症や臨床スコアが改善されることから IL-17 産生の制御は自己免疫疾患の病態改善につながると考えられている<sup>51,52</sup>。一方、T 細胞、B 細胞が存在しない *Rag2* 欠損マウスに IFN- $\gamma$  を産生する Th1 細胞を養子移入すると EAE を発症することから IFN- $\gamma$  を産生する Th1 細胞の重要性も示唆されている<sup>53</sup>。そこで EAE 誘導後の STAP-2 KO 及び STAP-2 Tg マウスで IL-17 及び IFN- $\gamma$  産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞数やその割合に変化が生じるか検討を行った。病態ピーク時の CNS 浸潤細胞を PMA と Ionomycin で刺激し、細

胞内サイトカイン染色によるフローサイトメトリー解析を行い IFN- $\gamma$  及び IL-17 産生細胞 (Th1 細胞、Th17 細胞)の割合を測定した。その結果、STAP-2 KO マウス、STAP-2 Tg マウスともに CNS 浸潤 CD4<sup>+</sup> T 細胞中 Th17 細胞の割合が有意に増加していた(Fig.16 A-B)。STAP-2 Tg マウスでは Th17 細胞数も有意に増加していた(Fig.16 C)。一方で STAP-2 KO マウスでは Th17 細胞数では差が見られなかった(Fig.16 C)。これは CNS 浸潤細胞の全体数及び CD4<sup>+</sup> T 細胞数がやや減少していることが原因と考えられる(Fig. 15 A、C)。これらの結果から EAE において STAP-2 が Th17 細胞への分化及び IL-17 産生を調節することで病態の増悪化に関与することが示唆された。



**Fig.16** 炎症局所(CNS)における Th1/Th17 細胞の分化に対する STAP-2 の機能

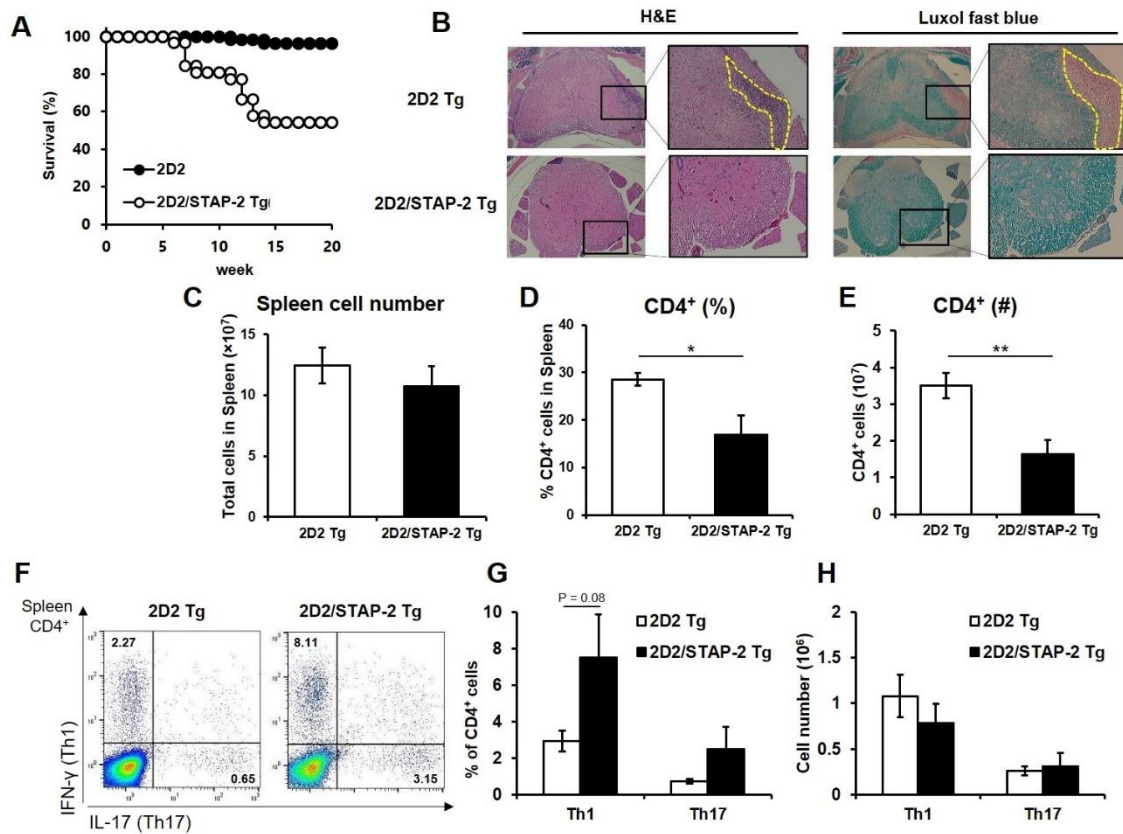
(A)ピーク時の CNS 浸潤 CD4<sup>+</sup> T 細胞における Th1/Th17 細胞の代表的なフローサイトメトリー図

(B) CNS 浸潤 CD4<sup>+</sup> T 細胞における Th1/Th17 細胞の割合を比較した。

(C) CNS 浸潤 CD4<sup>+</sup> T 細胞中の Th1/Th17 細胞数を比較した。

### 2-3-3. MOG 特異的 T 細胞の活性化における STAP-2 の機能解析

Fig. 14-16 の結果から STAP-2 は IL-17 の主要な産生細胞である Th17 細胞の増加によって EAE の病態増悪化に関与することが分かった。また、STAP-2 Tg マウスでは CNS 浸潤 CD4<sup>+</sup> T 細胞中で Th17 細胞のみならず Th1 細胞の割合及び細胞数も増加する傾向が観察された (Fig. 16)。多発性硬化症や関節リウマチ等の自己免疫疾患において抗原反応性 T 細胞の活性化異常が病態の増悪化に強く起因することが知られている<sup>54,55</sup>。このことから、病態に関与する MOG 抗原反応性 T 細胞の活性化異常やそれに伴う Th17 細胞の分化異常に STAP-2 が何らかの役割を担っている可能性が考えられた。EAE マウスモデルでは MOG 反応性 T 細胞は一部分であり、この抗原特異的 T 細胞内の STAP-2 が直接 EAE 病態形成に関わるかどうかを解析することは不可能である。近年、MOG 特異的 TCR を発現したマウスである 2D2 マウスが広く自己免疫疾患研究で使われており、本研究においても抗原特異的 T 細胞内 STAP-2 の機能解析を行うのに有用であると考えた。そこで、より詳細な MOG ペプチド特異的 T 細胞の活性化における STAP-2 の影響を解析するため、MOG ペプチドを特異的に認識する TCR を発現した T 細胞を有する 2D2 Tg マウスと STAP-2 Tg マウスを交配し、2D2/STAP-2 Tg マウスを樹立した。2D2 TCR の発現は TCR V $\beta$ 11 及び TCR V $\alpha$  3.2 に対する抗体<sup>56</sup>を用いたフローサイトメトリーにて確認した(データ未掲載)。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>56</sup>、当研究室でも約 5%とわずかではあるが生後 10~12 週経過すると EAE の自然発症が観察された。しかし、驚くべきことに生後 8 週齢で約 50%の 2D2/STAP-2 Tg マウスは EAE を自然発症し、さらに発症したマウスのほとんどが生後 15 週齢で死亡する結果が得られた (Fig. 17 A)。これらのマウスを病理学的に解析するため、それぞれ生後 8~10 週齢のマウスの脊髄組織を HE 染色とルクソールファストブルー (LFB) 染色を行い、2D2/STAP-2 Tg マウスでは脊髄組織に白血球が浸潤している様子が観察された (Fig. 17 B)、LFB 染色では脊髄の炎症による髄鞘の脱落がみられた (Fig. 17 B)。そこで、フローサイトメトリー解析による EAE 発症前(生後 6~8 週齢)の脾臓の総細胞数と CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合と細胞数を比較した。その結果、総細胞数に差は見られなかったが、脾臓内 CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合及び細胞数が 2D2/STAP-2 Tg マウスで減少していた (Fig. 17 C-E)。また、細胞内サイトカイン染色によるフローサイトメトリー解析を行った結果、2D2/STAP-2 Tg マウスで Th1 細胞及び Th17 細胞の細胞数に大きな変化は観察されなかったが、割合が上昇傾向であった (Fig. 17 F-H)。以上の結果から STAP-2 は MOG ペプチド特異的 T 細胞の Th1 細胞及び Th17 細胞応答の亢進を介して EAE の増悪化を正に制御することを示唆している。これらの結果から STAP-2 は生体内においても抗原特異的な T 細胞応答を促進するために TCR シグナルを正に制御する重要な因子として機能することが示された。



**Fig.17 MOG ペプチド特異的 T 細胞応答における STAP-2 の機能**

(A)2D2 Tg、2D2 / STAP-2 Tg マウスの出生後の自然発症型 EAE による生存率。

(B)8~10 週齢の 2D2 Tg、2D2/STAP-2 Tg マウスの脊髄組織の HE 染色、LFB 染色像。

HE 染色ではでリンパ球の浸潤度合い、LFB 染色では、髄鞘の損傷度合いを観察した。

(C)通常時の脾臓全細胞数を比較した。

(D)脾臓細胞中における CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合を比較した。

(E)脾臓細胞中における CD4<sup>+</sup> T 細胞数を比較した。

(F)脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞における Th1/Th17 細胞のフローサイトメトリー図

(G)脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞における Th1/Th17 細胞の割合を比較した。

(H)脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞における Th1/Th17 細胞数を比較した。

Mean ± SEM \* : p < 0.05 \*\* : p < 0.01

## 2-4. 考察

本研究ではマウス EAE モデルを用いた解析から STAP-2 が抗原特異的な CD4<sup>+</sup>T 細胞の浸潤、及び Th17 細胞の分化や活性化を亢進することで病態の増悪化に関与することが明らかとなった。これまでの報告において、自己免疫疾患モデルを用いて生体内における STAP-2 の機能は明らかにされていなかった。多発性硬化症及びマウス EAE モデルにおいて発症機序やその詳細な分子機構は多くが明らかにされていないなかで本研究はアダプタータンパク質 STAP-2 の関与を示すことができ、自己免疫疾患発症機序の解明の一助となると考えられる。

これまでに当研究室では STAP-2 は自然免疫やアレルギー反応等の免疫系におけるシグナル伝達を制御することを報告しており、近年、自然免疫とアレルギー反応の動物モデルに関しては STAP-2 の個体レベルでの機能も見出している<sup>14,47</sup>。しかしながら、T 細胞における STAP-2 の機能は多くの報告を行っているものの、個体レベルでの T 細胞の活性化における STAP-2 の機能解明は未だ十分な解析は進んでいない。本研究では多発性硬化症のマウスモデルである EAE において STAP-2 KO マウスではピーク時の臨床スコアが抑制、STAP-2 Tg マウスでは寛解が遅れることが分かった。また、重要なことに STAP-2 Tg マウスにおいては CNS 浸潤細胞中における Th1/Th17 細胞の割合が増加していることから STAP-2 が T 細胞の分化調節機構にも関与することが示唆された。本研究論文第 1 章で STAP-2 を介した T 細胞の活性化制御のメカニズムは明らかになったものの Th 細胞への分化制御における STAP-2 の機能や分子メカニズムの詳細は未だ不明であり、今後の課題である。CD4<sup>+</sup>T 細胞の分化は TCR シグナルと共刺激シグナル、そしてサイトカインのシグナルによって厳密に制御されている。EAE は前述したとおり T 細胞の活性化により生じる中枢神経系の自己免疫疾患であり、病態形成には様々な要因が関わっているが、を生じる要因は様々であるがその中でも炎症性サイトカインである IL-17 が主要な役割を果たすと考えられる<sup>51</sup>。IL-17 の産生には炎症性サイトカインである IL-6 刺激による STAT3 の転写活性の増強を介した Th17 細胞への分化が非常に重要である。第 1 章では STAP-2 が T 細胞活性化時に転写因子である NFAT の活性化を亢進することを見出しており、過去の報告から抗 CD3/CD28 抗体による共刺激時によって NFAT 転写活性及び IL-17 の産生量が上昇することが分かっている<sup>57,58</sup>。また、肝細胞において STAP-2 が直接的に IL-6 刺激による STAT3 の転写活性を正に制御することを報告している<sup>11</sup>。これらのことから、STAP-2 が炎症応答時、T 細胞においても IL-6/STAT3 シグナルを亢進させることで Th17 細胞の分化及び IL-17 産生を亢進させている可能性が挙げられる。今後、CD4<sup>+</sup>T 細胞における IL-6 シグナルにおいても STAP-2 が同様に STAT3 の活性化を亢進することで IL-17 発現の亢進に関与するかどうか、Th17 細胞の分化に関与するかどうかを検討する必要がある。

当研究室では T 細胞における STAP-2 の機能としてケモカイン SDF-1 $\alpha$  誘導性の細胞遊走を亢進することを報告している<sup>16,17</sup>。MS の患者の病変部位における SDF-1 $\alpha$  の増加が認められていること、STAP-2 の関与が明らかになっている重要な細胞遊走シグナル経路の一つ

である Pyk2 シグナルの下流分子 VAV KO マウスで EAE が抑制されることから MS の病態には CD4<sup>+</sup> T 細胞の分化や活性化だけではなく遊走の異常も関与することが示唆されている<sup>59,60</sup>。実際に CNS 浸潤細胞中における CD4<sup>+</sup> T 細胞数は STAP-2 KO マウスでは減少、STAP-2 Tg マウスでは増加している傾向が見られた。近年、STAP-2 が活性化を調節している Cdc42 の活性化を制御する LRCH がケモカイン誘導性の CD4<sup>+</sup> T 細胞遊走を抑制することで EAE の病態を改善することが報告された<sup>61</sup>。これらのことから EAE において STAP-2 が Th17 細胞への分化及び IL-17 産生を調節するのみならず、ケモカイン誘導性の CD4<sup>+</sup> T 細胞の遊走への機能も調節することで EAE の病態に寄与することも考えられる。本研究で行った WT マウス、STAP-2 KO マウス、STAP-2 Tg マウスにおける病態ピーク時における脾臓やリンパ節を含めた末梢組織の CD4<sup>+</sup> T 細胞を解析することで EAE における STAP-2 の炎症局所への CD4<sup>+</sup> T 細胞遊走能の機能も併せて解析を進めている。

本研究で用いられている STAP-2 Tg マウスはリンパ球特異的 STAP-2 を発現するマウスであることから、リンパ球における STAP-2 の機能解析に用いることが出来る。一方でこのマウスで利用したプロモーター/エンハンサーは、T 細胞のみならず B 細胞を含めた他のリンパ球にも STAP-2 を発現させることから、STAP-2 Tg マウスの EAE の増悪化には他のリンパ球の STAP-2 機能が関与していることが考えられる。EAE の制御機構において多くは T 細胞の関与が報告されているが B 細胞の関与を示唆する報告もされている<sup>62,63</sup>。しかし、本研究では STAP-2 Tg マウスにおける CNS 浸潤 CD4<sup>+</sup> T 細胞中の Th1 細胞と Th17 細胞の割合及び細胞数の増加傾向が観察された。MS、EAE の発症及び増悪化に関してはミエリン鞘特異的な自己反応性 CD4<sup>+</sup> T 細胞の活性化と Th1/Th17 細胞への分化によって誘導されることが知られている。このことから STAP-2 は CD4<sup>+</sup> T 細胞の中でも MOG 抗原特異的な CD4<sup>+</sup> T 細胞の活性化及び分化に対する寄与が大きい可能性が考えられた。そこで MOG 抗原特異的な CD4<sup>+</sup> T 細胞における STAP-2 の機能をより明確にするために、MOG ペプチド特異的な TCR を発現させた 2D2 Tg マウス、2D2/STAP-2 Tg マウスを樹立し、EAE を誘導して活性化された T 細胞を分離し、養子移入によって EAE の病態に差が出るか解析することで EAE における STAP-2 の機能が T 細胞によるものかどうか判別が可能である。そこで、それぞれのマウスを樹立したところ、約 50% の 2D2/STAP-2 Tg マウスで EAE の自然発症が観察され、さらに全例が寛解せず死亡する結果が得られた。STAP-2 は CD8<sup>+</sup> T 細胞における IL-21 を介した STAT3 シグナルを亢進すること、2D2 マウスに IL-21 受容体を欠損させた 2D2/IL-21R KO マウスでは EAE の自然発症が観察されないことから抗原特異的な T 細胞応答において STAP-2 は IL-21 を介した STAT3 シグナルに寄与する可能性も考えられるもののその詳細は不明であることから今後の解析が必要である<sup>64,65</sup>。さらに、定常時における脾臓中の Th1/Th17 細胞の割合の増加傾向が 2D2/STAP-2 Tg マウスで認められた。ただ、脾臓中における CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合及び細胞数が減少していることもわかった。この現象は WT マウスと STAP-2 Tg マウスにおいても同様の減少が観察されることから(データ未掲載)、STAP-2 が T 細胞の初期分化に影響及ぼす可能性が考えられるが今後の検討課題である。また、脾臓を含めた末梢リンパ組織の CD4<sup>+</sup> T 細胞が中枢神経組織に浸潤している可能性も考えられ

るので通常はほぼ観察されない脊髄や脳への CD4<sup>+</sup>T 細胞の浸潤が 2D2/STAP-2 Tg マウスで観察されるかについても解析が必要である。多発性硬化症は 20~30 代の成人に多く見られ、予兆なしに自然発症することから、2D2/STAP-2 Tg マウスのリンパ球におけるより詳細な解析は多発性硬化症の初期症状及び寛解のメカニズムの解明につながると考えられる。今後は 2D2/STAP-2 Tg マウスの MOG 抗原特異的な CD4<sup>+</sup>T 細胞を用いた養子移入実験、MOG 抗原特異的な CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖能、活性化能、分化能のより詳細な解析を行うことで EAE における T 細胞内の STAP-2 機能を明らかにしたい。

## 終章



## 終章

本研究では STAP-2 による T 細胞活性化制御における新たな機能解明を試みた。第 1 章では TCR シグナル伝達制御機構における STAP-2 の機能について、第 2 章では自己免疫疾患における STAP-2 の機能解析を行った。その結果、STAP-2 が TCR シグナル伝達を介した T 細胞活性化を正に制御することを明らかにした。さらに詳細な分子機構の解析を行い、STAP-2 が TCR シグナルの開始に重要な LCK-CD3 $\zeta$  間の相互作用を増強することを明らかにした。本研究により明らかになった STAP-2 の機能は TCR シグナル伝達において LCK がどのように CD3 $\zeta$  ヘリクルートされるのかという解明が不十分であった作用機構に STAP-2 が両者の複合体形成の足場として機能することを明らかにした点で非常に重要である。また、STAP-2 が自身の 250 番目のチロシン残基のリン酸化依存的に TCR シグナル伝達を制御することを示すことができた。この結果から STAP-2 のリン酸化が新たな T 細胞活性化の指標として用いることが可能であると考えられる。

また、本研究は STAP-2 が T 細胞の活性化の寄与が大きいとされる自己免疫疾患の一つである多発性硬化症のマウスモデル EAE を用いて STAP-2 による自己免疫応答における未知の機能を明らかにし、さらに抗原特異的 T 細胞内 STAP-2 の発現が EAE の自然発症に極めて重要であることが示された。EAE の発症に伴って病変部位での STAP-2 の発現が認められたことから現在は同定されていない STAP-2 遺伝子 SNPs と自己免疫の関連性を詳細に解析することで、STAP-2 を含めた多発性硬化症の新たな診断マーカーの獲得に繋がることが期待できる。また、近年は脳梗塞やアルツハイマー病などの中枢神経疾患と T 細胞との関連が示唆される報告もあることから、本研究による自己免疫応答における T 細胞活性化及び分化の制御に対する STAP-2 の機能解析は多発性硬化症を含め、未だ根本的な治療方法がない中枢神経疾患に対する発症メカニズムの解明、新規治療薬の開発の一助となることが考えられる。

今後は STAP-2 がどのように抗原特異的な T 細胞応答を活性化することで自己免疫疾患増悪化に関与するのか、Th17 細胞の分化に関わっているのかをナイーブ T 細胞を用いた T 細胞分化誘導実験や他の Th17 細胞が関与する疾患モデルを用いてより詳細に解析し T 細胞における STAP-2 の機能の全体像を明らかにする。また、STAP-2 が T 細胞の活性化を制御することが分かったが STAP-2 自身の発現がどのように制御されているかに関しては不明であるため、STAP-2 の発現は T 細胞の活性化によって誘導されるのか、発現を制御する分子機構についても今後解析を進めていく必要がある。本研究並びに今後の研究を遂行することで新規 T 細胞機能調節機構及び T 細胞を介する免疫疾患制御機構が明らかになり、多発性硬化症を含む様々な免疫系疾患の治療薬開発、さらには、人々の健康的な生活の営みへ貢献に繋がることが期待する。

## 参考文献

1. Xavier, R.J. & Podolsky, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**, 427-434 (2007).
2. Guo, L. *et al.* Innate immunological function of TH2 cells in vivo. *Nat Immunol* **16**, 1051-1059 (2015).
3. Stepensky, P. *et al.* Deficiency of caspase recruitment domain family, member 11 (CARD11), causes profound combined immunodeficiency in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 477-485 e471 (2013).
4. Chyuan, I.T., Tsai, H.F., Wu, C.S., Sung, C.C. & Hsu, P.N. TRAIL-Mediated Suppression of T Cell Receptor Signaling Inhibits T Cell Activation and Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol* **9**, 15 (2018).
5. Gaud, G., Lesourne, R. & Love, P.E. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **18**, 485-497 (2018).
6. Aki, D. *et al.* The E3 ligases Itch and WWP2 cooperate to limit TH2 differentiation by enhancing signaling through the TCR. *Nat Immunol* **19**, 766-775 (2018).
7. Li, Y., He, X., Schembri-King, J., Jakes, S. & Hayashi, J. Cloning and characterization of human Lnk, an adaptor protein with pleckstrin homology and Src homology 2 domains that can inhibit T cell activation. *J Immunol* **164**, 5199-5206 (2000).
8. Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P. & Samelson, L.E. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**, 83-92 (1998).
9. Wu, J., Motto, D.G., Koretzky, G.A. & Weiss, A. Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* **4**, 593-602 (1996).
10. Mitchell, P.J., Sara, E.A. & Crompton, M.R. A novel adaptor-like protein which is a substrate for the non-receptor tyrosine kinase, BRK. *Oncogene* **19**, 4273-4282 (2000).
11. Minoguchi, M. *et al.* STAP-2/BKS, an adaptor/docking protein, modulates STAT3 activation in acute-phase response through its YXXQ motif. *J Biol Chem* **278**, 11182-11189 (2003).
12. Ikeda, O. *et al.* STAP-2 negatively regulates both canonical and noncanonical NF-kappaB activation induced by Epstein-Barr virus-derived latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol* **28**, 5027-5042 (2008).
13. Sekine, Y. *et al.* Modulation of TLR4 signaling by a novel adaptor protein signal-transducing adaptor protein-2 in macrophages. *J Immunol* **176**, 380-389 (2006).
14. Sekine, Y. *et al.* Signal-transducing adaptor protein-2 controls the IgE-mediated, mast cell-mediated anaphylactic responses. *J Immunol* **192**, 3488-3495 (2014).

15. Sekine, Y. *et al.* Signal-transducing adaptor protein-2 regulates integrin-mediated T cell adhesion through protein degradation of focal adhesion kinase. *J Immunol* **179**, 2397-2407 (2007).
16. Sekine, Y. *et al.* Signal-transducing adaptor protein-2 regulates stromal cell-derived factor-1 alpha-induced chemotaxis in T cells. *J Immunol* **183**, 7966-7974 (2009).
17. Saitoh, K. *et al.* STAP-2 interacts with Pyk2 and enhances Pyk2 activity in T-cells. *Biochem Biophys Res Commun* **488**, 81-87 (2017).
18. Sekine, Y. *et al.* Signal-transducing adaptor protein-2 modulates Fas-mediated T cell apoptosis by interacting with caspase-8. *J Immunol* **188**, 6194-6204 (2012).
19. Iritani, B.M., Forbush, K.A., Farrar, M.A. & Perlmutter, R.M. Control of B cell development by Ras-mediated activation of Raf. *EMBO J.* **16**, 7019-7031 (1997).
20. Byrum, J.N., Van Komen, J.S. & Rodgers, W. CD28 sensitizes TCR Ca(2)(+) signaling during Ag-independent polarization of plasma membrane rafts. *J Immunol* **191**, 3073-3081 (2013).
21. Sekine, Y. *et al.* Leukemia inhibitory factor-induced phosphorylation of STAP-2 on tyrosine-250 is involved in its STAT3-enhancing activity. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 517-522 (2007).
22. Sekine, Y. *et al.* STAP-2 interacts with and modulates BCR-ABL-mediated tumorigenesis. *Oncogene* **31**, 4384-4396 (2012).
23. Yamasaki, S., Takamatsu, M. & Iwashima, M. The kinase, SH3, and SH2 domains of Lck play critical roles in T-cell activation after ZAP-70 membrane localization. *Mol Cell Biol* **16**, 7151-7160 (1996).
24. Dobbins, J. *et al.* Binding of the cytoplasmic domain of CD28 to the plasma membrane inhibits Lck recruitment and signaling. *Sci Signal* **9**, ra75 (2016).
25. Schneider, H., Cai, Y.C., Prasad, K.V., Shoelson, S.E. & Rudd, C.E. T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras. *Eur J Immunol* **25**, 1044-1050 (1995).
26. Cai, Y.C. *et al.* Selective CD28pYMNM mutations implicate phosphatidylinositol 3-kinase in CD86-CD28-mediated costimulation. *Immunity* **3**, 417-426 (1995).
27. Finco, T.S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L.E. & Weiss, A. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* **9**, 617-626 (1998).
28. Ohya, K. *et al.* Molecular cloning of a docking protein, BRDG1, that acts downstream of the Tec tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11976-11981 (1999).
29. Masuhara, M. *et al.* Molecular cloning of murine STAP-1, the stem-cell-specific adaptor protein containing PH and SH2 domains. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 697-703 (2000).
30. Dutta, D. *et al.* Recruitment of calcineurin to the TCR positively regulates T cell

- activation. *Nat Immunol* **18**, 196-204 (2017).
31. Philipsen, L. *et al.* De novo phosphorylation and conformational opening of the tyrosine kinase Lck act in concert to initiate T cell receptor signaling. *Sci Signal* **10** (2017).
  32. Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J. & Harrison, S.C. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell* **3**, 629-638 (1999).
  33. Ikeda, O. *et al.* STAP-2 is phosphorylated at tyrosine-250 by Brk and modulates Brk-mediated STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun* **384**, 71-75 (2009).
  34. Paige, L.A., Nadler, M.J., Harrison, M.L., Cassady, J.M. & Geahlen, R.L. Reversible palmitoylation of the protein-tyrosine kinase p56lck. *J Biol Chem* **268**, 8669-8674 (1993).
  35. Huppa, J.B. & Davis, M.M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983 (2003).
  36. Yokosuka, T. *et al.* Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat Immunol* **6**, 1253-1262 (2005).
  37. Rossy, J., Owen, D.M., Williamson, D.J., Yang, Z. & Gaus, K. Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signaling. *Nat Immunol* **14**, 82-89 (2013).
  38. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W.E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol* **28**, 445-489 (2010).
  39. Lighvani, A.A. *et al.* T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15137-15142 (2001).
  40. Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D. & Paul, W.E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* **172**, 921-929 (1990).
  41. Cua, D.J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744-748 (2003).
  42. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151-1164 (1995).
  43. Frohman, E.M. Multiple sclerosis. *Med Clin North Am* **87**, 867-897, viii-ix (2003).
  44. Ransohoff, R.M., Kivisakk, P. & Kidd, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **3**, 569-581 (2003).
  45. Kerfoot, S.M. & Kubes, P. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **169**, 1000-1006 (2002).

46. Becher, B. & Segal, B.M. T(H)17 cytokines in autoimmune neuro-inflammation. *Curr Opin Immunol* **23**, 707-712 (2011).
47. Fujita, N. *et al.* Signal-transducing adaptor protein-2 regulates macrophage migration into inflammatory sites during dextran sodium sulfate induced colitis. *Eur J Immunol* **44**, 1791-1801 (2014).
48. Schulze-Topphoff, U. *et al.* Tob1 plays a critical role in the activation of encephalitogenic T cells in CNS autoimmunity. *J Exp Med* **210**, 1301-1309 (2013).
49. Zamvil, S.S. & Steinman, L. Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron* **38**, 685-688 (2003).
50. Simmons, S.B., Pierson, E.R., Lee, S.Y. & Goverman, J.M. Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends Immunol* **34**, 410-422 (2013).
51. Komiyama, Y. *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **177**, 566-573 (2006).
52. Kroenke, M.A., Carlson, T.J., Andjelkovic, A.V. & Segal, B.M. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med* **205**, 1535-1541 (2008).
53. Domingues, H.S., Mues, M., Lassmann, H., Wekerle, H. & Krishnamoorthy, G. Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* **5**, e15531 (2010).
54. Nakae, S. *et al.* IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5986-5990 (2003).
55. Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. & Iwakura, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* **171**, 6173-6177 (2003).
56. Bettelli, E. *et al.* Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* **197**, 1073-1081 (2003).
57. Liu, X.K., Lin, X. & Gaffen, S.L. Crucial role for nuclear factor of activated T cells in T cell receptor-mediated regulation of human interleukin-17. *J Biol Chem* **279**, 52762-52771 (2004).
58. Chen, Z., Tato, C.M., Muul, L., Laurence, A. & O'Shea, J.J. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum* **56**, 2936-2946 (2007).
59. Korn, T. *et al.* Vav1-deficient mice are resistant to MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis due to impaired antigen priming. *J Neuroimmunol* **139**, 17-26 (2003).
60. Krumbholz, M. *et al.* Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* **129**, 200-

- 211 (2006).
61. Xu, X. *et al.* LRCH1 interferes with DOCK8-Cdc42-induced T cell migration and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **214**, 209-226 (2017).
  62. Simon, M. *et al.* Anti-CD52 antibody treatment depletes B cell aggregates in the central nervous system in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* **15**, 225 (2018).
  63. Yoshizaki, A. *et al.* Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* **491**, 264-268 (2012).
  64. Muraoka, D. *et al.* Signal-transducing adaptor protein-2 promotes generation of functional long-term memory CD8<sup>+</sup> T cells by preventing terminal effector differentiation. *Oncotarget* **8**, 30766-30780 (2017).
  65. Lee, Y. *et al.* IL-21R signaling is critical for induction of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* **125**, 4011-4020 (2015).

## 謝辞

本研究を遂行するに当たり、終始熱心な御指導、御助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 衛生化学研究室 松田 正教授、柏倉 淳一講師、室本 竜太講師、鍛代 悠一助教、ならびに福山大学薬学部 分子免疫学研究室 今 重之教授に深く御礼申し上げます。

本論文を査定していただきました北海道大学大学院薬学研究院薬物動態解析学研究室 菅原 満教授、国際医療福祉大学大学院医学研究科 血液内科学 織谷健司教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するに当たり、実験材料を快く御供与下さいました吉村 昭彦博士 (慶応義塾大学医学部微生物学免疫学教室教授)、村上 正晃博士 (北海道大学遺伝子病制御研究所・大学院医学研究科 分子神経免疫学分野教授)、織谷 健司博士 (国際医療福祉大学大学院医学研究科 血液内科学教授)に深く御礼申し上げます。

また、研究の進め方・考え方を熱心に御指導いただき、さらに様々な面でお世話になりました大鵬薬品株式会社、赤坂 大地さんに深く感謝いたします。

研究面のみならず、様々な面でお世話になりました衛生化学分野の諸先輩方、後輩の皆様、同期の皆様、ならびに友人たちに深く感謝いたします。

最後に、これまで長い学生生活を常に励まし、支えて、博士課程進学と研究を続けることを快く受け入れ、厳しく暖かく見守ってくれた家族に心から感謝いたします。

2019年3月

著者