



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	齋藤, 浩大
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13614号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73852
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kodai_Saitoh_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 齋 藤 浩 大

審査担当者	主 査	教 授	松田 正
	副 査	教 授	菅原 満
	副 査	講 師	柏倉 淳一
	副 査	教 授	織谷 健司（国際医療福祉大学）

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

博士学位論文審査等の結果について（報告）

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 ζ 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- κ 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 シグナル伝達を介した 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。アダプタータンパク質 STAP-2 (Signal-Transducing Adaptor Protein-2) は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が報告され、T 細胞においても細胞接着、細胞遊走、活性化細胞死に関与することを報告されているが、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。

本研究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ものである。まず、著者は 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 細胞に対してコントロールベクター恒常発現 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 の産生をウエ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- γ 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 ζ と相互作用することを明らかにした。TCR シグナルは TCR 複合体の構成分子の一つである CD3 ζ が LCK によってリン酸化されることによって開始されことから STAP-2 が LCK 及び CD3 ζ 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を示した。

さらに著者は 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自己免疫疾患モデルとして、ミエリン蛋白由来 MOG ペプチド免疫による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。その結果、EAE の発症に伴い EAE の脊椎内で STAP-2 mRNA 発現が亢進すること、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 マウスでは病態増悪化の抑制傾向が観察され、STAP-2 Tg マウスでは有意な病態の増悪化が観察されたことを示し、リンパ球における STAP-2 発現が EAE 増悪化に強く関与することを明らかにした。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- γ を産生する Th1 細胞の割合に変化を比較し、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することを示した。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 ペプチド特異的 TCR を発現する 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、実際に約 5%で EAE の自然発症が観察された。しかしながら、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、STAP-2 がマウス個体において 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した。

本研究から著者は STAP-2 が足場となって形成される LCK/STAP-2/ CD3 ζ 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を示した。本研究により新規 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 を標的治療薬開発に繋がることが期待され、自己免疫疾患治療において新規創薬標的の発見に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。