



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	T細胞受容体シグナルを標的とした新規治療戦略の検証
Author(s)	佐々木, 悠斗
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	乙第7227号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7227
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98170
Type	doctoral thesis
File Information	Yuto_Sasaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏 名 佐々木 悠斗

学 位 論 文 題 名

T 細胞受容体シグナルを標的とした新規治療戦略の検証

Signal-Transducing Adaptor Protein (STAP)-2 は 2003 年に c-fms に結合するタンパク質としてクローニングされたアダプタータンパク質である。STAP-2 は N 末端側からリン脂質結合モチーフである PH ドメイン、リン酸化チロシン結合モチーフである SH2 ドメイン、およびプロリンリッチ領域から構成されている。STAP-2 は様々な組織にユビキタスに発現しており、これまでに当研究室では STAT3 及び STAT5 の転写活性を制御すること、FcεRI 誘導性マスト細胞活性化、Fas 誘導性 T 細胞死などに関与することを見出している。さらに、当研究室の前任者が STAP-2 と T 細胞の機能との関係を調べたところ、STAP-2 は T 細胞の活性化を正に制御する機能をもつことを明らかにした。具体的には抗原提示細胞から MHC 分子を介して T 細胞に提示された抗原を T 細胞が T 細胞受容体 (TCR) を介して認識すると、STAP-2 は TCR の細胞内ドメインである CD3ζ の ITAM モチーフおよび LCK と足場タンパクとして結合することで下流の ZAP-70 分子の LCK によるリン酸化が効率よく行われ、結果的に下流のシグナル伝達も促進されることを見出した。さらに、*in vivo* においては T 細胞依存的自己免疫疾患の一つである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis、以下 EAE) の病態を正に制御することを明らかにした。本研究では上記の研究結果より、STAP-2 と CD3ζ ITAM との結合を阻害することで T 細胞の活性化を抑制することができ、ひいては T 細胞の異常活性化が原因で引き起こされる自己免疫疾患の新たな治療戦略になるのではないかを仮説を立てて研究を行った。STAP-2-CD3ζ ITAM 結合はタンパク-タンパク結合であるため、低分子を用いた阻害剤ではなくペプチドを用いた阻害剤作製を試みた。STAP-2-CD3ζ ITAM 結合を阻害するペプチドの設計に際し、STAP-2 のどのドメイン、またどの配列が CD3ζ ITAM と結合しているのかを STAP-2 の deletion mutant を用いて CD3ζ ITAM との共免疫沈降法により行った。同定された配列をもとに細胞膜透過性をもつ配列を結合させたペプチドをいくつか作成し、ヒト白血病由来 T 細胞株である Jurkat 細胞を用いて細胞増殖を抑制するペプチドをスクリーニングした。スクリーニングの結果得られたペプチドの配列をできるだけ配列が短くなるように最適化した。本ペプチドを以下“iSP2”として、T 細胞に対する iSP2 の機能を検討した。iSP2 を処置することで実際に STAP-2-CD3ζ ITAM 結合が減弱していることを確認した。その上で Jurkat 細胞及びヒト末梢血由来単核球細胞 (PBMC) に対して iSP2 を処置し、T 細胞活性化の指標である細胞増殖、IL-2 産生及び TCR シグナル伝達が抑制されていることを見出した。実臨床での応用を考えた際には、本ペプチドの細胞特異的効果は副作用の点から非常に重要であるため、iSP2 が非 T 細胞にも機能的影響を及ぼすのか検討したところ、少なくとも B 細胞や上皮系の細胞の増殖、並びに好塩基球の活性化に影響を及ぼさないことがわかった。

iSP2 のヒト T 細胞活性化抑制効果はマウス T リンパ腫由来細胞株である EL-4 細胞並びに CD4⁺T 細胞でも同様に見られたため、iSP2 が *in vivo* においても T 細胞活性化抑制効果を示し、自己免疫疾患マウスモデルの病態を抑制するのかどうか検討した。前述の前任者の研究において、STAP-2 KO マウスでは野生型マウスと比較して EAE の病態が抑制されていたことから、

iSP2 の in vivo における機能の検討でも EAE モデルを用いて検討したところ、ネガティブコントロールペプチド（以下 iCont と表記）投与群と比較して iSP2 投与マウスでは EAE の病態が有意に抑制されていることがわかった。次に iSP2 がどのようなメカニズムで EAE の病態を抑制しているのか検討した。EAE は末梢で分化・増殖した自己反応性 T 細胞が脳脊髄に浸潤し脳に炎症が生じて四肢の麻痺などの身体症状を示す。また、その発症や症状進行には IFN- γ を産生する Th1 細胞及び IL-17 を産生する Th17 細胞が重要な役割を果たすことから、これら細胞のポピュレーションが iSP2 投与マウスでどのようなになっているのか検討した。その結果、iCont 投与マウスと比較して iSP2 投与マウスでは Th1 及び Th17 細胞の数・割合が有意に減少していることがわかった。さらに、EAE 病態における脳脊髄に浸潤している細胞 1 つ 1 つの遺伝子発現を Single-cell RNA sequence により解析したところ、iCont 投与マウスと比較して iSP2 投与マウスにおいて CD4⁺T 細胞の遺伝子発現が減少していた。以上の結果から、iSP2 は脳脊髄への Th1 及び Th17 細胞の浸潤を抑制した結果、EAE の病態を抑制していることが示唆された。

以上、本研究ではこれまでに当研究で見出した「STAP-2 が CD3 ζ ITAM と結合することで T 細胞の活性化を正に制御する」という知見から、STAP-2-CD3 ζ ITAM 結合を阻害することで T 細胞の活性化を抑制できるのではないかと仮説を立て、新たに開発した阻害剤 iSP2 が実際にヒト及びマウスの T 細胞の活性化を抑制した。EAE モデルを用いた検討では iSP2 を投与することで病態に寄与する Th1 および Th17 細胞の CNS への浸潤を抑制することで病態を軽減する効果があることを明らかにした。