

学位論文題名

アダプター分子 STAP-2及び低分子量二重特異性
ホスファターゼによるサイトカインシグナル
制御機構の解析

学位論文内容の要旨

本論文では、アダプター分子 STAP-2 及び低分子量二重特異性ホスファターゼ(DUSP)による、免疫系細胞におけるシグナル伝達制御機構について解析を行った。

細胞内外の種々のシグナル伝達系により、個々の細胞の増殖、分化、細胞死は厳密に制御され、異なる細胞群がサイトカインやホルモンのバランスのもとに調和を保っている。サイトカインの異常産生や産生低下によって、生体はその恒常性から逸脱することがあり、そのような状態の持続により、疾患が発症する。特に、炎症性サイトカインによる過剰な炎症反応が、病態形成の初期過程への導入にもなりうる。種々の疾患が、サイトカインの制御破綻により起きていることが明らかにされており、疾患の病態解釈にはサイトカインの機能の理解が不可欠である。Jak-STAT シグナル伝達系は、サイトカインの最も主要な細胞内シグナル伝達系である。サイトカインのレセプターへの結合により Jak キナーゼが活性化され、転写因子である STAT がリン酸化される。リン酸化された STAT は、二量体化し、核内へと移行し標的遺伝子の転写を活性化する。Jak-STAT シグナル伝達系は様々な制御分子による調節を受けていることが明らかにされており、その制御蛋白の変異や、欠損は種々の疾患として発症することも明らかになっている。

アダプター分子 STAP-2 は、STAT3 の活性を亢進させることが報告されていた。そこで、他の STAT ファミリー分子である、STAT5 に対する STAP-2 の機能解析を行った。その結果、STAP-2 は STAT5 と会合し、レポーターアッセイにより STAT5 の活性を抑制することが明らかになった。さらに、STAP-2 を発現させると、サイトカイン刺激による STAT5 のリン酸化が抑制され、IL-3/STAT5 依存的な Ba/F3 細胞の増殖も抑制された。また、STAP-2 KO マウス由来胸腺細胞の、IL-2 依存的な細胞増殖が亢進することも観察された。以上より、STAP-2 は STAT5 を介したサイトカインシグナルを、抑制する分子であることが明らかとなった。さらに、本研究において、STAP-2 はキナーゼによってその Tyr250 残基がリン酸化されることで、STAT3 シグナルの活性を亢進させることを明らかにした。STAT3 シグナルは正に制御するが、STAT5 シグナルは負に制御することが明らかとなり、サイトカインシグナル伝達経路において、標的

子に対して特異的に STAP-2 は機能することが示唆される。

STAP-2 は、LPS による急性期応答時に、その mRNA が誘導されることが報告されていたため、LPS 応答時のサイトカイン産生経路における STAP-2 の機能解析を試みた。LPS の腹腔投与により誘導される炎症性サイトカイン TNF- α の血中量が、STAP-2 KO マウスでは WT に比べ減少していた。LPS は TLR4 を介して、主にマクロファージや樹状細胞において炎症性サイトカインの産生を誘導する。そこで、マウスから腹腔マクロファージを分離し、LPS による炎症性サイトカイン産生を比較すると、KO マクロファージで産生量が減少していた。また、マクロファージに STAP-2 を過剰発現させると、サイトカイン産生が亢進することも明らかになった。炎症性サイトカイン誘導経路における、STAP-2 の機能を解析するため、TLR4 下流のシグナル伝達分子との相互作用を検討した。すると、MyD88, IKK- α , β と STAP-2 が結合することが確認できた。STAP-2 は MyD88 や IKK との複合体の形成により、転写因子 NF- κ B の活性を増強し、サイトカイン産生を亢進させることが明らかとなった。以上より、STAP-2 はマクロファージにおいて、LPS による炎症性サイトカインの産生を亢進させる分子であることが明らかとなった。

さらに、T 細胞の炎症局所への遊走、浸潤過程で重要な、インテグリンを介した接着においても、STAP-2 が機能しており、STAP-2 は接着因子である FAK の分解を促進することで、T 細胞の接着能を減弱させていることを明らかとした。

アダプター分子 STAP-2 は、自身は酵素活性を持たないが、他の分子との相互作用によって、細胞内シグナルを正にも負にも制御し、免疫系システムの恒常性を維持する重要な分子であることが示唆される。STAP-2 は自然免疫から獲得免疫をリンクする、多機能分子であり、更なる機能解析により、種々の疾患の病因解明につながると考えられる。

サイトカインシグナル伝達経路において、Jak により STAT はリン酸化され、シグナルを伝える。リン酸化された STAT は、ホスファターゼによって脱リン酸化されることで不活性化され、シグナル伝達が抑制される。本研究において、STAT3 の新たなホスファターゼの同定を試みた。そして、IL-6 や LIF により誘導されるホスファターゼとして DUSP22 を同定された。そこで、DUSP22 の機能解析を行ったところ、DUSP22 の発現により STAT3 の転写活性が抑制されることが観察された。また、STAT3 のリン酸化が DUSP22 のホスファターゼ活性依存的に抑制され、DUSP22 の発現により、STAT3 の核移行が抑制された。さらに、免疫沈降法より、STAT3 と DUSP22 は結合することも明らかとなった。DUSP22 は、IL-6 ファミリーサイトカインにより誘導されるフィードバックインヒビターであることが示唆される。また、サイトカインシグナルとステロイドホルモンシグナルには、クロストークが存在することが知られており、互いにシグナルを制御している。サイトカインシグナル経路の制御因子として DUSP22 が同定されたが、さらに、本研究においてエストロゲンシグナルを DUSP22 が制御していることも明らかにした。DUSP22 は、リン酸化し活性化したエストロゲンレセプターを脱リン酸化することで、エストロゲンシグナルを抑制することが示された。DUSP22 はこれまで MAPK を基質とすることが知られていたが、本研究において、新たに STAT3 やエストロゲンレセプターを基質とすることが明らかになった。これより、DUSP22 は、サイトカインやホルモンによるシグナル伝達

を制御する、重要なホスファターゼであることが示唆された。

以上より、本研究においてアダプター分子 STAP-2 やホスファターゼ DUSP22 による、免疫系におけるサイトカインシグナル制御の一端が解明された。サイトカインシグナルは様々な分子によりその活性が制御されている。今後の更なる解析により、免疫疾患や悪性腫瘍の治療薬の開発につながることが期待される。また、STAT3 や STAT5 は細胞の癌化にも重要であり、STAP-2 や DUSP22 による STAT 制御機構の解析は免疫系のみでなく、細胞癌化のメカニズム解明の手掛かりになると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 正
副 査 教 授 南 雅 文
副 査 教 授 吉 村 昭 彦
副 査 准教授 上 原 孝

学 位 論 文 題 名

アダプター分子 STAP-2及び低分子量二重特異性 ホスファターゼによるサイトカインシグナル 制御機構の解析

本論文ではアダプター分子STAP-2及び低分子量二重特異性ホスファターゼ (DUSP) によるサイトカインシグナル伝達系制御機構について解析を行った。

サイトカインの異常産生や産生低下によって生体はその恒常性から逸脱することがあり、そのような状態の持続により、疾患が発症する。特に炎症性サイトカインによる過剰な炎症反応が、病態形成の初期過程への導入にもなりうる。Jak-STATシグナル伝達系はサイトカインの最も主要な細胞内シグナル伝達系であり、様々な制御分子による調節を受けていることが明らかにされており、その制御蛋白の変異や欠損は種々の疾患として発症することも明らかになっている。

アダプター分子STAP-2はSTAT3の活性を亢進させることが報告されていた。そこで、他のSTATファミリー分子である、STAT5に対するSTAP-2の機能解析を行った。その結果、STAP-2はSTAT5と会合しSTAT5の活性を抑制することが明らかになった。さらにSTAP-2過剰発現はIL-3/STAT5依存的なBa/F3細胞増殖も抑制し、またSTAP-2遺伝子欠損マウス由来胸腺細胞のIL-2/STAT5依存的な細胞増殖が亢進することも観察された。以上よりSTAP-2はSTAT5を介したサイトカインシグナルを抑制する分子であることが明らかとなった。さらに本研究においてSTAP-2はキナーゼによってそのTyr250残基がリン酸化されることでSTAT3シグナルの活性を亢進させることを明らかにした。すなわちSTAP-2はSTAT3シグナルを正にSTAT5シグナルは負に制御する分子であ

ることが示された。

STAP-2は、LPSによる急性期応答時にそのmRNAが誘導されることが報告されていたため、LPS応答時のサイトカイン産生経路におけるSTAP-2の機能解析を試みた。LPSの腹腔投与により誘導されるTNFの血中量がSTAP-2 遺伝子欠損マウスでは減少していた。また遺伝子欠損マウスから腹腔マクロファージを分離し、LPSによる炎症性サイトカイン産生を比較するとその産生量が減少していた。さらにTLR4下流のシグナル伝達分子との相互作用を検討すると、MyD88やIKKとSTAP-2が結合することが確認できた。すなわち、STAP-2はMyD88やIKKとの複合体の形成により転写因子NF- κ B活性を増強しサイトカイン産生を亢進させることが明らかとなった。

STAP-2は細胞内シグナルを正にも負にも制御し、免疫系システムの恒常性を維持する重要な分子であるばかりか、STAP-2は自然免疫から獲得免疫をリンクする分子であり、更なる機能解析により種々の疾患の病因解明につながると考えられる。

サイトカインシグナル伝達経路においてSTATはJakキナーゼによりリン酸化されシグナルを伝える。リン酸化されたSTATはホスファターゼによって脱リン酸化されることで不活性化され、シグナル伝達が抑制される。本研究においてSTAT3の新たなホスファターゼの同定を試み、IL-6やLIFにより誘導されるホスファターゼとしてDUSP22が同定した。さらにDUSP22の機能解析を行ったところ、DUSP22の発現によりSTAT3の転写活性が抑制されることが観察された。またSTAT3のリン酸化がDUSP22のホスファターゼ活性依存的に抑制され、さらに免疫沈降実験によりSTAT3とDUSP22は結合することも明らかとなった。DUSP22はこれまでMAPKを基質とすることが知られていたが、本研究において新たにSTAT3を基質とし、サイトカインシグナル伝達を制御する重要なホスファターゼであることが示唆された。

以上より、本研究においてアダプター分子 STAP-2 やホスファターゼ DUSP22 による、サイトカインシグナル制御機構の一端が解明された。今後の更なる解析により免疫疾患や悪性腫瘍の治療薬の開発につながることが期待される。

よって本研究は博士（薬学）の学位を授与するに相応しいものである。