

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790353

研究課題名（和文）

受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 による腸管免疫制御機構

研究課題名（英文）

Roles of protein tyrosine phosphatase SAP-1 in the intestinal immunity.

研究代表者

小谷 武徳 (Kotani Takenori)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：40455960

研究成果の概要（和文）：

研究代表者は腸上皮細胞の微絨毛に特異的に局在する受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 とその基質分子 p100 による腸管免疫制御機構の解析を行った。その結果、SAP-1 は p100 と細胞外ドメインを介して結合していることが明らかとなった。また SAP-1/p100 を介したシグナル伝達によりケモカインの分泌や細胞の貪食機能が制御されていることも明らかとなり、SAP-1/p100 系はこれらの生理機能の制御を介して腸管免疫を制御している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

SAP-1 is a receptor-type protein tyrosine phosphatase that specifically localizes to microvilli of the brush border in gastrointestinal epithelial cells. In this study, I found that SAP-1 and p100 interact through their ectodomains and form a complex. I also found that SAP-1/p100 regulates the production of chemokine and the phagocytosis of HEK293 cells, suggesting intestinal immunity might be regulated by these physiological functions of SAP-1/p100.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：腸管免疫・チロシンホスファターゼ・チロシンリン酸化

1. 研究開始当初の背景

腸管は常に外界（腸内腔）と接する器官であることから、脾臓や末梢リンパ節を中心とする全身免疫系とは異なった腸管免疫系と呼ばれる腸管独自の粘膜免疫システムが発達している。とりわけ最近では、腸上皮細胞が単に腸内腔と体内を隔てる物理的なバリアとして機能するだけでなく、腸内環境を監視して腸上皮細胞の下層に存在する免疫細

胞と協調しながら腸管免疫系を綿密に制御していることが示唆されている (Garrett et al., *Cell*, 2010; Artis, *Nat. Rev. Immunol.*, 2008)。

研究開始当初、すでに研究代表者は炎症性腸疾患のモデルマウスとして知られる IL-10 遺伝子破壊 (KO) マウスを用いた解析から受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 が腸管免疫制御に関与している可能性を見出して

いた。具体的には SAP-1/IL-10 二重遺伝子破壊 (DKO) マウスは、IL-10 単独の KO マウスに比べ大腸炎の重篤化を示すことを明らかにしていた。さらに研究代表者は、SAP-1 KO マウス由来の大腸および小腸では約 100 kDa の膜貫通領域を持つ糖蛋白質 (p100) のチロシンリン酸化レベルが野生型マウスに比べ顕著に亢進していることを見出していた。細胞レベルの解析では p100 の細胞内領域は Src ファミリーチロシンキナーゼによってチロシンリン酸化され、チロシンリン酸化した p100 には Syk チロシンキナーゼが結合し、Syk の下流分子 Vav2, PLC γ , MAPK の活性化を誘導することも明らかにしていた。また p100 の細胞外ドメインを認識する anti-p100 抗体でコーティングした 2 μ m のビーズが p100 を発現させた腸上皮細胞株に積極的にエンドサイトーシスされることも研究代表者らは見出していた。これらの結果から、腸上皮細胞は *in vivo* において p100 を介して p100 のリガンドやリガンドを含む物質を積極的に細胞内に取り込み腸内環境を監視する機能を持つことが予想され、また SAP-1/IL-10 DKO マウスの腸炎の重篤化は、SAP-1 欠損による p100 のチロシンリン酸化の亢進がその一因であると考えられた。以上より、腸上皮細胞に発現する SAP-1/p100 系は、腸管内環境を監視し腸管免疫を制御する新たなシステムであると考えられたが、*in vivo* で実際にはどのような分子メカニズムによって SAP-1/p100 系が腸管免疫を制御しているのかについて未だ十分な解析がなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では SAP-1 とその基質分子 p100 を介したシグナル伝達系による腸管免疫制御のメカニズムを、分子から動物個体レベルまで明らかにすることを目的とした解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物個体における SAP-1/p100 系の機能解析

① IL-10 KO マウスの SAP-1 欠損によって起こる腸炎の重篤化は p100 の過剰なチロシンリン酸化による可能性が考えられた。そこで腸炎発症への p100 の関与を検討する為に、まず

は腸上皮細胞特異的に機能する villin プロモーターを用いて p100 を過剰発現させたトランスジェニック (TG) マウスの腸炎重篤度について解析を行った。次に、IL-10 欠損によって生じる腸炎への p100 過剰発現の影響を調べる為に IL-10 KO マウスと p100 TG マウスの交配により IL-10 KO/p100 TG マウスを作製し、腸炎の重篤度を IL-10 KO マウスと比較した。同様に SAP-1 KO/p100 TG や SAP-1/IL-10 DKO/p100 TG マウスも作製し、腸炎の重篤度について検証を行った。

② 上述の TG マウスを用いた実験とは逆に、p100 の欠損が腸炎に与える影響を検証する為に p100 KO マウスの作製を行った。

(2) SAP-1/p100 系によるケモカイン産生制御

① ケモカイン産生への p100 のチロシンリン酸化の関与を検証する為に p100 や p100 の ITAM 領域に存在するチロシン残基をフェニルアラニンに置換したミュータント (p100 (2YF)) を c-Src や Syk とともに HEK293 細胞に共発現させ、細胞からのケモカイン分泌量を ELISA により測定した。

② 腸上皮細胞でのケモカイン産生量への SAP-1 欠損による影響を動物レベルで調べる為に IL10 単独 KO マウスと SAP-1/IL-10 DKO マウスから腸上皮細胞を単離し、それぞれの細胞でのケモカインの発現量を qPCR により調べた。

(3) SAP-1 と p100 の相互作用

① SAP-1 と p100 は共にマウス個体内において腸上皮細胞の微絨毛に共局在する。そこで、これらの分子が分子間で相互作用するか否かを判定する為に HEK293 細胞に両分子を発現させ、共沈降するか否かを生化学的に解析した。

② さらに、両分子の相互作用は各分子のどの領域で行われているのかを調べる為に、各分子の細胞内領域を欠損させた変異体を用いて上記(3)-①と同様の共沈降実験を試みた。

(4) anti-p100 抗体ビーズの取り込みにお

ける p100 のチロシン残基の機能解析

研究代表者らは、p100 の細胞外ドメインを認識する anti-p100 抗体でコーティングした 2 μm のビーズが p100 を発現させた腸上皮細胞株に積極的にエンドサイトーシスされることを見出していたが、p100 に存在する 4 つのチロシン残基のうちどのチロシン残基がビーズの取り込みに関与するかについて検討を行う為に p100 の細胞内領域を欠損させた変異体 (ΔCP)、全てのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体 (4YF)、C 末端側の 3 つのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体 (3YF)、C 末端側の 2 つのチロシン残基 (ITAM 領域に存在するチロシン残基) をフェニルアラニンに置換した変異体 (2YF) を HEK293 細胞に発現させ、anti-p100 抗体ビーズの取り込み能力を検証した。

4. 研究成果

(1) 動物個体における SAP-1/p100 系の機能解析

腸炎発症への p100 の関与を検討する為に、まずは腸上皮細胞特異的に機能する villin プロモーターを用いて p100 を過剰発現させたトランスジェニック (TG) マウスを作製した。その結果、このマウスは正常に発生し、発育した。このマウスは 3 ライン得られたが、小腸及び大腸でのトランスジーン発現について mRNA レベル (qPCR 法)、蛋白質レベル (Western blotting) で調べたところ、mRNA レベルでは野生型マウスに比べ p100 が顕著に高発現していることが確認できたが、蛋白質レベルでの発現上昇はわずかであることが明らかとなった。このマウスについて経時的に観察を行ったが、腸炎の発症は認められなかった。そこで IL-10 欠損によって生じる腸炎への p100 過剰発現の影響を調べることを目的として IL-10 KO マウスと p100 TG マウスの交配により IL-10 KO/p100 TG マウスを作製し、腸炎の重篤度を IL-10 KO マウスと比較した。しかしながら p100 過剰発現による腸炎の重篤度への影響は認められなかった。次に研究代表者らは p100 の過剰なチロシンリン酸化の亢進が腸炎の重篤度に影響を与えるという仮説のもと SAP-1 KO/p100 TG や

SAP-1/IL-10 DKO/p100 TG マウスも作製し、腸炎の重篤度について検証を行った。しかしながらこれらのマウスについても p100 過剰発現による腸炎の重篤度への影響は認められなかった。以上の結果は、得られた p100 TG マウスにおいて p100 蛋白質の過剰発現レベルが低いことによるものと考えられた。そこで、SAP-1/IL-10 DKO マウスの腸炎の重篤化は p100 の過剰なチロシンリン酸化の亢進によることであることを証明する為に SAP-1/IL-10/p100 三重遺伝子破壊マウスの作製を開始した。まず p100 KO マウスの作製を行ったところ、最近 p100 KO マウスを得ることが出来た。

(2) SAP-1/p100 系によるケモカイン産生制御

細胞でのケモカイン産生への p100 のチロシンリン酸化の関与を検証する為に p100 や p100 の ITAM 領域に存在するチロシン残基をフェニルアラニンに置換したミュータント (p100 (2YF)) を c-Src や Syk とともに HEK293 細胞に共発現させ、細胞からのケモカイン分泌量を ELISA により測定した。その結果、野生型の p100 と c-Src、Syk を共発現させると顕著にケモカインの分泌量が上昇することが明らかとなった。一方、p100 (2YF) と c-Src、Syk を共発現させた場合にはケモカインの分泌量の増加は認められなかった。これらの結果から、p100 のチロシン残基のリン酸化はケモカイン産生を誘導すると考えられた。

次にこれらの細胞レベルでの実験結果が動物個体レベルにおいても適用出来るかについて検証する為に IL10 単独 KO マウスと SAP-1/IL-10 DKO マウスから腸上皮細胞を単離し、それぞれの細胞でのケモカインの発現量を qPCR により調べた。その結果、IL10 単独 KO マウスにくらべ SAP-1/IL-10 DKO マウスから単離した腸上皮細胞ではケモカインの発現量が上昇している傾向があることが明らかとなった。

(3) SAP-1 と p100 の相互作用

SAP-1 と p100 の相互作用の可能性を検証す

る為に、HEK293 細胞に両分子を発現させ、共沈降実験を試みたところ、両分子は共沈降した。つまり、両分子は結合することが明らかとなった。次に両分子の相互作用は各分子のどの領域で行われているのかを調べる為に、各分子の細胞内領域を欠損させた変異体を用いて同様の共沈降実験を試みたところ、両分子は細胞外ドメイン同士だけでも共沈降することが明らかとなった。つまり、SAP-1 と p100 は互いの細胞外ドメインを介して協調的に機能している可能性が示唆された。

(4) anti-p100 抗体ビーズの取り込みにおける p100 のチロシン残基の機能解析

p100 に存在する 4 つのチロシン残基のうちどのチロシン残基が anti-p100 抗体ビーズの取り込みに関与するかについて検討を行う為に全てのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体 (4YF)、C 末端側の 3 つのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体 (3YF)、C 末端側の 2 つのチロシン残基 (ITAM 領域に存在するチロシン残基) をフェニルアラニンに置換した変異体 (2YF) を HEK293 細胞に発現させ、anti-p100 抗体ビーズの取り込み能力を検証した。その結果、野生型 p100 に比べ 2YF、3YF、4YF 発現細胞では、各細胞に接着もしくは貪食されたビーズの総数について違いは認められなかったが、細胞内への取り込み数に有意な減少が認められた。このことから、p100 を介した貪食活性の誘導に C 末端側の 2 つのチロシン残基の関与が示唆された。p100 の細胞内領域は Src ファミリーチロシンキナーゼによってチロシンリン酸化されることから、Src ファミリーチロシンキナーゼの阻害剤 PP2 にて野生型 p100 発現細胞を処理し、ビーズの貪食に与える影響について検討したところ、PP2 不活性型アナログである PP3、溶媒の DMSO で処理した場合に比べ、PP2 処理した場合にはマイクロビーズの細胞内への取り込みに有意な低下が認められたが、接着もしくは貪食されたマイクロビーズの総数については異なる処理を施した細胞間で違いは認められなかった。以上のことから p100 の C 末端側の 2 つのチロシン残基のリ

ン酸化がマイクロビーズの貪食の誘導に重要な役割を持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- (1) Kaneko T. [§], Saito Y. [§], Kotani T. [§], Okazawa H., Iwamura H., Sato-Hashimoto M., Kanazawa Y., Takahashi S., Hiromura K., Kusakari S., Kaneko Y., Murata Y., Ohnishi H., Nojima Y., Takagishi K., and Matozaki T. (§: Contributed equally to this work)
Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase shp1 promotes Th1 cell differentiation and induces autoimmunity.
J. Immunol., 188, 5397-5407, 2012 査読あり
DOI: 10.4049/jimmunol.1103210.
- (2) Hayashi Y., Kusakari S., Sato-Hashimoto M., Urano E., Shigeno M., Sekijima T., Kotani T., Murata Y., Murakami H, Matozaki T and Ohnishi H.
Hypothermia-dependent and -independent effects of forced swim on the phosphorylation states of signaling molecules in mouse hippocampus.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 428, 475-481, 2012 査読あり
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.083.
- (3) Maruyama T., Kusakari S., Sato-Hashimoto M., Hayashi Y., Kotani T., Murata Y., Okazawa H., Oldenborg P.-A., Kishi S., Matozaki T., and Ohnishi H.
Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP α in the brain.
J. Neurochem., 121, 891-902, 2012 査読あり
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.0774

8. x.

- (4) Sato-Hashimoto M., Saito Y., Ohnishi H., Iwamura H., Kanazawa Y., Kusakari S., Kotani T., Mori M., Murata Y., Okazawa H., Ware CF., Olodenbrg PA., Nojima Y., and Matozaki T.
Signal regulatory protein α regulates the homeostasis of T lymphocytes in the spleen.
J. Immunol., 187, 291-297, 2011 査読あり
DOI:10.4049/jimmunol.1100528

[学会発表] (計 14 件)

- (1) 小谷 武徳
Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp1 promotes Th1 cell differentiations and induces autoimmunity
第10回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス, 2013年02月07日~2013年02月09日, 東京
- (2) 村田 陽二
Regulation of intestinal immunity by the protein tyrosine phosphatase SAP-1
第10回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス, 2013年02月07日~2013年02月09日, 東京
- (3) 草苺 伸也
Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP α in the brain
第10回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス, 2013年02月07日~2013年02月09日, 東京
- (4) Edwin Widyanto Daniwijaya
Tyrosine phosphorylation of CEACAM20 and its functional roles
第10回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス, 2013年02月07日~2013年02月09日, 東京
- (5) 橋本 (佐藤) 美穂
脾臓T細胞の恒常性調節へのSIRP α の関与
第85回日本生化学会大会、2012年12月14日~2012年12月16日, 福岡
- (6) 草苺伸也
細胞質型チロシンホスファターゼShp2の成熟脳における機能解析
第85回日本生化学会大会、2012年12月14日~2012年12月16日, 福岡
- (7) 草苺伸也
Regulation of brain functions by a protein tyrosine phosphatase Shp2
International Synapse Research Workshop 2012 "Understanding of synapse pathology, from genome mutation to functional defects", 2012年11月08日~2012年11月09日, 岡崎
- (8) Kemala Isnainiasih Mantilidewi
Roles of vascular endothelial protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) in endothelial cells
2nd Bandung Biomolecular Medicine Conference, 2012年10月05日~2012年10月06日, インドネシア・バンドン
- (9) 草苺伸也
Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP α in the brain
11th biennial meeting of APSN/55th Meeting of JSN, 2012年09月30日~2012年10月02日, 神戸
- (10) 草苺伸也
細胞質型チロシンホスファターゼShp2の成熟脳における機能解析
第11回生体機能研究会, 2012年07月21日~2012年07月22日, 箱根
- (11) 金子哲也
IMPORTANCE OF THE PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE SHP1 IN DENDRITIC CELLS FOR PREVENTION OF TH1 CELL DIFFERENTIATION AND AUTOIMMUNITY: A POTENTIAL TARGET FOR THE THERAPY
European League Against Rheumatism 2012, 2012年06月06日~2012年06月09日, ドイツ・ベルリン
- (12) 草苺伸也
成熟脳における Shp 2 の生理機能解析

第5回プロテインホスファターゼ研究会
学術集会, 2012年1月19日, 大阪

(13) 小谷武徳

腸微絨毛特異的な発現を示す受容体型
チロシンホスファターゼSAP-1による腸
管免疫制御

第5回プロテインホスファターゼ研究会
学術集会, 2012年1月19日, 大阪

(14) 金子哲也

Dendritic cell-specific depletion of
protein-tyrosine phosphatase Shp1
promotes Th1 differentiation and
autoimmunity

第40回日本免疫学会学術集会、2011年
11月29日, 千葉

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.kobe-u.ac.jp/tougou/sign
al/Home.html](http://www.med.kobe-u.ac.jp/tougou/sign
al/Home.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 武徳 (KOTANI TAKENORI)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号: 40455960