

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590380

研究課題名(和文) 腸管免疫のダブルレギュレーション機構とその破綻による炎症性腸炎

研究課題名(英文) The double regulation of intestinal immunity and its implications in inflammatory bowel disease

研究代表者

岡澤 秀樹 (OKAZAWA, HIDEKI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・医学研究員

研究者番号：80334126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：腸管免疫は、腸上皮細胞と免疫細胞により制御されているが、その分子機構の理解は十分ではない。本研究課題では、研究代表者が独自に見出しているシグナル系であるSAP-1/pp90系やCD47-SIRP系を切り口として、腸上皮細胞と免疫細胞による腸管免疫のダブルレギュレーション機構につき研究を行った。その結果、腸上皮細胞に発現するpp90はチロシンリン酸化によりケモカイン産生を制御することを見出した。また、免疫細胞である樹状細胞におけるSIRPの発現が、樹状細胞自身の恒常性の維持に重要であることも明らかにし、これらの制御機構の破綻が炎症性腸疾患の発症に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intestinal epithelial cells and immune cells are known to regulate intestinal immunity, it remains unclear how these cells regulate intestinal immunity, however. We examined the double regulatory role of intestinal immunity by epithelial and immune cells, focusing on SAP-1/pp90 and CD47-SIRP signaling systems which we have originally identified. We found that phosphorylated pp90 regulates chemokine production from epithelial cells. Moreover, we demonstrated that SIRP expression intrinsic to dendritic cells is essential for homeostasis of dendritic cells. Our findings suggest that both SAP-1/pp90 and CD47-SIRP signaling systems regulate intestinal immunity and their disruption is implicated in the development of inflammatory bowel disease.

研究分野：病態医化学

キーワード：シグナル伝達 生体分子 癌 炎症 免疫学

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸炎の原因は、近年の研究により腸管免疫の恒常性の破綻によるものと考えられている。腸管免疫は、主に腸粘膜に位置する免疫担当細胞と腸上皮細胞により二重に制御(ダブルレギュレーション)されている。腸上皮細胞の下層にある粘膜固有層には、病原微生物を感知する樹状細胞やマクロファージが存在し、炎症時に自然免疫系や獲得免疫系を活性化し病原微生物を攻撃・排除する。一方、恒常的な状態では IL-10 を産生する細胞や制御性 T 細胞などの細胞群が腸内常在細菌 (microflora) に対して免疫寛容をもたらし、過剰な免疫応答を抑制する。しかしながら、腸上皮細胞による腸管免疫制御の分子機構の理解は十分でなく、特に腸上皮細胞がどのようにして腸内細菌を感知し腸内環境を監視しているのか、あるいは腸上皮細胞と免疫系細胞との連携はどのようにしてなされているか、その分子機構はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者が独自に見出しているシグナル系であるチロシンホスファターゼ SAP-1/pp90 系や膜型分子間シグナル CD47-SIRP 系を切り口として、IBD の発症機構をよりよく理解するために、腸上皮細胞系と免疫系による腸管免疫のダブルレギュレーション機構とその異常につき研究をすすめる。

3. 研究の方法

(1) 腸上皮細胞による腸管免疫制御機構の解明

SAP-1/pp90 系を介した腸上皮細胞による制御: SAP-1/pp90 系を介した腸管免疫制御機構を解析する目的で、pp90 遺伝子破壊 (KO) マウスの作製を行った。得られた pp90 KO マウスを用い、野生型マウスと腸管の構造、腸上皮細胞の構造やその細胞間接着構造について比較検討した。さらに、薬剤誘導性の腸炎モデルを作製し、pp90 遺伝子の欠損による腸炎の発症度および重症度に与える影響を検討した。腸炎の発症度および重症度は、便の堅さ、血便の有無、体重の減少度で評価した。また、pp90 KO マウスと野生型マウス由来の腸上皮細胞を単離し、遺伝子発現パターンの違いを検討することで、pp90 を介した腸管免疫制御に関与する分子群の同定を試みた。さらに、培養細胞を用い、SAP-1/pp90 系を介したケモカイン産生に関わるシグナル経路の解析を行った。

TSC-mTOR 系を介した腸上皮細胞による制御: 野生型マウスに抗生剤を投与することによって腸内細菌を除去したマウスの腸上皮細胞での mTOR シグナルについて解析を行った。

(2) CD47-SIRP 系による免疫制御機構
CD47-SIRP 系による樹状細胞の制御機

構: 樹状細胞における SIRP の機能を詳細に解析するため、樹状細胞特異的 SIRP コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製した。また、リガンドである CD47 の樹状細胞の機能制御への関与を詳しく調べるため、T 細胞特異的 CD47 flox マウスを作製した。SIRP の細胞内領域に結合する SHP-1 および SHP-2 が樹状細胞においてどのような機能を担うかを明らかにするため樹状細胞特異的 SHP-1, SHP-2cKO マウスを作製した。また、樹状細胞に加えて、マクロファージに発現する SIRP の機能を明らかにする目的で、LyzM-Cre マウスとの交配によりマクロファージ特異的 SIRP KO マウスを作製して、腸炎発症に重要とされる、樹状細胞、マクロファージの詳細な解析を行った。

4. 研究成果

(1) SAP-1/pp90 系を介した腸上皮細胞による制御: pp90 の生理機能をより詳細に解析するため、pp90 KO マウスの作製を進めた。その結果、pp90 KO マウスは正常に生まれ、通常の飼育下 (SPF) では腸炎の発症を認めなかった。また、組織学的な解析から、腸管の構造、上皮細胞の形態や細胞間接着構造などに pp90 KO マウスにおいて著明な異常は認められなかった。一方、薬剤誘導性の腸炎を pp90 KO マウスに誘導したところ、野生型に比べ、腸炎の重症度が高まる傾向が認められ、pp90 がマウス個体において腸管免疫の制御に関与する可能性が示唆された。さらに、pp90 による腸管免疫制御機構を解析する目的で、pp90 KO マウス由来腸上皮細胞を用いたマイクロアレー解析を行ったところ、pp90 KO マウス由来腸上皮細胞では腸管免疫制御に関わるとされる複数の抗菌ペプチドの遺伝子発現が低下する傾向であることを確認した。また、培養細胞を用いた解析から、pp90 が Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化を受け、リン酸化依存的にケモカイン産生の制御に関与すると共に、pp90 を介したケモカイン産生に MAPK 系が関与することを見出した。

TSC-mTOR 系について: 腸内細菌叢と腸炎発症には深い関わりがあると考えられている。そこで腸管免疫や腸炎発症との関わりが深いと考えられる TSC-mTOR 系と腸内細菌叢の関係性を調べる為に野生型マウスに抗生剤を投与することによって腸内細菌を除去したマウスの腸上皮細胞での mTOR シグナルについて解析を行った。その結果、抗生剤投与マウスでは mTOR シグナルが顕著に減少することを見出した。

(2) CD47-SIRP 系による免疫制御機構: 樹状細胞特異的な SIRP コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを得ることに成功し、このマウスの解析を行った。SIRP cKO マウスの脾臓では、コンベンショナル樹状細胞 (cDC) の比率及び絶対数は著明に減

少しており、中でも最大の亜分画である CD4 陽性 cDC 分画が特異的に減少していることを見出した。さらに、SIRP cKO マウスのリンパ節においても、脾臓と同様に CD4 陽性 cDC 分画の特異的な減少を認めた。SIRP cKO マウスと全身性 SIRP KO マウスでは、CD4 陽性 cDC の減少は同程度であることから、樹状細胞上に発現する SIRP によって、リンパ組織内での cDC、特に CD4 陽性 cDC の恒常性の維持に重要であることが明らかとなった。また、マクロファージ特異的な SIRP cKO マウスも同様に作製した。樹状細胞特異的、マクロファージ特異的 SIRP cKO マウス共に自己免疫疾患モデルの発症に抵抗性を認めたことから、腸管免疫系においても、樹状細胞やマクロファージに発現する SIRP が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

一方、研究代表者は抗 SIRP 抗体の作製にも取り組んでおり、CD47 と SIRP との結合を強力に阻害する抗体の作製に成功した。

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3件)

Washio K, Kotani T, Saito Y, Respatika D, Murata Y, Kaneko Y, Okazawa H, Ohnishi H, Fukunaga A, Nishigori C, Matozaki T. Dendritic cell SIRP regulates homeostasis of dendritic cells in lymphoid organs. *Genes Cells*, 査読有、2015、in Press. DOI:10.1111/GTC.12238.

Yamashita H, Kotani T, Park JH, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Ku Y, Matozaki T. Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium. *PLoS One*, 査読有、2014、9:e92904. DOI: 10.1371/journal.pone.0092904.

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, Matozaki T. Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp1 promotes Th1 cell differentiation and induces autoimmunity. *J Immunol*, 査読有、Vol.188、2012、pp.5397-5407. DOI:10.4049/jimmunol.1103210.

[学会発表](計20件)

Washio K, Kotani T, Respatika D, Murata Y, Saito Y, Okazawa H, Ohnishi H, Fukunaga A, Nishigori C, Matozaki T. Essential role of SIRP on dendritic cells in organization and homeostasis of the spleen. 第43回日本免疫学会学術集会、2014.12.10、国立京都国際会館(京都府)

北村 泰明、村田 陽二、朴 貞河、今田 慎也、小谷 武徳、岡澤 秀樹、東 健、的崎 尚、腸管における CEACAM20 の発現と腸内細菌叢を介した発現制御/Expression of CEACAM20 in intestine epithelial cells and regulation of its expression by intestinal microflora. 第87回日本生化学会大会、2014.10.17、国立京都国際会館ほか(京都府)

北村 泰明、村田 陽二、朴 貞河、小谷 武徳、岡澤 秀樹、東 健、的崎 尚、腸管における CEACAM20 の発現と腸内細菌叢を介した発現制御、第13回生体機能研究会、2014.7.19、ホテルパーク(岐阜県)

鷺尾 健、小谷 武徳、レスパティカダトゥ、村田 陽二、齊藤 泰之、金子 和光、岡澤 秀樹、大西 浩史、福永 淳、錦織 千佳子、的崎 尚、樹状細胞及び二次リンパ組織の恒常性維持における SIRP の役割、第13回生体機能研究会、2014.7.19、ホテルパーク(岐阜県)

Washio K, Kotani T, Respatika D, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Fukunaga A, Nishigori C, Matozaki T. SIRP -CD47 system regulates the homeostasis of dendritic cells in lymphoid tissues. ワシントン大学・神戸大学国際合同シンポジウム、2014.3.27、ワシントン大学(アメリカ)

鷺尾 健、小谷 武徳、レスパティカダトゥ、村田 陽二、岡澤 秀樹、大西 浩史、福永 淳、錦織 千佳子、的崎 尚、樹状細胞及び二次リンパ組織の恒常性維持における SIRP の役割、第6回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2014.2.21、三重大学(三重県)

小谷 武徳、山下 博成、朴 貞河、
村田 陽二、岡澤 秀樹、大西 浩史、
具 英成、的崎 尚、
腸上皮の恒常性維持におけるチロシン
ホスファターゼ Shp2 の役割、
第 6 回日本プロテインホスファターゼ研
究会学術集会、2014.2.21、三重大学(三
重県)

Washio K, Kotani T, Respatika D,
Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H,
Fukunaga A, Nishigori C, Matozaki T.
SIRP -CD47 system regulates the
homeostasis of dendritic cells in
lymphoid tissues.
第 42 回日本免疫学会学術集会、
2013.12.12、幕張メッセ(千葉県)

的崎 尚、村田 陽二、小谷 武徳、
Yana Supriatna、森 宗昌、岡澤 秀樹、
大西 浩史、
R3 受容体型チロシンホスファターゼの
発現、局在と生理機能、
第 36 回日本分子生物学会年会、
2013.12.5、神戸国際会議場ほか(兵庫
県)

山下 博成、小谷 武徳、村田 陽二、
岡澤 秀樹、大西 浩史、具 英成、
的崎 尚、
腸上皮の恒常性維持におけるチロシン
ホスファターゼ Shp2 の役割、
第 72 回日本癌学会学術総会、2013.10.3、
パシフィコ横浜(神奈川県)

村田 陽二、小谷 武徳、Yana
Supriatna、森 宗昌、草苺 伸也、
岡澤 秀樹、大西 浩史、的崎 尚、
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 72 回日本癌学会学術総会、2013.10.3、
パシフィコ横浜(神奈川県)

橋本 美穂、齊藤 泰之、金子 哲也、
大西 浩史、草苺 伸也、小谷 武徳、
村田 陽二、岡澤 秀樹、的崎 尚、
SIRP による脾臓 T 細胞の恒常性の調節、
第 60 回北関東医学会総会、2013.9.26、
群馬大学医学部刀城会館(群馬県)

小谷 武徳、山下 博成、村田 陽二、
岡澤 秀樹、大西 浩史、具 英成、
的崎 尚、
腸上皮の恒常性維持におけるチロシン
ホスファターゼ Shp2 の役割、
第 86 回日本生化学会大会、2013.9.11、
パシフィコ横浜(神奈川県)

Matozaki T, Murata Y, Kotani T,
Supriatna Y, Okazawa H, Ohnishi H.

The protein tyrosine phosphatase
SAP-1 protects against colitis
through regulation of CEACAM in the
intestinal epithelium.
FASEB, 2013.8.12-13、
The Steamboat Grand(アメリカ)

Kotani T, Yamashita H, Murata Y,
Okazawa H, Ohnishi H, Matozaki T.
Roles of the protein tyrosine
phosphatase Shp2 in homeostasis of the
intestinal epithelium.
FASEB, 2013.8.12-13、
The Steamboat Grand(アメリカ)

小谷 武徳、山下 博成、村田 陽二、
岡澤 秀樹、大西 浩史、具 英成、
的崎 尚、
腸上皮の恒常性維持におけるチロシン
ホスファターゼ Shp2 の役割、
第 12 回生体機能研究会、2013.7.28、
ホテル木暮(群馬県)

Kusakari S, Maruyama T,
Hashimoto-Sato M, Hayashi Y, Urano E,
Kusakari Y, Kotani T, Murata Y,
Okazawa H, Oldenborg P.-A., Matozaki
T, Ohnishi H.
Hypothermia-induced tyrosine
phosphorylation of SIRP 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、2013.2.8、国立がん研
究センター(東京都)

Mantilidewi KI, Murata Y, Mori M,
Kotani T, Okazawa H, Ohnishi H,
Matozaki T.
Roles of vascular endothelial protein
tyrosine phosphatase (VE-PTP) in
endothelial cells.
2nd Bandung Biomolecular Medicine
Conference、2012.10.5、パジャジャラ
ン大学(インドネシア)

Kusakari S, Maruyama T,
Hashimoto-Sato M, Hayashi Y, Kusakari
Y, Kotani T, Murata Y, Okazawa H, Kishi
S, Matozaki T, Ohnishi H.
Hypothermia-induced tyrosine
phosphorylation of SIRP in the
brain.
11th biennial meeting of APSN/55th
Meeting of JSN、2012.9.30、神戸国際
会議場(兵庫県)

草苺 伸也、橋本 美穂、林 由里子、
小谷 武徳、村田 陽二、岡澤 秀樹、
吾郷 由希夫、柴崎 貢志、松田 敏夫、
Benjamin G. Neel、的崎 尚、大西 浩

史、
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、2012.7.21、
箱根プリンスホテルレイクサイドアネ
ックスコテージ(神奈川県)

〔その他〕

ホームページ等

神戸大学大学院医学研究科 生化学・分子生
物学講座 シグナル統合学分野

[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

岡澤 秀樹 (OKAZAWA, Hideki)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：80334126