

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461468

研究課題名(和文) 樹状細胞に発現する細胞質型チロシン脱リン酸化酵素に関する研究

研究課題名(英文) Functional analysis of the protein phosphatase expressed in dendritic cells

研究代表者

金子 和光 (KANEKO, YORIAKI)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00334095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞(dendritic cell:DC)における細胞質型チロシン脱リン酸化酵素Shp-1の機能解析を目標にDC特異的にShp-1を欠損するコンディショナルノックアウトマウス(Shp-1 cKO)を作製して解析を行った。その結果Shp-1 cKOにおいては、加齢にともない自己免疫性の腎炎が生じ、腎臓内にマクロファージやT細胞が強く浸潤することが明らかになった。また、腎臓内に浸潤する細胞が炎症性サイトカインを強く産生することも判明した。

研究成果の概要(英文)：We generated a conditional knockout mouse (Shp-1 cKO) in which Shp-1, an intracytoplasmic tyrosine phosphatase, is specifically depleted in dendritic cells (DCs). Shp-1 cKO developed autoimmune nephritis with aging, which was characterized by massive infiltration of macrophages and T cells. The cells prepared from the kidneys of Shp-1 cKO were able to produce large amounts of inflammatory cytokines, therefore we conclude Shp-1 in DCs acts as a negative regulator for the development of autoimmune nephritis.

研究分野：膠原病

キーワード：自己免疫疾患 ホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

脱リン酸化酵素である Shp-1、Shp-2 の基質タンパク質として同定された SIRP はマクロファージと樹状細胞(Dendritic cell ; DC)に強く発現する分子である。SIRP は細胞質内領域に抑制性のシグナル伝達に重要とされる ITIM と呼ばれるアミノ酸配列を有していることから、抑制性のシグナル伝達分子として機能することが考えられてきた。また SIRP

は細胞接着などの刺激によりチロシンリン酸化が生じ、Shp-1、Shp-2 を介してシグナルが伝達されると考えられている。SIRP のリガンドとなる CD47 は T 細胞や B 細胞を含めた免疫担当細胞に広く発現する分子であり、免疫系においては CD47 と SIRP は T 細胞が DC により抗原提示を受ける際に補助刺激分子として機能する事が想定されている。これまでに研究代表者らのグループでは SIRP の ITIM 領域を欠損する遺伝子改変マウスである SIRP ミュータントマウス(SIRP

MT)を用いて解析を続けてきている。SIRP MT は SIRP の細胞外領域が CD47 との相互作用を有しながら、Shp-1、Shp-2 のシグナル伝達が障害されるように作製された遺伝子改変マウスである。そして、SIRP MT を用いた解析で、DC から産生される IFN がコントロールマウスに比べて著しく減少し、T 細胞の Th1 タイプへの分化が减弱することを見いだしている(Tomizawa T., et al., J Immunol.2007)。また、抗原特異的自己免疫疾患のモデルであるコラーゲン誘導関節炎に対して、SIRP MT は抵抗性を示す事が判明した(Okuzawa, C., Biochem Biophys Res Commun., 2008)。このように SIRP から Shp-1、Shp-2 へのシグナルが遮断されると、免疫応答は減弱することが明らかになった。これらの事実から DC における脱リン酸化酵素である Shp-1 や Shp-2 の機能を明らかにする必要性が生じ、DC において特異的に Shp-1 を欠損するコンディショナルノックアウトマウス (Shp-1 cKO)を作製した。そして Shp-1 cKO の解析で、研究代表者らは Shp-1 cKO では DC が脾臓内で増加することや、DC からの TNF や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が亢進する事を見いだした。また、Shp-1 cKO は生後 40 週齢の時点で、自己免疫性の腎炎や肺炎を発症する事も確認している(Kaneko T., et al., J Immunol.2012)。そして、これらの事実から、研究代表者は Shp-1 cKO の腎炎を解析することが、ループス腎炎などの自己免疫性腎炎に対する新規治療法の開発に有用であると考え解析を行った。

2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者がこれまでに得ている研究成果を基盤にして、DC に発

現する Shp-1 がコントロールする臓器特異的自己免疫現象の解析を試みた。具体的には 40 週齢を超える Shp-1 cKO に見られる自己免疫性の腎炎の解析を目的として、Shp-1 cKO の腎臓内に分布する炎症細胞を同定し、免疫学的な機能を解析するとともに、Shp-1 cKO より DC の亜群である形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell; pDC)を単離して、TLR9 のリガンドで刺激してサイトカイン産生を確認した。

3. 研究の方法

本研究では、C57BL/6 の遺伝的背景を有し、DC 特異的に Shp-1 を欠損する Shp-1 cKO を用いて解析を行った。DC は細胞表面に CD11c を特異的に発現する細胞であるので CD11c のプロモーター活性に依存して Cre を発現するトランスジェニックマウスと Shp-1 のエクソン特異的に loxP を発現する Shp-1 トランスジェニックマウスを交配して Shp-1 cKO を産生し解析に使用した。

(1) Shp-1 cKO にみられる腎炎の組織学的検討

本研究では Shp-1 cKO の自己免疫性腎炎の分子機構を詳細に検討する目的で、40 週齢の Shp-1 cKO を用いて病理組織学的な検討を行った。腎臓は固定法により、酵素抗体の発色が安定しないため本研究においては良好な染色性を得るためアルコールやアセトン、また亜鉛を用いた各種の固定法を試み、安定した免疫組織染色法を確立した。さらに、腎臓の凍結切片を用いて蛍光染色を行うことで、糸球体に沈着する免疫グロブリンを同定した。また、腎臓をコラゲナーゼで処理する事で腎臓内に浸潤する単核球を単離することが可能であるが、Shp-1 cKO の腎臓から単離された単核球を用いて、多重染色法によるフローサイトメトリー解析を行った。この時抗 F4/80 抗体や抗 CD4 抗体などのマクロファージや T 細胞などを特異的に検出する抗体を用いて腎臓内に浸潤する細胞の変化を量的にも評価した。さらに磁気ビーズによる細胞分離装置を用いて腎臓内のマクロファージや T 細胞を単離し、サイトカイン産生に関して検討を行った。

(2) pDC からのサイトカイン産生の検討

pDC から産生される I 型 IFN である IFN は DC の活性化や、免疫グロブリン産生の増強等の多彩な作用を有している。さらに、最近では IFN による免疫細胞の過剰な活性化が全身性エリテマトーデスの原因になることも想定されており、pDC の機能異常がもたらす IFN の産生障害に注目が集まっている。

そこで本研究ではpDCにSiglec H抗原が特異的に発現することを利用し、Shp-1 cKOの脾臓からpDCを磁気分離装置で単離し、in vitroにおいてTLR9のリガンドである合成オリゴデオキシヌクレオチド(CpG)で刺激し、IFNの産生についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) Shp-1 cKO にみられる腎炎の組織学的検討

40週齢のShp-1 cKOの腎臓を病理組織学的に検討したところ、Shp-1 cKOでは、糸球体のメサンギウム領域が拡大することが明らかになった。そして、蛍光染色を行ったところ、糸球体内の拡大したメサンギウム領域にIgGを中心とした免疫グロブリンの沈着が確認できた。

さらにShp-1 cKOの腎間質には単核球の浸潤が強く認められ、特にボーマン嚢の周囲に血球系のマーカーであるCD45陽性細胞の強い浸潤が確認された(図1)。そして、これらのCD45陽性細胞の多くは抗F4/80抗体や抗CD4抗体などを用いた染色から、主にマクロファージにより形成されていることが明らかになった。さらに、腎臓をコラゲナーゼ処理することにより得られる単核球を用いたフローサイトメーターによる解析でも、40週齢の mouse ではF4/80陽性のマクロファージの増加が確認され、その他、CD4陽性のT細胞の増加も確認できた。これらの結果は腎の免疫組織染色の結果を支持するものであった。そして、Shp-1 cKOの腎臓から得られた単核球から磁気ビーズによりマクロファージとTh細胞を分取したところ、マクロファージはTNFを強く産生しTh細胞はIFNを産生することが確認できた。

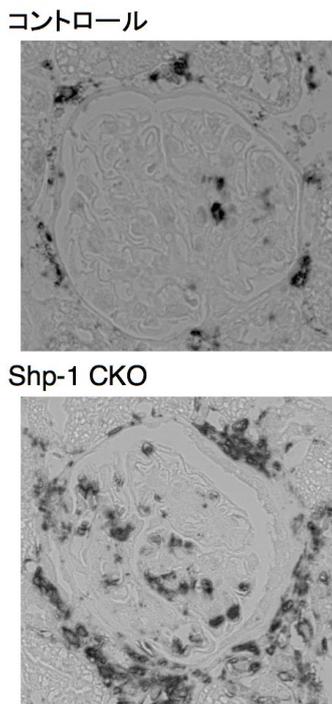


図1 Shp-1 CKOの糸球体周囲に浸潤するCD45陽性細胞(40週齢)

Shp-1 cKOの腎臓から得られた単核球から磁気ビーズによりマクロファージとTh細胞を分取したところ、マクロファージはTNFを強く産生しTh細胞はIFNを産生することが確認できた。

(2) pDCからのサイトカイン産生の検討

Shp-1 cKOにDCの増殖因子であるFlt3リガンドを投与し、骨髄中に増殖したpDCを抗Siglec H抗体を用いた磁気ビーズで単離した。得られたpDCをCpGの存在下で培養しIFNの産生量を測定した。その結果、Shp-1を欠損するShp-1 cKOのpDCにおいてもIFNの産生は確認することができたが、コントロールマウスに比べて有意差をもったIFN産生の相違は確認できなかった。

以上の研究結果から、Shp-1を欠損するDCがマクロファージやT細胞を活性化することで、腎炎が形成されることが判明した。またDCの機能異常はB細胞の活性化を通じて自己反応性の液性免疫応答を惹起し、その結果腎臓に免疫グロブリンが沈着する事も明らかになった。しかし、その一方でShp-1 cKOのpDCから産生されるIFNの産生に著変がなく、pDCの機能異常が自己免疫性腎炎の原因となる可能性は示唆されなかった。

そして、上記の研究結果は臓器特異的な自己免疫性腎炎の病態を考える上でDCが果たす重要性を示すものとなった。

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)

- (1) Dendritic cell SIRP regulates homeostasis of dendritic cells in lymphoid organs.
Washio K, Kotani T, Saito Y, Respatika D, Murata Y, Kaneko Y, Okazawa H, Ohnishi H, Fukunaga A, Nishigori C, Matozaki T
Genes Cells. (査読あり)
2015 20(6):451-63.
doi: 10.1111/gtc.12238.
- (2) Autoimmune animal models in the analysis of the CD47-SIRP signaling pathway.
Murata Y, Saito Y, Kaneko Y, Kotani T, Kaneko Y, Ohnishi H, Matozaki T.
Methods. (査読あり)
2014 65(2):254-9.
doi: 10.1016/j.ymeth.2013.09.016.
- (3) SIRP signaling regulates podocyte structure and function.
Takahashi S, Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Hamatani H, Watanabe M, Ikeuchi H, Kaneko Y, Maeshima A, Aoki T, Ohnishi H, Matozaki T,

Nojima Y.
Am J Physiol Renal Physiol.
(査読あり)
2013 Sep 15;305(6):F861-70
doi: 10.1152/ajprenal.00597.2012.

[学会発表](計 7 件)

- (1) Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp-1 induces autoimmune nephritis characterized by infiltration of dendritic cell and Th1 cell
WATANABE Mitsuharu, KANEKO Yoriaki, HIROMURA Keiju, OHISHI Yuko, KINOSHITA Masato, SAITO Yasuyuki, OHNISHI Hiroshi, MATOZAKI Takashi, NOJIMA Yoshihisa
The 44th annual meeting of the Japan Society of Immunology
2015.11.19 Sapporo
- (2) Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp-1 induces enhanced production of inflammatory cytokines by toll-like receptor-mediated stimulation
OHISHI Yuko, KANEKO Yoriaki, WATANABE Mitsuharu, KINOSHITA Masato, HIROMURA Keiju, SAITO Yasuyuki, OHNISHI Hiroshi, MATOZAKI Takashi, NOJIMA Yoshihisa
The 44th annual meeting of the Japan Society of Immunology
2015.11.20 Sapporo
- (3) Dendritic Cell-Specific Shp-1 Knockout Mice Spontaneously Develop Unique Glomerulo- and Tubulointerstitial Nephritis
Mitsuharu Watanabe, Keiju Hiromura, Yoriaki Kaneko, Masato Kinoshita, Yuko Ohishi, Toru Sakairi, Hidekazu Ikeuchi, Akito Maeshima, Hiroshi Ohnishi, Takashi Matozaki, Yoshihisa Nojima
Kidney WEEK
2015.11.6 San Diego CA
- (4) 樹状細胞特異的 Shp-1 欠損マウスにおける自己免疫性腎炎の解析
渡辺 光治, 廣村 桂樹, 金子 和光, 大石 裕子, 木下 雅人, 坂入 徹, 池内 秀和, 前嶋 明人, 大西 浩史, 的崎 尚, 野島 美久

第 58 回日本腎臓学会学術総会
2015.6.6 名古屋国際会議場(名古屋)

- (5) Essential role of SIRP on dendritic cells in organization and homeostasis of the spleen
WASHIO Ken, KOTANI Takenori, RESPATIKA Datu, MURATA Yoji, SAITO Yasuyuki, KANEKO Yoriaki, OKAZAWA Hideki, OHNISHI Hiroshi, FUKUNAGA Atsushi, NISHIGORI Chikako, MATOZAKI Takashi
The 43rd annual meeting of the Japan Society of Immunology
2014. 12.10 Kyoto
- (6) Immunological analysis of autoimmune nephritis observed in DC-specific Shp-1 conditional knockout mice.
WATANABE Mitsuharu, KANEKO Yoriaki, HIROMURA Keiju, OHISHI Yuko, KINOSHITA Masato, OHNISHI Hiroshi, MATOZAKI Takashi, NOJIMA Yoshihisa
The 43rd annual meeting of the Japan Society of Immunology
2014.12.10 Kyoto
- (7) SLE の病態と治療 樹状細胞と SLE 樹状細胞特異的 Shp-1 欠損マウスの解析
廣村 桂樹, 渡辺 光治, 大石 裕子, 金子 和光, 齋藤 泰之, 金子 哲也, 高岸 憲二, 大西 浩史, 的崎 尚, 野島 美久
第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会
2014.4.26 グランドプリンス新高輪(東京)

6. 研究組織

1. 研究代表者
金子 和光 (KANEKO YORIAKI)
群馬大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00334095