

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860210

研究課題名(和文)細胞間シグナル伝達システムCD47-SIRP系による免疫制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of CD47-SIRPalpha system, an intercellular signaling system, in immune regulation

研究代表者

小谷 武徳 (Kotani, Takenori)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40455960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質であるsignal regulatory protein (SIRP)は、主に樹状細胞(DC)やマクロファージに高発現しており、同じく免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質であるCD47と相互作用することで細胞間シグナル伝達を行う。本研究ではDC特異的にSIRPを欠損したマウスについて解析を行い、このマウスでは二次リンパ組織中のCD4陽性古典的DCや表皮ランゲルハンス細胞が顕著に減少していることを見出した。以上のことから、DC上のSIRPは二次リンパ組織や皮膚においてDCの恒常性維持に必須であると考えられた。

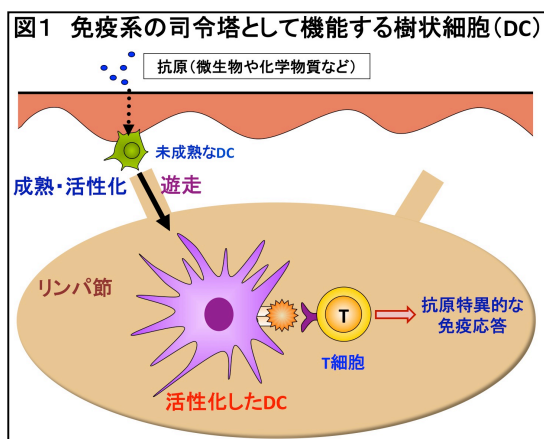
研究成果の概要(英文)：Signal regulatory protein (SIRP), an immunoglobulin superfamily protein that is expressed predominantly in dendritic cells (DCs) or macrophages, mediates cell-cell signaling by interacting with its ligand CD47, another immunoglobulin superfamily protein. In this study, I showed that mice lacking SIRP specifically in DCs manifested a marked reduction of CD4-positive conventional DCs in the secondary lymphoid organs, as well as of Langerhans cells in the epidermis. Thus, these findings suggest that SIRP on DCs is indispensable for homeostasis of DCs in the secondary lymphoid organs and skin.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：細胞間シグナル伝達 樹状細胞 チロシンリン酸化・脱リン酸化 SIRP CD47

1. 研究開始当初の背景

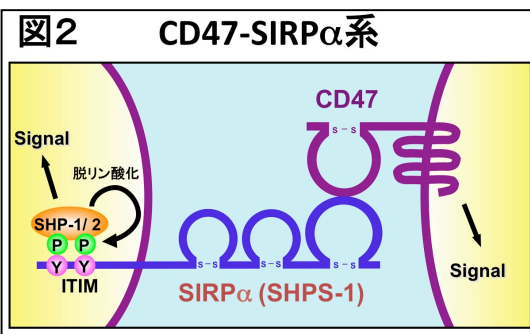
樹状細胞 (DC) は、自己・非自己の認識により発動される自然免疫系とそれに引き続き誘導される獲得免疫系の活性化において、司令塔として重要な役割を担う細胞である。DC は生体内の様々な臓器に分布し、病原体など外来侵入因子を取り込んだ後に所属リンパ節へと遊走するが、この過程において To11 様受容体等を介し非自己である外来侵入因子を認識することで活性化し、抗原提示能や種々のサイトカイン産生能が増強することが知られる。また、活性化した DC はリンパ節において、ナイーブな T 細胞に外来侵入因子抗原を提示し、抗原特異的な T ヘルパー細胞への分化を刺激することにより多様な免疫応答を誘導することが知られる (図 1)。一方、非炎症下の状態では DC が自己抗原を T 細胞に提示し免疫寛容を誘導するとされている。このため DC の機能異常は、自己反応性 T 細胞の活性化や外来抗原に対する過剰な免疫応答を引き起こし、自己免疫病やアレルギー疾患発症に結びつくことが強く示唆されている。



研究代表者はこれまで DC における細胞内シグナル伝達機構の 1 つである蛋白質チロシンリン酸化シグナル系に注目し、このシグナル系による DC の生理機能の制御機構について解析を行って来た。蛋白質チロシンリン酸化は、チロシンリン酸化を触媒するチロシンキナーゼ (PTK) と脱チロシンリン酸化を触媒するチロシンホスファターゼ (PTP) のバランスにより制御されることが知られているが、これまで PTK の研究に比して、PTP の機能やその作用機構に関しては未だ十分に明らかにされていない。しかしながら PTP の 1 つである SHP-1 を突然変異により全身性に欠損した motheaten マウスでは T 細胞や B 細胞が過剰に活性化し肺炎や腎炎などの臓器障害および易感染性を伴う全身性の免疫異常を発症することが報告されており、やはり免疫系の制御において PTP が重要な役割を担っていることが示唆されている。

研究代表者は、この SHP-1 が DC、さらには DC を司令塔とした免疫系をどのように制御

しているのかについて、より詳細に解明することを目的として SHP-1 を DC 特異的に欠損させたマウスを作製し、DC における SHP-1 の役割についての解析を本研究の開始前までに行ってきた。その結果、DC 特異的 SHP-1 コンディショナルノックアウト (cKO) マウスでは脾腫が認められ、その脾臓では DC を含む様々な血球系細胞の増加が認められることが明らかとなった。また、DC 特異的 SHP-1 cKO マウスの脾臓 DC について詳細な解析を行ったところ、DC は活性化状態にあり、炎症性サイトカイン産生の亢進、T 細胞への Th1 反応の誘導能の亢進も認められることが明らかとなった。さらにこの SHP-1 cKO マウスでは B 細胞の過剰な活性化が認められると同時に、自己免疫病の症状も認められた。以上の結果から SHP-1 は DC の活性化を抑制することで自己免疫病に対して抑制的に機能していることが明らかとなった。また、分子レベルの解析からは、SHP-1 cKO マウスの DC において約 100 kDa の蛋白質のチロシンリン酸化レベルの亢進が認められた。この約 100 kDa の分子は SHP-1 の主な基質であり DC に高度に発現することが知られる 1 回膜貫通型分子 SIRP α (図 2, 別名 SHPS-1) である可能性が高く、この SIRP α のチロシンリン酸化レベルの亢進が SHP-1 cKO マウスにおいて DC を過剰に活性化させる要因の 1 つになっていると研究代表者は考えた。これまでに、SIRP α は細胞外領域に免疫グロブリン (Ig) 様構造をもつ Ig スーパーファミリーに属する分子であり、他の Ig スーパーファミリー分子である CD47 をリガンドとして各々の細胞外領域が相互作用をすることにより細胞間シグナル伝達系 “CD47-SIRP α 系” を形成していることが知られている (図 2)。一方、SIRP α の細胞内領域にはチロシンリン酸化を受ける部位があり、これに SHP-1 や SHP-2 と構造がよく似ている SHP-2 が結合して下流にシグナルが伝達されることが想定されている。



2. 研究の目的

DC の機能制御、DC による T 細胞の活性化制御の詳細な分子メカニズムの理解は、自己免疫病を含め DC の機能異常に伴う疾患の発症機序や、それを克服する大きな手がかりを与えるものであると考えられる。しかしなが

ら DC の機能制御の分子機構や、その異常と疾患との関連については未だ十分明らかにされていないことから、本研究では DC 特異的 SHP-1 cKO マウスで得られた研究成果を手がかりに、DC の生理機能制御に関わる蛋白質チロシンリン酸化シグナルを明らかにしていくことを目的とした。特に SHP-1 の主な基質であり DC に高度に発現することが知られる 1 回膜貫通型分子 SIRP α と、SIRP α のリガンドとして知られる 5 回膜貫通型分子 CD47 によって形成される CD47-SIRP α 系による DC の生理機能制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) DC 特異的 SIRP α cKO マウスの解析

DC 上に発現する SIRP α の生理機能について明らかにすることを目的として、DC 特異的 SIRP α cKO マウスの二次リンパ組織（脾臓やリンパ節）や表皮に存在する DC の詳細な解析を免疫染色法やフローサイトメーターによって行った。本研究で用いた DC 特異的 SIRP α cKO マウスは、Cre-loxP システムを用いることで DC 特異的に SIRP α を欠損させたマウスであり、具体的には SIRP α floxed マウスと CD11c-Cre マウスの交配により得られたマウスである。

(2) ストローマ細胞特異的 CD47 cKO マウスの作製及び解析

DC 上の SIRP α は、二次リンパ組織においてストローマ細胞に発現する CD47 と相互作用することで CD47-SIRP α 系を形成し、機能していると考えられる。そこで、CD47 floxed マウスとストローマ細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する CCL19-Cre トランスジェニックマウスとの交配によりストローマ細胞特異的 CD47 cKO マウスを得て DC に発現する SIRP α と非 DC であるストローマ細胞上の CD47 によって形成される CD47-SIRP α 系の生理機能につき解析を行った。具体的には、このストローマ細胞特異的 CD47 cKO マウスの脾臓について免疫染色法を用いた解析を進めた。

4. 研究成果

(1) DC 特異的 SIRP α cKO マウスの解析

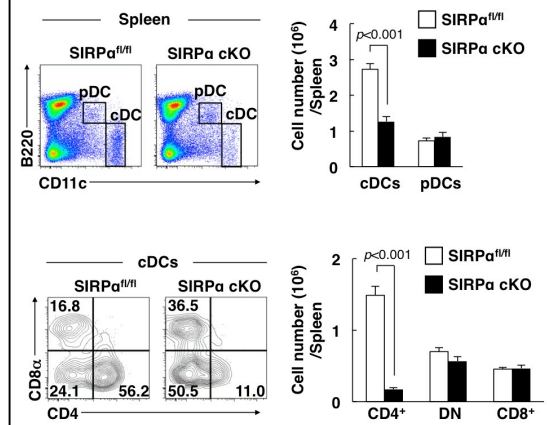
① DC 特異的 SIRP α cKO マウスの脾臓における CD4⁺ 陽性古典的 DC (CD4⁺ cDC) の減少

DC は主に骨髄から産生され、抗原提示細胞である古典的 DC (cDC) と、タイプ I インターフェロンを産生する形質細胞様 DC (pDC) の二種類に大別される。そこで、DC 上での SIRP α 欠損がこれらの DC の種類に与える影響を調べるため、コントロールマウス (SIRP α floxed マウス; SIRP α ^{f1/f1}) 及び DC 特異的 SIRP α cKO マウスの脾臓細胞についてフローサイトメーターを用いた解析を行った。フローサイトメーターにより CD11c の発現が高い cDC と、CD11c と B220 を発現している pDC を分けることが出来るが、SIRP

α ^{f1/f1} マウスに比べ DC 特異的 SIRP α cKO マウスの脾臓では cDC が顕著に減少することが明らかとなった (図 3 上段)。

さらに、cDC は CD4 と CD8 の染色により、3 つのサブタイプ (CD4⁺ cDC, CD4⁻ CD8⁻ cDC (DN cDC), CD8⁺ cDC) に分類することが出来るが、DC 特異的 SIRP α cKO マウスの脾臓においては CD4⁺ cDC が顕著に減少していることが明らかとなった (図 3 下段)。

図3 DC特異的SIRP α cKOマウスの脾臓における CD4⁺ cDCの減少

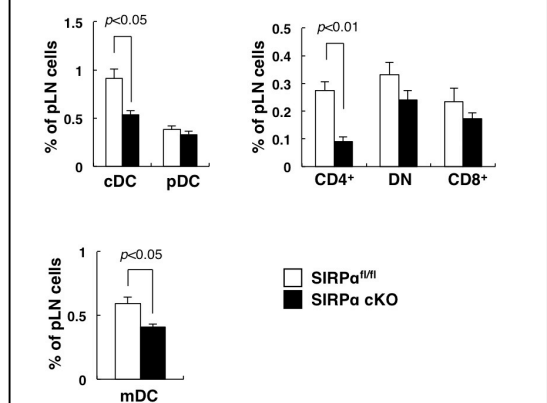


② DC 特異的 SIRP α cKO マウスの末梢リンパ節における CD4⁺ cDC の減少

上記①の脾臓を用いた解析と同様に、末梢リンパ節中の DC についてもフローサイトメーターを用いた解析を行った。その結果、脾臓と同様に DC 特異的 SIRP α cKO マウスの末梢リンパ節においても cDC の減少、さらには CD4⁺ cDC の減少が認められた (図 4 上段)。

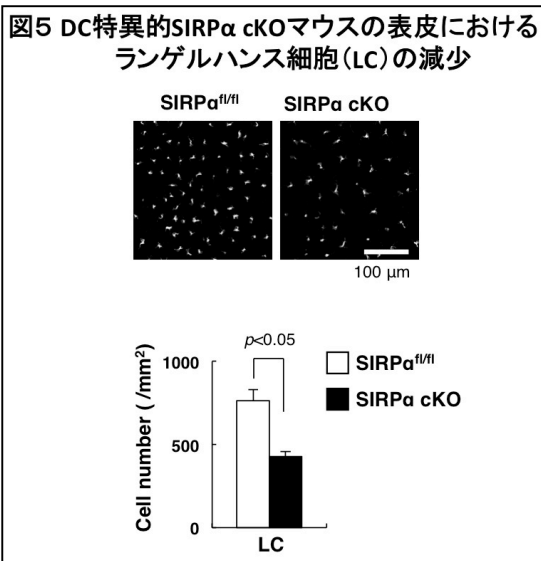
その一方で、表皮から末梢リンパ節に移動して来た migratory DC (mDC; CD11c^{int} I-A^{high} DC) についても解析を行ったところ、mDC 数は DC 特異的 SIRP α cKO マウスの末梢リンパ節で減少していることが明らかとなった (図 4 下段)。

図4 DC特異的SIRP α cKOマウスのリンパ節における CD4⁺ cDC及びmigratory DC (mDC)の減少



③ DC 特異的 SIRP α cKO マウスの表皮におけるランゲルハンス細胞 (LC) の減少

上記の結果を踏まえ、DC 特異的 SIRP α cKO マウスの表皮における DC についても解析を行った。表皮においてはランゲルハンス細胞 (LC) が DC と考えられる。DC 特異的 SIRP α cKO マウスにおいて Cre リコンビナーゼを発現させる為に使用している CD11c プロモーターは LC のうち I-A⁺LC で特異的に機能することが知られていることから、マウスの耳の表皮を抗 I-A 抗体で免疫染色し、I-A⁺LC の観察を行った。その結果、DC 特異的 SIRP α cKO マウスの表皮において I-A⁺LC の減少が認められた (図5)。



以上の①～③の結果から、DC 上の SIRP α は二次リンパ組織や皮膚において DC の恒常性の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(2) ストローマ細胞特異的 CD47 cKO マウスの作製及び解析

本研究の開始前までに作製していた CD47 floxed マウスとストローマ細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する CCL19-Cre トランスジェニックマウスとの交配を重ね、ストローマ細胞特異的 CD47 cKO マウスを得た。

このマウスの脾臓につき免疫染色による解析を進めたところ、ストローマ細胞の構成に異常が認められた。また、この異常は DC 特異的 SIRP α cKO マウスの脾臓においても同様に認められた。現在、この結果を再確認中ではあるが、DC に発現する SIRP α とストローマ細胞上の CD47 によって形成される CD47-SIRP α 系が脾臓の構築に重要な細胞間シグナル伝達系であることが予想された。

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 2 件)

① 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 α regulates homeostasis of dendritic cells in lymphoid organs.

Genes Cells. 査読有. 20 巻. 2015. 451-63. doi:10.1111/gtc.12238.

② 小谷 武徳, 村田 陽二, 的崎 尚
【細胞シグナル操作法】分子からみたシグナル操作法 キナーゼ プロテインホスファターゼ
生体の科学. 査読無. 66 巻. 2015. 432-433

[学会発表] (計 5 件)

① Datu Respatika, Yasuyuki Saito, Ken Washio, Satomi Komori, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki
Essential Role of SIRP α on Dendritic Cells in Homeostatic Regulation of Spleen Stromal Cells
第 7 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2016. 1. 29、自然科学研究機構山手地区 3 号館大会議室(愛知県)

② Datu Respatika
Essential role of SIRP α on dendritic cells in homeostatic regulation of the secondary lymphoid organ
2015 神戸大学・ワシントン大学国際合同シンポジウム、2015. 9. 10、シアトル (USA)

③ Ken Washio, Takenori Kotani, Datu Respatika, Yoji Murata, Yasuyuki Saito, Hideki Okazawa, Hiroshi Ohnishi, Atsushi Fukunaga, Chikako Nishigori, Takashi Matozaki
Essential role of SIRP α 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)

④ 小谷 武徳、鷺尾 健、レスパティカ・ダトゥ、村田 陽二、齊藤 泰之、的崎 尚
細胞間コミュニケーションシステム CD47-SIRP α 系による血液・免疫系の制御
第 37 回日本分子生物学会年会、2014. 11. 26、パシフィコ横浜(神奈川県)

⑤ 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維持における SIRP α 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）

〔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/signal/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 武徳 (KOTANI, Takenori)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 40455960