

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591307

研究課題名（和文） SHPS-1/SIRP α 関連蛋白による制御性 T 細胞の誘導と皮膚炎症の制御研究課題名（英文） Induction of regulatory T cells by SHPS-1/SIRP α -related proteins and regulation of skin inflammation

研究代表者

堀川達弥（HORIKAWA TATSUYA）

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00173633

研究成果の概要：マウスに抗 SHPS-1 抗体を投与することによって接触過敏症の抑制を誘導できたが、ハプテン特異的免疫寛容を誘導できなかった。CCR7 刺激による皮膚樹状細胞の遊走は Rho kinase の活性化を伴っており、抗 SHPS-1 抗体によって CCR7 による遊走および Rho kinase の活性化は抑制された。また SHPS-1 変異マウスの骨髄から作成した樹状細胞は CCR7 刺激による遊走が現弱していた。これらのことより SHPS-1 は感作相において接触過敏症を制御するが、その機序は Rho kinase を介した CCR7 刺激による遊走の制御によるものであることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：(1) 樹状細胞、(2) SHPS-1、(3) 細胞遊走、(4) Rho kinase、(5) XS52、(6) 抗 SHPS-1 抗体、(7) SHPS-1 knockout マウス

1. 研究開始当初の背景

Signal regulatory protein (SIRP)

familyは免疫担当細胞の機能制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。

Src Homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-1 (SHPS-1) は SIRP familyの一つであり SIRP α とも呼ばれ、樹状細胞(DC)、マクロファージ、好中球、神経細胞などの細胞膜上に発現している。SIRP familyの中でSHPS-1/SIRP α のみが細胞内に ITIMと呼ばれる抑制性モチーフを有し、活性化モチーフである ITAM を欠くことから免疫機能を負の方向に誘導する働きを持つと考えられている。我々は皮膚の代表的な DC である

Langerhans 細胞 (LC) の細胞膜上に SHPS-1/SIRPa が発現し、感作相においてその抗体やリガンド (CD47-Fc) を結合させることによって *in vivo* 及び *in vitro* で LC の遊走および成熟を抑制しハプテンによる接触過敏反応が減弱すること、および SHPS-1 変異マウスにおいて LC の遊走、成熟および接触過敏反応 (CHS) が減弱していることを見出した (J Immunol, 2004, Eur J Immunol, 2006)。

一方、SHPS-1/SIRPa のリガンドである CD47 は全ての体細胞の細胞膜上に発現しており、細胞の貪食、アポトーシス、細胞遊走など白血球の様々な機能と関連することが知られている分子であり、上皮細胞による免疫担当細胞の機能制御にも関連している。我々は CD47 が表皮角化細胞 (KC) や LC に発現していることを確認し、感作相において CD47 のリガンド (SHPS-1-Fc) を *in vivo* 投与すると LC の遊走と成熟が抑制され、さらにハプテンによる CHS 反応が抑制されることを報告した (J Invest Dermatol, 2006)。CD47 は可溶性分子である thrombospondin-1 (TSP-1) とも結合することが知られており、これらの分子によって CD47 のシグナルはさらに制御を受けていると考えられる。

2. 研究の目的

角化細胞と樹状細胞間あるいは樹状細胞と田の細胞との間で相互作用をしている SHPS-1-CD47 システムは皮膚局所において皮膚炎症応答を制御している可能性があり、その制御機序を明らかにすることは有意義である。SHPS-1-CD47 システムによる皮膚炎症制御機序の解明は炎症性皮膚疾患の症状を抑制する治療法の開発にも役立つと考えられる。SHPS-1-CD47 システムにおける接触過敏症の抑制、およびその抑制機序を検討する。接触過敏反応を抑制する系ではハプテン特異的免疫寛容が見られるが、このハプテン特異的免疫寛容に SHPS-1-CD47 システムが関与するのか、また SHPS-1-CD47 システムは樹状

細胞遊走をどのように制御し、さらに SHPS-1 の抗体によって皮膚炎などの炎症の抑制ができるのかについて検討する。免疫寛容が誘導されれば制御性 T 細胞の誘導に SHPS-1-CD47 システムがどのように関与するのかを検討する。SHPS-1-CD47 システムは樹状細胞の所属リンパ説への遊走を制御することによって皮膚炎症応答を制御しており、樹状細胞の遊走を制御する機序についても検討を行う。

3. 研究の方法

マウスにおける抗 SHPS-1 抗体投与による接触過敏反応の抑制とハプテン特異的免疫寛容の誘導 : C57BL6 マウスに DNFB で感作を行い、5 日後にチャレンジを行って 24 時間後に耳介腫脹が起こることを確認した。感作 1 時間前に抗 SHPS-1 抗体あるいはコントロール抗体 (rat IgG) を投与し、DNFB 感作を行い、5 日後にチャレンジを行った。さらに抗 SHPS-1 抗体処置後に DNFB 感作を行った 14 日後にチャレンジを行った。

ハプテン塗布後の I-A^b 陽性細胞の SHPS-1 発現の変化 : マウス耳介に DNFB を塗布し、その 24 時間後に同部より表皮を採取し、抗 SHPS-1 抗体および抗 I-A^b 抗体を用いて FACS 解析を行い、I-A^b 陽性細胞の SHPS-1 の発現の変化を検討した。

XS52 細胞の成熟と CCR7 刺激による

chemotaxis と Rho kinase の活性化 : XS52 細胞は GM-CSF 2ng/ml と 10% NS47 stroma cell 培養上清、10% FBS を含む complete RPMI1640 培地で増殖させ、GM-CSF 10ng/ml と IL-4 10ng/ml の存在下に 9 日間培養することにより成熟させた。成熟させた XS52 細胞が CCR7 を発現しているかどうかを FACS 解析した。さらに成熟させた XS52 細胞を MIP3 β で刺激してリン酸化 MBS 抗体を用いて Rho kinase

の活性化を検討した。

SHPS-1 変異マウスからの骨髄由来樹状細胞の作成：野生型および変異マウスの大腿骨を採取し、骨髄細胞を取り出し、浸透圧ショックにより赤血球を取り除いた後に 2×10^6 個の細胞を 10cm デッシュにて培養した。培養液は GM-CSF 20ng/ml、10%FBS 加 complete RPMI1640 を使用し、day 3、day 6、day 8 に培地の交換をした。Day10 に GM-CSF 10ng/ml と LPS 2ug/ml または TNF- α 50ng/ml で 2 日間刺激をして成熟させた。

CCR7 発現の解析：骨髄細胞由来樹状細胞は I-A^b、CD80、CD86、CCR7 に対する抗体を用いて FACS 解析を行なった。

骨髄由来樹状細胞中の CCR7 陽性細胞の enrichment：骨髄細胞から作成した樹状細胞を FITC 付き anti-mouse CD86 抗体でさせ、洗浄後 MACS Anti-FITC Microbeads 抗体を反応させた。洗浄後 MACS にて CD86 陽性細胞 fraction を回収した。

Chemotaxis assay：Boyden chamber 法で検討した。Day12 に回収した骨髄由来 CD86 陽性細胞 5×10^4 個を upper chamber に、MIP3 β 50ng/ml を lower chamber に添加し 4 時間培養した後、遊走した細胞数を WT の骨髄由来 CD86 陽性細胞と比較検討した。

Rho kinase 活性の評価：成熟 XS52 細胞あるいは Day12 に回収した骨髄由来 CD86 陽性細胞を MIP3 β 50ng/ml で 30 分間刺激後、Rho kinase による myosin-binding subunit (MBS) のリン酸化レベルの上昇を Western blotting により検出し、WT と比較検討した。

4. 研究成果

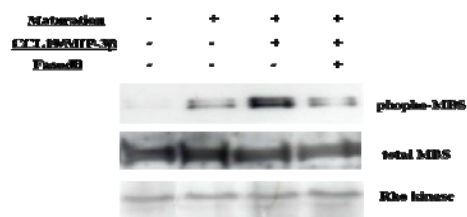
(1) 抗 SHPS-1 抗体のマウスへの in vivo 投与により接触過敏症の減弱が起こることを確認した。さらに免疫寛容が誘導されるか否かについて検討を行なったが免疫寛容は誘導

されなかった。このことから抗 SHPS-1 抗体投与は接触過敏症を抑制するが、免疫寛容を誘導しないことが示唆された。SHPS-1 変異マウスでは野生型に比べて接触過敏症の減弱があることを確認した。

(2) ハプテン塗布 24 時間後の表皮 I-A^b 陽性細胞の SHPS-1 発現の変化について検討をしたが、DNFB 塗布後 24 時間では表皮 I-A^b 陽性細胞は減少していたが、SHPS-1 発現の変化は見られなかった。このことから、樹状細胞はハプテン塗布後も SHPS-1 による制御を受けている可能性が示唆された。

(3) 樹状細胞株 XS52 を IL-4 と GM-CSF で 9 日間刺激することによって成熟させると CCR7 が発現することを確認した。成熟 XS52 細胞を CCR7 のリガンドである MIP3 β で刺激すると chemotaxis が起こること、およびその際に Rho kinase の活性化がみられることを見出した (図 1A)。Rho kinase 阻害薬は XS52 の遊走や in vivo での Langerhans 細胞の遊走を阻害し接触過敏症を抑制することを報告した (図 1B)。

A



B

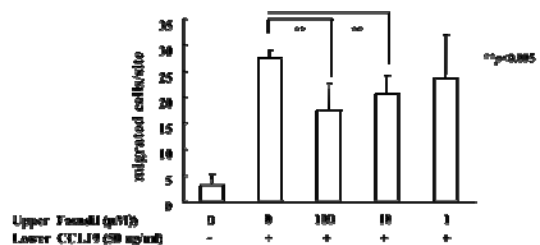


図 1

(4) 成熟 XS52 細胞の MIP3 β による

chemotaxis は抗 SHPS-1 抗体によって抑制されたがコントロール抗体では抑制されなかった(図 2)。

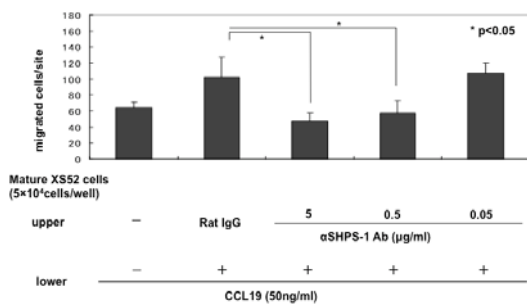


図 2

(5) 成熟 XS52 細胞の MIP3 β による Rho kinase 活性化は抗 SHPS-1 抗体によって抑制されたがコントロール抗体では抑制されなかった(図 3)。

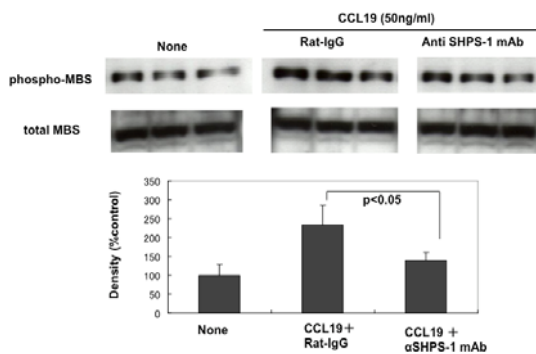
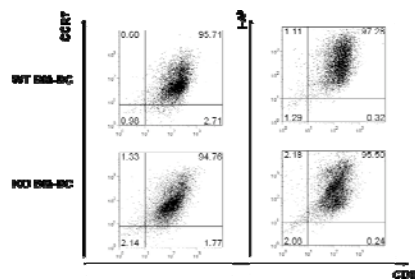


図 3

(6) 野生型、および SHPS-1 変異マウスの骨髄細胞から樹状細胞を作成したが、両者はともに十分に成熟し CD80, CD86, CCR7 を発現することができることを確認し、抗 CD86 抗体と MACS によって purify した樹状細胞は約 95%が CCR7 陽性であることを確認した(図 4A)。この樹状細胞を用いて chemotaxis assay を行ったところ、SHPS-1 変異マウスでは野生型に比べて MIP3 β による chemotaxis が減弱していることを見出した(図 4B)。

A



B

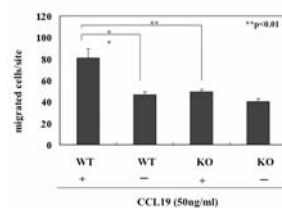


図 4

これらのことより(1)CCR7 刺激による皮膚樹状細胞あるいは骨髄由来樹状細胞の遊走には Rho kinase の活性化が関与していること、(2)抗 SHPS-1 抗体により結合は CCR7 刺激による Rho kinase の活性化を抑制して樹状細胞の遊走を抑制していることが示唆された。SHPS-1 が免疫寛容を誘導するということは明らかにできなかったが、SHPS-1 は樹状細胞の遊走を制御し、免疫応答を制御していること、その遊走の制御には Rho kinase が関与していることを明らかにした。SHPS-1 のシグナル経路は未だ不明であり、Rho kinase の関与があることは新知見であり、SHPS-1 による樹状細胞の制御機構を考える上で重要な知見である。

(7)自然発症皮膚炎モデルにおいて T 細胞受容体の V β 8 の変異が皮膚炎発症と関連していること、さらに TLR2 刺激による IL-13 産生には V β 8 陽性細胞が必要なことを見出し報告した。

(8)マウス接触過敏反応においてはチオレドキシシンが惹起相を抑制するが感作層には関与しないことを見いだした。

(9)マウス関節炎モデルにおいて抗 SHPS-1 抗体の投与により、関節炎の発症が抑制されることを見いだした。In vitro での抗 SHPS-1 抗体の投与により con A 刺激リンパ球からは Th1 サイトカインの低下が見られたが Th2 サイトカインの低下は見られなかった。

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 9 件)

1. Fukunaga A, Horikawa T, et al (他 8 名、2 番目) : Thioredoxin Suppresses the Contact Hypersensitivity Response by Inhibiting Leukocyte Recruitment during the Elicitation Phase. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Feb 2. [Epub ahead of print] 査読有
2. Imura K, Horikawa T, et al (他 6 名、7 番目) : Association of T-cell receptor Vbeta haplotypes with dry skin in DS-Nh mice. *Clin Exp Dermatol*. 34:61-67, 2008 査読有
3. Tanaka K, Horikawa T, Suzuki R et al (他 9 名、2 番目TH, 12 番目RS) : Inhibition of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 reduces the severity of collagen-induced arthritis. *J Rheumatol*. 35:2316-24, 2008 査読有
4. Gotoh A, Horikawa T, et al (他 5 名、6 番目) : Skew in T cell receptor usage with polyclonal expansion in lesions of oral lichen planus without hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*. 154:192-201, 2008 査読有
5. Yoshioka T, Horikawa T, et al (他 7 名、

8 番目) : Impact of the Gly573Ser substitution in TRPV3 on the development of allergic and pruritic dermatitis in mice. *J Invest Dermatol*. 129:714-22, 2009 査読有

6. Ueno M, Horikawa T, et al (他 4 名、3 番目) : Allergic contact dermatitis caused by poly(adipic acid-co-1,2-propylene glycol) and di-(n-octyl) tin-bis(2-ethylhexylmaleate) in vinyl chloride gloves. *Contact Dermatitis*. 57:349-51, 2007 査読有

7. Tohyama M, Horikawa T, et al (他 4 名、3 番目) : Association of human herpesvirus 6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol*. 157:934-40, 2007 査読有

8. Yoshioka T, Horikawa T, et al (他 6 名、7 番目) : Impact of T-cell receptor Vb haplotypes on the development of dermatitis in DS-Nh mice: synergistic production of interleukin-13 caused by staphylococcal enterotoxin C and peptide glycans from *Staphylococcus aureus*. *Immunology*, 121:51-56, 2007 査読有

9. Shiobara N, Suzuki R et al (他 9 名、11 番目). Bacterial superantigens and T cell receptor β -chain-bearing T cells in the immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*, 150:13-21, 2007 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Horikawa T, Ogura K, et al (他 6 名、1 番目) : CCR7-mediated migration of DCs through activation of Rho kinase is regulated by SHPS-1, 10th International

Meeting on Dendritic Cells, 2008 年 10 月
1-5 日 Kobe

2. Ogura K, Horikawa T, et al: CCR7-mediated
migration of dendritic cells through
activation of Rho kinase is regulated by
Src homology 2 domain-containing protein
tyrosine phosphatase substrate-1 ,
International Investigative Dermatology,
2008 年 5 月 14-17 日、Kyoto

3. 堀川達弥、小倉香奈子他 5 名 (1 番目) :
樹状細胞の CCR7 刺激による rho kinase の活性
化における SHPS-1 の制御. 日本皮膚科学会
総会、2008 年 4 月 18-20 日、京都

4. Oniki T, Horikawa T, et al (他 5 名, 7 番目
) : Rho kinase plays a crucial role in the
migration of epidermal Langerhans cells
mediated by CCR7. 日本研究皮膚科学会 2007
年 4 月 19 日, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀川達弥 (HORIKAWA TATSUYA)
神戸大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00173633

(2) 研究分担者

鈴木隆二 (SUZUKI RYUJI)
独立行政法人国立病院機構 (相模原病院臨床
研究センター)
臨床研究センター・診断治療研究室・研究室
長
研究者番号：70373470

(3) 連携研究者

なし