

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370044

研究課題名（和文）CD47-SHPS-1系の生理機能と病態への関与

研究課題名（英文）Physiological and pathological roles of CD47-SHPS-1 system

研究代表者

的崎 尚 (MATOZAKI TAKASHI)

群馬大学・生体調節研究所・客員教授

研究者番号：80252782

研究成果の概要（和文）：

膜型分子であるCD47とSHPS-1は、各々の細胞外ドメインを介して相互作用することにより細胞間シグナル伝達システムとして機能する。本研究において研究代表者は、CD47-SHPS-1系が、脳においてストレスを感知しうつ状態の制御に関与していること、免疫系においてIL-17産生Tヘルパー(Th17)細胞の誘導と自己免疫病発症に重要であること、さらに膵β細胞からのインスリン分泌制御において重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

SHPS-1 and CD47 are transmembrane proteins and they constitute a cell-cell communication system by interacting their ectodomains. In this research project, we have shown that CD47-SHPS-1 system participates in regulation of brain stress response and depression-like behavior as well as induction of IL-17-producing helper T cells and autoimmune diseases. In addition, it also plays an important role in regulation of insulin secretion from pancreatic β cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

研究分野：生化学、分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：シグナル伝達学、生体分子学、蛋白質、脳・神経、免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) CD47-SHPS-1系は、1回膜貫通型のレセプター型分子であるSHPS-1と、その細胞外領域の生理的なりガンドである5回細胞膜貫通型分子CD47により構成される。SHPS-1とCD47は共に、各々の細胞外ドメインに免疫グロブリン様構造をもち、これらを

介して相互作用することにより、双方向性にシグナルを伝えると想定している。SHPS-1の細胞内ドメインには、増殖因子などによりチロシンリン酸化を受けるモチーフをもち、これにSH2ドメインをもつ細胞質型チロシンホスファターゼSHP-2あるいはSHP-1が結合する。

(2) 研究代表者は、以前の基盤研究(B) (平成14-15年度、平成16-17年度)により、CD47-SHPS-1系が普遍的な細胞運動、マクロファージによる食食、神経回路網形成などの制御において、極めて重要な細胞間シグナル伝達機構であることを明らかにしていた。SHPS-1とCD47は共に中枢神経系において豊富に発現するが、脳における生理的な機能は不明であった。さらにSHPS-1は、獲得免疫系の活性化に重要である樹状細胞にも強く発現するが、CD47-SHPS-1系の免疫系における機能についても全く明らかでなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究においては、中枢神経系ならびに免疫系でのCD47-SHPS-1系の生理機能ならびに作用機構に関する詳細な解析を行うことを目的とする。

(2) 上記以外の臓器、組織におけるCD47-SHPS-1系の新たな機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) 中枢神経における機能制御に関しては、SHPS-1遺伝子破壊(KO)マウスとCD47 KOマウスの両方を用いて、種々の行動実験を行った。さらに、行動負荷に反応した脳内の変化を生化学的、分子生物学的手法により解析した。

(2) 免疫機能制御におけるCD47-SHPS-1系の生理機能と病態への関与について、SHPS-1 KOマウスならびにCD47 KOマウスを用い、自己免疫疾患のマウスモデルである実験的脳脊髄炎(EAE)、コラーゲン誘導性関節炎(CIA)あるいは接触過敏性皮膚炎(CHS)の発症を検討した。また、EAEやCIAの発症に重要であるとされるIL-17産生性CD4⁺T細胞(Th17)分化を検討した。樹状細胞上のSHPS-1とT細胞上のCD47との相互作用が、いわゆる副刺激分子として機能し、Th17細胞の誘導に重要である可能性につき検討した。

4. 研究成果

(1) CD47とSHPS-1は共に中枢神経系に高度に発現する。SHPS-1 KOマウスが、うつ状態を判定する行動実験である強制水泳テスト(Forced Swim Test, FST)において強いうつ傾向を示すことを見出した。さらに、FS

ストレスにより脳内SHPS-1の細胞内ドメインが強くチロシンリン酸化されることを明らかにした。このFSストレスによるSHPS-1のチロシンリン酸化は、SrcファミリーキナーゼであるFynのKOマウスでは顕著に抑制されること、またFSストレスにより脳内のSrcファミリーキナーゼが活性化されることから、FSストレスによるSHPS-1のチロシンリン酸化には、Srcファミリーキナーゼが重要であることが示唆された。さらに、CD47 KOマウスもFSTにおいてうつ傾向を示すことが判明し、このマウスではFSストレスによるSHPS-1のチロシンリン酸化が著しく抑制されていた。従って、CD47-SHPS-1系は、脳においてストレスを感知しうつ状態の制御に関与していることが明らかとなった。興味深いことに、CD47との結合に重要なSHPS-1の細胞外領域のN末端免疫グロブリン様ドメインにはアミノ酸置換を伴う遺伝子多型が集中し、これがCD47との結合に多様性を生み出す可能性を見出しつつある。すなわち、SHPS-1遺伝子多型によりCD47-SHPS-1系の機能に違いが生まれストレスへの応答性やうつ病など精神疾患発症の素因に影響する可能性が示唆される。

(2) SHPS-1は獲得免疫系の活性化に重要である樹状細胞(DC)に強く発現する。SHPS-1マウスとCD47 KOマウスを用いて、自己免疫疾患のマウスモデルであるEAE(多発性硬化症モデル)、CIA(関節リウマチモデル)、CHS(接触性皮膚炎モデル)の発症を検討したところ、これら自己免疫疾患モデルの発症が共に著しく抑制されることを見出した。さらに、SHPS-1マウスでは、抗原により感作されたDCによるTh17細胞誘導が極度に障害されていることを見出した。これらの結果から、DCに発現するSHPS-1とCD4⁺T細胞に発現するCD47の相互作用が、Th17細胞の誘導と自己免疫病モデルの発症に重要であると想定している。リーシュマニア感染ではTh1系の誘導により原虫が排除されることが知られているが、SHPS-1 KOマウスでは、リーシュマニア感染に対する抵抗性が強度に低下していることを見出している。この結果から、CD47-SHPS-1系がTh17系以外にもTh1系制御における役割を担っていることが示された。

(3) 骨髄中に存在する DC の前駆細胞は脾臓、リンパ節といった二次リンパ組織や全身の各臓器へ移動し、様々な種類の DC へ分化する。CD11c 高度陽性 DC (コンベンショナル DC、cDC) は CD8 陽性 cDC および CD4 陽性 CD8 陰性 cDC (CD4⁺cDC) ならびに CD4 陰性 CD8 陰性 cDC といったサブセットにマウスでは細分化される。SHPS-1 KO ならびに CD47 KO マウスの二次リンパ組織において、CD8 陰性 cDC (とりわけ CD4⁺cDC) が著しく減少しており、これが CD4⁺cDC の細胞寿命の短縮によることを見出した。さらに、骨髄キメラマウスを用いた解析から、SHPS-1 による cDC の恒常性制御には cDC 自体に発現する (cell-autonomous な) SHPS-1 が重要であり、一方、非血球細胞の CD47 がこの制御に重要であることが明らかとなった。これらの結果から、DC の SHPS-1 とストローマ細胞などの CD47 の相互作用が CD4⁺cDC の恒常性維持に必須であることが示唆された。

(4) SHPS-1 は膵ラ氏島においてインスリンを分泌する β 細胞に特異的な発現を示し、一方、CD47 は β 細胞に強い発現を認めたが、 α 、 δ 、PP 細胞にも発現が認められた。SHPS-1 KO マウスは、野生型マウスに比べて有意な血中インスリン量の低下が認められた。高脂肪食負荷を与えた SHPS-1 KO マウスでは、耐糖能の低下と、グルコース刺激で血中に分泌されるインスリン量の低下が認められた。単離膵ラ氏島を用いて、インスリン分泌を検討したが、野生型と SHPS-1 KO マウスの間で明らかな違いは認められなかった。一方、 $\alpha 2$ アドレナリン受容体の遮断薬 Yohimbine で、交感神経系によるインスリン分泌抑制作用を遮断すると、SHPS-1 KO マウスのインスリン分泌不全が改善されるという結果を得た。この結果から、SHPS-1 KO マウスの表現型には交感神経系が関与し、その制御に交感神経系-膵ラ氏島間での CD47-SHPS-1 系が機能する可能性が想定された。

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 10 件)

1. Morimoto, N., Murata, Y., Motegi, S., Suzue, K., Saito, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Kotani, T., Kusakari, S., Ishikawa, O., and Matozaki, T. Requirement of SIRP α for protective immunity against leishmania major. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (査読あり) 401, 385-389, 2010.
2. Kanazawa, Y., Saito, Y., Supriatna, Y., Tezuka, H., Kotani, T., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Kinouchi, Y., Nojima, Y., Ohteki, T., Shimosegawa, T., and Matozaki, T. Role of SIRP α in regulation of mucosal immunity in the intestine. *Genes Cells*, (査読あり) 15, 1189-1200, 2010.
3. Saito, Y., Iwamura, H., Kaneko, T., Ohnishi, H., Murata, Y., Okazawa, H., Kanazawa, Y., Sato-Hashimoto, M., Kobayashi, H., Oldenborg, P.-A., Naito, M., Kaneko, Y., Nojima, Y., and Matozaki, T. Regulation by SIRP α of dendritic cell homeostasis in lymphoid tissues. *Blood*, (査読あり) 116, 3517-3525, 2010.
4. Ohnishi, H., Murata, T., Kusakari, S., Hayashi, Y., Takao, K., Maruyama, T., Ago, Y., Koda, K., Jin, F.-J., Okawa, K., Oldenborg, P.-A., Okazawa, H., Murata, Y., Furuya, N., Matsuda, T., Miyakawa, T., and Matozaki, T. Stress-evoked tyrosine phosphorylation of SIRP α regulates behavioral immobility in the forced swim test. *J. Neurosci.*, (査読あり) 30, 10472-10483, 2010.
5. Matozaki, T., Murata, Y., Okazawa, H., and Ohnishi, H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRP α signalling pathway. *Trends Cell Biol. (Review)*, (査読あり) 19, 72-80, 2009.
6. van Beek, E. M., de Vries, T. J., Mulder, L., Schoenmaker, T., Hoeben, K. A., Matozaki, T., Langenbach, G. E. J., Kraal, G., Everts, V., and van den Berg, T. K. Inhibitory regulation of osteoclast bone resorption by SIRP α . *FASEB J.*, (査読あり) 23, 4081-4090, 2009.

7. Kobayashi, M., Ohnishi, H., Okazawa, H., Murata, Y., Hayashi, Y., Kobayashi, H., Kitamura, T., and Matozaki, T. Expression of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 in pancreatic β -cells and its roles in promotion of insulin secretion and protection against diabetes. *Endocrinology*, (査読あり) 149, 5662-5669, 2008.
 8. Okuzawa, C., Kaneko, Y., Murata, Y., Miyake, A., Saito, Y., Okajo, J., Tomizawa, T., Kaneko, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Matozaki, T., and Nojima, Y. Resistance to collagen-induced arthritis in SHPS-1 mutant mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (査読あり) 371, 561-566, 2008.
 9. Miyake, A., Murata, Y., Okazawa, H., Ikeda, H., Niwayama, Y., Ohnishi, H., Hirata, Y., and Matozaki, T. Negative regulation by SHPS-1 of Toll-like receptor-dependent proinflammatory cytokine production in macrophages. *Genes Cells*, (査読あり) 13, 209-219, 2008.
 10. Kusakari, S., Ohnishi, H., Jin, F.-J., Kaneko, Y., Murata, T., Murata, Y., Okazawa, H., and Matozaki, T. Trans-endocytosis of CD47 and SHPS-1 and its role in regulation of the CD47-SHPS-1 system. *J. Cell Sci.*, (査読あり) 121, 1213-1223, 2008.
- [学会発表] (計 13 件)
1. Ohnishi, H., Kusakari, S., Murata, T., Hayashi, Y., Maruyama, T., Okazawa, H., Murata, Y., Takao, K., Miyakawa, T., Oldenborg, P.-A., and Matozaki, T. Stress-evoked tyrosine phosphorylation of SIRP α mediates an antidepressant effect. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2010. 11. 13-17. San Diego Convention Center (USA, San Diego)
 2. 大西浩史, 草苺伸也, 村田考啓, 丸山登士, 林由里子, 高雄啓三, 宮川剛, 吾郷由希夫, 香田健, 松田敏夫, 大川克也, 齋藤泰之, 村田陽二, 的崎尚 チロシンリン酸化シグナルによる脳のストレス応答制御 第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会、合同大会 2010. 9. 2-4. (兵庫)
 3. Saito, Y., Iwamura, H., Kaneko, T., Kanazawa, Y., Sato-Hashimoto, M., Murata, Y., Ohnishi, H., Kaneko, Y., Nojima, Y., and Matozaki, T. Regulation by SIRP α of homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. 14th International Congress of Immunology 2010. 8. 22-27. 神戸ポートアイランド (兵庫)
 4. 齋藤泰之, 岩村紘子, 金澤義丈, 橋本美穂, 村田陽二, 大西浩史, 金子和光, 野島美久, 的崎尚 CD47-SIRP α 系による免疫機能制御 第 71 回日本血液学会 2009. 10. 23-25. (京都)
 5. Matozaki, T., Saito, Y., Iwamura, H., Kanazawa, Y., Sato-Hashimoto, M., Murata, Y., Ohnishi, H., Kaneko Y., and Nojima, Y. Roles of the CD47-SIRP α signaling in homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells and development of autoimmune diseases. G-COE Program International Symposium 2009. 6. 24-25. 秋田大学 (秋田)
 6. 金澤義丈, 齋藤泰之, ヤナ・スプリアトナ, 村田陽二, 岡澤秀樹, 大西浩史, 下瀬川透, 的崎尚 腸管における SHPS-1 発現と腸管免疫制御 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008. 12. 1-3. 京都国際会館 (京都)
 7. 齋藤泰之, 金子和光, 岩村紘子, 金澤義丈, 村田陽二, 大西浩史, 野島美久, 的崎尚 SHPS-1 は樹状細胞の恒常性に重要である 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008. 12. 1-3. 京都国際会館 (京都)
 8. Kobayashi, M. Ohnishi, H., Okazawa, H., Murata, Y., Hayashi, Y., Kobayashi, H., Kitamura, T., and Matozaki, T. Expression of SHPS-1 in pancreatic

β -cells and its role in promotion of insulin secretion and protection against diabetes.

第8回国際プロテインホスファターゼカンファレンス 2008.11.12-14. 前橋テルサ (群馬)

9. Kusakari, S., Ohnishi, H., Okazawa, H., Murata, T., Murata, Y., and Matozaki, T.

Trans-endocytosis of CD47 and SHPS-1 and its role in regulation of the CD47-SHPS-1 system.

第8回国際プロテインホスファターゼカンファレンス 2008.11.12-14. 前橋テルサ (群馬)

10. 的崎尚、岡澤秀樹、村田陽二、大西浩史
チロシンホスファターゼによるがん、炎症性腸炎の制御

第 67 回 日本 癌 学 会 学 術 総 会
2008.10.28-30. 名古屋国際会議場 (愛知)

11. 齋藤泰之、金子和光、岩村紘子、金澤義丈、村田陽二、大西浩史、野島美久、的崎尚

Essential roles of SHPS-1 in homeostasis of dendritic cells.

第10回国際樹状細胞シンポジウム 2008.10.1-5. 神戸国際会議場 (兵庫)

12. 大西浩史、草苺伸也、村田考啓、村田陽二、岡澤秀樹、的崎尚

CD47とSHPS-1のトランスエンドサイトーシスとCD47-SHPS-1系の制御における役割

第60回日本細胞生物学会大会2008.6.29-7.1パシフィコ横浜(神奈川)

13. 小林雅樹、大西浩史、岡澤秀樹、村田陽二、林由里子、北村忠弘、的崎尚

受容体型膜蛋白質 SHPS-1 のインスリン分泌制御における機能解析

第 51 回 日本 糖 尿 病 学 会 年 次 学 術 集 会
2008.5.22-24. 東京国際フォーラム (東京)

[図書] (計1件)

1. 的崎 尚、岡田雅人、他、羊土社、シグナル伝達研究 2008-'09 Vol.26 No.15 248 ページ

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/biosig/>

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/tougou/signall/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

的崎 尚 (MATOZAKI TAKASHI)

群馬大学・生体調節研究所・客員教授

研究者番号：80252782

(2) 研究分担者

大西 浩史 (OHNISHI HIROSHI)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：70334125

(平成22年)