

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790936

研究課題名（和文）SHPS-1による樹状細胞を介した自己免疫疾患に対する制御機構の解明

研究課題名（英文）The role of SHPS-1 in dendritic cell-mediated autoimmune diseases

研究代表者

齊藤 泰之（SAITO YASUYUKI）

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：40508842

研究成果の概要（和文）：

研究代表者は、樹状細胞（以下 DC）に特異的に発現する膜型蛋白 SHPS-1（別名 SIRP α ）による自己免疫疾患に対する制御機構について、定常状態における樹状細胞の機能を中心に詳細な解析を行った。その結果、SHPS-1 ノックアウト（KO）マウスにおいて、脾臓やリンパ節では CD8⁺CD4⁺ コンベンショナル DC（cDC）が顕著に減少しており、その成因として SHPS-1 シグナルが CD4⁺ cDC の生存を制御している可能性が示唆された。さらに CD47 KO マウスにおいても CD4⁺ cDC が同様に減少しており、DC 上の SHPS-1 と非血球細胞上の CD47 との相互作用が DC の恒常性維持に重要である可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

SHPS-1, also known as SIRP α , is a transmembrane protein, which is predominantly expressed in dendritic cells (DCs). To clarify the role of SHPS-1 in autoimmune diseases, I examined the function of DCs in a steady state. I found that the number of CD8⁺CD4⁺ conventional DCs (CD4⁺ cDCs), is markedly decreased in the spleen and lymph nodes of SHPS-1 KO mice. This reduction is likely attributable to a reduced half-life of DCs. Moreover, the number of CD4⁺ DCs is also decreased in CD47 KO mice, suggesting the interaction of CD47 on nonhematopoietic cells with SHPS-1 on DCs is important for regulation of DC homeostasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：樹状細胞

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：免疫学、内科、シグナル伝達、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (Dendritic cells; DC) は生体内のあらゆる臓器に分布する抗原提示細胞であり、外来抗原に対する免疫応答の中心的な役割を果たすことが知られている。一方、定常状態においても DC は自己抗原に対する過剰な免疫応答を抑制し、自己に対する免疫寛容の誘導に必須の役割を担っている。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、自己免疫疾患の発症に結びつくことが強く示唆されている。従って、定常状態と炎症状態、それぞれにおける DC の機能制御の分子メカニズムの解明は、自己免疫疾患を含め様々な免疫疾患の発症機序の理解へとつながり、それらを克服するための大きな手がかりを与えるものと考えられる。

免疫応答の主体の場である脾臓やリンパ節などの二次リンパ組織には、コンベンショナル DC (cDC) と形質細胞様 DC の 2 つの分画が常在している。DC について詳細な解析がなされているマウスにおいて、cDC は表面抗原の発現の違いによって、 $CD8^+ CD4^-$ cDC ($CD8^+ cDC$)、 $CD8^- CD4^+$ cDC ($CD4^+ cDC$)、 $CD8^- CD4^-$ cDC (DN cDC) の 3 つの分画に分かれており、それぞれ分布や役割が異なっている。また、これら cDC 分画は、共通する前駆細胞 (pre-cDC) より分化し、数日の間にまた新たに分化したものと入れ替わることにより恒常性が保たれている。

SHPS-1 (別名 SIRP α) は血球系細胞、特に DC に強く発現する 1 回膜貫通型タンパク質である。SHPS-1 は細胞外領域に免疫グロブリン様構造を有し、細胞内領域がチロシンリン酸化を受けることにより、細胞質型チロシンホスファターゼである SHP-1 もしくは SHP-2 を活性化する。さらに SHPS-1 は細胞外領域を介してリガンドである膜タンパク質 CD47 と相互作用をしており、細胞間シグナル伝達系 (CD47-SHPS-1 系) を形成している。これまで、研究代表者らは SHPS-1 の細胞内領域を欠損したマウス (SHPS-1 KO マウス) において、自己免疫疾患のマウスモデルである実験性自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症に著しい抵抗性を示していること、炎症下における DC による T 細胞の活性化に障害を来していることを報告した。一方、定常状態の DC における SHPS-1 の役割については未だ十分な解析がなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究において、研究代表者は自己免疫疾患の発症における SHPS-1 の役割をより明らかにすることを目的に、定常状態の DC における SHPS-1 の役割について詳細な解析をおこなった。

3. 研究の方法

- (1) SHPS-1 による DC の恒常性の制御
- ① DC において、SHPS-1 は $CD4^+$ cDC と DN cDC に強く発現していること、定常状態において、脾臓における DC の比率が SHPS-1 KO マウスでは野生型に比べ低下していることから、SHPS-1 は DC の恒常性の維持に重要な分子であると推測される。そこで、定常状態のリンパ組織 (脾臓、リンパ節) における各 DC 分画の比率ならびに絶対数の検討を SHPS-1 KO マウスを用いておこなった。
- ② 定常状態の SHPS-1 KO マウスに見られる DC の減少が内因性の SHPS-1 に起因するかを検討するために、野生型 (WT) マウスならびに SHPS-1 KO マウスの骨髄細胞を、致死量照射した WT マウスに移入した骨髄キメラマウスを作製し DC 分画の検討をおこなった。
- ③ SHPS-1 が DC の恒常性をどのように制御しているかを調べる目的で、WT マウスならびに SHPS-1 KO マウス由来骨髄細胞を、DC の分化・増殖に重要なサイトカインである GM-CSF や Flt3 リガンド存在下で培養して DC への分化を誘導し、SHPS-1 の欠損が DC の分化能・増殖能に与える影響について検討をおこなった。
- ④ 定常状態における DC の前駆細胞 (pre-cDC) の比率、ならびに実際に単離した SHPS-1 KO マウス由来の pre-cDC を WT マウスに投与し、前駆細胞から DC への分化段階における SHPS-1 の役割について検討をおこなった。さらに、SHPS-1 KO マウスに BrdU を経時的に投与し、各 cDC 分画における BrdU の取り込み率をフローサイトメトリーで計測することにより DC 分画の寿命を計測した。
- ⑤ SHPS-1 のリガンドである CD47 の欠損マウス (CD47 KO) においても $CD4^+$ cDC が減少していることが報告されていることから、リンパ組織内での CD47 と SIRP α との相互作用が DC の恒常性の制御に重要であることが強く示唆された。そこで DC の制御における血球側、非血球側の CD47 の関与を調べる目的で、CD47 KO を用いた骨髄キメラマウスを作製し検討をおこなった。

(2) 自己免疫疾患の発症における SHPS-1 の役割

SHPS-1 のリガンドである CD47 の KO マウスを用い、SHPS-1 KO マウスと同様に実験的自己免疫性脳脊髄膜炎 (EAE) 及びコラーゲン誘導関節炎 (CIA) の発症頻度の解析をおこなった。

4. 研究成果

- (1) SHPS-1 による樹状細胞の恒常性の制御
- ① 定常状態において SHPS-1 KO マウスの脾臓

では、cDCの分画の中でも最大の分画であるCD4⁺cDCの数がWTに比べて著明に減少していることが明らかとなった(図1)。さらにリンパ節でも同様にCD4⁺cDCの数が減少していたことから、SHPS-1が定常状態のリンパ組織内においてCD4⁺cDCの恒常性を制御していると考えられた。

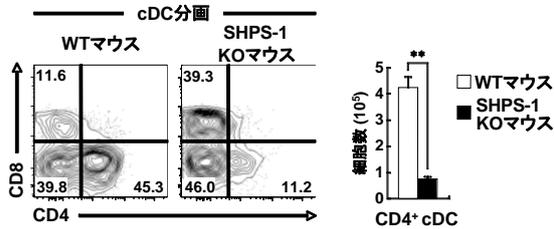


図1 SHPS-1 KO マウスにおけるCD4⁺cDCの減少

②WTマウス由来の骨髄を移植したマウスに比べ、SHPS-1 KOマウス由来の骨髄を移植したマウスでは、脾臓におけるCD4⁺cDCの分画が著明に減少しており(図2)、SHPS-1はCD4⁺cDCの恒常性を内因性に制御していることが示唆された。

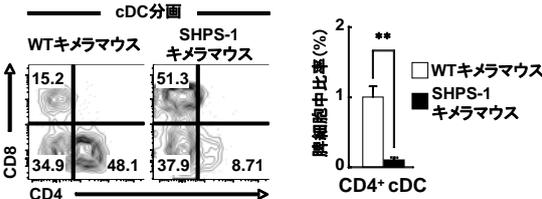


図2 SHPS-1 KOキメラマウスにおけるCD4⁺cDCの減少

③SHPS-1 KOマウスにおいて、各サイトカインで誘導したDCの細胞数、分化マーカーの発現はWTと同等であり、SHPS-1の欠損はDCの分化ならびに増殖の制御には影響していない可能性が考えられた。

④SHPS-1 KOマウスの脾臓においてpre-cDCの比率はWTに比べ同等であった。一方、単離したSHPS-1 KOマウス由来のpre-cDCをWTに投与した場合、SHPS-1 KOマウスのpre-cDCに由来するCD4⁺cDCが有意に減少していたことから、SHPS-1 KOマウスにおけるcDCの減少はpre-cDCから各cDC分画に分化した後を生じていると考えられた。さらに、SHPS-1 KOマウス由来のCD4⁺cDCにおいてBrdUの取り込み率がWTに比べ有意に亢進しており、SHPS-1 KOマウス由来CD4⁺cDCでの寿命の短縮が示唆された(図3)。

これらの結果から、SHPS-1はpre-cDCからCD4⁺cDCへの分化後における生存の制御に重要であると考えられた。

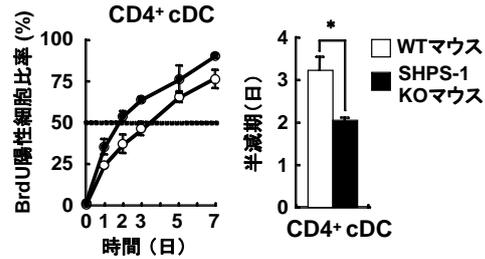


図3 CD4⁺cDC分画における寿命の短縮

⑤CD47 KO由来の血球ならびに非血球キメラマウスの双方において、CD4⁺ならびにDN cDCが有意に減少していたことから、血球側、非血球側両方のCD47がcDCの恒常性を制御していることが示唆された。

(2) 自己免疫疾患の発症におけるCD47-SHPS-1系の役割

SHPS-1 KOマウスと同様に、リガンドであるCD47のKOマウスもEAEの発症に抵抗性を示すことを見出したことから、DCの恒常性と同様に、自己免疫疾患の病態形成においてもCD47-SHPS-1系が重要な役割を担っていることが示唆された(未発表データ)。

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)

発表論文

- Iwamura, H., Saito, Y., Sato-Hashimoto, M、他9名、Essential roles of SIRP α in homeostatic regulation of skin dendritic cells.、*Immunol. Lett.*、査読有、Vol. 135、2011、pp.100-107
- Kanazawa, Y., Saito, Y., Suriatna, Y.、他10名、Role of SIRP α in regulation of mucosal immunity in the intestine.、*Genes Cells*、査読有、Vol. 15、2010、pp. 1189-1200.
- Saito, Y.、Iwamura, H.、Kaneko, T.、他11名、Regulation by SIRP α of dendritic cell homeostasis in lymphoid tissues.、*Blood*、査読有、Vol. 116、2010、pp. 3517-3525.
- Morimoto, N.、Murata, Y.、Saito, Y.、他8名、Requirement of SIRP α for protective immunity against *Leishmania Major*.、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*、査読有、Vol. 401、2010、pp. 385-389.
- Mori, M.、Murata, Y.、Saito, Y.、他7名、Promotion of cell spreading and

migration by vascular endothelial-protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) in cooperation with integrins.、*J. Cell. Physiol.*、査読有、Vol. 224、2010、pp.195-204.

- ⑥ Murata, Y.、Mori, M.、Saito, Y.、他6名、Tyrosine phosphorylation of R3 subtype receptor-type protein tyrosine phosphatases and their complex formations with Grb2 or Fyn.、*Genes Cells*、査読有、Vol. 15、2010、pp. 513-524.
- ⑦ Kotani, T.、Murata, Y.、Saito, Y.、他5名、Expression of PTPRO in the interneurons of adult mouse olfactory bulb.、*J. Comp. Neurol.*、査読有、Vol. 518、2010、pp.119-136.
- ⑧ Matozaki, T.、Murata, Y.、Saito, Y.、他6名、Protein tyrosine phosphatase SHP-2: a proto-oncogene product that promotes Ras activation.、*Cancer Sci.*、査読有、Vol. 100、2009、pp.1786-1793.
- ⑨ 齊藤泰之、村田陽二、大西浩史、的崎尚、SIRP α による樹状細胞の機能制御、臨床免疫・アレルギー科、査読無、Vol. 52、2009、pp.494-498.

[学会発表] (計7件)

- ① Saito, Y.、他、Regulation by SIRP α of dendritic cell homeostasis in lymphoid tissues.、11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology、2010. 9. 28、Lugano Convention Centre (ルガーノ、スイス)
- ② Saito, Y.、他、Regulation by SIRP α of homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells.、14th International Congress of Immunology、2010. 8. 25、神戸国際会議場 (兵庫県)
- ③ Saito, Y.、他、Essential role of the CD47-SIRP α signaling system for dendritic cell homeostasis in lymphoid tissues.、JSH International Symposium 2010、2010. 7. 16、秋田大学 (秋田県)
- ④ 齊藤泰之、他、CD47-SIRP α シグナル系による樹状細胞の恒常性の制御、第4回日本プロテインホスファターゼ研究会、2009. 11. 13-14、熊本大学 (熊本県)
- ⑤ 齊藤泰之、他、CD47-SIRP α シグナル系によるリンパ組織内樹状細胞の恒常性の制御、第71回日本血液学会、2009. 10. 23、京都国際会議場 (京都府)
- ⑥ 齊藤泰之、他、CD47-SIRP α シグナル系による樹状細胞機能制御、第18回内毒素・LPS研究会、2009. 6. 20、東京大学 (東京都)
- ⑦ Saito, Y.、他、Essential roles of the CD47-SIRP α signaling for homeostasis

of lymphoid tissue dendritic cells.、The First International Kishimoto Foundation Symposium、2009.5.25-27、大阪国際会議場 (大阪府)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 泰之 (SAITO YASUYUKI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：40508842