

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370061

研究課題名(和文)チロシンホスファターゼによる生体機能制御とその作用機構に関する統合的研究

研究課題名(英文)The integrative research for regulation by protein tyrosine phosphatases of biological functions and its molecular mechanism

研究代表者

的崎 尚(Matozaki, Takashi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80252782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者が独自に見出したチロシンホスファターゼ(PTP)であるSHP-2、その関連分子により構成されるシグナル系(CD47-SIRP系)、およびR3受容体型PTPの生理機能とその作用機構に関して統合的な解析を行なった。その結果、SHP-2が脳の活動性制御、CD47-SIRP系が樹状細胞やリンパ組織形成の制御、R3受容体型PTPであるVE-PTPがシェアストレスによる血管内皮細胞制御に重要であること等を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have here performed the integrative research for the biological functions and molecular mechanisms for the protein tyrosine phosphatases SHP-2 as well as the related signaling pathway CD47-SIRPalpha, and R3-receptor type PTPs. We have shown that SHP-2 in the post-mitotic neurons is important for regulation of the neuronal activity. The CD47-SIRPalpha is important for regulation of dendritic cells as well as organization of lymphoid tissues. In addition, VE-PTP is implicated in regulation of endothelial cell functions by shear stress.

研究分野：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 生体分子 蛋白質 脳・神経 免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、国際的にみても PTP 研究の極めて初期の段階よりこの研究分野に携わってきており、特に SH2 ドメインを有している細胞質型 PTP である SHP-2 を見出し、SHP-2 が増殖因子による低分子量 G 蛋白質 Ras の活性化に必須な役割を果たすことを明らかにしている。

研究代表者はさらに、SHP-2 が結合する受容体型分子 SIRP を発見し、これが、5 回膜貫通型分子 CD47 と相互作用することにより、細胞間シグナル伝達系 (CD47-SIRP 系) を形成することを明らかにしている。さらに、CD47-SIRP 系が樹状細胞機能を制御し自己免疫病発症に重要なシグナル系であることを明らかにしている。また、研究代表者は SAP-1、VE-PTP、PTPRO よりなる R3 受容体型 PTP サブファミリーについても精力的に研究を行ってきており、R3 受容体型 PTP が、それぞれの発現する細胞の固有の機能制御に共通の作用機構を介して関わる可能性を想定している。

## 2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者が得ている研究成果を基盤として、SHP-2 あるいは CD47-SIRP 系の中樞神経系と免疫系における機能をさらに解明すると共に、個々の R3 受容体型 PTP の生理機能とその分子機構を解明しようと試みた。

## 3. 研究の方法

(1) SHP-2 による中枢神経系の制御について、SHP-2-flox マウスと CAMKII-Cre トランスジェニックマウスの交配により、SHP-2 の前脳特異的遺伝子 KO マウスを作製しその表現型を解析した。

(2) CD47-SIRP 系による免疫系の制御に関して、SIRP -flox マウスと CD11c-Cre トランスジェニックマウスとの交配により樹状細胞特異的 SIRP KO マウスを作製し、その表現型を解析した。

(3) R3 受容体型 PTP に関しては、KO マウスなどを用い生化学的に SAP-1 の基質分子を同定した。また、VE-PTP のシヤアストレスによる血管内皮細胞制御を検討した。

## 4. 研究成果

(1) SHP-2 の前脳特異的遺伝子 KO マウスの表現型を解析した。その結果、活動性の亢進

と immediate early gene の低下、ならびに記憶形成の異常が認められた。また、Ras-MAPK 系シグナルの異常が観察され、SHP-2 を制御する薬剤が、精神疾患の治療薬に応用できる可能性が考えられた。

(2) CD47-SIRP 系による免疫系の制御に関して、樹状細胞特異的 SIRP KO マウスを作製し解析を行った。このマウスでは、脾臓において樹状細胞の特異的分画における変化と T 細胞濾胞形成の異常を認めた。また、間葉系ケモカインの異常やリンフォトキシン関連の遺伝子の異常が見られた。以上より、CD47-SIRP 系が樹状細胞の制御を介してリンパ組織形成に重要な役割を果たしているという全く新たな機序を明らかにすることが出来た。

(3) R3 受容体型 PTP に関しては、腸上皮細胞特異的に発現する SAP-1 の基質分子 p90 を見出し、p90 も腸上皮細胞特異的に発現すること、ならびにその下流シグナルを明らかにすることが出来た。血管内皮細胞に特異的に発現する VE-PTP が、血流により生じる力学的な刺激であるシヤアストレスにより、その流れの下流方向に局在することを見出した。この局在化には、Cdc42 の作用やアクチン再構成が重要であること、VE-PTP がシヤアストレスによる細胞形態の変化の制御に重要であることを明らかにした。このように、R3 受容体型 PTP が、それぞれの発現する細胞の固有の機能制御に重要な役割を果たしていることを明らかに出来た。

## 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 23 件)

1. Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium. Yamashita H, Kotani T, Park JH, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Ku Y, Matozaki T. *PLoS One*. (査読あり) 2014, 9:e92904. doi: 10.1371/journal.pone.0092904.
2. The CD47-SIRP signalling system: its physiological roles and therapeutic application. Murata Y, Kotani T, Ohnishi H, Matozaki T. *J Biochem*. (査読あり) 2014, [Epub

- ahead of print]  
doi: 10.1093/jb/mvu017
3. Comprehensive behavioral analysis of cluster of differentiation 47 knockout mice.  
Koshimizu H, Takao K, Matozaki T, Ohnishi H, Miyakawa T.  
*PLoS One*. (査読あり)2014, 9:e89584.  
doi: 10.1371/journal.pone.0089584.
  4. Signal Regulatory Protein Alpha Is Present in Several Neutrophil Granule Populations and Is Rapidly Mobilized to the Cell Surface to Negatively Fine-Tune Neutrophil Accumulation in Inflammation.  
Stenberg A, Karlsson A, Feuk-Lagerstedt E, Christenson K, Bylund J, Oldenberg A, Vesterlund L, Matozaki T, Sehlin J, Oldenberg PA.  
*J Innate Immun*. (査読あり) 2014 [Epub ahead of print]  
doi:10.1159/000357820
  5. Shear Stress-induced Redistribution of Vascular Endothelial-Protein-tyrosine Phosphatase (VE-PTP) in Endothelial Cells and Its Role in Cell Elongation.  
Mantilidewi KI, Murata Y, Mori M, Otsubo C, Kotani T, Kusakari S, Ohnishi H, Matozaki T.  
*J Biol Chem*. (査読あり) 2014, 289:6451-61.  
doi: 10.1074/jbc.M113.529503.
  6. The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment.  
Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I, Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T, Akashi K.  
*Exp Hematol*. (査読あり) 2014, 42:163-171.  
doi: 10.1016/j.exphem.2013.11.005.
  7. Autoimmune animal models in the analysis of the CD47-SIRP signaling pathway.  
Murata Y, Saito Y, Kaneko T, Kotani T, Kaneko Y, Ohnishi H, Matozaki T.  
*Methods*. (査読あり)2014, 65:254-9.  
doi: 10.1016/j.ymeth.2013.09.016.
  8. Inflammation-induced proteolytic processing of the SIRP cytoplasmic ITIM in neutrophils propagates a proinflammatory state.  
Zen K, Guo Y, Bian Z, Lv Z, Zhu D, Ohnishi H, Matozaki T, Liu Y.  
*Nat Commun*. (査読あり)2013, 4:2436.  
doi: 10.1038/ncomms3436.
  9. Lack of CD47 impairs bone cell differentiation and results in an osteopenic phenotype in vivo due to impaired signal regulatory protein (SIRP) signaling.  
Koskinen C, Persson E, Baldock P, Stenberg Å, Boström I, Matozaki T, Oldenberg PA, Lundberg P.  
*J Biol Chem*. (査読あり) 2013, 288:29333-44.  
doi: 10.1074/jbc.M113.494591.
  10. 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, 305:861-70.  
doi: 10.1152/ajprenal.00597.2012.
  11. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment.  
Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K.  
*Blood*. (査読あり)2013, 121, 1316-25.  
doi: 10.1182/blood-2012-06-440354.
  12. Hypothermia-dependent and -independent effects of forced swim on the phosphorylation states of signaling molecules in mouse hippocampus.  
Hayashi Y, Kusakari S, Sato-Hashimoto M, Urano E, Shigeno M, Sekijima T, Kotani T, Murata Y, Murakami H, Matozaki T, Ohnishi H.

- Biochem Biophys Res Commun.* (査読あり) 2012, 428:475-81.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.083.
13. The absence of CD47 promotes nerve fiber growth from cultured ventral mesencephalic dopamine neurons. Marschinke F, Hashemian S, Matozaki T, Oldenborg PA, Strömberg I. *PLoS One.* (査読あり) 2012, 7:e45218. doi: 10.1371/journal.pone.0045218.
  14. SIRP controls the activity of the phagocyte NADPH oxidase by restricting the expression of gp91(phox). van Beek EM, Zarate JA, van Bruggen R, Schornagel K, Tool AT, Matozaki T, Kraal G, Roos D, van den Berg TK. *Cell Rep.* (査読あり) 2012, 2:748-55. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.027.
  15. Macrophages require Skap2 and Sirp for integrin-stimulated cytoskeletal rearrangement. Alenghat FJ, Baca QJ, Rubin NT, Pao LI, Matozaki T, Lowell CA, Golan DE, Neel BG, Swanson KD. *J Cell Sci.* (査読あり) 2012, 125:5535-45. doi: 10.1242/jcs.111260.
  16. SHPS-1 deficiency induces robust neuroprotection against experimental stroke by attenuating oxidative stress. Wang L, Lu Y, Deng S, Zhang Y, Yang L, Guan Y, Matozaki T, Ohnishi H, Jiang H, Li H. *J Neurochem.* (査読あり) 2012, 122:834-43. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07818.x.
  17. Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp1 promotes Th1 cell differentiation and induces autoimmunity. Kaneko T, Saito Y, Kotani T, Okazawa H, Iwamura H, Sato-Hashimoto M, Kanazawa Y, Takahashi S, Hiromura K, Kusakari S, Kaneko Y, Murata Y, Ohnishi H, Nojima Y, Takagishi K, Matozaki T. *J Immunol.* (査読あり) 2012, 188:5397-407. doi: 10.4049/jimmunol.1103210.
  18. Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP in the brain. Maruyama T, Kusakari S, Sato-Hashimoto M, Hayashi Y, Kotani T, Murata Y, Okazawa H, Oldenborg PA, Kishi S, Matozaki T, Ohnishi H. *J Neurochem.* (査読あり) 2012, 121:891-902. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07748.x.
  19. The Rho kinase pathway regulates the migration of dendritic cells through SIRP- . Ogura K, Fukunaga A, Taguchi K, Nagai H, Yu X, Oniki S, Okazawa H, Matozaki T, Horikawa T, Nishigori C. *J Dermatol Sci.* (査読あり) 2012, 66:74-6. doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.02.003.
  20. Src family kinases: modulators of neurotransmitter receptor function and behavior. Ohnishi H, Murata Y, Okazawa H, Matozaki T. *Trends Neurosci.* (査読あり) 2011, 34:629-37. doi: 10.1016/j.tins.2011.09.005.
  21. CD47-signal regulatory protein-(SIRP ) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. Zhao XW, van Beek EM, Schornagel K, Van der Maaden H, Van Houdt M, Otten MA, Finetti P, Van Egmond M, Matozaki T, Kraal G, Birnbaum D, van Elsas A, Kuijpers TW, Bertucci F, van den Berg TK. *Proc Natl Acad Sci USA.* (査読あり) 2011, 108:18342-7. doi: 10.1073/pnas.1106550108.
  22. SIRP /CD172a regulates eosinophil homeostasis. Verjan Garcia N, Umemoto E, Saito Y, Yamasaki M, Hata E, Matozaki T, Murakami M, Jung YJ, Woo SY, Seoh JY, Jang MH, Aozasa K, Miyasaka M. *J Immunol.* (査読あり) 2011,

187:2268-77.  
doi: 10.4049/jimmunol.1101008.

23. Signal regulatory protein regulates the homeostasis of T lymphocytes in the spleen.  
Sato-Hashimoto M, Saito Y, Ohnishi H, Iwamura H, Kanazawa Y, Kaneko T, Kusakari S, Kotani T, Mori M, Murata Y, Okazawa H, Ware CF, Oldenborg PA, Nojima Y, Matozaki T.  
*J Immunol.* (査読あり) 2011, 187:291-7.  
doi: 10.4049/jimmunol.1100528.

[学会発表](計 50 件)

1. 鷲尾健、小谷武徳、レスパティカ ダトゥ、村田陽二、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性維持における S I R P の役割  
第 6 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 2014.2.21 三重大学(三重)
2. Washio K, Kotani T, Datu Respatika, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Fukunaga A, Nishigori C, Matozaki T  
SIRP -CD47 system regulates the homeostasis of dendritic cells in lymphoid tissues  
第 42 回日本免疫学会学術集会 2013.12.12 幕張メッセ(千葉)
3. 的崎尚、村田陽二、小谷武徳、Yana Supriatna, 森宗昌、岡澤秀樹、大西浩史  
R3 受容体型チロシンホスファターゼの発現、局在と生理機能  
第 36 回日本分子生物学会年会 2013.12.5 神戸国際会議場ほか(兵庫)
4. Matozaki T  
Expression, localization, and biological function of the R3 subtype of receptor-type protein tyrosine phosphatases  
The 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatases 2013.11.29 国家衛生研究院(新竹市 Hsinchu/TAIWAN)
5. 村田陽二、小谷武徳、Supriatna Yana、森宗昌、草苺伸也、岡澤秀樹、大西浩史、的崎尚  
受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 による腸管免疫制御/Regulation of intestinal immunity by the protein tyrosine phosphatase SAP-1  
第 73 回日本癌学会学術総会 2013.10.3 パシフィコ横浜(神奈川)
6. Mantilidewi KI, Murata Y, Mori M, Kotani T, Kusakari S, Okazawa H, Ohnishi H, Matozaki T  
Role of VE-PTP in shear stress responses of endothelial cells  
第 86 回日本生化学会大会 2013.9.11 パシフィコ横浜(神奈川)
7. Matozaki T, Murata Y, Kotani T, Yana Supriatna, Okazawa H, Ohnishi H  
The protein tyrosine phosphatase SAP-1 protects against colitis through regulation of CEACAM in the intestinal epithelium  
FASEB, 2013/8/12-13 The Steamboat Grand(SteamboatSprings/USA)
8. Kusakari S, Saitow F, Sato-Hashimoto M, Shibasaki K, Ago Y, Matsuda T, Benjamin G. Neel, Kotani T, Murata Y, Matozaki T, Ohnishi H  
Functional Analysis of A non-receptor type protein tyrosine phosphatase Shp2 in the adult brain  
Neuro2013 2013.6.20 国立京都国際会館(京都)
9. Murata Y, Kotani T, Yana Supriatna, Daniwijaya EW, Ohnishi H, Matozaki T  
Regulation of intestinal immunity by the protein tyrosine phosphatase SAP-1  
第 10 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス 2013.2.8 国立がん研究センター(東京)
10. 橋本(佐藤)美穂、齊藤泰之、金子哲也、大西浩史、草苺伸也、小谷武徳、村田陽二、岡澤秀樹、的崎尚  
脾臓 T 細胞の恒常性調節への SIRP の関与/Signal regulatory protein alpha regulates the homeostasis of T lymphocytes in the spleen  
第 85 回日本生化学会大会 2012.12.16 福岡国際会議場ほか(福岡)
11. 草苺伸也、橋本美穂、柴崎貢志、吾郷由希夫、松田敏夫, Benjamin G. Neel, 小谷武徳, 村田陽二, 的崎尚, 大西浩史  
細胞質型チロシンホスファターゼ Shp2

の成熟脳における機能解析/Functional analysis of tyrosine phosphatase Shp2 in the adult brain  
第 85 回日本生化学会大会 2012.12.16  
福岡国際会議場ほか(福岡)

12. Matozaki T  
Protein tyrosine phosphatases and the CD47-SIRP System that mediates cell-to-cell communication  
The First Taiwan Phosphatase Conference 2012.11.10 国立成功大学 (Tainan/TAIWAN)
13. Kusakari S, Hashimoto M, Hayashi Y, Kusakari Y, Ago Y, Matsuda T, Shibasaki K, Kotani T, Murata Y, Benjamin G. Neel, Matozaki T, Ohnishi H  
Regulation of brain functions by a protein tyrosine phosphatase Shp2  
平成 24 年度国際シナプス研究会  
2012.11.8 岡崎コンファレンスセンター(愛知)
14. 草苺伸也、小谷武徳、橋本美穂、村田陽二、岡澤秀樹、吾郷由紀夫、松田敏夫、Benjamin G. Neel、的崎尚、大西浩史  
成熟脳における Shp2 の生理機能解析  
第 5 回プロテインホスファターゼ研究会  
学術集会大阪 2012.1.19 大阪大学銀杏会館(大阪)
15. 小谷武徳、村田陽二、Yana Supriatna、岡澤秀樹、大西浩史、Edwin Daniwijaya、草苺伸也、定方久延、大川克也、的崎尚  
腸微絨毛特異的な発現を示す受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 による腸管免疫制御  
第 5 回プロテインホスファターゼ研究会  
学術集会大阪 2012.1.19 大阪大学銀杏会館(大阪)
16. Matozaki T  
The R3 subtype of receptor-type protein tyrosine phosphatases: Expression, localization, and biological function  
The First Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatases 2011.12.2 基礎生物学研究所(愛知)
17. 大西浩史、的崎尚  
チロシンリン酸化シグナルによるうつ様行動の制御/Regulation by protein tyrosine phosphorylation of depression-like behavior

第 34 回日本神経科学大会 2011.9.17 パシフィコ横浜(神奈川)

〔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

的崎 尚 (MATOZAKI TAKASHI)  
神戸大学・医学研究科・教授  
研究者番号：80252782

### (2)研究分担者

大西 浩史 (OHNISHI HIROSHI)  
群馬大学・保健学研究科・教授  
研究者番号：70334125

### (3)連携研究者

村田 陽二 (MURATA YOJI)  
神戸大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：60400735