

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291022

研究課題名(和文)細胞間シグナルCD47-SIRP系による生体機能調節の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of the CD47-SIRP alpha signaling system in the regulation of physiological function

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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は中枢神経系、免疫系における細胞間CD47-SIRPシグナル系による生体機能調節の分子基盤につき解析を行なった。その結果、中枢神経系において、SIRPの下流分子であるShp-2がシナプス機能を制御し、学習や活動量の制御に関わることを見出した。免疫系においては、SIRPは二次リンパ組織や皮膚における樹状細胞の恒常性維持に重要であることを見出した。さらに、研究代表者は抗SIRP抗体ががんに対する免疫療法の新たなツールとして有用である可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have here investigated the molecular basis of the CD47-SIRP signaling system in the regulation of physiological function in the central nervous system (CNS) as well as in the immune system. In the CNS, we have shown that the protein tyrosine phosphatase Shp-2, which is a downstream molecule of SIRP, regulates synaptic functions and thereby modulates learning and locomotor activity. In the immune system, we have shown that SIRP is essential for the maintenance of dendritic cell homeostasis in the secondary lymphoid organs and skin. Furthermore, we have found that anti-SIRP antibodies appear to be a potential new tool for cancer immunotherapy.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：シグナル伝達 生体分子 脳・神経 免疫学 癌

1. 研究開始当初の背景

神経・免疫系などに代表される高次生体機能の恒常性と可塑性が形成・維持されるためには、細胞間のシグナル伝達が重要である。研究代表者は、細胞間シグナル CD47-SIRP α 系を独自に見出し、その生理機能と病態への関与につき、これまで研究を継続してきた。SIRP α (Signal regulatory protein α) は免疫グロブリン領域を持つ受容体型膜分子であり、生理的リガンドである5回膜貫通型分子 CD47 と相互作用することにより、双方向性にシグナルが伝わる。SIRP α の細胞内領域には、細胞質型チロシンホスファターゼ Shp-1 あるいは Shp-2 の結合領域が存在し、SIRP α への結合によりこれらのホスファターゼは活性化され、SIRP α の下流シグナル分子として機能する。SIRP α は神経細胞、マクロファージや樹状細胞 (DC) といった特定の細胞に強く発現するが、CD47 はユビキタスに発現するという特徴があり、この両分子の発現様式が CD47-SIRP α 系の機能に重要である。

研究代表者は、CD47-SIRP α 系による神経系と血液・免疫系に関する生体機能の制御につき、SIRP α や CD47 を全身性に欠損させたノックアウトマウスなどを用いこれまで精力的に研究を進めてきた結果、以下のことを明らかにしている。①中枢神経系においては、CD47 と SIRP α が共にシナプスに豊富に局在し、SIRP α が軸索 (シナプス前) に CD47 は樹状突起 (シナプス後) により強い発現を示すことを明らかにした。さらに CD47-SIRP α 系は神経系においてストレスを感じうつ状態の制御に関与していることを見出した。②免疫・血液系においては、CD47-SIRP α 系は抗原提示による T 細胞の活性化に重要である DC の寿命制御に関与しており、DC と相互作用する T 細胞や間葉系細胞の恒常性制御に関与することが明らかとなった。また、SIRP α はマクロファージにも高発現しており、マクロファージによる貪食の標的細胞に発現する CD47 とマクロファージ上の SIRP α が結合することにより、CD47-SIRP α 系はマクロファージによる標的細胞の貪食を抑制することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が独自に見出した膜結合型リガンド・レセプターによる「細胞間シグナル CD47-SIRP α 系」に関して、これまで得た知見を基盤とし、さらに詳細かつ統合的な解析を行うことにより、このシグナル系による生体機能調節の分子基盤を明らかにしようと試みる。特に、中枢神経系と血液・免疫系に焦点を絞り、その生理機能と作用機構の詳細について解析を行う。また、CD47-SIRP α 系の異常と病態への関わりにつきより深い理解を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

種々の組織特異的 SIRP α ならびに CD47 コンディショナル KO (cKO) マウスの作製とその解析により、CD47-SIRP α 系による中枢神経系および血液・免疫系の制御に関して生理

機能と作用機構の検討を行った。神経系においては、SIRP α の下流シグナルとして、SIRP α の細胞内領域に結合する Shp-2 に着目して、前脳特異的な Shp-2 cKO マウスを作製し、組織学的解析、生化学的解析、行動実験を行った。さらに、野生型マウスおよび Shp-2 cKO マウス由来初代培養神経細胞を用い種々の刺激に対する応答性の違いにつき、解析を行った。免疫系においては、CD47-SIRP α 系による DC-間葉系制御の分子基盤に関して、DC の恒常性制御や DC による間葉系細胞の恒常性制御を中心に解析を行った。さらに CD47-SIRP α 系によるマクロファージ機能制御に着想を得た新たながん微小環境の制御機構について、複数の腫瘍マウスモデルを作製し、CD47-SIRP α 系に作用する薬剤による抗腫瘍効果とその作用機構について評価・解析を行った。また、*in vitro* においてマクロファージによるがん細胞の貪食能に与える影響を検討した。

4. 研究成果

1) CD47-SIRP α 系による中枢神経機能制御：SIRP α の細胞内シグナルに重要であると考えられるチロシンホスファターゼ Shp-2 を前脳特異的に欠損させた cKO マウス (Shp-2 cKO) を作製し解析を行なった。行動解析テストの結果より、Shp2 cKO マウスは多動傾向や学習行動の異常を示すことが明らかとなった。さらに大脳皮質や海馬において、神経活動依存的に誘導される最初期遺伝子の発現低下がみられ、これらの部位での神経活動性が低下している可能性が考えられた。また、Shp2 をノックダウンした培養神経細胞の解析の結果などから、成熟脳における Shp-2 は Ras/MAPK 系の抑制を介してプレシナプス機能を制御し、行動制御に関わる可能性が考えられた (Kusakari et al., *Mol. Cell. Biol.*, 2015)。

2) CD47-SIRP α 系による血液・免疫系制御：DC 上に発現する SIRP α による DC の恒常性制御について詳細な解析を行うことを目的として、DC 特異的 SIRP α cKO (SIRP $\alpha^{\Delta DC}$) マウスを作製した。SIRP $\alpha^{\Delta DC}$ マウスの脾臓やリンパ節において、SIRP α が高発現する CD4⁺ DC の特異的減少が認められた。また、SIRP $\alpha^{\Delta DC}$ マウスの皮膚においても SIRP α が高発現するランゲルハンス細胞 (LC) の減少を認めた。したがって、二次リンパ組織における CD4⁺ DC や皮膚 LC の恒常性制御における SIRP α の重要性が明らかとなった (Washio et al., *Genes Cells*, 2015)。

一方、がん微小環境におけるマクロファージとがん細胞との相互作用に関しては、患者検体を用いた解析から、腎がんや悪性黒色腫 (メラノーマ) において、SIRP α が高発現することを見出した。そこでマウス腎がん細胞を移植したマウスに CD47 と SIRP α の相互作用を阻害する抗 SIRP α 抗体を投与したところ、①腫瘍への抗 SIRP α 抗体の結合による抗

体依存性細胞障害 (ADCC) の誘導、②腫瘍-マクロファージ間の CD47-SIRP α 結合阻害による ADCC の抑制解除による二重の作用を介した抗腫瘍効果の増強を認めた。さらにこの抗 SIRP α 抗体は、既存のがんに対する抗体療法や免疫チェックポイント阻害薬と併用することにより、より強力な抗腫瘍効果を有することを明らかにした (Yanagita et al., *JCI Insight*, 2017)。

以上の結果により、細胞間シグナル CD47-SIRP α 系は中枢神経系と血液・免疫系において、行動制御や DC の機能制御に重要な細胞間シグナル系であること示すと共に、SIRP α を標的とした治療が、がんなどの難病に対する新たな治療戦略として有効である可能性を本研究結果によって明らかにした。

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 12 件)

- (1) Yanagita T, Murata Y, Tanaka D, Motegi SI, Arai E, Daniwijaya EW, Hazama D, Washio K, Saito Y, Kotani T, Ohnishi H, Oldenburg PA, Garcia NV, Miyasaka M, Ishikawa O, Kanai Y, Komori T, Matozaki T. Anti-SIRP α antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. *JCI Insight*, 2, e89140, 2017. 査読有
- (2) Imada S, Murata Y, Kotani T, Hatano M, Sun C, Konno T, Park JH, Kitamura Y, Saito Y, Ohdan H, Matozaki T. Role of Src family kinases in regulation of intestinal epithelial homeostasis. *Mol Cell Biol.*, 36, 2811-2823, 2016, 査読有.
- (3) Holm CK, Engman S, Sulniute R, Matozaki T, Oldenburg PA, Lundberg P. Lack of SIRP α phosphorylation and concomitantly reduced SHP-2-PI3K-Akt2 signaling decrease osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 478, 268-273, 2016, 査読有.
- (4) Murata Y, Kotani T, Supriatna Y, Kitamura Y, Imada S, Kawahara K, Nishio M, Daniwijaya EW, Sadakata H, Kusakari S, Mori M, Kanazawa Y, Saito Y, Okawa K, Takeda-Morishita M, Okazawa H, Ohnishi H, Azuma T, Suzuki A, Matozaki T. Protein tyrosine phosphatase SAP-1 protects against colitis through regulation of

CEACAM20 in the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 112, E4264-4271, 2015, 査読有.

- (5) Li XJ, Goodwin CB, Nabinger SC, Richine BM, Yang Z, Hanenberg H, Ohnishi H, Matozaki T, Feng GS, Chan RJ. Protein-tyrosine phosphatase Shp2 positively regulates macrophage oxidative burst. *J Biol Chem.*, 290, 3894-3909, 2015, 査読有.
- (6) Kusakari S, Saitow F, Ago Y, Shibasaki K, Sato-Hashimoto M, Matsuzaki Y, Kotani T, Murata Y, Hirai H, Matsuda T, Suzuki H, Matozaki T, Ohnishi H. Shp2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity, locomotion, and memory formation in mice. *Mol Cell Biol.*, 35, 1557-1572, 2015, 査読有.
- (7) Kolan SS, Lejon K, Koskinen Holm C, Sulniute R, Lundberg P, Matozaki T, Oldenburg PA. Non-hematopoietic and hematopoietic SIRP α signaling differently regulates murine B cell maturation in bone marrow and spleen. *PLoS One*, 10, e0134113, 2015, 査読有.
- (8) 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*, 20, 451-463, 2015, 査読有.
- (9) Kolan SS, Boman A, Matozaki T, Lejon K, Oldenburg PA. Lack of non-hematopoietic SIRP α signaling disturbs the splenic marginal zone architecture resulting in accumulation and displacement of marginal zone B cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 460, 645-650, 2015, 査読有.
- (10) Alvarez-Zarate J, Matlung HL, Matozaki T, Kuijpers TW, Maridonneau-Parini I, van den Berg TK. Regulation of phagocyte migration by signal regulatory protein-alpha signaling. *PLoS One*, 10, e0127178, 2015, 査読有.
- (11) Yoshino S, Satoh T, Yamada M, Hashimoto K, Tomaru T, Katano-Toki A, Kakizaki S, Okada S, Shimizu H, Ozawa A, Tuchiya T, Ikota H, Nakazato Y,

Mori M, Matozaki T, Sasaki T, Kitamura T, Mori M. Protection against high-fat diet-induced obesity in Helz2-deficient male mice due to enhanced expression of hepatic leptin receptor. *Endocrinology*, 155, 3459-3472, 2014, 査読有.

- (12) Murata Y, Kotani T, Ohnishi H, Matozaki T. The CD47-SIRP α signalling system: its physiological roles and therapeutic application. *J Biochem.*, 155, 335-344, 2014, 査読有.

[学会発表] (計 13 件)

- (1) Respatika D, Saito Y, Washio K, Komori S, Kotani T, Murata Y, Matozaki T. Role of SIRP α on dendritic cells in homeostatic regulation of fibroblastic reticular cells in the spleen. 第 45 回日本免疫学会学術集会 2016. 12. 5, 沖縄コンベンションセンター (沖縄)
- (2) Yanagita T, Murata Y, Tanaka D, Saito Y, Kotani T, Komori T, Matozaki T. Therapeutic application of anti-SIRP α antibody in cancer treatment. 第 12 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス & 革新がんゲノム国際シンポジウム, 2016. 10. 28, 近畿大学 東大阪キャンパス (大阪)
- (3) Respatika D, Saito Y, Washio K, Komori S, Kotani T, Murata Y, Matozaki T. Role of SIRP α on dendritic cells in homeostatic regulation of fibroblastic reticular cells in the spleen. 第 12 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス & 革新がんゲノム国際シンポジウム, 2016. 10. 28, 近畿大学 東大阪キャンパス (大阪)
- (4) 的崎 尚, がん微小環境を利用した新しいがん免疫療法の開発、第 75 回日本癌学会学術総会、2016. 10. 8、パシフィコ横浜 (神奈川)
- (5) 柳田 匡彦、村田 陽二、田中 大介、齊藤 泰之、小谷 武徳、古森 孝英、的崎 尚、抗 SIRP α 抗体を用いた新たながん治療法、第 75 回日本癌学会学術総会、2016. 10. 6、パシフィコ横浜 (神奈川)
- (6) 的崎 尚、村田 陽二、齊藤 泰之、小谷 武徳、柳田 匡彦、田中 大介、大西 浩史、Role of the CD47-SIRP α system and its therapeutic application. 第 89 回日本生化学会大会、2016. 9. 25, 仙台国際センター (宮城)
- (7) Ohnishi H, Kusakari S, Sato-Hashimoto M, Ishikawa S, Urano E, Kotani T, Murata Y, Matozaki T. Behavioral analysis of forebrain neuron-specific Shp2 conditional knockout mice. Neuroscience 2015/第 38 回日本神経科学大会、2015. 9. 8, 神戸国際会議場 (兵庫)
- (8) Imada S, Murata Y, Kitamura Y, Park JH, Hatano M, Kotani T, Saito Y, Ohdan H, Matozaki T. Role of C-terminal Src kinase (Csk) and Src family kinases in homeostasis of the intestinal epithelium. FASEB, 2015. 8. 3, Colorado (USA)
- (9) Washio K, Kotani T, Respatika D, Murata Y, Saito Y, Okazawa H, Ohnishi H, Fukunaga A, Nishigori C, Matozaki T. 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)
- (10) Kotani T, Washio K, Respatika D, Murata Y, Saito Y, Matozaki T. Regulation by CD47-SIRP α signaling of hematopoietic and immune systems. 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)
- (11) Kusakari S, Saitow F, Hashimoto H, Matsuzaki Y, Kotani T, Murata Y, Hirai H, Suzuki H, Matozaki T, Ohnishi H. Functional analysis of protein tyrosine phosphatase Shp2 in post-mitotic neurons. 第 11 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス、2014. 11. 14, 東北大学医学部 良陵会館 (宮城)
- (12) Matozaki T, Murata Y, Kotani T, Saito Y. Roles of protein tyrosine phosphatases in homeostasis of intestinal epithelium. 第 11 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス、2014. 11. 13, 東北大学医学部 良陵会館 (宮城)

- (13) Ohnishi H, Kusakari S, Saitow F, Hashimoto M, Matsuzaki Y, Kotani T, Murata Y, Hirai H, Suzuki H, Matozaki T. Functional analysis of protein tyrosine phosphatase Shp2 in the adult forebrain neurons.
Neuroscience 2014/第37回日本神経科学大会, 2014.9.13, パシフィコ横浜 (神奈川)

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/tougou/signa/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

的崎 尚 (MATOZAKI, Takashi)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80252782

(3) 連携研究者

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

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

齊藤 泰之 (SAITO, Yasuyuki)
神戸大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：40508842

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