

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670110

研究課題名(和文)低温バイオロジーに基づく新規生体制御システムの探索

研究課題名(英文) Search for a novel biological regulatory system based on low temperature biology

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：低温が細胞に引き起こす膜蛋白質SIRP のチロシンリン酸化について、機能とメカニズムをモデル系で検討した。検討の結果、低温応答性SIRP シグナルが低体温による記憶形成・維持作用に関わる可能性が残った。また、培養神経細胞の低温ストレスに対する感受性に関わる可能性、低温誘導性SIRP シグナルが全身性炎症反応を抑制する可能性などが考えられた。また、SIRP が温度依存的に分子シャペロンと複合体形成する可能性や、低温誘導性SIRP リン酸化におけるリガンドとの結合の重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：The function and molecular mechanism of low temperature-induced tyrosine phosphorylation of a membrane protein SIRP were investigated. As a result of examinations, there was a possibility that the low temperature-induced SIRP signal might be related to suppressive action of hypothermia on memory formation and/or maintenance. In addition, possibilities that the SIRP signal might enhance the susceptibility of cultured neurons to low temperature stress, and that it might contribute to the suppression of the LPS-induced systemic inflammatory response, were considered. In addition, possible molecular interaction between SIRP and molecular chaperons, and the importance of ligand-binding to the extracellular region of SIRP in cold-induced SIRP phosphorylation, were indicated.

研究分野：神経化学

キーワード：チロシンリン酸化 低体温 ストレス 生体保護

1. 研究開始当初の背景

低温は生体機能を大きく変化させる環境要因である。哺乳類などの恒温動物に、何らの原因で低体温が生じると、血行不良や免疫力低下などの有害な影響が現れ、重篤な場合には意識障害や心肺機能低下など、生命の維持にとってきわめて深刻な状態となる。一方で、低温には生体への保護効果があり、臓器や組織の保存、脳低温療法などに応用されている。このように低温が生体に与える作用には陰陽両面があり、これを理解・制御することにより、様々な応用が可能に成ると考えられる。

一方で、低温は生物が環境から受ける一般的な環境要因の1つであり、生物は進化の過程で温度感知センサーや、その情報処理システムを発展させて温度環境への適応能力を獲得してきた。哺乳類でも TRP チャネルファミリーなどの温度センサーやその機能について、分子から個体レベルまで精力的に解析が展開され、臨床標的としても研究が進められているが、それ以外にも、生体に多様な未知の低温応答シグナルが存在し、生命活動に関与している可能性は高い。膜型分子 SIRPα は細胞内領域がチロシンリン酸化を受けてチロシン脱リン酸化酵素 Shp2 と結合し、これを強く活性化する。研究代表者は、強制水泳ストレスを受けたマウスの脳内では、SIRPα が強くリン酸化され、このシグナルが学習依存的行動変化に関わることを見出ししていた。その後、強制水泳中に起こる脳内 SIRPα のチロシンリン酸化の誘導は低体温が主要な原因であることを見出し、さらに、冬眠中のシマリスでも脳内 SIRPα のチロシンリン酸化が強く誘導されることを明らかにした。さらに、低温に暴露した培養神経細胞でも SIRPα がリン酸化されることから、低温が直接 SIRPα のリン酸化を誘導することが明らかとなった。このことは哺乳類の細胞において、低温が特定のシグナル系を活性化することを示しているが、その機能的意義やメカニズムは明らかになっていない。今後、これらの問題に取り組むことで生体の低温応答反応の理解と応用にむけた基盤的成果が得られると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、独自に見出した低温誘導性の SIRPα チロシンリン酸化シグナルについて、その機能の生理的意義と分子メカニズムについて解析を行い、哺乳類の細胞・組織がもつ低温への生体応答機構を理解し、その応用に向けた基盤的成果を得ることを目的とする。低温という非生理的条件下での生体反応の理解をすすめることで、通常の研究では見出すことのできない新しい生体調節機構を解明し、これを利用した応用分野の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) 低体温の記憶への影響の検討

低体温は記憶障害の原因となることが報告されている。低体温により誘導される SIRPα のチロシンリン酸化が記憶形成に影響を与える可能性を検討するために、電気ショックと浸水による低体温誘導を組み合わせた恐怖条件づけテストを行った。1 日目に一般的な恐怖条件づけテストと

同様にマウスに電気ショックを与えた直後に、室温で 10 分間の浸水処理を与えて低体温を誘導し、翌日 24 時間後、前日に電気ショックを与えたのと同じ環境でマウスの行動を 30 分間ビデオ撮影し、「フリージング(すくみ)」行動を測定した。さらにその翌日、同じ環境で 5 分間測定し、恐怖記憶の維持を検討した。電気刺激のみで浸水処理を与えない実験も行い、比較対照群とした。週齢の近い野生型マウスと SIRPα KO マウスで実験を行い、測定結果を遺伝子型の違い、浸水操作の有無で比較検討した。

(2) 培養神経細胞を用いた低温への細胞応答の解析

SIRPα の発現を抑制する short hairpin (sh) RNA を蛍光タンパク質 GFP と同時に発現させるプラスミドベクターをトランスフェクションしたマウス海馬初代培養神経細胞で、低温への応答性を検討した。培地から増殖因子を除去して細胞死を誘導し、このとき低温処理を行って、細胞死の抑制作用(低温による保護効果)を検討した。また、低温が神経細胞へ与える影響についても検討した。GFP の蛍光シグナルに基づき細胞形態を観察して、細胞への影響を検討した。

(3) SIRPα KO マウスを用いた LPS 誘導性低体温の解析

炎症反応に対する低体温の作用と SIRPα リン酸化シグナルの関連を検討するために、グラム陰性菌の内毒素であるリポ多糖(LPS)をマウスの腹腔に投与して、全身性炎症応答を誘導した。このとき、LPS によりマウスに誘導される体温変化と行動量変化をモニターし、野生型マウス、全身性 SIRPα KO マウスで比較を行った。さらに、細胞特異的に SIRPα シグナルの関与を検討するために、SIRPα を強く発現し、自然免疫系の制御に重要な役割を果たすマクロファージで SIRPα を特異的に遺伝子破壊したマウス(SIRPα コンディショナル KO(cKO))を作製して、その影響を検討した。SIRPα cKO マウスは、SIRPα 遺伝子に loxP 配列を挿入した SIRPα^{lox/lox} マウスと、マクロファージ特異的に Cre リコンビナーゼを発現する LysM-Cre マウスの交配により作製した。

(4) SIRPα シグナル複合体の解析

低温誘導性 SIRPα チロシンリン酸化シグナルの反応メカニズムや機能を理解する手がかりを得るために、SIRPα のタンパク質複合体の解析を行った。水への浸水により低体温を誘導したマウスと、対照群として 37°C の水に立たせたマウス(低体温は誘導されない)の脳組織サンプルから、SIRPα 特異的な抗体で免疫沈降を行い SDS 化してサンプルとした。サンプルをポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、銀染色によりタンパク質のバンドを同定して切り出し、質量分析によりゲルに含まれるタンパク質の同定を試みた。野生型マウスと SIRPα KO マウスで実験を行い、SIRPα KO マウスサンプル中にも存在するタンパク質分子はバックグラウンドと判断し、野生型マウスサンプルにのみ認められた分子に焦点を絞って解析データを検討した。

(5) ミクログリアにおける低温誘導性 SIRPα シグ

ナルの解析

本研究を進める過程で、脳内免疫に重要な役割を果たすミクログリアに発現する **SIRP α** がミクログリア活性化を制御することをみいだした。そこで、低温応答性 **SIRP α** シグナルが脳内炎症反応に与える作用の解明に取り組む目的で、まず、ミクログリアを低温でインキュベーションして **SIRP α** チロシンリン酸化を誘導するための実験系を構築した。ミクログリア由来の株化培養細胞を 23°C の培養条件に暴露した後、界面活性剤を含むバッファーで細胞抽出サンプルを調製し、ウェスタンブロットにより、**SIRP α** のチロシンリン酸化状態を検討した。リガンドの存在下での応答を検討するために、**SIRP α** の細胞外領域を認識する抗体をコートした培養皿上でも同様の実験を行った。

4. 研究成果

(1) 低体温の記憶への影響の検討

低体温処理のない場合、電気ショックを受けたマウスは、翌日(2日目)に同じ環境において強いフリージングを示し、電気刺激と環境条件を関連づけた記憶形成が見られた。フリージングは30分間の観察の2-3分において最も顕著(70-88% : 42-52秒のフリージング/1分間)であり、その後、時間経過と共に減少し、30分後には30-50%のフリージングを示した。さらに翌日(3日目)、同じ条件下で5分間の観察を行ったところ、前日とほぼ同等の最大70-78%のフリージングが認められた。フリージングの程度は野生型マウスと **SIRP α** KO マウスの間で有意な差は見られなかったことから、**SIRP α** の有無は恐怖記憶の形成・維持には影響しないと考えられた。電気ショックの直後に浸水処理により低体温を誘導した野生型マウスの場合、2日目のフリージングの程度は、低体温を誘導しなかった場合に比べて、30分間の観察全体を通して10%程度減弱する傾向がみられたが、有意な差は見られなかった。3日目のフリージングは、低体温処理により15-20%程度の有意な減少が認められた。電気刺激経験直後の低体温により記憶の維持が障害された可能性が考えられた。**SIRP α** KO マウスの場合、2日目のフリージングの程度は、野生型マウスとほぼ同様に低体温処理により減弱する傾向があった。3日目のフリージングも同様であったが、どちらの場合も低体温の有無の条件間で有意差は見られず、野生型マウスでは3日目に有意差が見られた点で異なる結果となった。全体的には野生型マウスと **SIRP α** マウスの間で明確な違いは見られず、基本的に低温 **SIRP α** シグナルと記憶形成・維持との関連は見られなかった。しかし、3日目の違い(野生型マウスでは低体温処理によりフリージングが有意に減少。KO マウスでは有意差無し)に基づいて考察した場合、低温応答性 **SIRP α** シグナルは、記憶形成・維持に抑制的に作用している可能性がある。今回のデータは1条件あたり $n=5-8$ 匹のマウスの解析結果である。上記の可能性については、今後さらに n 数を増やしてデータの信頼性を高めた上で検討する必要があると考えている。

(2) 培養神経細胞を用いた低温への細胞応答の解析

SIRP α の発現を抑制する short hairpin (sh) RNA と蛍光タンパク質 GFP を同時に発現させた細胞と、GFP のみを発現させたマウス海馬初代培養神経細胞の培地から増殖因子を除去後、24°C で培養(低温処理)した場合と、37°C で培養した場合を比較したが、条件に関わらず細胞の形態からみたダメージは同程度であり、低温による細胞死の抑制作用(低温による保護効果)は十分に確認できなかった。一方で、増殖因子を除去せず温度のみを変えて培養した場合、GFP だけを発現する細胞は、24°C において細胞の一部に GFP が集積して膨らんだ swelling 様の構造が頻繁に見られたが、shRNA により **SIRP α** の発現を抑制した細胞では、24°C でもそのような様子はほとんど見られなかった。今回我々の増殖因子を除去した実験条件では、過去に論文で報告されている低温による培養神経細胞の細胞死保護効果は再現できず、条件設定をさらに検討する必要があると考えられた。一方で、低温による細胞障害については、**SIRP α** の発現を抑制した細胞の方がより耐性が見られた。細胞を低温に暴露した場合、イオン恒常性の破綻等により細胞障害性が見られるが、低温応答性 **SIRP α** シグナルは、このような低温障害性を増悪させている可能性が考えられた。

(3) **SIRP α** KO マウスを用いた LPS 誘導性低体温の解析

LPS により誘導される低体温が **SIRP α** シグナルを介して生体保護作用をもつ可能性の検討を計画していたが、**SIRP α** KO マウスでは野生型マウスに比べて、LPS でより激しく低体温が誘導され、同レベルの低体温状況で野生型マウスと KO マウスを比較することはできなかった。**SIRP α** KO マウスでは、LPS 投与後に体温が 30°C 以下にまで低下し、その後徐々に回復したが、野生型マウスでは、そのように長時間にわたる激しい体温低下は見られなかった。また全身性炎症反応による行動量の低下は、野生型マウスと **SIRP α** KO マウスの両方で見られたが、**SIRP α** KO マウスの方が有意に強い行動量低下を示すことも分かった。LPS 応答に重要な役割を果たすマクロファージで特異的に **SIRP α** を KO した cKO マウスでも同様の実験を行ったが、**SIRP α** cKO マウスの体温低下や行動量変化は野生型マウスと比べて明らかな違いは認められなかった。これらの結果から、**SIRP α** シグナルは LPS 負荷に対する生体応答を抑制的に制御していることが予測され、その作用はマクロファージ以外の細胞に発現する **SIRP α** が重要であると考えられた。LPS による全身性炎症反応が体温変化を誘導し、それによって低温誘導性 **SIRP α** シグナルが過剰な生体応答を抑制している可能性がある。

(4) **SIRP α** シグナル複合体の解析

浸水により低体温を誘導した野生型マウスと、低体温を誘導しない野生型マウスの脳組織サンプルから、免疫沈降法により調製した **SIRP α** 複合体を SDS-PAGE 後に銀染色してパターン

異なるタンパク質のバンドを切り出し、質量分析による同定を試みた。SIRPα KO マウスから調製したサンプルを解析してバックグラウンドとした。解析の結果、野生型マウスのサンプルからは分子シャペロン TCP-1 (T-complex protein 1) のサブユニットが多数検出され、低体温サンプルではその検出頻度が低下していた。またそれらのサブユニットは SIRPα KO マウスサンプルからは検出されなかった。SIRPα 分子が TCP-1 と複合体を形成しており、低温刺激によってこの複合体が解離する可能性が考えられた。今後は、結果の再現性、および、その分子複合体がもつ機能的な意義の検討が重要である。

(5) ミクログリアにおける低温誘導性 SIRPα シグナルの解析

ミクログリア由来株化細胞の培養系でも 23°C で SIRPα のチロシンリン酸化が誘導されたが、その程度は低かった。より生理的な条件に近づけるために、SIRPα の細胞外領域を認識する抗体をコートした培養皿上で実験を行い、本来のリガンドである膜タンパク質 CD47 の結合状態を擬似的に再現したところ、低温誘導性 SIRPα リン酸化の顕著な増強が見られた。低温誘導性 SIRPα リン酸化にはリガンドと結合して膜上で動きが制限されていることが重要である可能性がある。一方で、神経細胞では低温誘導性 SIRPα リン酸化は CI チャンネルの機能が必要であることを見出している。CI チャンネルは細胞の容量調節に重要であることから、リガンドと結合した SIRPα は、細胞表面上で細胞容量変化に应答して働くシグナル分子である可能性を考え、今後、仮説の検証を予定している。

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 7 件)

① 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*, 査読有, vol.35, 2015, pp1557-1572

DOI: 10.1128/MCB.01339-14

② Koshimizu H, Takao K, Matozaki T, Ohnishi H, Miyakawa T. Comprehensive behavioral analysis of Cluster of Differentiation 47 knockout mice. *PLoS ONE*, 査読有, vol.9, 2014, e89584

DOI: 10.1371/journal.pone.0089584.

③ Murata Y, Saito Y, Kaneko T, Kotani T, Kaneko Y, Ohnishi H, Matozaki T. Autoimmune animal models in the analysis of the CD47-SIRPα signaling pathway. *Methods*, 査読有, vol.65, 2014, 254-259

DOI: 10.1016/j.jymeth.2013.09.016.

④ Moriya M, Inoue S, Miyagawa-Tomita S, Nakashima Y, Oba D, Niihori T, Hashi M, Ohnishi H, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y. Adult mice expressing a Braf Q241R mutation on an

ICR/CD-1 background exhibit a cardio-facio-cutaneous syndrome phenotype. *Hum Mol Genet*, 査読有, vol.24, 2015, 7349-7360

DOI: 10.1093/hmg/ddv435

⑤ Motegi S, Yokoyama Y, Ogino S, Yamada K, Uchiyama A, Takeuchi Y, Ohnishi H, Ishikawa O. Pathogenesis of multiple lentiginos in LEOPARD syndrome with PTPN11 gene mutation. *Acta Derm Venereol*, 査読有, vol.95, 2015, 978-984

DOI: 10.2340/00015555-2123.

⑥ Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Murata T, Ohnishi H, Oyama T, Chikamatsu K. Relationship between tumor-associated macrophage subsets and CD47 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck in the tumor microenvironment. *Lab Invest*, 査読有, vol.96, 2016, 994-1003

DOI: 10.1038/labinvest.2016.70

⑦ Yanagita T, Murata Y, Tanaka D, Motegi S, Arai E, Daniwijaya EW, Hazama D, Washio K, Saito Y, Kotani T, Ohnishi H, Oldenborg P-A, Garcia NV, Miyasaka M, Ishikawa O, Kanai Y, Komori T, Matozaki T. Anti-SIRPα antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. *JCI Insight*, 査読有, vol.2, 2017, e89140

DOI: 10.1172/jci.insight.89140.

[学会発表] (計 13 件)

① Sato-Hashimoto M, Hayashi Y, Kusakari S, Kotani T, Murata Y, Matozaki T, Ohnishi H. Regulation of microglial homeostasis through cell-cell interaction signal. 第 37 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜, 2014.9.11-13

② 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. 第 37 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜, 2014.9.11-13

③ Kusakari S, Saitow F, Hashimoto M, 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. 11th International Conference on Protein Phosphatases in Health and Diseases, 東北大学, 2014.11.12-14

④ Sato-Hashimoto M, Nozu T, Urano E, Saito Y, Kotani T, Murata Y, Matozaki T, Ohnishi H. Analysis of cell-cell interaction signal that regulates microglial homeostasis. 第 38 回日本神経科学大会, 神戸コンベンションセンター, 2015.7.28-31

⑤ Ohnishi H, Kusakari S, Hashimoto M, Ishikawa S, Urano E, Kotani T, Murata Y, Matozaki T. Behavioral analysis of forebrain neuron-specific Shp2 conditional knockout mice. 第 38 回日本神経科学大会, 神戸コンベンションセンター, 2015.7.28-31

⑥ Sato-Hashimoto M, Nozu T, Urano E, Saito Y,

Kotani T, Murata Y, Matozaki T, Ohnishi H. Cell-cell interactions via CD47-SIRP α signal regulate microglial activation. 第 58 回日本神経化学会大会, 大宮ソニックシティ, 2015.9.12-14

⑦ Ohnishi H, Kusakari S, Hashimoto M, Ishikawa S, Urano E, Kotani T, Murata Y, Matozaki T. Behavioral phenotypes of neuron-specific Shp2 conditional knockout mice. 第 58 回日本神経化学会大会, 大宮ソニックシティ, 2015.9.12-14

⑧ 橋本美穂, 野津智美, 浦野江里子, 齊藤泰之, 小谷武徳, 村田陽二, 的崎尚, 大西浩史. ミクログリアにおける SIRP α の役割. 第 62 回北関東医学会総会, 群馬大学, 2015.10.1-2

⑨ 橋本美穂, 野津智美, 浦野江里子, 齊藤泰之, 小谷武徳, 村田陽二, 的崎尚, 大西浩史. SIRP α 欠損マウスは LPS 投与によって誘導される低体温症が重篤化する. 第 59 回日本神経化学会大会, 福岡国際会議場, 2016.9.8-10

⑩ 野津智美, 橋本美穂, Ruwaida Elhanbaly, 石川達也, 齊藤泰之, 小谷武徳, 村田陽二, 的崎尚, 深澤有吾, 大西浩史. 白質におけるミクログリア恒常性制御. 第 59 回日本神経化学会大会, 福岡国際会議場, 2016.9.8-10

⑪ Nozu T, Hashimoto M, Elhanbaly R, Ishikawa T, Hirose A, Shimizu W, Matozaki T, Fukazawa Y, Ohnishi H. Analysis of a direct cell-cell communication signal that regulates glial activation in the brain. 12th International Conference on Protein Phosphatase, 近畿大学, 2016.10.27-30

⑫ 野津智美, 橋本美穂, Ruwaida Elhanbaly, 石川達也, 齊藤泰之, 小谷武徳, 村田陽二, 深澤有吾, 的崎尚, 大西浩史. SIRP α 欠損マウスにおけるクプリゾン感受性の亢進. 第 63 回北関東医学会総会, 群馬大学, 2016.9.29-30

⑬ 大西浩史. 細胞間接触シグナルによる脳内グリア恒常性制御. 第 6 回 Multidisciplinary meeting on atherosclerosis, 仙台, 2017.1.7

[図書](計 1 件)

① 大西浩史, 橋本美穂, メディカルドゥ, 脳内環境 維持機構と破綻がもたらす疾患研究 (高橋良輔, 漆谷真, 山中宏二, 樋口真人 編) 2014, 114-118

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://biosignal.dept.med.gunma-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

橋本 美穂(HASHIMOTO Miho)

学術振興会・特別研究員

研究者番号:90381087

草薨 伸也(Kusakari Shinya)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号:10510901

小寺 義男(KODERA Yoshio)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号:60265733

金子 和光(KANEKO Yoriaki)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号:00334095

北村 忠弘(KITAMURA Tadahiro)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号:20447262

小林 雅樹(KOBAYASHI Masaki)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号:80373041

(4)研究協力者

()