

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08532

研究課題名(和文)細胞間シグナルCD47-SIRP系による免疫制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of the immunological function by the CD47-SIRP alpha signaling system

研究代表者

齊藤 泰之(Saito, Yasuyuki)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：40508842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、細胞間シグナルCD47-SIRP系による免疫制御、特に樹状細胞を介した制御機構に関して解析をおこなった。その結果、樹状細胞上のSIRPとCD47の双方がSIRPを発現するリンパ組織樹状細胞の恒常性を制御することを見出した。さらにこれらの分子は樹状細胞からのTNF受容体リガンドの産生を介して、脾臓ストローマ細胞の恒常性の制御を行うことを明らかにした。さらに研究代表者はヒト樹状細胞をin vivo解析するツールとして免疫系ヒト化マウスを用いた実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：We have here investigated the regulatory mechanism of the immune system, especially of dendritic cell function by the CD47-SIRP signaling system. We have shown that both SIRP and CD47 on dendritic cells regulate homeostasis of SIRP + dendritic cells in lymphoid organs. Moreover, these molecules regulate homeostasis of stromal cells in the spleen through the production of TNF receptor ligands by dendritic cells. Furthermore, we have established a mouse model to characterize human dendritic cells in vivo using humanized mice in the immune system.

研究分野：免疫学、血液学

キーワード：樹状細胞 ストローマ細胞 SIRP CD47

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (DC) は強力な抗原提示能を有した血液細胞であり、免疫応答ならびに免疫寛容の誘導に中心的な役割を果たすことが知られている。DC は二次リンパ組織 (SLO) 内では T 細胞だけでなく、間葉系細胞 (ストローマ細胞) と常に相互作用しており、これらの細胞がもたらす微小環境における細胞間相互作用が、DC 機能を理解する上で非常に重要である。

研究代表者は、細胞間シグナル伝達による DC の機能制御に関する研究を継続しており、これまでの研究成果として、自己免疫応答や DC の恒常性の制御に重要であることを明らかにしてきた。しかしながら依然として CD47-SIRP α 系による DC 恒常性の制御についての詳細な分子基盤は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、細胞間シグナル CD47-SIRP α 系による免疫制御、特に DC の機能制御に関して、研究代表者がこれまで国内外で行ってきた研究成果を基盤とし、DC の恒常性の制御、ストローマ細胞の制御につき、詳細かつ包括的な解析を行うことで、このシグナル系により DC がもたらす多彩な機能を明らかにしようとする。また本研究では、ヒト DC における CD47-SIRP α 系の役割について解析を行う目的で、次世代ヒト化マウスを用いたヒト DC の研究基盤を確立する。本研究の成果は、造血器疾患、感染症、自己免疫疾患、免疫不全症などの難病、さらには移植ならびに腫瘍免疫等の原因解明や診断・治療法の開発へ直接つながることが期待される。

3. 研究の方法

(1) CD47-SIRP α 系による DC 恒常性の制御の分子基盤の解明、(2) SIRP α 陽性 DC をオーガナイザーとした SLO の微小環境の制御、ならびに (3) 次世代ヒト化マウスを用いたヒト DC における CD47-SIRP α 系の役割につき検討を行う。

(1) については、DC 特異的 SIRP α ならびに CD47 欠損マウスを作製し、DC 恒常性における CD47-SIRP α 相互作用を細胞レベル明らかにする。(2) については、(1) 同様 DC 特異的 SIRP α ならびに CD47 欠損マウスの解析を行うと共に、DC-ストローマ細胞の共培養系を樹立し、DC によるストローマ細胞の機能制御における CD47-SIRP α 系の役割を明らかにする。(3) については次世代ヒト化マウスを用いて、ヒト DC の分化能の解析、ならびに CD47-SIRP α 系の役割について解析を行う。

4. 研究成果

(1) CD47-SIRP α 系による DC 恒常性の制御の分子基盤の解明

CD47-SIRP α 系による DC 恒常性の制御機構のさらなる解析を目的に、新たに作製した DC 特異的 SIRP α コンディショナルノックアウト (cKO) (*Sirpa*^{ΔDC}) マウス (Washio et al. *Genes Cells*, 2015)、ならびに DC 特異的 CD47 cKO マウスの解析を行った。これまで見出していた全身性に SIRP α を欠損させたマウス同様に、これらのマウスの二次リンパ組織において主に存在する DC 分画である CD4⁺CD8 α ⁻ 古典的 DC (cDC) が著しく減少しており、DC に発現する SIRP α ならびに CD47 による同一細胞 (cis) もしくは DC 同士 (Trans) の相互作用によって、cDC 自身の恒常性が制御されることが明らかとなった (Saito et al. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2017)。一方で二次リンパ組織以外の組織に、特に表皮においてはランゲルハンス細胞の数が *Sirpa*^{ΔDC} マウスで著減しており (Washio et al. *Genes Cells*, 2015)、SLO も含む全身の DC の制御に CD47-SIRP α 系が関与する可能性が示唆された。

(2) SIRP α 陽性 DC をオーガナイザーとした二次リンパ組織 (SLO) の微小環境の制御

前述の *Sirpa*^{ΔDC} マウスの脾臓において T リンパ球領域のストローマ細胞である細網線維芽細胞 (Fibroblastic reticular cells; FRC) 数の減少を見出した。詳細な解析の結果、*Sirpa*^{ΔDC} マウス脾臓 FRC のターンオーバーが著明に亢進しており、その原因として FRC の多くは細胞死を起こしていることが明らかとなった。そこで、脾臓 DC によって、ストローマ細胞の生存が SIRP α 依存的かどうか検討を行うため、DC と FRC との共培養実験を行ったところ、DC から産生される Tumor necrosis factor (TNF) 受容体リガンド (TNF- α 、Lymphotoxin- α) が FRC の増殖と生存を制御すること、DC による TNF 受容体リガンドの産生は *Sirpa*^{ΔDC} マウス由来の DC で著明に減少していることが明らかとなった。さらに *in vivo* での効果を検討するために、TNF 阻害剤を正常マウスに投与したところ、FRC が実際に減少することを確認した。一方で、CD47 を DC 特異的に欠損させた CD47^{ΔDC} マウスにおいても、*Sirpa*^{ΔDC} マウスと同様に脾臓における FRC の減少を認めた (Saito et al. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2017)。

以上により、DC における CD47-SIRP α 系は生体マウスにおいて、自身の恒常性のみならず、TNF- α などのサイトカイン分泌を制御することで、微小環境、特に FRC の恒常性を制御することが明らかとなった。

(3) 次世代ヒト化マウスを用いたヒト DC における SIRP α の役割

ヒト DC における CD47-SIRP α 系の役割を調べることを目的に、新生仔免疫不全マウス (MISTRG マウス) にヒト CD34 陽性細胞を投

与したヒト化マウスを作製した (Saito et al. *Method Mol Biol*, 2016)。移植後 8~16 週の時点で、骨髄細胞の大半はヒト CD45 を発現しており、ヒト細胞の良好な生着、ならびに成熟細胞への分化能が認められた。中でもヒト DC に関して、レシピエントにヒト造血因子を発現させた次世代免疫不全マウスではコントロールマウスと比べ CD141+ 分画の著明な増加を認めており (Saito et al. *Blood*, 2016)、生体内でのヒト DC 分化におけるヒト造血因子の重要性が明らかとなった。現在これらの研究基盤を用いて、ヒト DC における CD47-SIRP α 系の役割の検討を行っている。

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 11 件)

1. Murata Y, Tanaka D, Hazama D, Yanagita T, Saito Y, Kotani T, Oldenborg PA, Matozaki T.
Anti-human SIRP α antibody is a new tool for cancer immunotherapy.
Cancer Sci. 査読有. 2018. 印刷中. Doi: 10.1111/cas.13548.
2. Sawada N, Kotani T, Konno T, Setiawan J, Nishigaito Y, Saito Y, Murata Y, Nibu K, Matozaki T.
Regulation by commensal bacteria of neurogenesis in the subventricular zone of adult mouse brain.
Biochem Biophys Res Commun. 査読有. 498 巻 . 2018. 824-829. Doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.064.
3. Saito Y, Respatika D, Komori S, Washio K, Nishimura T, Kotani T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Kaneko Y, Yui K, Yasutomo K, Nishigori C, Nojima Y, Matozaki T.
SIRP α^+ dendritic cells regulate fibroblastic reticular cells via TNF receptor ligands in the adult spleen.
Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有. 114 巻 . 2017. E10151-10160. Doi: 10.1073/pnas.1711345114.
4. Takizawa H, Fritsch K, Kovtonyuk L, Saito Y, Yakkala C, Jacobs K, Ahuja A, Lopes M, Hausmann A, Wolf-Dietrich H, Alvaro G, Nombela-Arrieta C, Manz MG.
Pathogen-induced TLR4-TRIF innate immune signaling in hematopoietic stem cells promotes proliferation but reduces competitive fitness.
Cell Stem Cell. 査読有. 21 巻. 2017. 225-240. e5 Doi: 10.1016/j.stem.2017.06.013.
5. Yanagita T, Murata Y, Tanaka D, Motegi SI, Arai E, Daniwijaya EW, Hazama D, Washio K, Saito Y, Kotani T, Ohnishi H, Oldenborg 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. 査読有. 2 巻. 2017. e89140. Doi: 10.1172/jci.insight.89140.
6. Respatika D, Saito Y, Washio K, Komori S, Kotani T, Okazawa H, Murata Y, Matozaki T.
Role of SIRP α in homeostatic regulation of T cells and fibroblastic reticular cells in the spleen.
Kobe J Med Sci. 査読有. 63 巻. 2017. E22-E29.
7. Saito Y, Ellegast JM, Rafiei A, Song Y, Kull D, Heikenwalder M, Rongvaux A, Halene S, Flavell RA, Manz MG.
Peripheral blood CD34⁺ cells efficiently engraft human cytokine knock-in mice.
Blood. 査読有. 128 巻. 2016. 1829-1833. Doi: 10.1182/blood-2015-10-676452.
8. Saito Y, Ellegast JM, Manz MG.
Generation of Humanized Mice for Analysis of Human Dendritic Cells.
Methods Mol Biol. 査読無. 1423 巻. 2016. 309-320. Doi: 10.1007/978-1-4939-3606-9_22.
9. Ellegast JM, Rauch PJ, Kovtonyuk LV, Muller R, Wagner U, Saito Y, Wildner-Verhey van Wijk N, Fritz C, Rafiei A, Lysenko V, Dudkiewicz E, Theocharides AP, Soldini D, Goede JS, Flavell RA, Manz MG.
inv(16) and NPM1mut AMLs engraft human cytokine knock-in mice.
Blood. 査読有. 128 巻. 2016. 2130-2134. Doi: 10.1182/blood-2015-12-689356.
10. 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. 査読有. 112 巻 . 2015. E4264-4271. Doi: 10.1073/pnas.1510167112.

11. 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. 査読有. 20 巻. 2015. 451-463. Doi:10.1111/gtc.12238.

[学会発表] (計 11 件)

1. Yasuyuki Saito, Satomi Komori, Datu Respatika, Ken Washio, Takenori Kotani, Yoji Murata, Hiroshi Ohnishi, Katsuyuki Yui, Koji Yasutomo, Takashi Matozaki.
SIRP α ⁺ dendritic cells regulate homeostasis of fibroblastic reticular cells via TNF receptor ligands in the adult spleen.
第46回日本免疫学会総会、2017. 12. 12、仙台国際センター (宮城県)
2. Komori Satomi, Yasuyuki Saito, Datu Respatika, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki.
Development of a novel primary culture system for lymphoid organ fibroblastic reticular cells.
第46回日本免疫学会総会、2017. 12. 12、仙台国際センター (宮城県)
3. Yasuyuki Saito, Satomi Komori, Datu Respatika, Ken Washio, Takenori Kotani, Yoji Murata, Hiroshi Ohnishi, Katsuyuki Yui, Koji Yasutomo, Takashi Matozaki.
SIRP α ⁺ dendritic cells regulate homeostasis of fibroblastic reticular cells via TNF receptor ligands in the adult spleen.
The 5th annual meeting of the international cytokine and interferon society, ICIS 2017、2017. 11. 1、ANA クラウンプラザ金沢 (石川県)
4. Yasuyuki Saito, Yoji Murata, Takenori Kotani, Richard A. Flavell, Markus G. Manz, Takashi Matozaki.
Establishment of a potential new PDX mouse model for personalized cancer immunotherapy.
第77回日本癌学会学術総会、2017. 9. 28、パシフィコ横浜 (神奈川県)
5. 齊藤 泰之、羽間 大祐、小谷 武徳、村田 陽二、的崎 尚
免疫系ヒト化マウスを用いた新規がん異種移植マウスモデルの作成
第16回生体機能研究会、2017. 9. 22、岐阜大学サテライトキャンパス (岐阜県)
6. 小森 里美、齊藤 泰之、Datu Respatika, 小谷 武徳、村田 陽二、的崎 尚
二次リンパ組織ストローマ細胞の新規初代培養系の樹立と増殖・制御機構の解明
第16回生体機能研究会、2017. 9. 22、岐阜大学サテライトキャンパス (岐阜県)
7. Yasuyuki Saito, Takashi Matozaki, Richard A. Flavell, Markus G. Manz.
Human hemato-lymphoid system development in human cytokine knock-in mice engrafted with adult donor-derived CD34⁺ cells.
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 (大阪府)
8. Yasuyuki Saito, Jana M. Ellegast, Yuanbin Song Daniel Kull, Mathias Heikenwalder, Anthony Rongvaux, Stephanie Helene, Richard A. Flavell, Markus G. Manz.
Peripheral blood CD34⁺ cells efficiently engraft human cytokine knock-in immunodeficient mice.
第78回日本血液学会総会、2016. 10. 6、パシフィコ横浜 (神奈川県)
9. Yasuyuki Saito.
Regulation of dendritic cell and stromal-cell homeostasis by dendritic cell-SIRP α in the spleen.
2015 神戸大学-ワシントン大学国際合同シンポジウム、2015. 9. 11、ワシントン大学 (米国)
10. Yasuyuki Saito, Jana Ellegast, Daniel Kull, Mathias Heikenwaelder, Richard Flavell, Markus Manz.
Development of a human hemato-lymphoid system in human cytokine knock-in *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice engrafted with peripheral blood mobilized CD34⁺ cells.
第44回日本免疫学会総会、2015. 11. 20、札幌コンベンションセンター (北海道)
11. 齊藤 泰之、的崎 尚
異種間移植における CD47-SIRP α 系の役割とその応用
第14回生体機能研究会、2015. 7. 26、ザ・プリンス箱根 (神奈川県)

〔図書〕（計3件）

1. Yasuyuki Saito, Yoji Murata, Takenori Kotani, Takashi Matozaki、Springer、Encyclopedia of Signaling Molecules:Sirpa、印刷中
2. Yoji Murata, Takenori Kotani, Yasuyuki Saito, Takashi Matozaki、Springer、Encyclopedia of Signaling Molecules:PTPRH、印刷中
3. Yoji Murata, Takenori Kotani, Yasuyuki Saito, Takashi Matozaki、Springer、Encyclopedia of Signaling Molecules: Tyrosine-Protein Phosphatase Nonreceptor Type 11 (PTPN11)、印刷中

〔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

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