

令和元年6月11日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09887

研究課題名(和文) 樹状細胞に発現するShp-1が制御する自己免疫現象の解析

研究課題名(英文) Analysis of the autoimmune phenomena that are controlled by Shp-1 in dendritic cells

研究代表者

金子 和光 (KANEKO, YORIAKI)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00334095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞(Dendritic Cell:DC)における細胞質型チロシン脱リン酸化酵素Shp-1の機能解析を目標にDC特異的にShp-1が欠損するコンディショナルノックアウトマウス(Shp-1 CKO)を作製して解析を行った。その結果、Shp-1 CKOは高齢になるとピロカルピンの刺激にて誘発される唾液の分泌が有意に低下することが判明した。組織学的な解析では、Shp-1 CKOにおいて唾液腺の萎縮と唾液腺内のリンパ濾胞の強い形成が認められた。またフローサイメーターを用いてShp-1 CKOの唾液腺内への浸潤する細胞を解析したところ、T、B細胞の増加が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Shp-1 CKOは加齢に伴いIgGやC3の沈着を伴う自己免疫性の腎炎を発症し、Th1タイプの免疫応答が強いことは、すでに報告している。そして、本研究課題を通じて、老齢となったShp-1 CKOが、外分泌腺を標的とする自己免疫性の臓器障害を呈することも明らかとなった。ヒトのシェーグレン症候群(SjS)は、唾液や涙液の分泌低下など外分泌腺障害を呈する自己免疫性疾患であり、腺外症状としての自己免疫性腎炎も主要な症候である。従って、Shp-1 CKOはSjSの有用な動物モデルの1つとなる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We generated a conditional knockout mouse (Shp-1 CKO) to analyze a cytoplasmic tyrosine phosphatase Shp-1. This knockout strain specifically lacks Shp-1 in dendritic cells (DCs). Aged Shp-1 CKO secreted less salivary fluid than control mice in response to pilocarpine stimulation. Histological analysis revealed periductal foci increased in the salivary glands of Shp-1 CKO. The numbers of the cells infiltrating into the glands of Shp-1 CKO were measured by flow cytometry, and we found T and B cells increased markedly in the glands.

研究分野：膠原病

キーワード：自己免疫疾患 シェーグレン症候群 樹状細胞 Shp-1

1. 研究開始当初の背景

脱リン酸化酵素である Shp-1、Shp-2 の基質タンパク質として同定された SIRP α はマクロファージと樹状細胞(Dendritic cell ; DC)に強く発現する分子である。SIRP α は細胞質内領域に抑制性のシグナル伝達に重要とされる ITIM と呼ばれるアミノ酸配列を有していることから、抑制性のシグナル伝達分子として機能することが考えられてきた。また SIRP α は細胞接着などの刺激によりチロシン酸化が生じ、Shp-1、Shp-2 を介してシグナルが伝達されると考えられている。SIRP α のリガンドとなる CD47 は T 細胞や B 細胞を含めた免疫担当細胞に広く発現する分子であり、免疫系においては CD47 と SIRP α は T 細胞が DC により抗原提示を受ける際に補助刺激分子として機能する事が想定されている。これまでに研究代表者らのグループでは SIRP α の ITIM 領域を欠損する遺伝子改変マウスである SIRP α ミュータントマウス(SIRP α MT)を用いて解析を続けてきている。SIRP α MT は SIRP α の細胞外領域が CD47 との相互作用を有しながら、Shp-1、Shp-2 のシグナル伝達が障害されるように作製された遺伝子改変マウスである。そして、SIRP α MT を用いた解析で、DC から産生される IFN γ がコントロールマウスに比べて著しく減少し、T 細胞の Th1 タイプへの分化が減弱することを見いだしている(Tomizawa T., et al., *J Immunol.*2007)。また、抗原特異的自己免疫疾患のモデルであるコラーゲン誘導関節炎に対して、SIRP α MT は抵抗性を示す事が判明した(Okuzawa, C., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2008)。このように SIRP α から Shp-1、Shp-2 へのシグナルが遮断されると、免疫応答は減弱することが明らかになった。これらの事実から DC における脱リン酸化酵素である Shp-1 や Shp-2 の機能を明らかにする必要性が生じ、DC において特異的に Shp-1 を欠損するコンディショナルノックアウトマウス (Shp-1 CKO) を作製した。そして Shp-1 CKO の解析で、研究代表者らは Shp-1 CKO では DC が脾臓内で増加することや、DC からの TNF α や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が亢進する事を見いだした。また、Shp-1 CKO は生後 40 週齢の時点で、自己免疫性の腎炎や肺炎を発症する事も確認している(Kaneko T., et al., *J Immunol.*2012)。そして、これらの事実から、研究代表者は Shp-1 CKO の自己免疫現象を解析することは、全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患の解明と新規治療法の開発に有用であると考え解析を行った。

2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者がこれまでに得ている研究成果を基盤にして、DC に発現する Shp-1 がコントロールする臓器特異的自己免疫現象に関して解析を行った。Shp-1 CKO は 40 週齢を超えると、免疫複合体の沈着を伴う自己免疫性の糸球体腎炎を発症するが、この時、糸球体腎炎に加えて、炎症細胞の強い浸潤を伴う間質性腎炎を併発することも判明している。ヒトにおいては、糸球体腎炎と間質性腎炎を認める自己免疫疾患として、SLE とシェーグレン症候群(SjS)が知られているが、特に、SjS は自己免疫現象の一環として、唾液腺や涙腺などの外分泌腺が障害される一方で、腺外症状としての間質性腎炎を発症する特徴も有する。そこで、本研究課題においては、Shp-1 CKO にみられる腎病変を手がかりとして、Shp-1 CKO における、外分泌腺障害の存在可能性に関して検討を行った。

3. 研究の方法

本研究では、C57BL/6 の遺伝的背景を有し、DC 特異的に Shp-1 を欠損する Shp-1 CKO を用いて解析を行った。DC は細胞表面に CD11c を特異的に発現する細胞であるので CD11c のプロモーター活性に依存して Cre を発現するトランスジェニックマウスと Shp-1 のエクソン特異的に loxP を発現する Shp-1 トランスジェニックマウスを交配して Shp-1 CKO を産生し解析に使用した。

1. Shp-1 CKO にみられる唾液腺分泌に関する検討

本研究課題の最初の取り組みとして、Shp-1 CKO における唾液腺の分泌障害に関して検討を行った。Shp-1 CKO は、腎機能障害が加齢に伴い顕在化することが知られているので、本研究課題においては、8 週齢の若齢の個体から 75 週齢を越える高齢化した Shp-1 CKO の個体を用意して検討を進めた。唾液分泌量は、ピロカルピンの腹腔内投与後 20 分間に分泌される唾液量を測定した。また、若齢と高齢の Shp-1 CKO から唾液腺を摘出して重量を測定した。

2. Shp-1 CKO にみられる唾液腺における病理組織学的検討

Shp-1 CKO における唾液分泌の測定と平行して、唾液腺の病理組織学的な解析を行った。具体的には、若齢から高齢までの Shp-1 CKO を用意し唾液腺を摘出してパラフィン包埋し、マッソントリクローム染色と HE 染色を行い、唾液腺の構造を確認した。また、抗 B220、CD4、CD8、

CD11b、F4/80、CD11c、Gr-1抗体を用いた免疫組織染色を行い、唾液腺内部に浸潤する炎症細胞を同定した。

3. Shp-1 CKO の唾液腺内部に浸潤する炎症細胞のフローサイトメトリー(FCM)による同定

40週齢の Shp-1 CKO の唾液腺を摘出し、コラーゲナーゼを用いて細胞を単離した。得られた細胞を用いて、抗 CD45.2、B220、CD4、CD8、CD11b、F4/80、CD11c、Gr-1 抗体などを用いて多重染色を行った。さらに、Counting beads を使用して、唾液腺内に浸潤する炎症細胞の絶対数を求めた。

4. 研究成果

1. Shp-1 CKO にみられる唾液腺分泌に関する検討

65週齢を越える Shp-1 CKO においては、ピロカルピンに反応して分泌される唾液量がコントロールマウスに比べて有意に低下することが明らかになった(図 1)。また、両側の唾液腺が萎縮して唾液腺重量が低下することも判明した(図 2)。

2. Shp-1 CKO にみられる唾液腺における病理組織学的検討

40週齢の Shp-1 CKO の唾液腺を病理組織学的に検討したところ、Shp-1 CKO では唾液腺の内部導管の周囲にリンパ濾胞が増生し、増加した濾胞数を光学顕微鏡にて計測すると Shp-1 CKO において濾胞数が有意に増加していることが明らかになった(図 3)。そして、増生したリンパ濾胞は B220 と CD4 が強陽性に染色されることが判明した。

3. Shp-1 CKO の唾液腺内部に浸潤する炎症細胞の FCM による同定

40週齢を越える Shp-1 CKO の唾液腺をコラーゲナーゼで処理して、単離した細胞を FCM により解析したところ、Shp-1 CKO では B220 が陽性の B 細胞と CD4 が陽性の T 細胞が有意に増加することが判明した。しかし、マクロファージのマーカーである CD11b や F4/80、また DC のマーカーである CD11c が陽性になる細胞は Shp-1 CKO とコントロールで絶対数に差が認められなかった。

結論

Shp-1 CKO は加齢により、唾液腺の萎縮から唾液分泌の低下が生じる。また、唾液腺が萎縮する過程においては、唾液腺内部に B 細胞と T 細胞の浸潤が生じ、浸潤した T、B 細胞はリンパ濾胞を形成する。これまでの解析で、Shp-1 CKO は加齢に伴って自己免疫性の糸球体腎炎や間質性腎炎を呈することが明らかになっているので、これらの所見を加味すると、Shp-1 CKO はヒトの SjS に類似する病態を呈することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. SIRPα⁺ dendritic cells regulate homeostasis of fibroblastic reticular cells via TNF receptor ligands in the adult spleen.
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
Proc Natl Acad Sci U S A (査読あり)
114 (47) E10151-E10160 10.1073/pnas.1711345114
2017

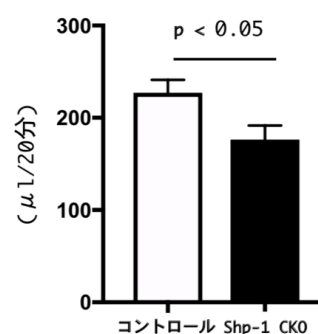


図1 唾液分泌量

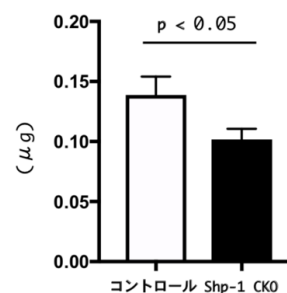


図2 唾液腺重量 (1匹あたり)

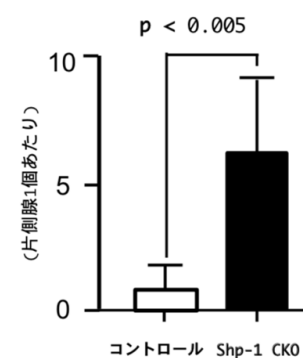


図3 リンパ濾胞数

[学会発表] (計 7 件)

1. CD11c-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp-1 induces autoimmune sialadenitis: Is it a new model mouse for Sjogren's syndrome?
Kinoshita Masato, Kaneko Yoriaki, Watanabe Mitsuharu, Ohishi Yuko, Shrestha Shreya, Suwa Junya, Saito Yasuyuki, Ohnishi Hiroshi, Nojima Yoshihisa, Matozaki Takashi, and Hiromura Keiju
The 47th annual meeting of the Japan Society of Immunology
2018
2. CD11c-Specific Ablation of SHP-1 Results in Renal Fibrosis with Age
Watanabe Mitsuharu, Kaneko Yoriaki, Kinoshita Masato, Ohishi Yuko, Sakairi Toru, Ikeuchi Hidekazu, Nojima Yoshihisa, and Hiromura Keiju
Kidney WEEK
San Diego CA
2018
3. 樹状細胞特異的に Shp-1 を欠損する遺伝子改変マウスにおける自己免疫性唾液腺炎の解析
木下雅人, 金子和光, 渡辺光治, 大石裕子, 諏訪絢也, 中里見征央, 坂入徹, 池内秀和, 前嶋明人, 野島美久, 廣村桂樹
第 62 回日本リウマチ学会総会・学術集会
2018
4. Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp-1 induces autoimmune sialadenitis characterized by infiltration of CD4⁺ T cells and B cells
KINOSHITA Masato, KANEKO Yoriaki, WATANABE Mitsuharu, OHISHI Yuko, SAITO Yasuyuki, OHNISHI Hiroshi, NOJIMA Yoshihisa, MATOZAKI Takashi, and HIROMURA Keiju
The 46th annual meeting of the Japan Society of Immunology
2017
5. Shp-1 in dendritic cells controls the development of memory-phenotype CD8⁺ T cells
OHISHI Yuko, KANEKO Yoriaki, WATANABE Mitsuharu, KINOSHITA Masato, HIROMURA Keiju, SAITO Yasuyuki, OHNISHI Hiroshi, MATOZAKI Takashi, and NOJIMA Yoshihisa
The 45th annual meeting of the Japan Society of Immunology
2016
6. Accumulation of dysregulated renal mononuclear phagocytes (rMoPh) and Th1 cells in the kidney of CD11c-specific Shp-1 knockout mice
WATANABE Mitsuharu, KANEKO Yoriaki, HIROMURA Keiju, KINOSHITA Masato, OHISHI Yuko, SAITO Yasuyuki, OHNISHI Hiroshi, MATOZAKI Takashi, and NOJIMA Yoshihisa
The 45th annual meeting of the Japan Society of Immunology
2016
7. 樹状細胞特異的 Shp-1 欠損マウスにおける自己免疫性腎炎の解析: 第 2 報
渡辺光治, 廣村桂樹, 金子和光, 木下雅人, 大石裕子, 坂入徹, 池内秀和, 前嶋明人, 大西浩史, 的崎尚, 野島美久
第 59 回日本腎臓学会学術総会
2016

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。