

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08398

研究課題名(和文)アダプター蛋白SH3BP2が全身性エリテマトーデスの病態形成に及ぼす役割の解明

研究課題名(英文)The role of SH3BP2 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus

研究代表者

向井 知之 (Mukai, Tomoyuki)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00454421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：SH3BP2 (SH3 binding protein2) は免疫細胞に広く発現するアダプター蛋白で、Syk等の細胞内シグナル伝達を調節する。自己免疫性疾患での役割は明らかでなく、今回、全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウスを用い、自己免疫現象・病変形成に及ぼす影響を検討した。結果、SH3BP2欠損は、SLEマウスの自己抗体産生、異常T細胞増加を軽減し、臓器障害を抑制した。SH3BP2欠損は樹状細胞分化・活性化抑制を介しSLE様病変を改善すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アダプター蛋白SH3BP2はもともと小児の顎骨破壊を特徴とするCherubismの原因遺伝子として同定された。SH3BP2のCherubism変異により、破骨細胞・マクロファージの活性化が生じCherubismの病態に関与することは過去に我々が報告したが、Cherubism以外の疾患におけるSH3BP2の役割は不明だった。本研究により、SH3BP2が自己免疫性疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)の病態に関与することが分かった。本研究は、広く他の自己免疫疾患におけるSH3BP2の役割を解明する端緒になると考える。また、SH3BP2を標的とする新規治療戦略にもつながると考える。

研究成果の概要(英文)：SH3BP2 (SH3 binding protein2) is an adaptor protein, which is widely expressed in immune cells and regulates intracellular signaling such as Syk. The role of SH3BP2 in autoimmune diseases is unclear. In this study, we investigated its effects on autoimmune phenomena and organ damage using a mouse model of systemic lupus erythematosus (SLE). The results showed that SH3BP2 deficiency reduced autoantibody production, increased abnormal T cells, and subsequently suppressed organ damage in the SLE mice. These findings suggest that SH3BP2 deficiency ameliorates SLE-like lesions through suppression of dendritic cell differentiation and activation.

研究分野：免疫学、リウマチ学

キーワード：SH3BP2 全身性エリテマトーデス Cherubism Fas-Iprマウス 樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アダプター蛋白 SH3BP2 (Src Homology 3 Binding Protein 2)は免疫担当細胞の機能を調節する。申請者は、SH3BP2 遺伝子改変マウスの解析により、機能獲得変異がマクロファージ系細胞の活性化を介し自己免疫性関節炎を増悪させ、また機能喪失変異が自己抗体の著明な産生低下を伴い関節炎を軽減させることを明らかとした (Mukai T, et al. PLoS One. 2014 Aug 21;9(8):e105518.; Mukai T, et al. J Bone Miner Res. 2014 Dec;29(12):2618-35.; Mukai T, et al. Arthritis Rheumatol. 2015 Mar;67(3):656-67.)。一連の結果は、SH3BP2 が自己免疫性疾患の発症・進展に関与しうることを示唆している。本申請研究では代表的自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)に着目し、SH3BP2 変異マウスと SLE モデルマウスを用い、自己免疫疾患の発症や臓器病変形成における SH3BP2 の役割の解明を目的とした。

先行して行った我々の解析では、SH3BP2 機能獲得変異が Fas-lpr 変異 SLE モデルマウスにおいて、SLE 病態を軽減させるという結果がえられた (Nagasu A, Mukai T, et al. Cells. 2019 Apr 30;8(5):402.; 科研費 研究課題 15K09540)。同研究では、SH3BP2 機能獲得変異によるマクロファージからの TNF 産生亢進が、Fas 変異によるアポトーシス障害を部分的に補完し、病的自己反応性リンパ球の除去に寄与したと考えられた。

本研究では、SH3BP2 の免疫系での多面的役割を解明し、SH3BP2 を標的とした自己免疫疾患の治療の可能性を探索する。

2. 研究の目的

本研究では SH3BP2 の全身性エリテマトーデスの病態における役割の解明を行う。過去の研究では SH3BP2 機能獲得変異マウスを用いたが、本研究では SH3BP2 欠損マウスを用いて解析する。また、細胞特異的な SH3BP2 の役割を調べるため B 細胞特異的 SH3BP2 欠損マウスを用いて解析する。

3. 研究の方法

1. マウス

全身性エリテマトーデスモデルマウスとして B6. MRL-FasIpr/lpr mice (#000482, Jackson Lab)を用いた。Cd19-Cre マウスは Jackson Lab より購入した (#006785)。Sh3bp2-floxed マウス、Sh3bp2- / (欠損)マウスは共同研究者の植木靖好博士 (インディアナ大学) より譲り受けた。

2. SLE マウスとの交配実験

SH3BP2 欠損マウスと FasIpr マウスを交配し、Sh3bp2 / FasIpr/lpr を作成した。Sh3bp2+/+ (n = 10), Sh3bp2 / (n = 10), FasIpr/lpr (n = 16), and Sh3bp2 / FasIpr/lpr (n = 14) マウスを 35 週齢まで観察し、安楽死の後に血液、組織を回収した。

B 細胞特異的マウスは、Cd19-Cre マウスおよび Sh3bp2-floxed マウスを用いて作成し、Cd19Cre/+Sh3bp2f1/FasIpr/lpr (n = 14), and Cd19+/+Sh3bp2f1/FasIpr/lpr (n = 14) について解析した。

3. ウェスタンブロット法

マウスよりリンパ節、脾臓、B 細胞を回収し、SH3BP2 などの蛋白発現をウェスタンブロット法により解析した。

4. Primary T 細胞および B 細胞の回収

摘出したマウス脾臓より、それぞれ CD4 isolation kit II, CD8a isolation kit II (Miltenyi Biotec)を用いて回収した。

5. 尿蛋白の定量

35 週齢のスポット尿を用いて、試験紙法にて尿蛋白量の定性検査を行った。

6. 腎臓の組織学的解析

摘出したマウス腎臓を薄切後に PAS 染色し、糸球体内の細胞増殖・硬化について評価した。

7. 血清抗 dsDNA 抗体価、リウマトイド因子の測定

経時的に回収したマウス血清を用いて、ELISA にて抗 dsDNA 抗体価、リウマトイド因子の測定を行った

8. 免疫グロブリンサブタイプの測定

血清免疫グロブリン、そのサブタイプを ELISA にて測定した。

9. フローサイトメトリー解析

脾臓の免疫細胞サブセットをフローサイトメトリーにより解析した。

10. 骨髄由来樹状細胞、マクロファージの解析

マウス骨髄細胞を回収し、GM-CSF+IL-4、また M-CSF 存在下で培養することで、それぞれ樹状細胞、マクロファージに分化誘導した。細胞機能への影響をフローサイトメトリー、定量 PCR 法で解析した。

4. 研究成果

1. SH3BP2 欠損により SLE モデルマウスの組織障害は軽減した

35 週齢時に Sh3bp2+/+ (n = 10), Sh3bp2 / (n = 10), FasIpr/lpr (n = 16), and Sh3bp2

/ FasIpr/Ipr (n = 14) マウスの解剖を行った。結果、FasIpr/Ipr マウスでは脾腫が見られるのに対し、Sh3bp2 / FasIpr/Ipr マウスでは脾腫の軽減を認めた。また FasIpr/Ipr マウスでは腎系球体への細胞浸潤増多が見られるのに対し、Sh3bp2 / FasIpr/Ipr マウスでは細胞浸潤の増多は認めなかった。これらの結果から、SH3BP2 欠損は SLE マウスの組織障害を抑制することが分かった。

2. SH3BP2 欠損により、抗 dsDNA 抗体、リウマチトイド因子の産生が抑制された

SH3BP2 欠損の免疫異常に対する影響を検討した。35 週齢時に採取したマウス血清を用いた解析で、FasIpr/Ipr マウスでは抗 dsDNA 抗体、リウマチトイド因子の上昇が見られたのに対し、Sh3bp2 / FasIpr/Ipr マウスでは FasIpr/Ipr マウスに比して有意に低下していた。

3. SH3BP2 欠損により、自己反応性 T 細胞の異常蓄積が軽減した

FasIpr/Ipr マウスでは Fas 機能障害により CD3+B220+CD4-CD8- T 細胞が増多することが知られている。35 週齢に摘出した脾臓を用いて、T 細胞サブセットの解析を行った。FasIpr/Ipr マウスでは既報のごとく CD3+B220+CD4-CD8- T 細胞の増多が見られ、Sh3bp2 / FasIpr/Ipr マウスでは FasIpr/Ipr マウスに比して有意に低下していた。

4. B 細胞での SH3BP2 欠損では SLE の組織障害・免疫異常は改善しなかった

過去の研究で SH3BP2 が B 細胞からの抗体産生を抑制するとの報告があり、B 細胞特異的 SH3BP2 欠損 FasIpr マウス (Cd19Cre/+Sh3bp2fl/FasIpr/Ipr) を作成し、その解析を行った。結果、B 細胞での SH3BP2 欠損により、脾腫、腎障害、自己抗体産生は軽減が見られなかった。B 細胞における SH3BP2 は、SLE 病態形成における役割は限定的と考えられた。

5. SH3BP2 欠損は骨髄由来マクロファージの活性化に影響を及ぼさなかった

骨髄由来マクロファージを用いて SH3BP2 欠損のマクロファージ胃機能への影響を検討した。SH3BP2 の欠損の有無で CD80、CD86 の遺伝子発現に差はなく、また LPS 初め各種 TLR ligands に対する TNF 産生能にも差は認めなかった。

6. SH3BP2 欠損は樹状細胞分化を抑制した

マウス骨髄細胞を GM-CSF+IL-4 で刺激し、樹状細胞分化を誘導する培養系を用いて、SH3BP2 欠損の影響を評価した。結果、SH3BP2 欠損により有意に CD11c 陽性樹状細胞数が減少することが分かった。

上記一連の結果より、SH3BP2 欠損は樹状細胞分化を抑制することで、SLE モデルマウスにおいて免疫学的異常、組織障害を軽減することが考えられた。この結果は、SLE 患者において SH3BP2 発現を抑制することが治療につながる可能性を示唆している。この研究成果は、Int J Mol Sci 誌に発表した (Kawahara K, Mukai T, et al. Int J Mol Sci. 2021 Apr 17;22(8):4169.)

一方、既報で我々は SH3BP2 機能獲得変異も SLE モデルマウスの免疫異常、組織障害を抑制することを見いだしている (Nagasu A, Mukai T, et al. Cells. 2019 Apr 30;8(5):402.; 科研費研究課題 15K09540)。同研究では、SH3BP2 機能獲得変異によるマクロファージからの TNF 産生亢進が、Fas 変異によるアポトーシス障害を部分的に補完し、病的自己反応性リンパ球の除去に寄与したことが考えられた。機能獲得変異、機能欠失変異のいずれもが SLE 病態を抑制した理由として、我々は以下の可能性を考えている。機能獲得変異、機能欠失変異のそれぞれで主に影響しうる免疫細胞に違いがあると考えられる。マクロファージにおいては、機能獲得変異が TNF 過剰産生などその細胞機能に影響が見られる (PLoS One. 2014; J Bone Miner Res. 2014; Arthritis Rheumatol. 2015; Cells. 2019)。一方、本研究で示した如く機能欠失変異はマクロファージの活性化には影響は見られず、他の蛋白により SH3BP2 機能が補完されたことが推測された。逆に、樹状細胞においては SH3BP2 欠損で分化障害がみられ、SH3BP2 は樹状細胞分化に必須と考えられた。そのような、細胞毎における SH3BP2 蛋白の必要性の違いにより、別の機序により SLE 病態の軽減に寄与したと考えられた。

本研究の結果含めて SH3BP2 は種々の免疫細胞の機能に多彩に影響しており、その詳細な役割の解明が SH3BP2 およびその仲介する細胞内シグナルを標的とした新規治療法の確立に必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Nagasu Akiko, Mukai Tomoyuki, Iseki Masanori, Kawahara Kyoko, Tsuji Shoko, Nagasu Hajime, Ueki Yasuyoshi, Ishihara Katsuhiko, Kashihara Naoki, Morita Yoshitaka	4. 巻 8
2. 論文標題 Sh3bp2 Gain-Of-Function Mutation Ameliorates Lupus Phenotypes in B6.MRL-FasIpr Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 402 ~ 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8050402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mukai Tomoyuki, Fujita Shunichi, Morita Yoshitaka	4. 巻 8
2. 論文標題 Tankyrase (PARP5) Inhibition Induces Bone Loss through Accumulation of Its Substrate SH3BP2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 195 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8020195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujita Shunichi, Mukai Tomoyuki, Mito Takafumi, Kodama Shoko, Nagasu Akiko, Kittaka Mizuho, Sone Teruki, Ueki Yasuyoshi, Morita Yoshitaka	4. 巻 106
2. 論文標題 Pharmacological inhibition of tankyrase induces bone loss in mice by increasing osteoclastogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 156 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2017.10.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kittaka Mizuho, Mayahara Kotoe, Mukai Tomoyuki, Yoshimoto Tetsuya, Yoshitaka Teruhito, Gorski Jeffrey P, Ueki Yasuyoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Cherubism Mice Also Deficient in c-Fos Exhibit Inflammatory Bone Destruction Executed by Macrophages That Express MMP14 Despite the Absence of TRAP+ Osteoclasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 167 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.3295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawahara K, Mukai T, Iseki M, Nagasu A, Nagasu H, Akagi T, Tsuji S, Hiramatsu-Asano S, Ueki Y, Ishihara K, Kashihara N, Morita Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 SH3BP2 Deficiency Ameliorates Murine Systemic Lupus Erythematosus.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22084169.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hiramatsu-Asano S, Sunahori-Watanabe K, Zeggar S, Katsuyama E, Mukai T, Morita Y, Wada J.	4. 巻 11
2. 論文標題 Deletion of Mir223 Exacerbates Lupus Nephritis by Targeting S1pr1 in Faslpr/lpr Mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 616141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.616141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hada Y, Uchida HA, Mukai T, Kojima F, Yoshida M, Takeuchi H, Kakio Y, Otaka N, Morita Y, Wada J.	4. 巻 134
2. 論文標題 Inhibition of interleukin-6 signaling attenuates aortitis, left ventricular hypertrophy and arthritis in interleukin-1 receptor antagonist deficient mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Science	6. 最初と最後の頁 2771-2787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/CS20201036.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akagi T, Mukai T, Mito T, Kawahara K, Tsuji S, Fujita S, Uchida HA, Morita Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Effect of Angiotensin II on Bone Erosion and Systemic Bone Loss in Mice with Tumor Necrosis Factor-Mediated Arthritis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21114145.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuji S, Mukai T, Hirano H, Morita Y.	4. 巻 31
2. 論文標題 In vivo analysis of thrombus formation in arthritic mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 498-503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1740401	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 河原恭子, 向井知之, 長洲晶子, 井関 將典, 赤木貴彦, 長洲一, 植木靖好, 守田吉孝
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスモデルマウスにおけるアダプタータンパクSH3BP2の自己免疫現象に対する役割の解明
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyoko Kawahara, Tomoyuki Mukai, Akiko Nagasu, Masanori Iseki, Hajime Nagasu, Shoko Tsuji, Takahiko Akagi, Yasuyoshi Ueki, Yoshitaka Morita
2. 発表標題 The role of adppter protein SH3BP2 in a murine systemic lupus erythematosus model
3. 学会等名 2019 American College of Rheumatology(ACR) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原恭子, 向井知之, 長洲晶子, 井関將典, 赤木貴彦, 長洲一, 植木靖好, 守田吉孝
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスモデルマウスにおけるアダプター蛋白SH3BP2の自己免疫現象に対する役割の解明
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原恭子, 向井知之, 長洲晶子, 井関將典, 赤木貴彦, 長洲一, 植木靖好, 守田吉孝
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスモデルマウスにおけるアダプタータンパクSH3BP2の役割の解明
3. 学会等名 第84回日本インターフェロン・サイトカイン学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Nagasu, Tomoyuki Mukai, Masanori Iseki, Hajime Nagasu, Kyoko Kawahara, Shoko Tsuji, Shunichi Fujita, Naoki Kashihara, Katsuhiko Ishihara, Yoshitaka Morita
2. 発表標題 SH3BP2 gain-of-function mutation ameliorates lupus in B6.MRL-FasIpr mice
3. 学会等名 The 63rd Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Nagasu
2. 発表標題 SH3BP2 gain-of-function mutation ameliorates lupus in B6.MRL-FasIpr mice
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原恭子
2. 発表標題 アダプター蛋白SH3BP2のマウス関節リウマチモデルおよび全身性エリテマトーデスモデルにおける役割
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向井知之
2. 発表標題 アダプター蛋白SH3BP2の Maus 関節リウマチモデル および全身性エリテマトーデスモデルにおける役割
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoyuki Mukai
2. 発表標題 SH3BP2 gain-of-function mutation alleviates lupus phenotypes in B6.MRL-FasIpr mice
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向井知之
2. 発表標題 The role of an adaptor protein SH3BP2 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoyuki Mukai
2. 発表標題 SH3BP2 Deficiency Ameliorates Murine Systemic Lupus Erythematosus
3. 学会等名 2020 American College of Rheumatology(ACR) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoyuki Mukai
2. 発表標題 SH3BP2 deficiency ameliorates murine systemic lupus erythematosus
3. 学会等名 The 22nd Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原恭子
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスモデルマウスにおけるアダプター蛋白SH3BP2 の自己免疫現象における役割の解明
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究成果に関して、所属部署のHPにて紹介した。 「研究テーマ」 川崎医科大学 リウマチ・膠原病学 http://www.kawasaki-m.ac.jp/rheumatology/kenkyuutte-ma.html</p>

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	守田 吉孝 (Morita Yoshitaka) (50346441)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井関 将典 (Iseki Masanori) (30532353)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	
研究分担者	長洲 一 (Nagasu Hajime) (40412176)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	河原 恭子 (Kawahara Kyoko)	川崎医科大学・医学部・大学院生 (35303)	
研究協力者	赤木 貴彦 (Akagi Takahiko)	川崎医科大学・医学部・大学院生 (35303)	
研究協力者	辻 尚子 (Tsuji Shoko)	川崎医科大学・医学部・大学院生 (35303)	
研究協力者	長洲 晶子 (Nagasu Akiko)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

米国	Indiana University	University of Missouri- Kansas City		
----	--------------------	--	--	--