

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15494

研究課題名（和文）CD47-SIRP 系による樹状細胞の生存制御の分子基盤

研究課題名（英文）The role of CD47-SIRP α system in the regulation of dendritic cell survival

研究代表者

小森 里美 (Komori, Satomi)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：20939152

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、樹状細胞(DC)の生存制御機構の分子機序を明らかにする目的で、これまでに関与が指摘されている細胞間シグナル伝達系CD47-SIRP 系に着目した研究を行った。タモキシフェン誘導性SIRP 欠損マウスから単離したDCを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った結果、SIRP 欠損によって細胞死に関連する因子であるNの発現上昇が認められた。さらに、SIRP /遺伝子NダブルKOマウスの解析では、SIRP 欠損マウスと比較してDCの数の回復が認められた。以上のことから、SIRP および因子Nを介したDCの生存制御機構の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹状細胞は免疫応答を駆動する上で最初のステップを担う重要な免疫細胞であり、その恒常性は厳密に制御されていると考えられている。一方で、その生存制御機構についてはいまだに明らかになっていない点が多い。本研究では、樹状細胞(DC)の生存制御機構の分子機序について焦点を当てて研究を行い、DCの生存がSIRP および因子Nを介して制御されていることを明らかにした。さらに、SIRP および因子NによるDCの生存制御機構が自己免疫疾患の発症においても重要な役割を果たすことが明らかとなった。DCの恒常性維持機構と免疫システム全体に関する理解を深め、自己免疫疾患の病態解明に寄与することができた。

研究成果の概要（英文）：In this research, we focused on the involvement of CD47-SIRP system in the regulation of dendritic cell (DC) survival by using tomosifen-inducible SIRP knockout (iKO) mice. RNA-seq of sorted DCs from SIRP iKO mice revealed that expression of cell death associated genes such as gene N was upregulated in the absence of SIRP in DCs. To elucidate the role of gene N in the survival of SIRP-deficient DCs in vivo, we generated SIRP /N double KO (DKO) mice. We demonstrated that the number of DCs is recovered in the DKO mice compared with SIRP KO mice. Thus, our findings indicate that SIRP regulate DC survival by inhibiting gene N upregulation.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 CD47 SIRP

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞(DC)は、有害な病原体を認識し取り込み、自然免疫および獲得免疫応答を誘導するという、生体が免疫応答を駆動する過程で最初のステップを担う重要な免疫細胞である。DCはその機能の違いにより、I型インターフェロン産生に重要な形質細胞様DC(pDC)と獲得免疫応答の誘導に重要な古典的DC(cDC)の2つのサブタイプに分類される。さらに、cDCは表面抗原の発現と機能の違いから、1型(cDC1)および2型(cDC2)に分類される。cDC2は細胞表面にCD11b、CD4、そして膜型分子Signal regulatory protein α(SIRPα)を特異的に発現しており、Th2細胞やTh17細胞の誘導に関与することから、アレルギーや自己免疫疾患との関連が明らかになっている。このcDC2の分化誘導に関与する因子として、転写因子Irf4、Klf4あるいはRbpJなどの異なる転写因子やLTβRからのシグナル等がこれまでに報告されている。その一方で、分化成熟後のcDC2の生存制御に関する分子機序は未だ十分に明らかとはなっていない。

研究代表者らは、これまでに上記cDC2の生存制御において膜型分子SIRPαおよびCD47で構成される細胞間シグナル伝達系CD47-SIRPαが強く関与している可能性を見出してきた。実際に、DC特異的にSIRPαもしくはCD47を欠損したマウス(SIRPα^{ADC}、CD47^{ADC}マウス)の解析では、脾臓cDC2の著明な減少が認められており、cDC2の生存制御にSIRPαおよびCD47が強く関与している可能性が指摘されていた。一方で、CD47-SIRPα系がどのようにしてcDCの生存を制御しているのか、その具体的な分子機序については明らかにはなっていなかった。さらに、SIRPα^{ADC}マウスでは、自己免疫疾患のマウスモデルであるEAE(実験的自己免疫性脳脊髄炎)に抵抗性を示していることがこれまでに明らかになっているものの、それがcDC2の生存が短縮していることが原因であるのかについては明らかにはなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究ではCD47-SIRPα系を介したcDCの生存制御の分子機序を明らかにする目的で、(1)SIRPαを介したcDC2の生存制御の分子機序解明、(2)CD47-SIRPα系による生存制御の分子機序解明、(3)EAE発症におけるCD47-SIRPα系によるcDC2生存制御の重要性について研究を行った。

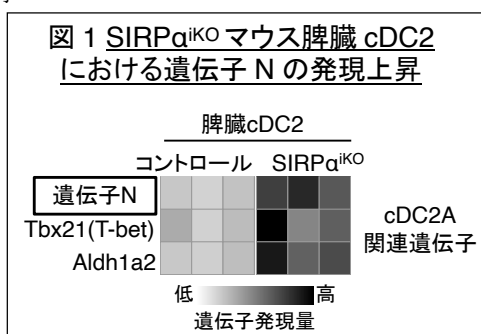
3. 研究の方法

上述の(1)SIRPαを介したcDC2の生存制御の分子機序を解明するために、SIRPα^{ADC}マウスの脾臓からcDC2を単離し、シングルセルRNA-seq解析を行った。さらに、SIRPαの発現が減少した直後にcDC2に起こる現象について詳細に解析するため、タモキシフェン誘導性SIRPα欠損マウス(R26-Cre^{ERT2};SIRPα^{fl/fl}マウス、SIRPα^{iKO})を作製し、脾臓cDC2数や活性化度をフローサイトメトリーを用いて解析を行った。また、SIRPα^{iKO}マウスの脾臓から単離したcDC2においてバルクRNA-seq解析を行ったところ、細胞死に関連することが報告されている因子である遺伝子Nの発現がコントロールマウスと比較して上昇していた。そこで、SIRPα/遺伝子Nダブル欠損マウス(DKO)を、CRISPR-Cas9システムを用いて新たに作製し、細胞数や活性化度などについて解析を行った。また、(2)CD47-SIRPα系による生存制御の分子機序を解明するために、CD47^{ADC}マウスのcDC2において細胞死が誘導されているのか、またその細胞死が遺伝子Nを介しているものなのかについて解析を行った。具体的には、CD47^{ADC}マウスの脾臓cDC2における活性化マーカーの発現量解析及び因子Nの発現量について解析を行った。さらにタモキシフェン誘導性CD47欠損マウス(CD47^{iKO})マウスを作製し、CD47を欠損した直後にcDC2に細胞死が誘導されるのかなどについて、詳細な解析を行った。そして、(3)EAE発症におけるCD47-SIRPα系によるcDC2生存制御の重要性を明らかにするために、(1)で作製したDKOマウスにおいて自己免疫性疾患のマウスモデルであるEAEを誘導し、臨床スコアの評価並びに所属リンパ節での免疫細胞数と脳脊髄内への免疫細胞の浸潤について解析を行った。

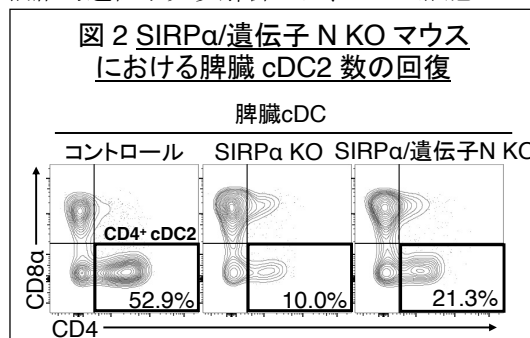
4. 研究成果

(1) SIRPαを介したcDC2の生存制御の分子機序解明

SIRPαを介したcDC2の生存制御の分子機序を明らかにすることを目的に、SIRPα^{ADC}マウスの脾臓からcDC2を単離し、シングルセルRNA-seq解析を行った。その結果、SIRPα^{ADC}マウスではcDC2の中でも特に最近cDC2Aと定義された集団が著明に減少していることが明らかとなった。さらに、SIRPα^{ADC}マウスで減少していたcDC2Aにおいて、コントロールマウスのcDC2Aと比較して特異的に発現が変動している複数の遺伝子の存在が明らかとなり、cDC2に発現するSIRPα自体がcDC2の遺伝子発現パターンにも

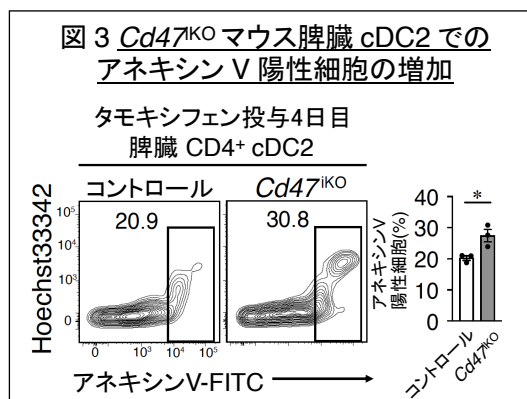


強く関与することが示唆された。また、SIRP α ^{ADC} マウスの cDC2 では CD86 や MHC-II などの活性化マーカーの発現量が増加していたほか、細胞死マーカーであるアネキシン V 陽性細胞の比率が増加していたことから、活性化を伴う細胞死(AICD, activation induced cell death)を起こしていることが示唆された。さらに、タモキシフェン投与によって SIRP α の発現を減少させた SIRP α ^{iKO} マウスから脾臓 cDC を単離して行った網羅的遺伝子発現解析では、DC の細胞死に関連することがこれまでに報告されている因子 N が、SIRP α を欠損することによって発現が上昇することが明らかとなった(図 1)。そこで、SIRP α および因子 N を介した生存制御機構について解析するために、SIRP α /遺伝子 N ダブル欠損(DKO)マウスを CRISPR-Cas9 システムを用いて作製し解析した。その結果、DKO マウスでは SIRP α KO マウスと比較して脾臓 cDC2 数の著明な回復が認められた(図 2)。このことから、SIRP α は因子 N の発現を制御することによって、cDC2 の生存を制御している可能性が示唆された(論文準備中)。



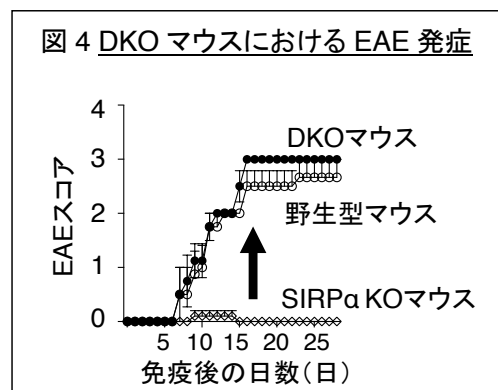
(2)CD47-SIRP α 系による cDC2 生存制御の分子機序解明

CD47 を介した cDC2 の生存制御の分子機序を明らかにするために、CD47^{ADC} マウスの脾臓 cDC2 を解析した。その結果、CD47^{ADC} マウスの脾臓 cDC2 でも SIRP α ^{ADC} マウスと同じく活性化マーカーの発現上昇が起こっていることが明らかとなった。さらに、CD47^{iKO} マウスの脾臓 cDC2 では SIRP α ^{iKO} マウスの脾臓 cDC2 と同じくアネキシン V 陽性細胞の増加が認められた(図 3)。また、CD47^{iKO} マウスの脾臓 cDC2 では因子 N の発現が上昇していた。このことから、CD47 についても因子 N を介して cDC2 の生存を制御している可能性が示唆された。一方で、同一細胞上における CD47 と SIRP α の相互作用(シス結合)が起こる可能性について、DC において起こっているのかを明らかにするために、骨髓細胞から分化誘導した DC を用いて近接ライゲーションアッセイ(PLA)を行った。その結果、DC 上の CD47 および SIRP α は同一細胞上で相互作用していることが明らかとなった。以上の結果から、DC 上の CD47 は同じ細胞上の SIRP α と相互作用し、因子 N の発現を抑えることによって cDC2 の生存を制御している可能性が示唆された。



(3)EAE 発症における CD47-SIRP α 系による cDC2 生存制御の重要性

SIRP α を全身で欠損したマウス(SIRP α KO)および SIRP α ^{ADC} マウスではコントロールマウスに比べて EAE の発症および臨床スコアが著しく抑えられることがこれまでに報告されている。そこで、上記の(1)で同定した因子 N が cDC2 の生存だけでなく自己免疫疾患の発症にも関与しているのかを明らかにする目的で、上記(1)で作製した DKO マウスにおいて EAE を誘導し解析を行った。その結果、DKO マウスでは SIRP α KO マウスと比較して EAE の臨床スコアが著明に増加していることが明らかとなった(図 4)。さらに、DKO マウスでは所属リンパ節内の細胞数並びに脳脊髄内への浸潤細胞数についても SIRP α KO マウスと比較して増加していることが明らかとなった。これらの結果から、SIRP α は因子 N の発現を抑制的に制御することによって、cDC2 の生存だけでなく自己免疫疾患の重症化にも関与していることが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komori Satomi, Saito Yasuyuki, Nishimura Taichi, Respatika Datu, Endoh Hiromi, Yoshida Hiroki, Sugihara Risa, Iida-Norita Rie, Afroj Tania, Takai Tomoko, Oduori Okechi S., Nitta Eriko, Kotani Takenori, Murata Yoji, Kaneko Yoriaki, Nitta Ryo, Ohnishi Hiroshi, Matozaki Takashi	4. 巻 120
2. 論文標題 CD47 promotes peripheral T cell survival by preventing dendritic cell-mediated T cell necroptosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2304943120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2304943120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Saito Yasuyuki, Iida-Norita Rie, Afroj Tania, Refaat Alaa, Hazama Daisuke, Komori Satomi, Ohata Shinya, Takai Tomoko, Oduori Okechi S., Kotani Takenori, Funakoshi Yohei, Koma Yu-Ichiro, Murata Yoji, Yakushijin Kimikazu, Matsuoka Hiroshi, Minami Hironobu, Yokozaki Hiroshi, Manz Markus G., Matozaki Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Preclinical evaluation of the efficacy of an antibody to human SIRP for cancer immunotherapy in humanized mouse models	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1294814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2023.1294814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Okamoto Takeshi, Murata Yoji, Hasegawa Daiichiro, Yoshida Makiko, Tanaka Daisuke, Ueda Takashi, Hazama Daisuke, Oduori Okechi S., Komori Satomi, Takai Tomoko, Saito Yasuyuki, Kotani Takenori, Kosaka Yoshiyuki, Maniwa Yoshimasa, Matozaki Takashi	4. 巻 114
2. 論文標題 Targeting of SIRP as a potential therapy for Langerhans cell histiocytosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1871 ~ 1881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15758	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 Saito Yasuyuki, Komori Satomi, Kotani Takenori, Murata Yoji, Matozaki Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 The Role of Type-2 Conventional Dendritic Cells in the Regulation of Tumor Immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1976 ~ 1976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14081976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Satomi Komori, Yasuyuki Saito, Tania Afroj, Tomoko Takai, Okechi S. Oduori, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki
2. 発表標題 CD47 promotes peripheral T cell survival by preventing dendritic cell-mediated T cell necroptosis
3. 学会等名 The 52st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satomi Komori, Yasuyuki Saito, Tania Afroj, Tomoko Takai, Okechi S. Oduori, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki
2. 発表標題 CD47 promotes peripheral T cell survival by preventing dendritic cell-mediated T cell necroptosis
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satomi Komori, Yasuyuki Saito, Tania Afroj, Tomoko Takai, Okechi S. Oduori, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki
2. 発表標題 CD47 promotes peripheral T cell survival by preventing dendritic cell-mediated T cell necroptosis
3. 学会等名 The 82nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satomi Komori, Yasuyuki Saito, Taichi Nishimura, Hiroki Yoshida, Risa Sugihara, Tomoko Takai, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki
2. 発表標題 SIRP and CD47 promote cDC2 survival through the regulation of transcriptional factor Nr4a3
3. 学会等名 The 51th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satomi Komori, Yasuyuki Saito, Taichi Nishimura, Takenori Kotani, Yoji Murata and Takashi Matozaki
2. 発表標題 SIRP maintains cDC2 survival by regulating the Nr4a3 expression
3. 学会等名 16th International Symposium on Dendritic Cells (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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