

受賞者

的崎 尚

群馬大学 生体調節研究所 バイオシグナル分野

## 研究テーマ

樹状細胞SHPS-1分子による新たな免疫機能制御とその治療的応用

### 1. 研究目的

樹状細胞は、自然免疫系と獲得免疫系との緊密な連携において、その司令塔の役割を担っている極めて重要な細胞である。申請者は、樹状細胞に強く発現する細胞膜型分子である SHPS-1 を発見し (1)、特に最近、SHPS-1 が樹状細胞によるナイーブ CD4 陽性 T 細胞の Th17 細胞への分化に必須であることを明らかにしている (2)。すなわち、SHPS-1 KO マウスでは、Th17 依存性とされる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) (ヒト多発性硬化症モデル) や DNFB 誘導性皮膚炎 (CHS) (ヒト接触性皮膚炎モデル) の発症が顕著に抑制されることを見出している (2, 3)。さらに、SHPS-1 のリガンド分子として、5 回細胞膜貫通型分子である CD47 が知られているが、申請者は、樹状細胞に発現する SHPS-1 と T 細胞に発現する CD47 とが相互作用して、いわゆる副刺激分子として機能することを明らかにしつつある。すでに、申請者は、抗 SHPS-1 モノクローナル抗体のマウスへの投与により CHS の発症を抑制できることを見出している (3)。従って、将来的には SHPS-1 の制御を様々な自己免疫疾患の治療に応用が可能であると想定している。そこで、本研究では、SHPS-1-CD47 相互作用による免疫制御の分子機構をより詳細に解析すると共に、抗 SHPS-1 抗体の治療的応用に向けた基礎的検討を行った。

### 2. 方法

#### (1) EAE モデルマウスの作製

8~12 週齢の雄マウスに 100  $\mu$ g の MOG (35-55) ペプチドを含む完全フロイントアジュバントを皮下投与することで免疫し、さらに免疫 0 日および 2 日目に百日咳毒素 (200ng) を腹腔内投与することで EAE モデルマウスを作製した (2)。

#### (2) CHS モデルマウスの作製

8~12 週齢の雌マウスの背部に 0.5% DNFB を塗布し、5 日後に 0.2% DNFB を耳介に塗布することにより CHS モデルマウスを作製した。また、0.5% DNFB 塗布の直前に 100  $\mu$ g の抗 SHPS-1 抗体 (mAb 97, p84)、または正常ラット IgG 抗体をマウス腹腔内に投与することで、抗体による接触性皮膚炎発症の抑制を評価した (4)。

#### (3) CIA モデルマウスの作製

6~12 週齢マウス (C57BL/6) をニワトリ由来タイプ II コラーゲン (100  $\mu$ g) を含む完全フロイントアジュバントで免疫し、さらに、21 日後に同様の免疫を行い、CIA モデルマウスを作製した。また、免疫後 49 日目に後肢関節の H&E 標本を作製し、その組織像を観察した (5)。

#### (4) SHPS-1 特異抗体の作製

マウス SHPS-1 の細胞外領域 (aa 1 to 146) とヒト IgG の Fc 領域との融合蛋白質を抗原としてラットに免疫を行い、免疫後のラットリンパ節より単離したリンパ球とマウスミエローマ細胞とを融合させ複

数のハイブリドーマを得た。さらに、SHPS-1 に対して特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマのみを ELISA により選別し、ラット抗 SHPS-1 モノクローナル抗体を得た。また、in vitro での SHPS-1 と CD47 との結合実験において、得られた複数のモノクローナル抗体から両者の結合を阻害する抗体のみを選別した。

#### (5) リンパ球混合試験

OVA で免疫したマウス脾臓由来の樹状細胞と OT-II マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞との共培養を行い、培地中に添加した [<sup>3</sup>H]チミジンの T 細胞への取り込み量を測定することで OVA 特異的反応性 T 細胞の増殖の程度を定量化した。

#### (6) サイトカインアッセイ

マウス脾臓より単離した樹状細胞、もしくはマウス骨髄より GM-CSF にて分化誘導させた樹状細胞を LPS、poly(I:C)、または IFN $\gamma$  と CpG-DNA にて刺激し、樹状細胞より産生された IL-6、TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインを ELISA にて測定した。

### 3. 結果

#### (1) 樹状細胞による Th17 細胞誘導における SHPS-1 の機能とその作用機構

樹状細胞上の SHPS-1 と T 細胞上の CD47 との相互作用が副刺激分子として Th17 細胞への分化、活性化に重要である可能性が高いと想定された。そこで、EAE や CHS の発症における CD47 と SHPS-1 の相互作用の重要性をさらに明らかにする目的で、CD47 KO マウスを用いて EAE と CHS の発症を検討した。EAE の発症は CD47 KO マウスでは SHPS-1 KO マウスと同様に抑制される傾向が認められた（未発表データ）。しかしながら、CHS の発症は CD47 KO マウスで抑制されなかった (4)。さらに、B6 マウス由来 SHPS-1 と CD47 との結合を特異的に阻害する抗 SHPS-1 モノクローナル抗体 (mAb 97) を作製し、非結合阻害抗体 (p84) との作用を比較検討した (4)。しかしながら、両者の抗体ではどちらも CHS の発症が抑制された。次に、EAE と同様に Th17 依存性とされる自己免疫病モデルであるコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) (関節リウマチモデル) の発症を SHPS-1、CD47 双方の KO マウスを用い検討した。SHPS-1 KO マウスでは、CIA の発症が顕著に抑制され、罹患関節の組織像でも KO マウスでは、ほとんど炎症や軟骨の破壊像が観察されなかった (5)。CD47 KO マウスにおいても CIA の発症が抑制される傾向があった（未発表データ）。さらに、樹状細胞による Th17 誘導における SHPS-1 の機能やその細胞内シグナルが不明であるので、これを解明した。しかし、SHPS-1 KO マウス由来樹状細胞の Toll 様受容体を介した炎症性サイトカインの産生能については、特に異常を認めなかった。さらに、OVA 特異的反応性 T 細胞である OT-II マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞に対する SHPS-1 KO マウス由来樹状細胞の抗原提示能にも異常を認めなかった。

#### (2) 抗 SHPS-1 抗体ならびに合成ペプチドによる自己免疫疾患の阻止

抗 SHPS-1 モノクローナル抗体投与により様々な自己免疫疾患の治療に応用可能であると想定している。本研究では、上記以外にも複数の抗 SHPS-1 モノクローナル抗体を作製し、これら有効な抗体の in vitro 系での効果をリンパ球混合試験や単離樹状細胞からのサイトカイン産生測定系を用い検討する予定である。さらに、本研究において大阪大学の岡田雅人教授のグループとの共同研究で SHPS-1 の N 末端 Ig-V 領域の結晶構造解析に成功した (6)。

#### 4. 考察

本研究により、SHPS-1 が、EAE や CIA などマウスにおける種々の自己免疫病モデルの発症に重要であることが示された。さらに、CD47 KO マウスにおいても、EAE や CIA の発症が抑制されることから、これら自己免疫病の発症に CD47 と SHPS-1 の相互作用が重要であることが示唆された。しかしながら、in vitro 系における SHPS-1 KO マウス由来樹状細胞の炎症性サイトカイン産生能や CD4<sup>+</sup>T 細胞に対する抗原提示能には異常を認めなかった。従って、樹状細胞上の SHPS-1 と T 細胞上の CD47 との相互作用が副刺激分子として Th17 細胞への分化、活性化に重要であるとする当初の仮説は妥当性が低く、SHPS-1 と CD47 との相互作用が何らかの別の機序を介して自己免疫病の発症を制御している可能性が高い。一方、SHPS-1 と CD47 との結合を特異的に阻害する抗 SHPS-1 モノクローナル抗体でも、非結合阻害抗体によっても CHS の発症が抑制されたことから、その作用機序については単純に SHPS-1 と CD47 との結合を阻害する以外の機序も想定された。多様な抗 SHPS-1 モノクローナル抗体を作製しており、今後その効果を検討することで、様々な自己免疫疾患の治療に応用可能であると想定している。また、SHPS-1 の N 末端 Ig-V 領域の結晶構造解析に成功した (6)。また、最近では、CD47-SHPS-1 複合体の結晶構造も報告されている (7)。従って今後、これらの情報に基づき将来的に臨床応用可能な合成ペプチドや化合物の創出が可能であると考えられる。

#### 5. 文献

1. Okajo, J. et al. Regulation by Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 of  $\alpha$ -galactosylceramide-induced antimetastatic activity and Th1 and Th2 responses of NKT cells. *J. Immunol.* 2007, 178:6164-6172.
2. Tomizawa, T. et al. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis and impaired T cell priming by dendritic cells in Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 mutant mice. *J. Immunol.* 2007, 179:869-877.
3. Fukunaga, A. et al. Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the induction of Langerhans cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 2006, 36:3216-3226.
4. Motegi, S. et al. Essential roles of SHPS-1 in induction of contact hypersensitivity of skin. *Immunol. Lett.* 2008, 121:52-60.
5. Okuzawa, C. et al., Resistance to collagen-induced arthritis in SHPS-1 mutant mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, 371:561-566.
6. Nakaishi, A. et al. Structural insight into the specific interaction between murine SHPS-1/SIRP $\alpha$  and its ligand CD47. *J. Mol. Biol.* 2008, 375:650-660.
7. Hatherley, D. et al. Paired receptor specificity explained by structures of signal regulatory proteins alone and complexed with CD47. *Mol. Cell* 2008, 31:266-277.