



## Dendritic cell SIRP $\alpha$ regulates homeostasis of dendritic cells in lymphoid organs

Washio, Ken

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6457号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006457>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Dendritic cell SIRPa regulates homeostasis of dendritic cells in lymphoid organs

樹状細胞上の SIRPa はリンパ組織における樹状細胞の恒常性を制御する

#### (目的)

樹状細胞 (Dendritic Cells: DC) は全身に分布する抗原提示細胞であり、T 細胞を介した免疫応答や免疫寛容の誘導に重要な役割を果たすことが知られている。DC はその機能により、T 細胞への強力な抗原提示能を有するコンベンショナル DC (cDC)、ならびに I 型インターフェロンの産生に重要な形質細胞様 DC (pDC) に大別される。更に免疫応答の中心の場である脾臓やリンパ節などの二次リンパ組織においては、cDC は機能的に異なった分画である CD8α 陽性 cDC (CD8<sup>+</sup> cDC) ならびに CD8α 陰性 cDC (CD8<sup>-</sup> cDC) に細分される。

Signal regulatory protein α (SIRPa) は、血球細胞、特に DC やマクロファージに強発現する 1 回貫通型膜蛋白であり、SIRPa の細胞内領域がチロシンリン酸化を受けることにより、SIRPa は細胞質型チロシンホスファターゼである Shp1 や Shp2 を活性化させる。一方 SIRPa の細胞外領域は免疫グロブリン様構造を有し、リガンドである膜蛋白 CD47 と結合することにより、SIRPa のリン酸化が促進されることが知られている。マウス cDC 分画のうち、SIRPa は CD8<sup>-</sup> cDC に特異的に発現しており、全身性に SIRPa の細胞内領域を欠失させたマウスを用いた研究から、SIRPa は、CD8<sup>-</sup> cDC、特にこれらの主分画である CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> cDC (CD4<sup>+</sup> cDC) の恒常性の制御に重要であることが明らかとされた。しかしながら、SIRPa は DC 以外にもマクロファージや好中球にも発現しており、DC に発現する内因性の SIRPa がこれらの制御に重要な役割を果たすことは明らかとなっていない。このため本研究では、DC 特異的に SIRPa を欠損させたマウスを作製し、SIRPa の DC の恒常性制御における役割を検討した。

#### (方法及び結果)

本研究では最初に、マウス *Sirpa* 遺伝子配列の転写開始領域をターゲットとした

神戸大学大学院医学研究科医学専攻  
皮膚科学  
(指導教員：錦織 千佳子 教授)

鶴尾 健

*loxP* 配列を有する SIRPa-floxed (*Sirpa*<sup>fl/fl</sup>) マウスを作製した。続いて *Sirpa*<sup>fl/fl</sup> マウスを DC 特異的に Cre リコンビナーゼを発現する CD11c-Cre マウスと交配することで DC 特異的 SIRPa コンディショナルノックアウトマウス (*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウス) を作製した。さらに全身性に Cre リコンビナーゼを発現する CMV-Cre マウスを *Sirpa*<sup>fl/fl</sup> と交配させることで全身性に SIRPa を欠失させたマウス (*Sirpa*<sup>-/-</sup> マウス) も作製し、これらのマウスを本研究に用いた。なお、コントロールには *Sirpa*<sup>fl/fl</sup> マウスを使用した。

まず、*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウスにおける DC 特異的な *Sirpa* 遺伝子の欠損を確認するため、マウス脾臓から cDC、pDC、T 細胞、B 細胞をセルソーターを用いて単離し、それぞれの分画より DNA を抽出して PCR 法を用い *Sirpa* 遺伝子の欠損を確認した。その結果、*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウスでは cDC ならびに pDC 分画特異的な *Sirpa* 遺伝子の欠損を認めた。次に DC、マクロファージにおける SIRPa の発現をフローサイトメトリーを用いて検討した。*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウスでは、DC 上の SIRPa の発現は認められず、マクロファージや単球ではその発現は保たれていたことから、*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウスでの DC 特異的な SIRPa の欠失が確認できた。

続いて、DC 特異的な SIRPa の欠失が DC 自身の恒常性に与える影響をフローサイトメトリーにより検討した。*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウスや *Sirpa*<sup>-/-</sup> マウスの脾臓では、cDC の比率及び絶対数は著明に減少していたが、pDC 分画の減少は認められなかった。さらに *Sirpa*<sup>ADC</sup> マウスや *Sirpa*<sup>-/-</sup> マウスでは、cDC 分画において CD4<sup>+</sup> cDC が著明に減少していた一方、CD4-CD8- cDC 分画、CD8<sup>+</sup> cDC 分画の減少は認められなかった。また、CD4<sup>+</sup> cDC はマウス脾臓内では白脾臓辺縁領域の bridging channel と呼ばれる領域に存在することが知られているが、マウス脾臓凍結切片を免疫組織染色で検討したところ、*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウスならびに *Sirpa*<sup>-/-</sup> マウス脾臓では、bridging channel における CD11c の発現、特に CD4<sup>+</sup> cDC に特異的な細胞表面マーカーである 33D1 の発現の著

しい減少が認められた。さらに、*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウス及び *Sirpa*<sup>-/-</sup> マウスのリンパ節においても、脾臓と同様に cDC、特に CD4<sup>+</sup> cDC の比率も明らかに減少していた。以上の結果から、DC 内在性の SIRPa が CD4<sup>+</sup> cDC の恒常性の制御に重要であることが示された。

一方、表皮には DC の亜分画であるランゲルハンス細胞 (LC) が存在し、SIRPa は LC においても強発現することが知られている。*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウス及び *Sirpa*<sup>-/-</sup> マウス表皮においては、LC の数が半減しており、表皮 LC においても LC 上の SIRPa が自身の恒常性の維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

近年 Notch2 受容体を介したシグナルが cDC の恒常性の制御に重要であり、特に細胞表面に ESAM を発現する cDC の恒常性の制御に重要であることが報告されている。フローサイトメトリーを用いた解析では、マウス cDC において ESAM は SIRPa 陽性分画に優位に発現しており、*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウス脾臓においては、ESAM 陽性 cDC の選択的減少を認めた。さらに、Notch 受容体シグナルの標的遺伝子である *Hes1* の発現は、*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウス脾臓で著明に減少していた。

加えて、G 蛋白質共役受容体である EBI2 とそのリガンドである 7a,25-OHC も、CD4<sup>+</sup> cDC の恒常性の維持に重要であることが最近になり明らかとされた。フローサイトメトリーを用いた解析では、EBI2 の発現は SIRPa 陽性 cDC に選択的に発現しており、*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウス脾臓において EBI2 陽性 cDC の数が著しく減少することが明らかとなった。一方、*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウス脾臓における 7a,25-OHC の産生に必須な酵素である CH25H や CYP7B1、また分解に重要な酵素である HSD3B7 の発現の減少を認めなかった。

#### (結論)

DC 特異的に SIRPa の発現が欠損した *Sirpa*<sup>ADC</sup> マウス、ならびに全身性に SIRPa を

欠損させた *Sirpa*<sup>-/-</sup>マウスを用いた検討により、DC 上に発現する内因性の SIRPa が二次リンパ組織において cDC、特に CD4<sup>+</sup> cDC の恒常性の維持に重要であることが明らかとなった。また表皮 LC においても内因性の SIRPa が表皮 LC の恒常性の維持に重要であることが示された。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2521 号	氏名	鶴尾 健
論文題目 Title of Dissertation	<p>Dendritic cell SIRPa regulates homeostasis of dendritic cells in lymphoid organs          樹状細胞上の SIRP<math>\alpha</math>はリンパ組織における樹状細胞の恒常性を制御する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 東信 晓 太 稔          副査 Vice-examiner 千向 建一          副査 Vice-examiner 南 康博</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【研究目的】

樹状細胞 (Dendritic Cells: DC) は全身に分布する抗原提示細胞であり、T 細胞を介した免疫応答や免疫寛容の誘導に重要な役割を果たすことが知られている。DC はその機能により、コンベンショナル DC (cDC)、形質細胞様 DC (pDC) に大別され、さらに cDC は CD4 陽性 cDC (CD4 $^{+}$  cDC) 等に細分される。DC 上に発現する免疫グロブリン様膜蛋白質である SIRPa は、これまでの全身性に SIRPa の細胞内領域を欠失させたマウスを用いた研究から、CD4 $^{+}$  cDC の恒常性の制御に重要であることが報告されている。しかしながら、SIRPa は DC 以外にもマクロファージや好中球にも発現しており、DC に発現する内因性の SIRPa がこれらの制御に重要な点が多い。

本研究では DC 上に発現する内因性の SIRPa がその恒常性に如何に関与するかについて明らかにすべく、コンディショナルノックアウトマウスを用いた検討を行った。

【研究方法および結果、考察】

本研究者らは最初に、マウス *Sirpa* 遺伝子配列の転写開始領域をターゲットとした loxP 配列を有する SIRP $\alpha$ -floxed (*Sirpa*<sup>fl/fl</sup>) マウスを作製した。続いて *Sirpa*<sup>fl/fl</sup> マウスと DC 特異的に Cre リコンビナーゼを発現する CD11c-Cre マウスと交配することで DC 特異的 SIRPa コンディショナルノックアウトマウス (*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウス) を作製した。さらに全身性に Cre リコンビナーゼを発現する CMV-Cre マウスを *Sirpa*<sup>fl/fl</sup> と交配させることで全身性に SIRPa を欠失させたマウス (*Sirpa*<sup>-/-</sup> マウス) も作製し解析を行った。*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウスにおいて DC 特異的に SIRPa の欠損が出来ていることは各免疫細胞のゲノム DNA を用いた PCR 法ならびに、フローサイトメトリーによる蛋白発現解析によって確認した。

まず、作製したマウスの表現系について明らかにすることを目的として脾細胞を用いたフローサイトメトリーを行った。その結果、*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウスや *Sirpa*<sup>-/-</sup> マウスの脾臓では、cDC の比率及び絶対数は著明に減少していたが、pDC 分画の減少は認められなかった。さらに *Sirpa*<sup>ADC</sup> マウスや *Sirpa*<sup>-/-</sup> マウスでは、cDC 分画において CD4 $^{+}$  cDC が著明に減少していた。*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウスと *Sirpa*<sup>-/-</sup> マウスでは CD4 $^{+}$  cDC の減少は同程度であり、DC 内因性の SIRPa が恒常性に寄与するものと考えられた。また凍結脾臓切片を用いた免疫染色では、これらの変異マウスでは樹状細胞の位置異常や、特に CD4 $^{+}$  cDC に特異的な細胞表面マーカーである 33D1 の発現の著しい減少が認められた。

さらに、末梢リンパ節においても同様に *Sirpa*<sup>ADC</sup> マウス及び *Sirpa*<sup>-/-</sup> マウスでは、脾臓と同様に cDC、特に CD4 $^{+}$  cDC の比率が著明に減少していた。ラングルハンス細胞 (LC) は表皮における DC の亜分画と考えられているが、*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウス及び *Sirpa*<sup>-/-</sup> マウス表皮においては、LC の数が半減しており、表皮 LC においても LC 上の SIRP $\alpha$  が自身の恒常性の維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

SIRPa と同様に CD4 $^{+}$  cDC の恒常性に寄与するシグナルとしては、Notch2 受容体を介したシグナルが非常に重要であるとの報告があり、特に細胞表面に ESAM を発現する cDC の恒常性に Notch シグナルが関与すると考えられている。ここで研究者らはフローサイトメトリーを用いた解析により、ESAM は SIRP $\alpha$  陽性分画に優位に発現しており、*Sirpa*<sup>ADC</sup> マウス脾臓においては、

ESAM 陽性 cDC の選択的減少を見出した。さらに *Sirpa<sup>ΔDC</sup>* マウス脾臓では、Notch 受容体シグナルの標的遺伝子である *Hes1* の発現が著明に減少していた。

G 蛋白質共役受容体である EBI2 とそのリガンドである 7α,25-OHC も、近年 CD4<sup>+</sup> cDC の恒常性の維持に重要であるとの報告があり、特に DC の位置の制御を司ると考えられている。ESAM と同じく、EBI2 も SIRP α 陽性分画に優位に発現しており、*Sirpa<sup>ΔDC</sup>* マウス脾臓においては、EBI2 陽性 cDC の選択的減少を認めた。

#### 【結論】

本研究により、申請者らは DC 上に発現する内因性の SIRP α が二次リンパ組織において cDC、特に CD4<sup>+</sup> cDC の恒常性の維持に重要であることを明らかにした。

本研究は、DC における膜蛋白質 SIRP α の役割を解明するため、従来にない細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスにおける表現型の解析を行ったものであるが、DC に内在性の SIRP α がその恒常性に果たす役割について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。