



# Negative regulation of platelet clearance and of the macrophage phagocytic response by the transmembrane glycoprotein SHPS-1

山尾, 卓司

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-12-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2654

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002654>

※ 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。



【 1 4 9 】

氏 名 ・ ( 本 籍 ) 山 尾 卓 司 ( 兵 庫 県 )

博士の専攻分野の名称 博士 ( 医学 )

学 位 記 番 号 博ろ第1857号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成14年12月11日

【 学位論文題目 】

Negative Regulation of Platelet Clearance and of the Macrophage  
Phagocytic Response by the Transmembrane Glycoprotein SHPS-1  
(膜貫通型糖蛋白 SHPS-1 による血小板消失およびマクロファージ  
貪食反応に対する抑制的制御)

審 査 委 員

主 査 教 授 春 日 雅 人

教 授 南 康 博

教 授 中 村 俊 一

## I. 緒言

SHPS-1は神経および骨髄組織に豊富な膜貫通型糖蛋白である。SHPS-1は細胞内部分に2つの免疫レセプターチロシン残基抑制モチーフ(ITIM)を有しており、細胞外部分にはCD47と会合する免疫グロブリン様ドメインを有する。SHPS-1のチロシンリン酸化は可溶性増殖因子、インテグリンを介する細胞接着、あるいはFcγレセプターのクロスリンキングなどによって引き起こされる。これまでの様々な知見はSHPS-1がチロシンリン酸化依存性にSH2 domainを有するチロシンフォスファターゼSHP-1およびSHP-2を膜近傍に引き寄せ活性化することにより、広範囲のチロシンリン酸化に関わる活性化シグナルを抑制的に調節していることを示唆しているが、生理的意義はまだ不明である。そこで我々はSHPS-1の細胞内部分の殆どを欠失したノックアウトマウスを作製した(参考論文)。このマウスから得られた線維芽細胞の解析によりSHPS-1がインテグリンを介する細胞骨格の再構成および細胞増殖因子によるMAP kinase経路の活性化の抑制に重要な役割を果たしていることが明らかになった。本研究では、さらにSHPS-1の生理的役割を明らかにするため、このマウスの個体レベルでの表現型の解析を行った。

## II. 方法

SHPS-1細胞内部分欠損マウスの作成法は参考論文に記載した。野生型、ヘテロおよびホモ接合型マウスについて、生後3-53週齢の各臓器の病理組織学的所見、末梢血液学的検査を行った。血小板造血能の解析のため、骨髄細胞、および脾臓細胞にて巨核球数の測定、巨核球の成熟度の評価およびColony-forming Unit-Megakaryocyte (CFU-MK) Assayを行った。骨髄抑制動物における血小板回転の評価のため、5-FUの経静脈投与後血球算定を行った。血小板寿命の算定のため、*in vivo*血小板ビオチン化と経時的採血、FACS解析を行った。食食アッセイはマウス腹腔よりマクロファージを採取し培養ディッシュに接着させた後、ラベルした赤血球を加え培養した。細胞伸展アッセイは腹腔より採取したマクロファージをフィブロネクチンでコートしたガラス板に接着させ、経時的に形態を観察した。

## III. 結果

1) SHPS-1変異マウスにおける脾臓の組織学的変化: ホモ接合体マウスは外見上健康であり、18ヶ月以上生存したが、野生型コントロールマウスと比較して体重が約10%減少していた。変異型マウスの脳組織および腹腔マクロファージに細胞内部分の欠失したSHPS-1の発現を認めたが、その量は野生型SHPS-1より著しく減少していた。SHPS-1のチロシンリン酸化およびSHP-1との会合は細胞内部分欠失型においては認められなかった。これらの結果は細胞内部分欠失型SHPS-1はSHP-1を膜近傍に引き寄せ活性化することが出来ないことを示唆した。

生後3週、7週、11週および1年の各遺伝子型マウスについては、ほとんどの臓器で両者に大きな組織病理学的差異はなかった。しかしながらホモ接合体マウスの肝臓で著しい脂肪量の増加が見られたほか、生後11週のホモ接合体マウスの脾臓において多数の巨核球が認められた。野生型マウスの脾臓において、巨核球は生後3週において認められるが、生後7週で消失しはじめ、生後11週では認められなかった。また、変異型マウスの脾臓では白脾髄部分が正常型マウスと比較して縮小していた。

2) SHPS-1変異マウスにおける血小板減少症: 次に各遺伝子型のマウスについて末梢血液学的検査を行った。赤血球系、白血球系については大きな違いは見られなかったが、ホモ接合体マウスの末梢循環血小板数は野生型マウスと比べ25%近く減少していた。この循環血小板数の減少は生後4-13週齢まで観察され、SHPS-1細胞内部分欠損は中程度の血小板減少症をもたらすものと考えられた。ヘテロ接合体マウスの末梢循環血小板数も野生型マウスと比較すると20%近く減少していたが統計学的に有意ではなかった。

3) SHPS-1変異マウスにおける血小板造血: この血小板減少の原因は巨核球-血小板系の増殖、成熟の障害あるいは循環血小板の消費の亢進と考えられた。前者の可能性を検討するため、大腿骨髄の巨核球数の算定と巨核球の成熟度の評価、大腿骨髄と脾臓細胞におけるCFU-MKアッセイ、血清トロンボポエチン濃度の測定を行ったが、ホモ接合体マウスと野生型マウスの間に優位な差は認められなかった。したがってSHPS-1細胞内部分の欠失は巨核球-血小板系の増殖成熟に影響を与えず、血小板減少の原因は血小板造血系の抑制によるものではないと考えられた。

SHPS-1 の生理的役割を明らかにしようとした。変異マウスでは血小板減少症を呈し、その原因が血小板産生の低下によるものではなく、循環血小板の消費の亢進によるものであることが明らかとなった。しかしながらこの結果を解釈する際に、この変異マウスが SHPS-1 細胞外ドメインを有していることから、真の機能欠失ではなく機能変化によるものである可能性を考慮する必要がある。

血小板の消失が促進している原因について少なくとも 2 つの可能性がある。一つは SHPS-1 の細胞内部分の欠失により血小板が脆弱となり消失が促進している可能性だが、凝集能などの血小板機能に変化が認められなかったこともあり、やや考えにくい。もう一つは血小板消失の増大の原因がマクロファージ以外の細胞に由来している可能性である。SHPS-1 は単球マクロファージ系のサイトカイン分泌を抑制的に制御しているため、これが血小板減少に関わっている可能性はありうる。

CD47 欠損マウス由来の赤血球を野生型マウスに輸血すると脾臓マクロファージにより速やかに除去されるが、この知見から予想されるのに反し、SHPS-1 変異マウスでは赤血球の消費の亢進を検知することは出来なかった。この差異は別経路の存在によるものではないかと考えられる。しかしながら、*ex vivo* 実験により SHPS-1 変異マウス由来のマクロファージの赤血球貪食が亢進していることが示され、SHPS-1 がマクロファージの貪食反応を抑制しているという見解を補助している。

生後 11 週齢の SHPS-1 変異マウスでは脾臓巨核球数が著明に増加し、脾臓における巨核球系造血が一時的に活性化していることが示唆された。これは *in vitro* での脾臓由来巨核球系細胞の増殖率がわずかに増えていないことと一致しないが、脾臓での巨核球周囲のサイトカインなどの微小造血環境の違いではないかと考えられる。

#### V. 結論

SHPS-1 は循環血小板の消失およびマクロファージの貪食反応を抑制的に制御している。

### 論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第 1859 号	氏 名	山 尾 卓 司
論 文 題 目	Negative Regulation of Platelet Clearance and of the Macrophage Phagocytic Response by the Transmembrane Glycoprotein SHPS-1 膜貫通型糖蛋白 SHPS-1 による血小板消失および マクロファージ貪食反応に対する抑制的制御		
審 査 委 員	主 査 春日 雅人 副 査 南 康博 副 査 中村 俊一		
審査終了日	平成 14 年 12 月 2 日		

(要旨は 1, 000 字～2, 000 字程度)

SHPS-1 (SH2-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1)は著者らが独自に見いだした神経系および免疫系組織を中心に発現する受容体型蛋白質である。同分子はチロシンホスファターゼSHP-1/SHP-2を結合し活性化することにより、インテグリン依存性細胞接着や増殖因子刺激により惹起される細胞内シグナルを調節している。また最近、SHPS-1がそのリガンドであるCD47/integrin-associated protein (IAP)との結合を介して、細胞間相互認識にも寄与することが明らかとなってきた。SHPS-1/CD47相互作用システムが関与する細胞応答として、マクロファージによる赤血球貪食や神経細胞間接着などが報告されているが、同システムの個体における生理機能は未だ不明である。これを解明するために、著者らは細胞内領域を欠失する変異型SHPS-1を発現するマウス(SHPS-1 KO mouse)を作成した。本研究では、SHPS-1 KOマウスのin vivoでの表現型を詳細に解析することによりSHPS-1の持つ生理機能を解明することを目的とした。

SHPS-1 KOマウスの脳および脾臓に発現する変異型SHPS-1はチロシンリン酸化を受けず、SHP-1/SHP-2と結合しないことを確認した。KOマウスの出生、成長は正常であり、外見上野生型マウスとの有意な違いはなかった。組織学的に検討したほとんどの臓器に明らかな異常は見いだせなかった。しかしながら、比較的若年(11週齢)のKOマウスの脾臓において、野生型マウスには見られない多数の巨核球が観察された。一方、末梢血解析より、KOマウスの血小板数が有意に(25%程度)減少していることが明らかとなった。

骨髄巨核球数は両マウス間に有意差はなく、さらに、in vitroでのCFU-MK (Colony-forming Unit-Megakaryocyte)アッセイにより計測された骨髄および脾臓中の巨核球前駆細胞数も両者ではほぼ同等であった。また血中thrombopoietin濃度にも有意差を認めなかった。これらより、KOマウスの血小板数減少は、巨核球前駆細胞の生成ならびに成熟の障害によるものではないと考えられた。

次にKOマウスの血小板数寿命を検討した。5-FUの全身投与にて一過性に骨髄抑制し、末梢血中の血小板数を経時的に測定したところ、骨髄抑制からの回復能力

は両マウスで同等であったものの、その後の血小板減少の程度はKOマウスで有意に亢進していた。さらに、in vivoピオチンラベルした循環血小板の末梢血からの消失率はKOマウスにおいて有意に増加していた。これらの結果は、SHPS-1 KOマウスにおいて血小板寿命の短縮(消費亢進)により血小板数が減少することを示唆した。

血小板に発現するSHPS-1は微量であること、さらに一方で血小板を貪食することによりその寿命を調節するマクロファージにはSHPS-1が豊富であることより、SHPS-1 KOマウスにおいてマクロファージによる血小板貪食が亢進している可能性が考えられた。この仮説を確かめるため、初代培養マクロファージと色素ラベルした赤血球を用いたin vitro phagocytosisアッセイを行った。KOマウス由来のマクロファージは野生型マウス由来のものに比較して著明に多数の赤血球を貪食した。マクロファージの貪食機能においては、アクチン細胞骨格の再構成が重要であることが知られているが、KOマウス由来のマクロファージにおいては、アクチンの集積により細胞辺縁に形成される微小突起が多数観察された。

本研究の要点をまとめると、1)SHPS-1の細胞内部分の欠失により、循環血小板の寿命が短縮すること、2)SHPS-1の細胞内部分は細胞骨格の再構成を抑制することにより、マクロファージの貪食機能を負に調節すること、の2点である。

本研究は、循環血小板数の調節ならびにマクロファージの貪食機能におけるSHPS-1の生理的役割を初めて明らかにしたものである。その成果は医学的に重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認められる。よって、本研究者は博士(医学)の学位を取る資格があると認める。