

樹状細胞分子 SHPS-1 による皮膚免疫制御とその皮膚アレルギーへの治療的応用

群馬大学生体調節研究所バイオシグナル分野

的 崎 尚

SHPS-1 is a transmembrane protein that binds the protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 and is abundant on the surface of CD11c⁺ dendritic cells (DCs). We recently showed that SHPS-1 is essential for priming by DCs of CD4⁺ T cells and for development of Th17 cell-mediated experimental autoimmunity. We have now further evaluated the importance of SHPS-1 and that of its ligand CD47 in contact hypersensitivity (CHS) to 2,4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB). Whereas the DNFB-induced CHS response was impaired in mice that express a mutant form of SHPS-1 lacking most of the cytoplasmic region, it was unaffected in CD47-deficient mice. Moreover, treatment of wild-type mice with mAbs to SHPS-1 that either block or do not block the binding of SHPS-1 to CD47 inhibited the CHS response, whereas that with a mAb to CD47 had no such effect. The 2,4-dinitro-benzenesulfonic acid-induced proliferation of, and production of IFN- γ or IL-17 by, T cells from DNFB-sensitized wild-type mice were inhibited by either mAb to SHPS-1 but not by that to CD47. In contrast, the blocking mAbs to SHPS-1, but not that to CD47, inhibited an allogenic mixed leukocyte reaction. These results suggest that SHPS-1 is essential for development of CHS, likely as a result of its positive regulation of the priming by DCs of CD4⁺ T cells. However, such regulation by SHPS-1 does not appear to require its interaction with CD47.

1. 諸 言

化粧品などにより誘導される皮膚アレルギーの要因となる化学物質には様々なものが知られているが、皮膚アレルギーの実験的マウスモデルとしては、DNFBあるいはTNCB誘導性皮膚炎などがよく知られている。従来これらの化学物質誘導性の皮膚炎は、Th1誘導性であると考えられてきたが、最近になりTh1細胞とは全く異なるTh細胞亜群と考えられIL-17を特異的に産生するTh17細胞の重要性が示唆されている¹⁻³⁾。実際、IL-17の遺伝子欠損(KO)マウスでは、DNFBやTNCB誘導性の皮膚炎やこれらの化学物質誘導性の皮膚炎の発症が著しく抑制されることが報告されている⁴⁾。Th17細胞の誘導には、ナイーブCD4⁺T細胞が樹状細胞から抗原提示を受けた後、TGF β 、IL-6、IL-23などのサイトカインが協調的に作用することが重要であるとされている¹⁻³⁾。しかし、このTh17細胞誘導の分子機構は未だ十分に明らかにされておらず、また、Th17系が様々な化学物質誘導性の皮膚炎発症に関与しているか否かも明らかとはなっていない。

SHPS-1は樹状細胞に強く発現する細胞膜型分子であり、T細胞などに発現する細胞膜型分子であるCD47と相互作用することで細胞-細胞間でのシグナル伝達を担うことが

明らかとなっている⁵⁾。私共はこれまでに、このSHPS-1が樹状細胞によるT細胞活性化に関与することを明らかにしている⁵⁾。特に、SHPS-1 KOマウスでは、DNFB誘導性皮膚炎やMOG誘導性脳脊髄炎(Th17誘導性)の発症が顕著に抑制されることを見出している^{6,7)}。さらに、DNFBで感作したマウスリンパ球におけるIL-17産生が、SHPS-1 KOマウスでは減弱することを見出している。以上の実験結果は、Th17細胞の誘導には、樹状細胞に発現するSHPS-1がT細胞上のCD47と相互作用して機能することが重要であることを強く示唆している。また興味深いことに、DNFB誘導性皮膚炎の発症抑制が抗SHPS-1モノクローナル抗体投与により認められ⁶⁾、抗SHPS-1抗体が化学物質誘導性皮膚炎の治療に有効性を持つ可能性が示唆されている。

そこで本研究では、接触性皮膚炎発症にSHPS-1、またCD47-SHPS-1系がどのように関与するかについて検討を行なうとともに、化学物質誘導性皮膚炎の治療に抗SHPS-1抗体を応用するための基礎的研究を行なった⁸⁾。

2. 実 験

2.1 マウス

SHPS-1 KOマウスはSHPS-1の細胞内領域をほぼすべて欠失したSHPS-1を持つマウスであり、野生型C57BL/6と5または6世代戻し交配を行ったマウスをSHPS-1 KOマウスとして用いた。CD47 KOマウスは、10世代以上CD57BL/6と戻し交配を行ったマウスであり、Oldenburg博士(Umeå大学、スウェーデン)より供与していただいた。野生型C57BL/6マウスおよびBALB/cマウスは日本SLCより購入した。



Regulation by dendritic cell SHPS-1 of skin immunity and its therapeutic application for skin allergy

Takashi Matozaki

Laboratory of Biosignal Sciences, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University

2.2 接触性皮膚炎モデルマウスの作製

8～12週の雌マウスの背部に0.5% DNFBを塗布し、5日後に0.2% DNFBを耳介に塗布した。0.2% DNFB塗布24時間後に耳介部の腫脹を計測した。また、DNFBによる耳介部の腫脹に対する抗体投与の効果は、0.5% DNFB塗布の直前に、100 μgの抗SHPS-1抗体 (mAb 97, p84)、抗CD47抗体、または正常ラットIgG抗体をマウスの腹腔内に投与することで検討した。

2.3 リンパ球のサイトカイン産生と増殖

8～12週の雌マウスの背部に0.5% DNFBを塗布5日後に、所属リンパ節よりリンパ球を回収した。回収したリンパ球を10 μg/mlの抗SHPS-1抗体、抗CD47抗体、または正常ラットIgG存在下で、DNBS (30 μg/ml)、またはIL-2 (50U/ml) により72時間刺激した時点での培地中に含まれるIFN-γおよびIL-17の産生量をELISA法にて測定した。また、リンパ球の増殖の程度は、DNBSまたはIL-2刺激60時間後に培地に³Hチミジンを添加して、さらに12時間培養した時点でのリンパ球に取り込まれた³Hチミジンの量を測定することで定量化した。

2.4 リンパ球混合試験

野生型C57BL/6マウスの脾臓よりCD11c⁺樹状細胞を、野生型BALB/cマウスよりCD4⁺T細胞を単離し、抗SHPS-1抗体、抗CD47抗体、または正常ラットIgGをそれぞれ10 μg/mlを含む培地で、両細胞の混合培養を行なった。培養72時間後にT細胞から分泌されたIFN-γの産生量をELISA法にて測定した。また、培養60時間後に培地に³Hチミジンを添加し、さらに12時間培養した後、T

細胞に取り込まれた³Hチミジンの量を測定することで、T細胞の増殖の程度を定量化した。

3. 結果

3.1 接触性皮膚炎発症へのSHPS-1とCD47の関与

接触性皮膚炎の発症におけるSHPS-1とCD47の重要性を検討する目的で、SHPS-1 KOおよびCD47 KOマウスにおけるDNFB誘導性皮膚炎の誘導を試みた。その結果、以前の報告と同様にSHPS-1 KOマウスでは、DNFB塗布による耳介の腫脹が野生型マウスに比べ有意に低下した(図1A)。一方、CD47 KOマウスでは、野生型マウスと同程度の耳介の腫脹が認められた(図1B)。これらの結果から、接触性皮膚炎の発症にはCD47ではなく、SHPS-1が重要であることが示唆された。

3.2 抗SHPS-1抗体による接触性皮膚炎の抑制

SHPS-1とCD47はそれぞれ細胞外領域を介して細胞間で結合し、細胞間シグナルCD47-SHPS-1系を形成している。CD47とSHPS-1との結合が、接触性皮膚炎の発症に関与するかを検討する目的で、CD47とSHPS-1の結合を阻害する抗SHPS-1抗体であるmAb97、両者の結合を阻害しない抗体であるp84、およびCD47とSHPS-1との結合を阻害する抗CD47抗体であるmiap301をそれぞれマウス腹腔内に投与し、これら抗体のDNFB誘導性皮膚炎の発症に与える影響について検討した。抗SHPS-1抗体であるp84およびmAb97を腹腔投与したマウスでは、DNFB塗布による耳介の腫脹の程度が有意に低下した(図2A, B)。一方、抗CD47抗体miap301を投与したマウスでは、その腫脹の程度に影響は認められなかった(図2C)。これらの

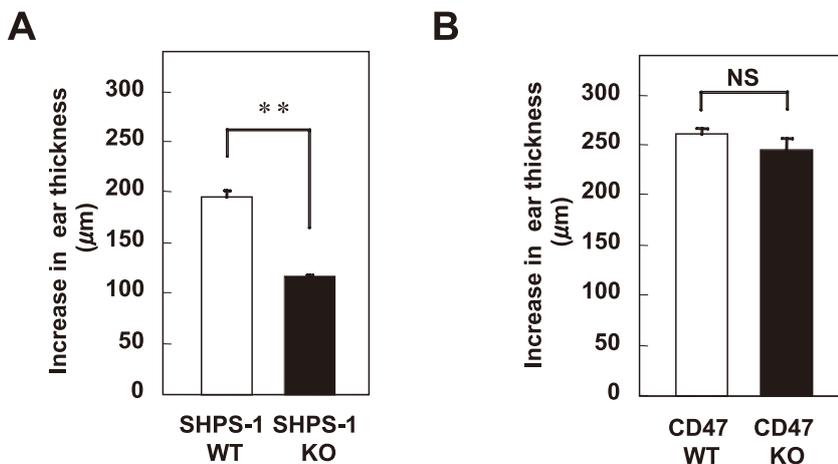


図1 SHPS-1 KO マウスおよびCD47 KO マウスにおける接触性皮膚炎の発症 SHPS-1 KO (A) または CD47 KO (B) の雌マウスの背部に DNFB を塗布 5 日後に、耳介に DNFB を塗布した。耳介の腫脹の程度は、耳介への DNFB の塗布前と塗布 24 時間後の耳介の厚みの差を測定することにより求めた。**, P<0.01 (野生型マウスとの比較)、NS, 有意差なし

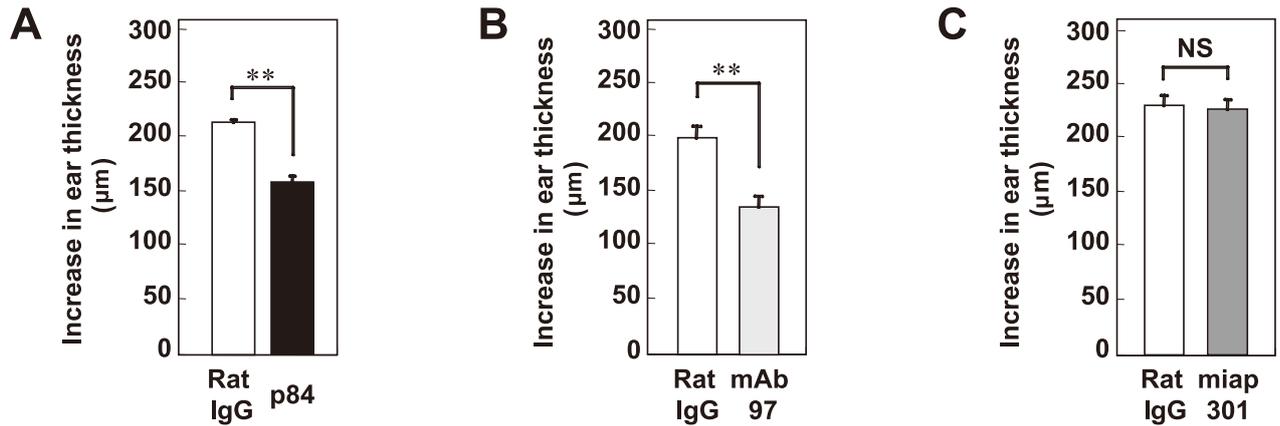


図2 接触性皮膚炎発症への抗SHPS-1抗体および抗CD47抗体の効果
 野生型マウスの腹腔内に抗SHPS-1抗体 [p84 (A) またはmAb97 (B)]、抗CD47抗体 [miap301 (C)]、またはコントロールとして正常ラットIgGを投与後、マウスの背部にDNFBを塗布した。その5日後に、さらに耳介にDNFBを塗布し24時間後の耳介の腫脹の程度を測定した。耳介の腫脹の程度は、耳介へのDNFBの塗布前と塗布24時間後での耳介の厚みの差を測定することにより求めた。**, P<0.01 (正常ラット抗体との比較)、NS, 有意差なし

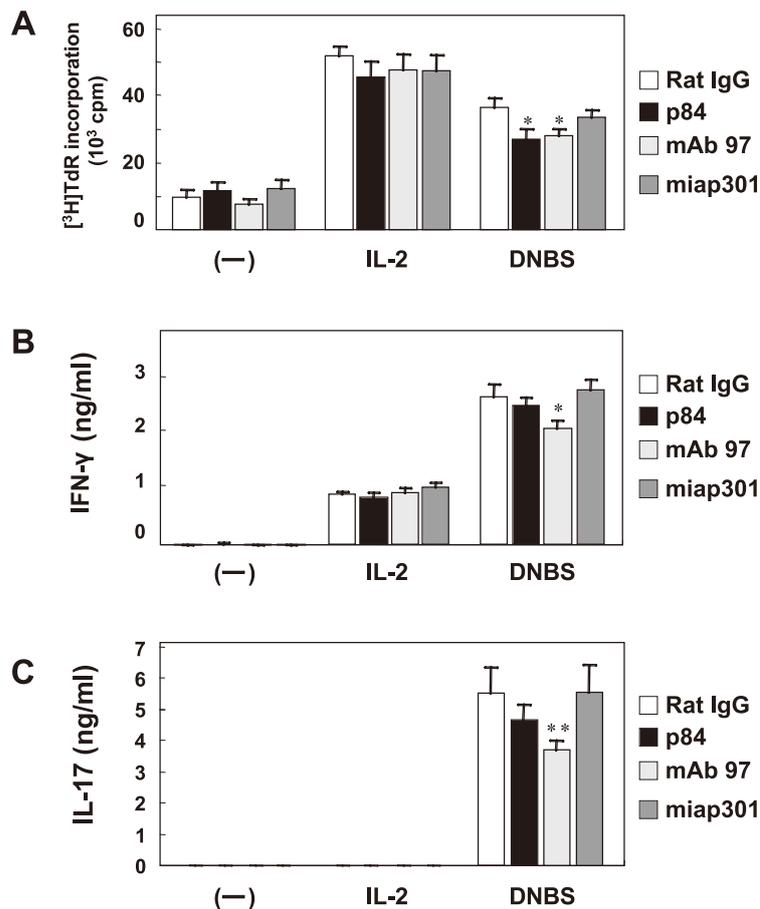


図3 DNBS刺激によるリンパ球の増殖およびIFN-γ、IL-17産生に対する抗SHPS-1抗体および抗CD47抗体の効果
 DNFBをマウス背部に塗布し、5日後に所属リンパ節よりリンパ球を調製した。リンパ球を含む培地中に抗SHPS-1抗体 (p84またはmAb97)、抗CD47抗体 (miap301)、コントロールとして正常ラットIgGを添加後、DNBS (DNFBと同様の抗原性を持つ可溶性物質) またはIL-2にて72時間リンパ球を刺激した。刺激終了12時間前に培地中に ³Hチミジンを加えることでリンパ球の増殖の程度 (A) を、また培地中に分泌されたIFN-γ (B) およびIL-17 (C) の産生量をELISA法により測定した。*, P<0.05, **, P<0.01 (正常ラット抗体との比較)

結果から、抗SHPS-1抗体であるp84およびmAb97は接触性皮膚炎の発症抑制効果をもち、その抑制効果はこれら抗体が持つCD47とSHPS-1の結合阻害活性に依存しないことが示唆された。

3.3 DNFBにより感作されたリンパ球の増殖、サイトカイン産生に対する抗SHPS-1抗体の効果

DNFB誘導性皮膚炎の発症には、所属リンパ節でのDNFB特異的に反応するリンパ球の増殖やそれによるサイトカイン産生が重要である。抗SHPS-1抗体処理により認められたDNFB誘導性皮膚炎の発症抑制は、抗SHPS-1抗体が所属リンパ節でのこれらリンパ球の反応を抑制したためである可能性が高い。そこで、DNFB感作後のマウス所属リンパ節より調整したリンパ球を抗SHPS-1抗体存在下でDNBS (DNFBと同様の抗原性を持つ水溶性物質) 刺激し、リンパ球の増殖およびそのサイトカイン産生について検討した。その結果、抗SHPS-1抗体 (p84またはmAb97) 存在下では、DNBS刺激を行ったリンパ球の増殖が抑制された (図3A)。さらにmAb97処理では、リンパ球からのIFN- γ の産生量が低下した (図3B)。接触性皮膚炎の発症にはIL-17細胞によるIL-17の産生が重要であるが、mAb97処理ではDNBS刺激によるリンパ球からのIL-17産生量の低下も認められた (図3C)。一方、IL-2による抗原刺激に依存しないリンパ球の増殖、IFN- γ 、およびIL-17の産生には、抗SHPS-1抗体処理の影響は認められなかった (図3)。また、抗CD47抗体miap301処理は、リンパ球の増殖、および両サイトカインの産生に影響を与えなかった (図3)。

3.4 抗SHPS-1抗体によるアロ抗原依存的な混合リンパ球培養反応の抑制

SHPS-1がランゲルハンス細胞などの樹状細胞に高く発現することから、抗SHPS-1抗体処理で認められたリンパ球の増殖抑制およびサイトカインの産生抑制は、所属リンパ節での樹状細胞によるT細胞の活性化の過程に抗SHPS-1抗体が抑制的に機能している可能性を示すとも考えられる。そこで、樹状細胞によるアロ反応性CD4⁺T細胞の増殖とこれらT細胞からのIFN- γ の産生に対する抗SHPS-1抗体の効果について検討した。C57BL/6マウス脾臓より調製したCD11c⁺樹状細胞とBALB/cマウスより調製したCD4⁺T細胞の混合培養を抗SHPS-1抗体存在下で行ったところ、mAb97ではCD4⁺T細胞の増殖を抑制する傾向が認められたが、p84抗体では認められなかった (図4A)。また、T細胞によるIFN- γ の産生についてはmAb97、p84のどちらにおいてもその産生量に影響は認められなかった (図4B)。一方、抗CD47抗体処理によるT細胞の増殖、IFN- γ の産生量の変化は、全く認められなかった (図4)。

4. 考察

DNFB誘導性皮膚炎の発症におけるCD47-SHPS-1系の役割についてSHPS-1 KOマウス、CD47 KOマウスを用い解析を行なったところ、SHPS-1 KOマウスではDNFB誘導性皮膚炎の発症が抑えられたが、CD47KOマウスではその発症の抑制が認められなかった。これまで、自己免疫疾患の発症にはSHPS-1とCD47の相互作用が関与すると考えられたが⁷⁾、これらの実験結果から、SHPS-1は接触性皮膚炎の発症に重要であるが、CD47はその発症に必須ではないと考えられた。また、CD47とSHPS-1の結合を阻害する抗SHPS-1抗体であるmAb97、および両者の結合を阻害しない抗体であるp84をマウスに投与し、接触性皮膚炎の発症に対する影響を検討したところ、どちらの抗体によってもその発症が抑制された。一方、CD47とSHPS-1との結合を阻害する抗CD47抗体であるmiap301の投与では抑制されなかった。これらの結果は、SHPS-1とCD47との相互作用が接触性皮膚炎の発症に重要ではないことを支持するものである。

抗SHPS-1抗体投与により接触性皮膚炎の発症が抑制され、これは細胞表面上に発現するSHPS-1が抗体により架橋され、SHPS-1の機能が阻害されたことによる可能性が考えられる。実際、SHPS-1を発現する培養細胞を抗SHPS-1抗体で処理した際、細胞表面上に発現するSHPS-1はエンドサイトーシスされることを認めている。したがって、抗SHPS-1抗体処理はランゲルハンス細胞および樹状細胞上のSHPS-1のエンドサイトーシスを誘導することにより、SHPS-1の機能を抑制した可能性が考えられる。一方で、抗SHPS-1抗体の処置によりSHPS-1はその細胞内領域にチロシンリン酸化を受けることを確認している。SHPS-1はチロシンリン酸化依存的に血球系細胞の種々の生理機能を負に制御するチロシンホスファターゼSHP-1と結合し、SHP-1を活性化することが知られている⁵⁾。したがって、抗SHPS-1抗体処理によりSHPS-1はSHP-1の活性化を介して、樹状細胞の生理機能を負に制御することで接触性皮膚炎の発症を抑制している可能性も考えられる。しかし、樹状細胞に対する抗SHPS-1抗体の作用機構の詳細については、今後の検討課題である。

DNFBで感作されたSHPS-1 KOマウスより単離したランゲルハンス細胞は、運動能とTNF- α の産生の障害を示す⁹⁾。また、SHPS-1 KOマウスおよび抗SHPS-1抗体処理を行った野生型マウスでは、DNFB刺激によるランゲルハンス細胞の成熟が障害を受けることも報告されている⁶⁾。これらに加えて、抗SHPS-1抗体であるmAb97、p84が、DNFBで感作を受けた野生型マウスより調製したリンパ球のDNBS刺激による細胞増殖を抑制し、さらにmAb97はリンパ球からのIFN- γ とIL-17の産生を抑制した。また、リンパ球混

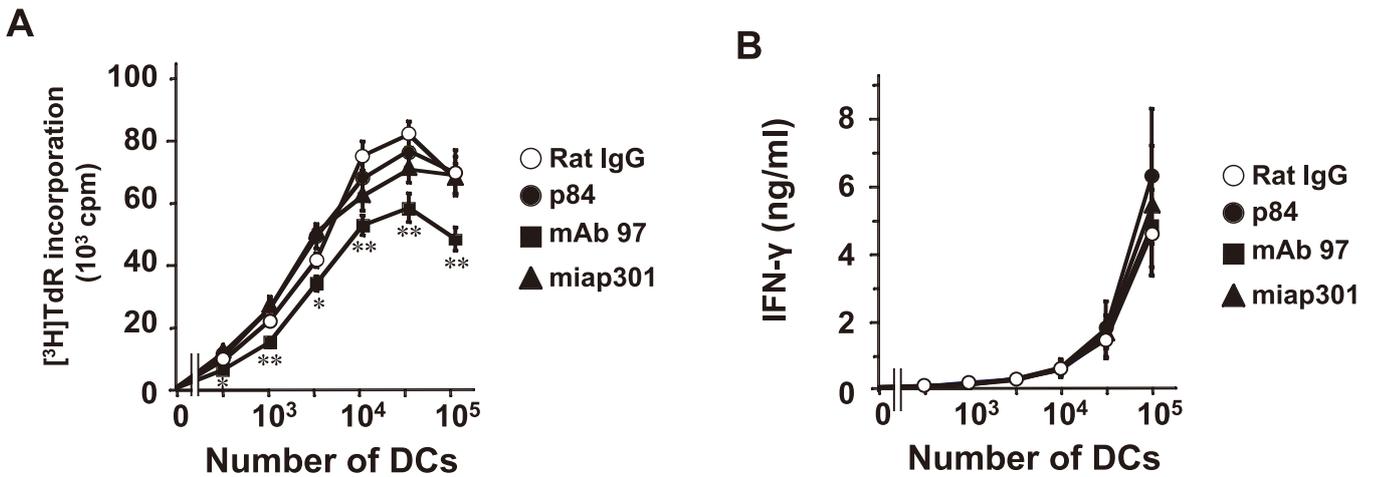


図4 樹状細胞依存的なCD4⁺T細胞の増殖、IFN-γ産生に対する抗SHPS-1抗体および抗CD47抗体の効果
 抗SHPS-1抗体(p84またはmAb97)、抗CD47抗体(miap301)またはコントロールとして正常ラットIgGを培地中に添加し、図中で示した細胞数のマウス脾臓由来のCD11c⁺樹状細胞とマウス脾臓由来CD4⁺T細胞の混合培養を行い、³Hチミジンの取り込み量によりCD4⁺T細胞の増殖の程度(A)を測定し、またIFN-γの産生量(B)をELISA法にて測定した。樹状細胞はC57BL6マウスより調製し、CD4⁺T細胞はBALB/cマウスより調製した。*, P<0.05, **, P<0.01(正常ラット抗体との比較)

合試験からは、樹状細胞によるCD4⁺T細胞の増殖の誘導が、mAb97処理により抑制されることが明らかとなった。すなわち、抗SHPS-1抗体によるT細胞の増殖とT細胞からのサイトカイン産生の抑制が、抗SHPS-1抗体の持つ誘導性皮膚炎発症抑制につながる可能性が示唆された。

本研究により、SHPS-1は接触性皮膚炎の発症に重要であり、樹状細胞の運動、成熟、T細胞の活性化などに関与することが示唆された。その一方で、SHPS-1とCD47の相互作用は、その発症には関与しないと考えられた。また、接触性皮膚炎の発症抑制に抗SHPS-1抗体が有効であることが明らかとなった。今後、SHPS-1の樹状細胞における生理機能を明らかにすると共に、接触性皮膚炎の発症をより効率よく抑制する抗SHPS-1抗体の作製が求められる。

(文 献)

- 1) Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, et al. :Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24, 677-688, 2006.
- 2) Kikly K, Liu L, Na S, et al. :The IL-23/Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 670-675, 2006.
- 3) Iwakura Y, Ishigame H. :The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* 116, 1218-22, 2006.
- 4) Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, et al. :Antigen-

specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17, 375-387, 2002.

- 5) Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, et al. :Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPα signalling pathway. *Trends Cell Biol.* 19, 72-80, 2009.
- 6) Fukunaga A, Nagai H, Yu X, et al. :Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the induction of Langerhans cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 36, 3216-3226, 2006.
- 7) Tomizawa T, Kaneko Y, Saito Y, 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.* 179, 869-877, 2007.
- 8) Motegi S, Okazawa H, Murata Y, et al. :Essential roles of SHPS-1 in induction of contact hypersensitivity of skin. *Immunol. Lett.* 121, 52-60, 2008.
- 9) Fukunaga A, Nagai H, Noguchi T, et al. :Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the migration of Langerhans cells from the epidermis to draining lymph nodes. *J. Immunol.* 172, 4091-4099, 2004.