

「単核食細胞による自己免疫疾患の制御機構の解明と治療への応用」

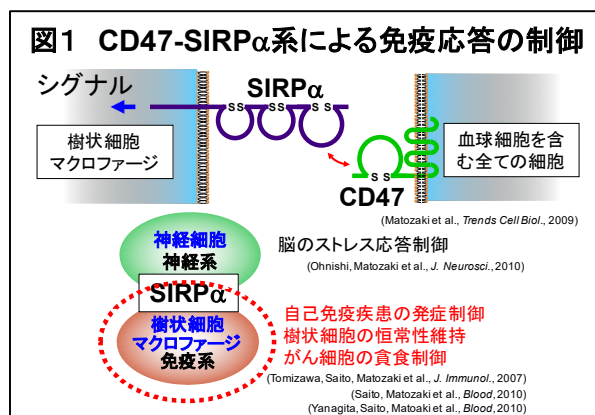
神戸大学大学院医学研究科

齊藤 泰之

1 研究の背景と目的

樹状細胞やマクロファージは単核食細胞と呼ばれ、食作用により取り込んだ異物や自己の成分(抗原)を分解したのちに、Tリンパ球に抗原を提示することで、異物に対しては排除し、自己に対しては攻撃しない(免疫寛容)ように働きが調節されている。一方で、手指の関節の炎症をきたす関節リウマチや全身に様々な神経症状をきたす多発性硬化症といった病気においては、この免疫寛容機構の破綻により、自己組織に対する免疫反応(自己免疫応答)が生じると考えられている。これらの病気に対して免疫細胞の機能を抑える薬剤を中心とした治療が行われているものの、これまでの免疫抑制剤は主にT細胞などの獲得免疫細胞の機能を抑えるものがほとんどであり、上述の単核食細胞の機能に注目した薬剤は少なく、単核食細胞の機能に注目した新たな治療薬の開発が注目されている。

SIRP α (Signal regulatory protein α)は免疫系・神経系に強く発現する受容体型膜タンパクである。免疫系細胞においては、樹状細胞やマクロファージといった細胞に強く発現する。これらの細胞においては、SIRP α がその生理的リガンドである膜蛋白質CD47 と相互作用することによって、その機能が制御されると考えられている(CD47-SIRP α 系)(図1)。これまで、全身性にCD47もしくはSIRP α を欠失させた遺伝子改変動物を用いた解析により、CD47-SIRP α 系は自己免疫性疾患(多発性硬化症や慢性関節リウマチモデル)の発症制御に重要であるものの、これらCD47もしくはSIRP α による細胞レベルでの自己免疫性疾患の制御については、十分に明らかとなっていない。そこで本研究課題では、SIRP α が高発現する単核食細胞、中でも樹状細胞に注目し、樹状細胞上のCD47-SIRP α 系による自己免疫性疾患の制御機構を明らかにすることを目的に、多発性硬化症の動物モデルである実験性自己免疫性脳脊髄炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; EAE)モデルを用いて評価を行った。

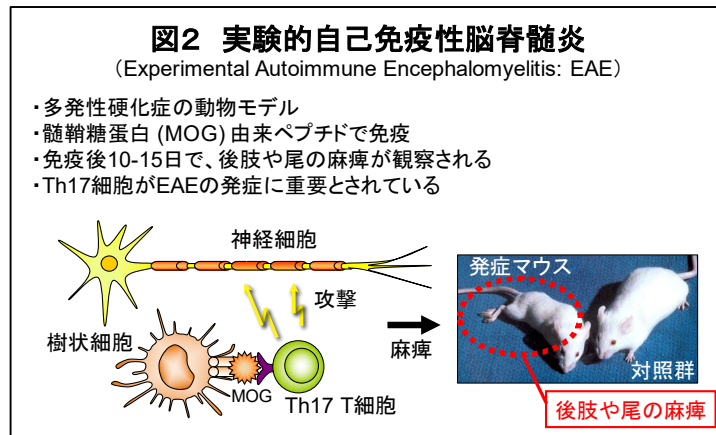


2 研究方法・研究内容

① 樹状細胞上の SIRP α による EAE 制御機構の解明

本研究においては、樹状細胞特異的に SIRP α を欠失させた SIRP α コンディショナ

ルノックアウトマウス(CD11c-Cre:SIRP $\alpha^{f/f}$, SIRP $\alpha^{\Delta DC}$) (Washio, Saito, *et al.*, *Genes Cells*, 2015)を用いた。本マウスを用い、EAE モデルを用いて評価を行った。EAE は慢性炎症性脱髄疾患である多発性硬化症の動物モデルであり、髄鞘糖蛋白由来糖蛋白質(myelin oligodendrocyte glycoprotein; MOG)のペプチド断片(MOG35-55)をマウス皮下に免疫すると、免疫後約 10-15 日で後肢や尾の麻痺が観察される(図2)。



このモデルにおいて、樹状細胞は発症初期のリンパ節における自己抗原(MOG ペプチド)の提示を介した T 細胞の活性化(プライミング)、もしくは発症後の脳脊髄内における炎症の重症化の両方に重要であることが示唆されている。そこで、SIRP $\alpha^{\Delta DC}$ マウスにおける EAE 発症抵抗性のメカニズムを明らかにする目的で、EAE 誘導した SIRP $\alpha^{\Delta DC}$ マウスの発症初期(10 日目)、もしくは炎症ピーク時(20 日目)におけるリンパ節や脳脊髄内での炎症像を組織学的、細胞免疫学的(フローサイトメリー)に解析を行った。

② CD47 による EAE 制御機構の解明

EAE の発症制御に樹状細胞上の SIRP α が重要であると想定される一方で、リガンドである CD47 に関しては、前述のように全身性に CD47 を欠損させたマウスで SIRP α ノックアウトマウスと同様に著しい EAE 抵抗性をきたすことが明らかとなっている (Murata, *et al.*, *Methods*, 2014)。しかしながら SIRP α と異なり CD47 は全ての細胞に発現することから、実際にどの細胞における CD47 が EAE 制御に重要か未だ明らかになっていない。そこで、EAE における樹状細胞を介した自己免疫応答における CD47 の役割を明らかにする目的で、樹状細胞特異的 CD47 ノックアウトマウス(CD11c-Cre:CD47 $^{f/f}$, CD47 ΔDC) (Saito *et al.*, *PNAS*, 2017)を用い、EAE モデルを用いた検証を行った。

③ SIRP α の発現制御による EAE 発症抑制効果の検討

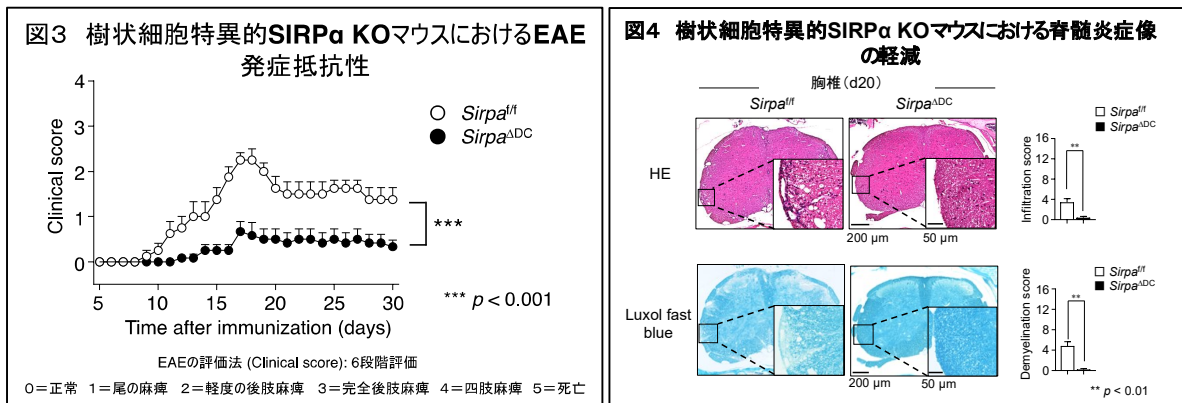
遺伝子改変マウスから得られたこれまでの知見から、CD47-SIRP α 系は自己免疫疾患(多発性硬化症)の発症の制御に重要であることが示唆されるものの、発症後の炎症の制御に対する役割に関しては不明である。そこで、EAE 発症後の炎症制御における CD47-SIRP α 系の役割を検討する目的で、タモキシフェン誘導性 SIRP α コンディショナルノックアウトマウス(R26CreERT2:SIRP $\alpha^{f/f}$, SIRP α^{iKO}) (Saito *et al.*, *PNAS*, 2017)を

用い、EAE モデルを用いた検証を行った。

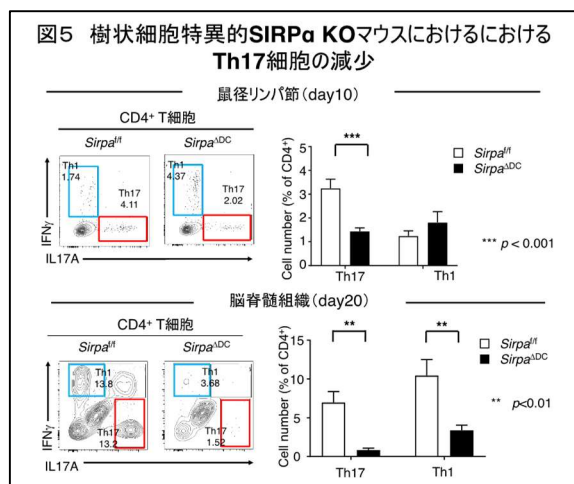
3 研究成果

1) 樹状細胞上の SIRP α による EAE 制御機構の解明

SIRP $\alpha^{\Delta DC}$ に対して EAE モデルによる検討を行ったところ、コントロールマウス (SIRP $\alpha^{fl/fl}$) マウスに比べ、SIRP $\alpha^{\Delta DC}$ マウスでは EAE の発症ならびに臨床スコアが著しく抑えられており(図3)、脊椎におけるリンパ球の浸潤、ならびに脱髄像も軽減していた(図4)。これらのことから、樹状細胞上の SIRP α が EAE の発症に重要であることが明らかとなった。

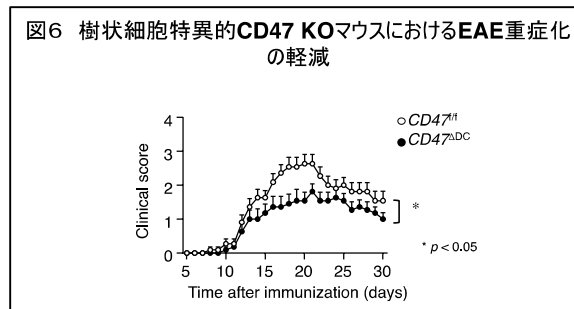


さらに、SIRP $\alpha^{\Delta DC}$ マウスの末梢リンパ節ならびに脳脊髄における Th17 細胞 (EAE の発症に重要な T 細胞分画) の数が著しく減少しており(図5)、SIRP $\alpha^{\Delta DC}$ マウスにおいては、これらの組織において樹状細胞による Th17 細胞の活性化が抑えられていることが考えられた。



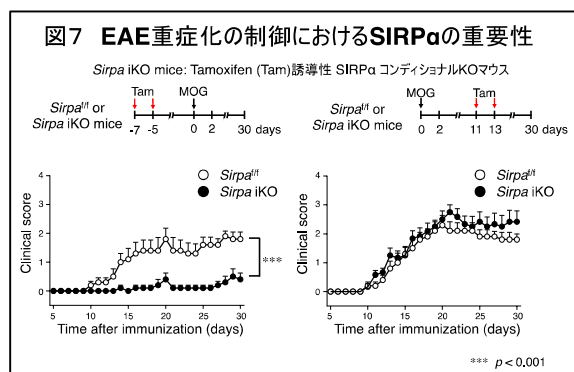
2) CD47 による EAE 制御機構の解明

一方、樹状細胞特異的 CD47 ノックアウトマウスである CD47^{ΔDC} マウスに対して EAE を行ったところ、EAE の重症スコアがコントロールマウスに比べて軽減していた(図6)。



3) SIRP α の発現制御による EAE 発症抑制効果の検討

タモキシフェン誘導性 SIRP α ノックアウトマウス(SIRP α^{iKO})にタモキシフェンを経口投与すると、1週間以内に樹状細胞上の SIRP α の発現が低下する(Saito *et al.*, *PNAS* 2017)。このマウスを用い、EAE 発症前後における SIRP α の重要性について検討を行った。EAE 発症前にタモキシフェンを投与した SIRP α^{iKO} マウスでは、これまでの樹状細胞特異的 SIRP α ノックアウトマウスと同様に EAE の発症が著しく抑えられた(図7左)。一方、EAE 発症後にタモキシフェンを投与したマウスでは EAE の重症度に変化を認めなかった(図7右)。これらの結果から、SIRP α は EAE の発症に重要であるが、発症後の重症化の制御には寄与しない可能性が示唆された。



4 生活や産業への貢献および波及効果

今回の研究成果により、難病である自己免疫疾患、特に多発性硬化症の原因解明や診断・治療法の開発へ直接つながることが期待される。申請者のグループは既ががんの分野において、CD47-SIRP α 系を標的とした治療法の開発に取り組んできており、自己免疫性疾患に対しても CD47-SIRP α 系が単核食細胞の機能制御を介した新たな治療標的となりうる可能性が示された。今後は、CD47と SIRP α の結合を抑制する抗体や化合物を用いて EAE モデルを用いた検討を行い、CD47-SIRP α 系を標的とした難治性自己免疫疾患に対する治療法の開発を進める。