

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15197

研究課題名(和文)低次元の血球貪食機構と免疫系・鉄代謝系の相互応答機構の存在証明への挑戦

研究課題名(英文)Fine tuning the immune response through physiological hemophagocytosis

研究代表者

橋口 照人 (Hashiguchi, Teruto)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：70250917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血球貪食症候群は一般的に免疫制御機構の破綻した病態として捉えられている。しかしながら、2013年、感染症マウスモデルにおいて血球貪食による免疫調節機構の存在が報告された(Ohyagi H, et al. Immunity 2013)。一方、我々はこれまでの研究において免疫B細胞特異的VEGF-A過剰発現マウスにおける免疫寛容誘導の存在を報告してきた(J Immunol, 2010)。今回この非感染症マウスモデルのリンパ節において血球貪食が観察され、感染状態のみならず、非感染状態における血球貪食と免疫調節機構の機能的関連の存在を明らかにするとともに、性差および加齢の関連を示唆するデータを得た。

研究成果の概要(英文)：Aim: Fine tuning the immune response through hemophagocytosis: Materials and methods: The CD19Cre/hVEGF-Afl mice were employed for this study. H&E staining and immunohistochemical staining were performed to identify hemophagocytosis in LNs. Prussian blue staining was done for quantification of iron deposition in tissues. The number of CD8+ T cells and programmed cell death 1 (PD-1) positive cells in LNs were analyzed by flow cytometry. Heparin expression in the liver was analyzed by RT-PCR. Result: The active hemophagocytosis in LNs of CD19Cre/hVEGF-Afl mice were observed together with decreasing the number of CD8+ T cells and increasing PD-1 expression in CD8+ T cells. Also CD19Cre/hVEGF-Afl mice represented the phenotype corresponding with iron deficiency anemia. Conclusion: B-cell derived VEGF-A executes tuning of immune response by decreasing the number of CD8+ T cells, increasing PD-1 expression in CD8+ T cells and hemophagocytosis.

研究分野：血管新生、血液凝固、免疫、HIV感染症

キーワード：血管新生 血球貪食 鉄 免疫 リンパ管新生 リンパ節 B細胞 VEGF

1. 研究開始当初の背景

炎症の病態反応として「所属リンパ節の腫脹」における血管・リンパ管新生の病理学的観察は古くより解析されてきたが、その分子メカニズムの詳細については 2000 年代に入り国内外の免疫系の研究の流れの一つとなった。そして国外より感染により所属リンパ節の免疫 B 細胞の産生する VEGF-A が樹状細胞の所属リンパ節へのリクルートを促しその後の免疫応答を修飾することが報告された(Angeli V, et al. *Immunity* 2006)。その後、我々は免疫 B 細胞の産生する VEGF-A が獲得免疫におけるリンパ節の構造的リモデリングから機能的な免疫機構のバランス制御に積極的に関わっていることを報告してきた¹⁾。その過程で得られた 3 つの観察を生体反応の意味づけの課題として挙げている。文献 1) Shrestha B, Hashiguchi T (申請者) et al. *J Immunol* 184(9):4819-26, 2010

2. 研究の目的

血球貪食症候群は一般的に免疫制御機構の破綻した病態として捉えられている。しかしながら、2013 年、感染症マウスモデルにおいて血球貪食による免疫調節機構の存在が報告された(Ohyagi H, et al. *Immunity* 2013)。一方、我々はこれまでの一連の研究において免疫 B 細胞特異的 VEGF-A 過剰発現マウスにおける免疫寛容誘導の存在を報告してきた(*J Immunol*, 2010)。この非感染症マウスモデルのリンパ節において血球貪食が観察され、感染状態のみならず、非感染状態における血球貪食と免疫調節機構の機能的関連の存在を示唆するデータを性差および加齢との関連も含めて蓄積してきた。本研究においては、非感染状態における低次元の血球貪食と免疫調節機構ならびに鉄代謝系の関連の存在を明らかにすることを目的とする。更に性差医学、加齢医学へ寄与することを目指す。

3. 研究の方法

2 年計画とし既に作出済みである免疫 B 細胞特異的 VEGF-A 産生 tg マウスを解析する。本 tg マウスの VEGF-A 産生量はコントロールマウスの 4 倍程度であり生理的動態の考察の範囲内にある。解析項目は 4 つの柱である①血球貪食系の解析 ②免疫応答系の解析 ③鉄代謝系の解析 ④脈管系の解析より構成される。これらの 4 つの生体システムが相互応答してホメオスタシスをバランスしていることを証明する。相互応答の証明には上記の解析を可能な限り同一マウス個体にて行うことでアプローチする。加齢によるこれらの生体システムへの影響を調べることから、平成 27 年度には 13-14 週齢のマウスの解析、平成 28 年度には 54 - 55 週齢のマウスの解析を行ない、データを比較する。また、4 つの系

の性差も解析することから、全ての解析をオス・メス双方にて行う。全ての解析項目の実験プロセスは既に preliminary data を得る過程にて遂行可能であることを確認している。

4. 研究成果

免疫応答の一つの pathway である免疫 B 細胞からの VEGF-A 発現の up-regulation が持続することによりマウスの個体は免疫寛容の表現型となることを、13-14 週齢の♂マウスにおいて報告してきたが、これらの個体応答が血球貪食系・鉄代謝系・血管／リンパ管の脈管系の動態と連動していることを証明した。さらにこれらの個体応答の“性差による差異”、13-14 週齢と 54 - 55 週齢のマウスを比較することにより“加齢による変化”を明らかにしつつある。

<血球貪食系>

54-55 週齢のメスマウスにおいて、腸間膜リンパ節における血球貪食の存在をヘモジデリンの沈着部位とマクロファージの染色部位の一致より確認した。

<免疫系>

13-14 週齢のオスマウスにおいて免疫寛容の個体環境となることを報告した。

<鉄代謝系>

54-55 週齢のメスマウスにおいて、鉄欠乏性貧血に compatible な表現型を示すことを確認した。

<脈管系>

13-14 週齢のオスマウスにおいて、本モデルマウスの腸間膜リンパ節においてリンパ管新生・血管新生およびリンパ節に特異的脈管構造である HEV (high endothelial venule)の増加を報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Yoshihara N, Terasaki H, Shirasawa M, Kawano H, Sonoda S, Yamaguchi M, Hashiguchi T, Hisatomi T, Ishibashi T, Sakamoto T. PERMEABILITY AND ANTI-VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EFFECTS OF BEVACIZUMAB, RANIBIZUMAB, AND AFLIBERCEPT IN POLARIZED RETINAL PIGMENT EPITHELIAL LAYER IN VITRO. *Retina*. 2017;37(1):179-190. (査読有)

2. Panta S, Yamakuchi M, Shimizu T, Takenouchi K, Oyama Y, Koriyama T, Kojo T, Hashiguchi T. Low grade inflammation inhibits VEGF induced HUVECs migration in p53 dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*.

2017;483(2): 803-809. (査読有)

3. Shimizu T, Yamakuchi M, Biswas KK, Aryal B, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I. HMGB1 is secreted by 3T3-L1 adipocytes through JNK signaling and the secretion is partially inhibited by adiponectin.

Obesity. 2016;24(9):1913-1921. (査読有)

4. Aryal B, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Komokata T, Inoue M, Ikeda S, Fukukura Y, Nakamura M, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Imoto Y. A Switch in the Dynamics of Intra-Platelet VEGF-A from Cancer to the Later Phase of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Humans. *PLoS One*. 2016 Mar 1;11(3):e0150446. (査読有)

5. Kawamura H, Tokuda K, Imuta N, Kubota T, Koriyama T, Miyanochara H, Hashiguchi T, Kawano Y, Nishi J. Epidemiological Analysis of Nosocomial MRSA Outbreaks Using Phage Open-Reading Frame Typing in a Tertiary-Care Hospital. *Jpn J Infect Dis*. 2016 ;69(6):523-524. (査読有)

6. Namino F, Iriki Y, Maenosono R, Ichiki H, Okui H, Yoshimura A, Oketani N, Matsushita M, Ohishi M, Hashiguchi T. The optimal setting of complex fractionated atrial electrogram software in substrate ablation for atrial fibrillation.

J Arrhythm. 2015;31(1):6-11. (査読有)

7. Amitani M, Cheng KC, Asakawa A, Amitani H, Kairupan TS, Sameshima N, Shimizu T, Hashiguchi T, Inui A. Allantoin ameliorates chemically-induced pancreatic β -cell damage through activation of the imidazoline I3 receptors. *PeerJ*. 2015;3:e1105. (査読有)

[学会発表] (計12件)

1. Bibek Aryal、清水利昭、門野潤、風呂井彰、山口宗一、菰方輝夫、橋口照人、井本浩: Platelet derived growth factors predict HCC recurrence after partial hepatectomy in humans. 第62回日本臨床検査医学会九州地方会・第28回日本臨床化学会九州支部総会; 2017年3月4日(土) 久留米大学病院 筑水会館 (福岡県久留米市)

2. 古城剛、山口宗一、吉村明子、竹之内和則、伊藤隆史、清水利昭、大山陽子、郡山豊泰、波野史典、Panta Sushil、松下昌風、丸山征郎、橋口照人: CalDAG-GEFI分子異常による血小板機能異常症. 第62回日本臨床検査医学会九州地方会・第28回日本臨床

化学会九州支部総会; 2017年3月4日(土) 久留米大学病院 筑水会館 (福岡県久留米市)

3. Sushil Panta、山口宗一、清水利昭、竹之内和則、大山陽子、郡山豊泰、古城剛、橋口照人: Tracking the signaling pathway for the anti-angiogenic activity of proinflammatory factor $TNF\alpha$. 第62回日本臨床検査医学会九州地方会・第28回日本臨床化学会九州支部総会; 2017年3月4日(土) 久留米大学病院 筑水会館 (福岡県久留米市)

4. 大山陽子、竹之内和則、古城剛、郡山豊泰、福山竜子、山口宗一、橋口照人: 血液培養陽性データよりみる検出菌とその臨床背景. 9月1日(木)~9月4日(日) 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

5. 竹中大喜、山口宗一、竹之内和則、大山陽子、清水利昭、郡山豊泰、古城剛、橋口照人: miR-22の血管内皮細胞での役割の検討. 第63回日本臨床検査医学会学術集会; 2016年9月1日(木)~9月4日(日) 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

6. 古城剛、山口宗一、吉村明子、竹之内和則、伊藤隆史、清水利昭、大山陽子、郡山豊泰、Panta Sushil、松下昌風、丸山征郎、高嶋博、橋口照人: CalDAG-GEFI分子異常により血小板機能異常を呈した一症例. 第63回日本臨床検査医学会学術集会; 2016年9月1日(木)~9月4日(日) 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

7. 山口宗一、郡山豊泰、向原公介、重久喜哉、古城剛、清水利昭、竹之内和則、大山陽子、井本浩、橋口照人: miRNAによる自然免疫制御機構の解明. 第63回日本臨床検査医学会学術集会; 2016年9月1日(木)~9月4日(日) 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

8. 山口宗一、郡山豊泰、古城剛、竹之内和則、清水利昭、大山陽子、松下昌風、橋口照人: L. pneumophila感染マクロファージ系細胞におけるmiRNAの役割. 第38回日本血栓止血学会学術集会; 2016年6月16日(木)~6月18日(土) 奈良春日野国際フォーラム 薨~IRAKA~ (奈良県奈良市)

9. 古城剛、政元いづみ、山崎家春、山口宗一、清水利昭、大山陽子、竹之内和則、郡山豊泰、松下昌風、吉満誠、石塚賢治、橋口照人: AML治療経過中に出現した細胞質内封入体様物質. 第61回日本臨床検査医学会九州地方会・第27回日本臨床化学会九州支部総会; 2016年3月19日(土) 長崎大学医学部 記念講堂・良順会館 (長崎県長崎

市)

10. 竹岡啓子、日高 洋、菱沼 昭、池田勝義、大久保滋夫、土屋達行、橋口照人、堀田多恵子、古田 耕、松下一之、松本祐之、村上正巳、前川真人：甲状腺刺激ホルモン(TSH)測定値のハーモナイゼーション. 第62回日本臨床検査医学会学術集会；2015年11月19日(木)～11月22日(日) 長良川国際会議場・岐阜都ホテル(岐阜県岐阜市)

11. 清水利昭、山口宗一、竹之内 和則、丸山征郎、橋口照人：HMGB1は大型脂肪細胞から分泌される炎症性のアディポサイトカインでありインスリン抵抗性を誘導する. 第55回日本臨床化学会年次学術集会；2015年10月30日(金)～11月1日(日) 大阪大学コンベンションセンター(大阪府吹田市)

12. Shrestha Binita、伊藤隆史、竹之内和則、Panta Sushil、郡山豊泰、古城 剛、山口宗一、丸山征郎、橋口照人：Physiological hemophagocytosis as a process of fine tuning immune system in vivo. 第37回日本血栓止血学会学術集会；2015年5月21日(木)～5月23日(土) 甲府市総合市民会館(山梨県甲府市)

[図書](計5件)

1. 小亀 浩市、橋口 照人、山田 典一：Hot Topics 血管分野. 日本血栓止血学会誌(0915-7441)28巻1号 Page89-91(2017.02)

2. 橋口 照人. 【凝固検査の標準化】 外因系凝固反応とプロトロンビン時間の多様性. 日本血栓止血学会誌(0915-7441)27巻6号 Page631-635(2016.12)

3. 橋口 照人. 【DOACの臨床とモニタリング】抗凝固療法の更なる進化を願う. Thrombosis Medicine(2186-0327)6巻4号 Page286-290(2016.12)

4. 橋口 照人. 【腎臓病と貧血】 エリスロポエチンと鉄代謝、骨髄異形成症候群への臨床応用. 臨床化学(0370-5633)45巻2号 Page117-119(2016.04)

5. 一瀬 白帝、和田 英夫、惣宇利 正善、橋口 照人、矢富 裕、小川 孔幸、北島 勲、朝倉 英策、岡本 好司、家子 正裕、山本 晃士、江口 豊. 自己免疫性出血病 FXIII/13 日本血栓止血学会診断基準作成委員会. 自己免疫性出血病 FXIII/13 診断ガイド. 日本血栓止血学会誌(0915-7441)26巻6号 Page 658- 668(2015.12)

[産業財産権]

○取得状況(計3件)

1. 名称：歯周病特異的ペプチド、並びにそれを用いた歯周病の治療および診断
発明者：橋口照人、他
権利者：国立大学法人 鹿児島大学
種類：特許
番号：特許第5961809号
取得年月日：平成28年7月8日
国内外の別：国内

2. 名称：N結合型糖鎖を利用した消化器癌の検査方法
発明者：橋口照人、他
権利者：国立大学法人 鹿児島大学
種類：特許
番号：特許第5856048号
取得年月日：平成27年12月18日
国内外の別：国内

3. 名称：糖尿病性腎症患者の病態把握方法
発明者：橋口照人、他
権利者：国立大学法人 鹿児島大学
種類：特許
番号：特許第4871173号
取得年月日：平成23年11月25日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋口 照人(HASHIGUCHI TERUTO)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：70250917

(2)研究分担者

山口 宗一(MUNEKAZU YAMAKUCHI)
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授
研究者番号：60709301

清水 利昭(SHIMIZU TOSHIAKI)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号 50468055

大山 陽子(OYAMA YOKO)
鹿児島大学・附属病院・特任助教
研究者番号：20583470

竹之内 和則(TAKENOUCHI KAZUNORI)
鹿児島大学・附属病院・医員
研究者番号：30646758