

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03766

研究課題名(和文) 死細胞の貪食制御による脳虚血疾患の新規治療コンセプトの提唱

研究課題名(英文) Proposal of a novel therapeutic concept for cerebral ischemic disease by regulation of efferocytosis

研究代表者

小田 ちぐさ (Nakahashi-Oda, Chigusa)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50510054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳虚血、死細胞の貯留、炎症、神経細胞障害という脳梗塞カスケードにおける免疫系、特にマクロファージとその表面分子CD300aによる貪食抑制の分子メカニズムを明らかにした。また、貪食ブレーキであるCD300aを阻害することによる脳虚血疾患の分子標的治療の具現化につながる基盤的知見を得た。具体的には、脳虚血によって出現してくる死細胞に対する貪食を、CD300aを阻害することによって亢進させると脳梗塞後の神経障害が軽減することから、CD300aが脳梗塞後の分子標的治療候補として考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞においては、神経細胞等の脳細胞が死滅し、死細胞由来の炎症が様々な神経症状を誘導するため、死細胞を早期に除去することができれば、脳梗塞による神経障害を最小限に食い止めることができると考えられる。本研究では、CD300aを欠損、もしくは抗CD300a抗体の投与によってその機能を阻害すると、マクロファージによる死細胞の貪食を亢進させることが可能となり、マウス脳梗塞モデルにおける神経障害が軽減することを見いだした。本研究の成果は、脳梗塞後の神経障害克服の実現へ向けた一歩になるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the molecular mechanism of efferocytosis inhibition by the immune system, especially by macrophages and their surface molecule CD300a, in the cerebral infarction cascade of cerebral ischemia, accumulation of dead cells, inflammation, and neuronal damage. In addition, we obtained fundamental findings that will lead to the realization of molecularly targeted therapy for cerebral ischemic diseases by inhibiting CD300a. Specifically, the inhibition of CD300a enhances efferocytosis that emerge as a result of cerebral ischemia and reduces neurological damage after cerebral infarction, suggesting that CD300a is a candidate for molecularly targeted therapy after cerebral infarction.

研究分野：免疫学

キーワード：脳梗塞 死細胞貪食 免疫受容体 マクロファージ CD300a 炎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳虚血における神経障害

血栓あるいは塞栓により脳組織の血流が途絶し虚血が始まると、神経細胞死が認められる梗塞巣に加えて、周辺の可逆的な領域であるペナンプラでは、発症1～3時間で炎症細胞の浸潤を認め、発症6時間を越えると神経細胞の死が始まる。すなわち、脳虚血の開始時は未病あるいはごく軽度の神経障害であり、その病態は可逆的であるが、ペナンプラでの炎症が遷延化すると、神経細胞死が誘導され、神経障害の不可逆化が成立する。これらのイベントカスケードの中で、貯留した死細胞に由来する DAMPs (Damage-associated molecular pattern) が誘導する免疫応答による炎症反応が、カスケードを増幅させ、神経障害の不可逆化の誘因となることが示唆されている (Eltzschig et al. *Nat Med* 2011)。したがって未病の時期に、死細胞の除去を促進させることによって DAMPs が誘導する炎症を制御することができれば、病態を可逆的に回復させたり、神経障害の軽減あるいは不可逆化を遅延することが可能と考えられる。しかし、この神経障害に至る一連のイベントカスケードの病理とその分子機構は十分に解明されていない。

(2) 死細胞のクリアランス制御メカニズム

ヒトの体内では毎秒 100 万個以上の細胞にアポトーシスが誘導されるが、通常はマクロファージなどの貪食細胞による死細胞の貪食が速やかに行われているために、生体の恒常性が維持されている。しかし一方で、貪食機能の過度の亢進は、貪食されるべきでない生細胞の貪食による、血球貪食症候群などの疾患につながる。したがって、生体には貪食機能の適切な制御が必須である。貪食は、死細胞や活性化した細胞で表出してくる膜リン脂質、PS を目印に、貪食細胞上の Tim-1, Tim-3, Stabilin-2, BAI1, CD300b, GAS6-TAM receptor や MFG-E8 (Milk fat globule-EGF-factor 8)- integrin などの PS 受容体が結合することによって開始されるが、この PS と結合する貪食細胞上の PS 受容体は、貪食を開始、促進させる受容体のみがこれまで報告されている (Elliott et al. *Developmental Cell* 2016)。しかし、PS を介した貪食を負に制御する機構については不明であった。

(3) 免疫受容体 CD300a

申請者らは、貪食細胞などの骨髄球系細胞に発現する抑制性免疫受容体である CD300a を同定し、CD300a が新しい PS 受容体であることを明らかにしてきた (Yotsumoto et al. *J Exp Med* 2003, Nakahashi-Oda et al. *BBRC* 2012, Nakahashi-Oda et al. *J Exp Med* 2013, Nakahashi-Oda et al. *Nat Immunol*, 2016)。加えて最近、申請者らは、マクロファージ上に発現する CD300a が PS と結合して、貪食を抑制しているというこれまで知られていなかった現象を見いだした。また、CD300a を阻害、もしくは CD300a を欠損させたマウスでは、コントロールマウスと比較して、脳虚血再灌流モデルにおける神経学的症状 (Bederson et al. *Stroke* 1986) の軽減および梗塞巣の縮小が認められた。CD300a は貪食を負に制御する新たな PS 受容体である可能性があり、CD300a を阻害することで、脳虚血による神経障害が改善する可能性があるが、そのメカニズムについては詳細な解析が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、虚血ストレスにより誘導される死細胞の貯留を起点とし、死細胞の貯留→炎症→神経細胞障害という脳梗塞カスケードにおける免疫系の関与を明らかにする。特に貪食ブレーキである CD300a の阻害が、神経障害を可逆的に回復させ、その不可逆化を予防できる有力な鍵因子であることを確認し、その分子機構を詳細に解明することで、脳虚血疾患の分子標的療法の開発の基盤となる知見を集積させる。

3. 研究の方法

本研究では、1) 脳虚血→死細胞の貯留→炎症→神経細胞死→神経障害という脳梗塞カスケードを、CD300aを介した死細胞のクリアランスという観点から明らかにするとともに、2) CD300aによる貪食抑制メカニズムを明らかにし、3) ヒト細胞、ヒト化マウス脳虚血モデルにおける解析を行うことで、貪食ブレーキ CD300a をターゲットとした脳虚血疾患の分子標的治療の基盤的知見を集積させる。

4. 研究成果

(概要)

本研究では、脳虚血→死細胞の貯留→炎症→神経細胞障害という脳梗塞カスケードにおける免疫系、特にマクロファージとその表面分子 CD300a による貪食抑制の分子メカニズムを明らかにした。また、貪食ブレーキである CD300a を阻害することによる脳虚血疾患の分子標的治療の具現化につながる基盤的知見を得た。具体的には、脳虚血によって出現してくる死細胞に対する貪食を、CD300a を阻害することによって亢進させると脳梗塞後の神経障害が軽減することから、CD300a が脳梗塞後の分子標的治療候補として考えられた。

(1) CD300a を介した死細胞クリアランスを起点とした脳梗塞カスケードの解明

本研究では、マクロファージで特異的に CD300a を欠損するマウス (*Cd300a^{fl/fl}Lyz2-Cre*) とコントロールマウス(*Cd300a^{fl/fl}*)に中大脳動脈を閉塞する(MCAO)ことによる脳梗塞モデルを作製した。

CD300a 欠損マウスでは、コントロールマウスと比較して著明に神経症状が軽減し、脳の神経細胞の脱落が有意に減少していることが明らかになっ

ていた。CD300a のリガンドである PS が脳梗塞誘導後 1 時間という極早期から脳で発現していることより、脳梗塞後 1 時間、3 時間での脳に浸潤してくる免疫細胞の single-cell RNA sequence を行い、CD300a 欠損マウスとコントロールマウスで RNA の発現を比較した。その結果、CD300a 欠損マウスではコントロールマウスと比較して脳梗塞後 1 時間の Ly6C^{hi} 単球由来マクロファージでエフェロサイトーシス関連遺伝子の発現亢進が認められた。従って、生体でのエフェロサイトーシスを解析するために、脳組織細胞と浸潤貪食細胞が違う蛍光を発現している骨髄キメラマウス (*Tg(EGFP)/Cd300a^{fl/fl} LysM-Cre/Td-Tomato-Cre* マウス)を作製し、脳梗塞を誘導したところ、CD300a 欠損マウスではコントロールマウスと比較して、脳梗塞後脳に浸潤してきた単球由来マクロファージでエフェロサイトーシスが亢進していることが示された

(図1)。さらに、CD300a 欠損マウスではコントロールマウスと比較して、脳梗塞後に DAMPs とそれに伴う脳梗塞巣周囲のペナンプラ領域での炎症が減少し、さらに、18 時間後のペナンプラでの神経細胞死の減少が認められた。実際、エフェロサイトーシスを阻害する蛋白(D89E-MFGE8)を予め投与した CD300a 欠損マウスで

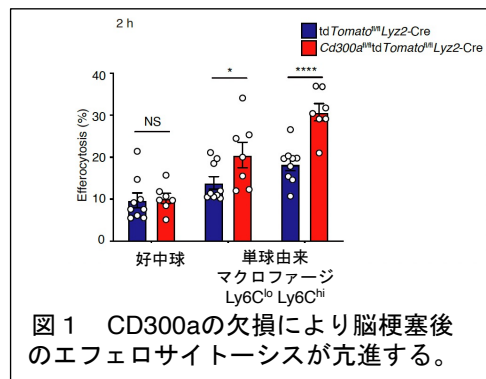
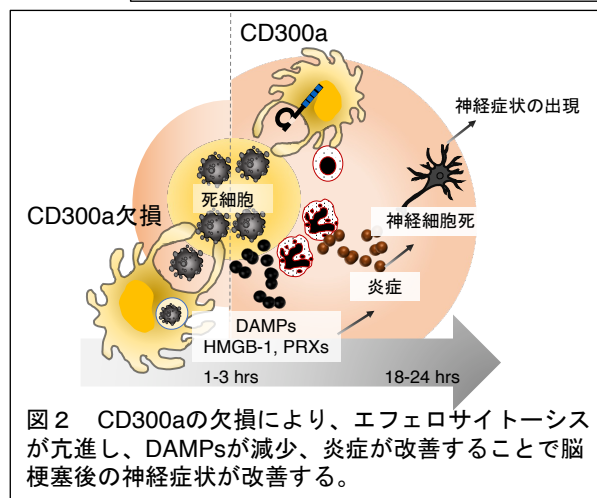


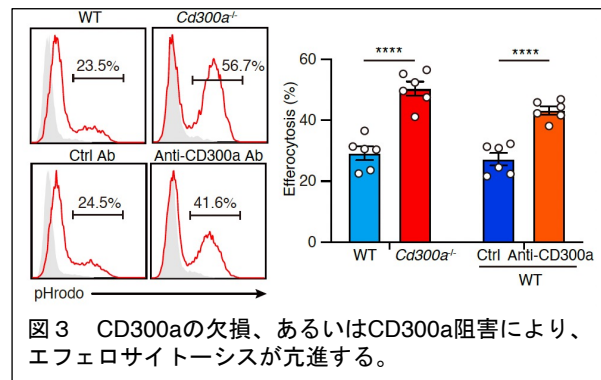
図1 CD300aの欠損により脳梗塞後のエフェロサイトーシスが亢進する。



は神経障害の軽減および DAMPs の減少が見られなかったことから、CD300a 欠損マウスにおける神経障害の軽減はエフェロサイトーシスが亢進したことによるものと考えられた (図2)。

(2) CD300a による食食抑制メカニズムの解明

CD300a はその細胞内領域の ITIMs (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) により、チロシンの脱リン酸化を誘導することで、骨髄球系細胞の活性化を負に制御する抑制性シグナルを細胞に伝達する。したがって、チロシンリン酸化を介して食食に関与する PS 受容体である MerTK (Todt et al. *J Leukoc Biol* 2004)、もしくは CD300b (Murakami et al. *Cell Death Differ* 2014) が、CD300a の標的となる食食促進 PS 受容体である可能性が高いと考えられた。よって、抗 MerTK、抗 CD300b 中和抗体を用いてマクロファージによる死細胞の食食を解析した。MerTK、CD300b のいずれもが発現している CD300a 欠損、もしくはコントロールマウスの腹腔マクロファージを用いて、食食されると蛍光を発する pH 依存性の蛍光色素をラベルした死細胞と共培養すると、CD300a が欠損しているマクロファージ、もしくは CD300a を抗体で阻害したマクロファージではエフェロサイトーシスが亢進した (図3)。このエフェロサイトーシスの亢進は、抗 MerTK 抗体では阻害されなかったが、CD300b 欠損由来のマクロファージでは、CD300a の阻害によるエフェロサイトーシスの亢進が消失したことから、CD300a は、エフェロサイトーシスを促進させる受容体である CD300b を抑制していることを明らかにした。



(3) ヒト細胞における CD300a の機能解析

脳虚血後3時間で、同じ神経症状を示す野生型マウスに抗 CD300a 阻害抗体、もしくはコントロール抗体を投与すると、抗 CD300a 阻害抗体を投与したマウスでは、著明に神経症状が軽減していた。このことは、脳虚血発症後の CD300a を標的とした治療の可能性を示唆している。したがって、ヒト細胞を用いた CD300a の解析を進めた。まず、抗ヒト CD300a 中和抗体を作製し、ヒト末梢血単球分画における CD300a の発現、および PS と CD300a との結合阻害効果を確認した。さらに、ヒト末梢血から単球を単離して死細胞との共培養を行い、抗ヒト CD300a 中和抗体、もしくはコントロール抗体を加えた。抗ヒト CD300a 中和抗体はコントロール抗体と比較してエフェロサイトーシスが亢進することを見いだした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 小田（中橋）ちぐさ、澁谷彰	4. 巻 275
2. 論文標題 肥満細胞自らがアレルギー応答を制御する仕組み	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 822-823
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小田ちぐさ、柴垣翔平、田原聡子、澁谷彰	4. 巻 41
2. 論文標題 マスト細胞に発現する抑制性受容体Allergin-1、CD300aによるアレルギー制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 17-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakazawa Yuta, Ohtsuka Shigeo, Nakahashi-Oda Chigusa, Shibuya Akira	4. 巻 203
2. 論文標題 Cutting Edge: Involvement of the Immunoreceptor CD300c2 on Alveolar Macrophages in Bleomycin-Induced Lung Fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3107 ~ 3111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Wang Yaqiu, Nakahashi-Oda Chigusa, Okayama Yoshimichi, Shibuya Akira	4. 巻 144
2. 論文標題 Autonomous regulation of IgE-mediated mast cell degranulation and immediate hypersensitivity reaction by an inhibitory receptor CD300a	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 323 ~ 327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2019.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujiyama Satoshi, Nakahashi-Oda Chigusa, Abe Fumie, Wang Yaqiu, Sato Kazuki, Shibuya Akira	4. 巻 31
2. 論文標題 Identification and isolation of splenic tissue-resident macrophage sub-populations by flow cytometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 51 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakazawa Y, Nishiyama N, Koizumi H, Kanemaru K, Nakahashi-Oda C (Co-corresponding author), Shibuya A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Tumor-derived extracellular vesicles regulate tumor-infiltrating regulatory T cells via the inhibitory immunoreceptor CD300a	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.61999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakahashi-Oda C, Fujiyama S, Nakazawa Y, Kanemaru K, Wang Y, Lyu W, Shichita T, Kitaura J, Abe F, Shibuya A.	4. 巻 64
2. 論文標題 CD300a blockade enhances efferocytosis by infiltrating myeloid cells and ameliorates neuronal deficit after ischemic stroke.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abe7915	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小泉仁志、小田ちぐさ、渋谷彰	4. 巻 33
2. 論文標題 敗血症と免疫反応	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 救急集中治療	6. 最初と最後の頁 1025-1030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Y, Wang;C, Nakahashi-Oda;A, Shibuya
2. 発表標題 Autonomous regulation of mast cell degranulation through an inhibitory receptor CD300a
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta, Nakazawa;Chigusa, Nakahashi-Oda;A, Shibuya
2. 発表標題 Involvement of the immunoreceptor CD300c2 on alveolar macrophages in bleomycin-induced lung fibrosis
3. 学会等名 9th international DAMPs and Alarmins symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta, Nakazawa;Chigusa, Nakahashi-Oda;A, Shibuya
2. 発表標題 An inhibitory immunoreceptor CD300a suppresses tumor infiltrating Treg cells and tumor development through binding to phosphatidylserine on tumor-derived exosomes
3. 学会等名 48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koizumi H, Fujiyama S, Oda C, Shibuya A
2. 発表標題 The role of immune-inhibitory receptor CD300a in acute renal ischemia-reperfusion
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishiyama N, Fujiyama S, Oda C, Shibuya A
2. 発表標題 Interferon- promotes the survival and function of induced regulatory T cells
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Oda C, Kanemaru K, Wang Y, T Shichita , Kitaura J, Shibuya A
2. 発表標題 Enhanced efferocytosis by macrophages ameliorates neuronal deficit in CD300a-deficient mice after ischemic stroke
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小田ちぐさ
2. 発表標題 CD300aの遮断は脳梗塞後の骨髄球系細胞によるエフェロサイトーシスを亢進する
3. 学会等名 第30回東京免疫フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------