

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：26201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17840

研究課題名（和文）単球サブセットの分化制御とM<sub>1</sub>のクリアランス障害に対するセマフォリンの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of Semaphorin against differentiation control of monocyte subsets and impaired macrophage clearance.

研究代表者

山口 航（Yamaguchi, Wataru）

香川県立保健医療大学・保健医療学部・助教

研究者番号：70611713

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000 円

研究成果の概要（和文）：免疫不全マウスの多くで脾臓組織に鉄が蓄積すると報告されている。免疫不全を呈するSema4D欠失マウスを用いて観察したところ、同様に脾臓への鉄蓄積を認めた。本研究ではその原因を明らかにすることを目的とした。鉄は赤血球に由来し、老廃した赤血球が脾臓の赤脾髄マクロファージにより貪食されて貯蔵される。我々はSema4D欠失マウスにおいて、赤脾髄マクロファージの貪食能が亢進していること、その細胞数が増加していることを明らかにした。以上のことから、赤脾髄マクロファージの増加により脾臓組織への鉄蓄積が増加したと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫不全は重篤な感染症を繰り返し引き起こし、また鉄の代謝異常は貧血や鉄過剰症に繋がることがあり、その関連について研究することは非常に重要である。これまでは感染症に伴うヘプシジンホルモンの影響により鉄が蓄積すると考えられていた。しかし本研究では免疫不全を呈するマウスにおいて、赤脾髄マクロファージの増加を認め、その鉄代謝バランスの異常により脾臓に鉄が蓄積することを明らかにし、新たな鉄蓄積のメカニズムを報告した。

研究成果の概要（英文）：Iron has been reported to accumulate in the spleen tissue of many immunodeficient mice. Particularly, splenic iron accumulation was observed in immunodeficient Sema4D-deficient mice, and its cause was aimed to be elucidated in this study. Iron that accumulates in the spleen is derived from erythrocytes, wherein waste erythrocytes are phagocytosed and stored by splenic red pulp macrophages. We showed that the phagocytic capacity of the red pulp macrophages was enhanced and the number of the cells was increased in Sema4D-deficient mice. These suggest that the increase in red pulp macrophages increased the splenic iron accumulation.

研究分野：血液・腫瘍内科学

キーワード：鉄代謝 赤脾髄マクロファージ セマフォリン 免疫不全

### 1. 研究開始当初の背景

鉄は赤血球の酸素運搬をはじめとする生命現象に必要な不可欠の原子であるが、逆に過剰になると活性酸素を産生し毒性を呈するため、体内での量的多寡は厳密に制御されている。生体内には約 3~5g の鉄があると推測され、その約 70% がヘム鉄として赤血球細胞に存在し、約 20~30% が貯蔵鉄（フェリチン、ヘモジデリン）として網内系（肝臓や脾臓など）に貯蔵されている。赤血球の寿命は 120 日であることから、毎日全体の 1/120 の赤血球が老化により処理される。この処理を脾臓のマクロファージが担っており、老化した赤血球から鉄を回収している。定常状態での 1 日 20~25mg とされる赤血球造血への鉄供給は、殆どがこのマクロファージから回収された鉄である。

マクロファージに貪食された老化赤血球は、活性酸素と加水分解によりヘムを放出し、 $\text{Fe}^{2+}$  が分離してくる。その後  $\text{Fe}^{2+}$  は PCBP1 を担体として細胞質を移動し、フェリチンに貯蔵されるか、細胞膜上の膜蛋白フェロポーチンを介してマクロファージ外へ運ばれる。門脈側に輸送された  $\text{Fe}^{2+}$  は、腸管上皮細胞の基底膜に発現する鉄酸化酵素ヘファスチンによって  $\text{Fe}^{3+}$  に酸化された後、鉄輸送タンパク質トランスフェリンに結合して末梢組織に輸送され、最終的に骨髄へと運搬された鉄は新たな赤血球の産生に用いられる。フェロポーチンの発現は、肝臓から分泌されるペプチドホルモンのヘプシジンにより制御されており、血清鉄が十分に存在する時には、ヘプシジンはフェロポーチンに結合してリン酸化し、エンドサイトーシスの後分解に導く。この制御により、ヘプシジンは体内への鉄の取り込みを負の方向に制御するホルモンとして機能する。

また体内の鉄代謝調節には生体への外部からの細菌侵入に対する防御システムの側面もある。細菌の増殖には鉄が必要であり、生体は血清鉄を下げ細菌が利用できる鉄を制限することにより増殖を抑制するもので、自然免疫における重要な機構と考えられている。感染症の罹患により IL-6 等の炎症性サイトカインが大量に産生されると、ヘプシジン分泌が増加し、フェロポーチン蛋白の分解が亢進し、腸上皮細胞から循環へ入る鉄の制限およびマクロファージからの鉄移動も制限される。結果、循環中への鉄供給量は低下し、細菌の鉄利用は制限され、増殖抑制に働くと考えられる。

自然免疫は病原体が体内に侵入して最初にはたらく原始的な防御機構で、貪食能を有する単球はマクロファージ、樹状細胞、破骨細胞に分化するため自然免疫の起源細胞ともいえる。病原体のみならず生体内で不要となった細胞を取込んで分解除去作用を持つマクロファージは、脾臓組織の白脾髄ではアポトーシスを起こした B 細胞を貪食し、赤脾髄では老廃赤血球を貪食する。死細胞が eat-me シグナルを出すと受容体を介して Rac1 を活性化して lamellipodia 領域にて貪食し、RhoA の活性化は逆に貪食作用を抑制することがわかっている。この貪食作用の破綻は SLE 等の自己免疫疾患の原因である可能性が考えられ、様々な免疫系疾患に関与することが示唆されている。

Sema4D は受容体 Plexin を介してさまざまな RhoGTPase を制御することが知られている。我々はこれまでに RhoA を活性化して樹状突起スパインを制御すること、髄鞘形成細胞のアポトーシスを制御することを報告した。また、Sema4D 結合により活性化した受容体は、活性型の Rac1 を結合させ、下流の PAK シグナルを抑制することがわかっている。さらに Sema4D 欠失マウスは加齢とともに辺縁帯 B 細胞数が増加し、自己抗体価の上昇を認めることが報告されている。

### 2. 研究の目的

自然免疫細胞は病原体ならびに生体内で不要となった細胞を貪食分解するクリアランス機能を有している。セマフォリン分子は単球やマクロファージなどの自然免疫を司る細胞についてほとんど調べられていない。そこで Sema4D 欠失マウスを用いて自然免疫系細胞を解析したところ、脾臓組織への鉄蓄積を認めた。

本研究ではこの成果を発展させ、脾臓組織への鉄蓄積の原因究明と、死細胞取込みに Sema4D シグナル下流の RhoA および Rac1 が関与するかを明らかにする。抗炎症性単球を増加させることによって炎症性疾患の予防や治療に繋げるとともに、死細胞クリアランス障害による自己免疫疾患発症機序の 1 つを明らかにすることを目指す。

### 3. 研究の方法

マウスは 8 週齢と 32 週齢の野生型と Sema4D 欠失マウスを用いた。各週齢のマウスの脾臓組織標本作製し、鉄染色ならびに各種抗体を使用して免疫組織化学染色を実施した。生化学検査は心臓より全血採取した後、血清を分離し、各種測定キットあるいは検査センターに外部委託して測定した。赤血球数とヘモグロビン濃度の測定も外部施設に依頼した。貪食能は *in vitro* と *in vivo* で検討を行った。まず *in vitro* では、脾臓組織から細胞を回収し、24 ウェルプレートに播種した後、蛍光標識した赤血球を加えて 37℃ で 90 分インキュベーションした。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後に細胞を回収し、フローサイトメトリを用いて F4/80 陽性細胞のうちの蛍光

標識した赤血球を取り込んでいる割合を測定して算出した。さらに外因性に Sema4D-Fc を添加して救済実験も実施した。次に *in vivo* では、同じく蛍光標識した赤血球を尾静脈より注入し、24 時間後に脾臓組織を回収し、先ほどと同じくフローサイトメトリにて測定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) Sema4D 欠失マウスの脾臓における鉄蓄積

マウス脾臓組織を鉄染色したところ、10 週齢では差がなかったものの、32 週齢では欠失マウスで明らかな増加を認めた (図 1)。同様に、脾臓組織の含有鉄量ならびに血清フェリチン量も欠失マウスで著増していた。

##### (2) ヘプシジンへの影響

肝臓で産生されるヘプシジンは鉄代謝に関与し、マクロファージなどに発現するフェロポーチン蛋白を制御して血中への鉄供給量を調整している。肝臓組織におけるヘプシジンの mRNA 量と脾臓組織におけるフェロポーチン蛋白の発現量を測定したところ、差を認めなかった。

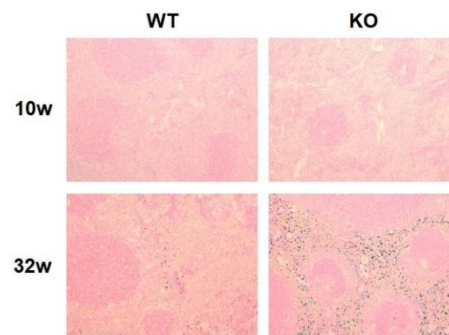


図 1 32 週齢の欠失マウスにおける脾臓組織の鉄蓄積

##### (3) 脾臓マクロファージの貪食能

これまでに報告されている免疫不全マウスにおける鉄蓄積について、多くの場合、脾臓マクロファージの貪食能の亢進が認められている。そこで我々も貪食能について検討したところ、Sema4D 欠失マウスにおいて貪食能の亢進を認めた。Sema4D シグナル下流の RhoA などの RhoGTPase の関与を疑い、外因性 Sema4D 添加による救済実験を行ったところ、変化はなかった。

よって、Sema4D が受容体 Plexin を介して RhoA を制御することで貪食能を抑制する仮説は否定された。次に脾臓マクロファージ

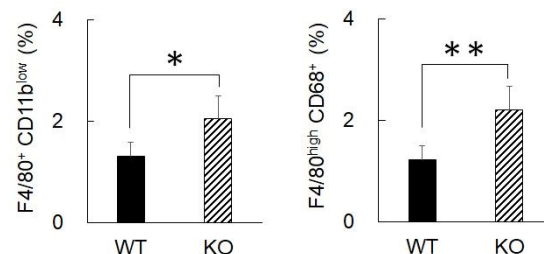


図 2 32 週齢の欠失マウスにおける赤脾髄マクロファージの増加

に占める赤脾髄マクロファージの割合について検討した。フローサイトメトリを用いて赤脾髄マクロファージの割合を測定したところ、Sema4D 欠失マウスにおいて有意に増加していた (図 2)。以上のことから、脾臓組織のマクロファージに占める赤脾髄マクロファージの割合が増加したことにより欠失マウスにおいて貪食能が亢進し、鉄が脾臓に蓄積したと考えられた。

##### (4) 鉄の局在変化に伴う生体への影響

欠失マウスにおいて、脾臓への鉄蓄積により血清フェリチンが上昇していたことから、鉄に関する生化学検査を実施した。8 週齢マウスでは影響なかったものの、32 週齢マウスでは不飽和鉄結合能を除く、血清鉄ならびに総鉄結合能が低下していた。血清鉄低下に伴い、貧血を疑ったが、赤血球数の減少およびヘモグロビン濃度低下を認めなかった。そこで赤血球の造血能について調べたところ、欠失マウスにおいて網状赤血球の増加を認めた。さらに赤血球寿命について検討したところ変化はなかった。以上のことから、赤脾髄マクロファージの増加により老廃赤血球の貪食が亢進しているものの、代償性に赤血球産生能が上昇することで、貧血には至っていないと考えられた。しかしながら、さらに脾臓組織への鉄蓄積がすすみ、鉄の局在変化により血清鉄の低下が著明になると、貧血状態に陥る可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 山口航 宜保明季 眞鍋紀子	4. 巻 12
2. 論文標題 カルシウム再加時間における容易なフィブリン検出法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床検査学教育学会機関誌	6. 最初と最後の頁 7-11
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 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 山口航 宜保明季 眞鍋紀子	4. 巻 12
2. 論文標題 学生実習用に改良したガラス反応板を用いたカルシウム再加時間におけるフィブリン検出法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床検査学教育学会機関誌	6. 最初と最後の頁 139-145
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 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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山口航 眞鍋紀子
2. 発表標題 血漿カルシウム再加時間における容易なフィブリン検出の検討
3. 学会等名 日本検査血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宜保明季 山口航 眞鍋紀子
2. 発表標題 カルシウム再加時間における容易なフィブリン検出の検討 -ガラス平板を使用した場合-
3. 学会等名 日本臨床検査学教育学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wataru Yamaguchi
2. 発表標題 Number of residual platelets in the measurement specimen affects the measurement of monocyte-platelet aggregates
3. 学会等名 International Society for Laboratory Hematology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口航 近藤明宏 池亀彰茂
2. 発表標題 ADVIA2120を用いた血小板吸光度サイトグラムにおけるNeutrophil Extracellular Traps(NETs) 検出の検討
3. 学会等名 日本検査血液学会
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
---------	---------