

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659292

研究課題名(和文)赤血球によるケモカインの吸着と放出のメカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Investigation on the chemokine kinetics through red blood cells

研究代表者

萱場 広之 (KAYABA, Hiroyuki)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70224706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：1)日本人の殆どは赤血球上にRANTES等の数種類のケモカインと結合するダフィー抗原(DARC)を発現し、中にはRANTESの他、DARC親和性のEotaxin, MCP-1が蓄積されている。2)RANTES溶液中に赤血球を入れるとRANTESは速やかに取り込む。3)赤血球内RANTESは膜機能低下あるいは崩壊によって血球外に漏出する。4)赤血球上のDARCの発現はRANTES添加培養液内では有意に低下する。5)赤血球は老化に伴ってDARC、CD47の発現低下を伴う。6)赤血球膜のIntegrityは蓄積したケモカインの保持に重要と考えられるが、それは浸透圧変化、pH変化に影響を受ける。

研究成果の概要(英文)：Red Blood Cells (RBCs) express Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) on the surface. DARC is a decoy receptor with no signal transduction into RBC and binds to several chemokines such as IL-8, MCP-1, Eotaxin and RANTES. RANTES was recognized in RBCs, but not on the surface. When compared the concentrations of IL-1beta, TNF-alpha, VEGF, RANTES, Eotaxin, MCP-1, IL-8 in the washed RBC supernatant before and after hemolysis, RANTES, Eotaxin and MCP-1 showed marked increase after hemolysis. This finding showed that RBCs absorb chemokines which have high affinity to DARC. RANTES was absorbed by RBCs rapidly. Intracellular RANTES concentration reached almost the maximum level within 10 minutes. DARC expression decreased in the presence of RANTES. The expression of DARC and CD47 decreased in senescent RBCs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、病態検査学

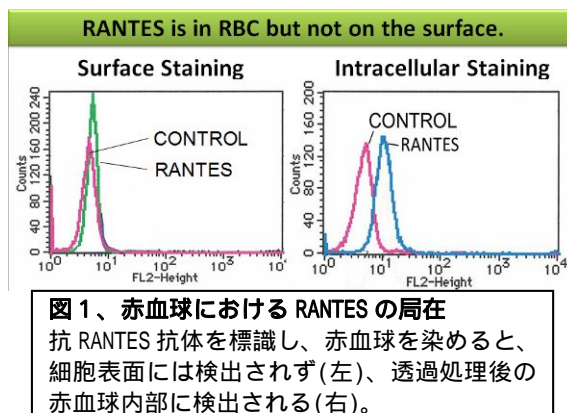
キーワード：赤血球 ケモカイン アレルギー 臨床マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

ケモカインは白血球の炎症病巣への集族に深く関与することが知られている。赤血球表面に発現している Duffy 抗原(以下、DARC)は複数のケモカインと結合する。炎症病巣近傍で産生されたケモカインは局所で濃度勾配を形成して白血球の炎症病巣への集族を誘導すると考えられているが、血管内ではDARCを発現する赤血球によって素早く持ち去られると考えられる。また、赤血球がケモカインを貯蔵する可能性が示唆されている。一方で赤血球内にケモカインがどの程度貯蔵されるのか、あるいは逆に赤血球からケモカインが放出されることはあるのか、あるとすればどのような条件と機序によって起るのかなど、様々な疑問が生じる。我々はすでにフローサイトメトリーを用いて赤血球内にDARCに結合するケモカインの1つであるRANTESが蓄積されていることを確認している(図1)。赤血球へのケモカイン吸着と放出のメカニズムを探ることで、アレルギーや感染症をはじめとする炎症性疾患の病態の新しい側面を明らかとするとともに、赤血球内ケモカインの診断治療面での臨床応用の糸口を発見できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

- 1) 赤血球内にRANTESなどのDARC親和性ケモカインが蓄積されていることを確認する。
- 2) 赤血球を異なるケモカイン濃度下で一定時間培養し、赤血球内および上清中のケモカイン濃度を測定する。
- 3) DARCの発現量がケモカイン蓄積量や、ケモカイン吸着力とどのように関係するのか検討する。
- 4) 赤血球上のDARC発現量の調節メカニズムを検索する。まず赤血球の老化に伴う発現量の変化について明らかとする。



## 3. 研究の方法

- 1) EDTA採血管に採取した血液を遠心分離し、血小板や白血球の混入をさけてPBSにて洗浄した濃厚赤血球を検体とした。
- 2) 赤血球表面DARC発現、RANTES細胞内含有の確認には、フローサイトメーター (FacsScan, BD, NJ, USA および FACS Canto II, BD, NJ, USA) による測定を用いた。
- 3) 赤血球のサイズおよび形状の評価: 自動血球測定装置 (XE-5000, Sysmex, Japan) およびフローサイトメーターによる評価を用いた。
- 4) ケモカインが赤血球内に蓄積されるかどうか、またDARC親和性のケモカインとサイトカインで蓄積量に差がでるかを調べるために、溶血前後のケモカイン濃度を測定した。DARC親和性ケモカインには、表1に示すように、代表的なものとして、RANTES、Eotaxin、IL-8などがあり、いずれも高い親和性を有している。今回は表1中の親和性の高いものからRANTES、Eotaxin、MCP-1、GRP-、IL-8を選択した。また、対象としてサイトカインとしてIL-1、TNF-、VRGFを測定した。各々のケモカイン、サイトカインの生体内での機能を表2、3にまとめた。IL-1、IL-8、Eotaxin、MCP-1、TNF-、VEGFはマルチプレックスアッセイ (Bio-Plex Pro™ Assays, BIORAD) を使用し、RANTESは (Quantikine, R&D) を使用した。
- 5) RANTESの濃度によって赤血球内のRANTESの蓄積量に変化が出るのかを調べるために、赤血球とRANTES (0ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml) を37度で培養し、溶血前上清と溶血後上清のRANTES濃度を測定した。
- 6) RANTESの存在下において赤血球表面のDARC発現量に変化が出るかを調べるために赤血球とRANTES (0ng/ml, 10ng/ml) を37度にて培養し24時間後の赤血球表面のDARC発現量を測定した。

## 4. 研究成果

- 1) RANTESは赤血球表面ではなく赤血球内に存在する

赤血球表面に発現するDARCにRANTESなどのDARC親和性ケモカインが結合する。しかし、DARC親和性ケモカインが赤血球表面にそのまま保持されるのか、あるい

は Internalize して赤血球内に蓄積するのは不明であった。溶血前後で有意差があったのは DARC 親和性のある Eotaxin、MCP-1、RANTES のみであった。対照として測定したサイトカイン、IL-1、TNF- $\alpha$  は測定感度以下であった。DARC 親和性のある IL-8 はごく微量を測定するのみで溶血前後に有意差はなかった。VEGF は DARC 親和性はないが、MCP-1 よりも溶血前後にて高濃度を測定した。しかし溶血前後の有意差は認められなかった(図2)。図2の右グラフ(RANTES)を個体ごとに表示したのが図3である。上昇の度合いは個人差が大きい。何らかの慢性炎症などによってケモカインの産生量に相当の差がある可能性がある。

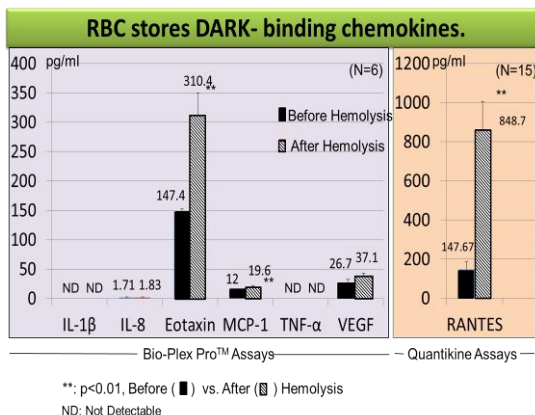


図2、溶血前後の上清ケモカイン濃度、DARC親和性ケモカインが選択的に赤血球内に貯留されている。(Mean  $\pm$  SE で表示)

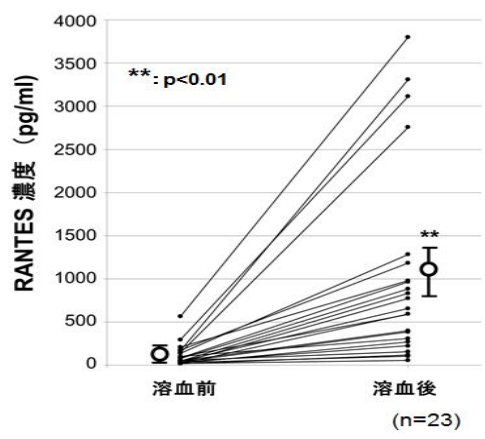


図3、溶血前後の上清の RANTES 濃度比較  
溶血後の濃度上昇のバラつきから、赤血球内 RANTES 濃度には相当な個人差があることが解る。(Mean  $\pm$  SE で表示)

## 2) RANTES は赤血球内に取り込まれ他は細胞膜とは結合せずに細胞内に存在する。

赤血球内に RANTES が存在することは確認したが、DARC が Internalize した後、ケモカインが膜裏に結合しているのか、あるいは細胞質内に膜と離れて存在するのかを観察した。赤血球は浮遊液の浸透圧を低下させていくと破裂し、あたかもブドウの実を出した後の皮のようになる。その状況はフローサイトメーターの FSC vs SSC サイトグラム上では図4のように赤血球表現される。RANTES の蛍光色素標識による染色では、破裂後の皮(デブリ)では蛍光のつよい集団は観察されず、RANTES は細胞膜に結合して存在するのではないことが解った。

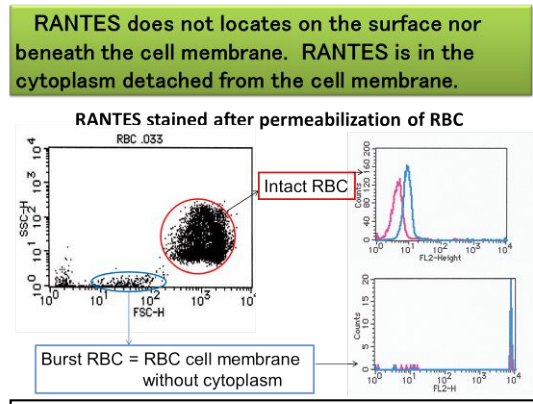


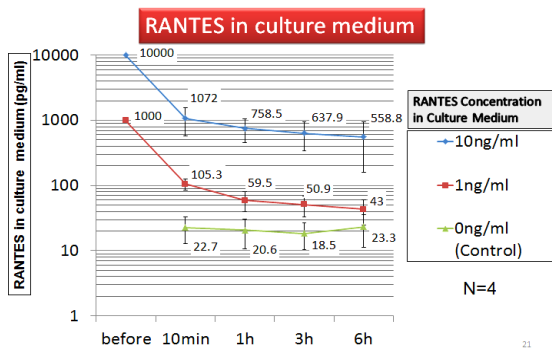
図4、RANTES 細胞内染色  
右上の で囲んだ細胞群は破裂前の細胞質が保たれている赤血球群であり、細胞内に RANTES が確認できる。左下の楕円で囲んだ一群は破裂後に細胞内容が飛び出し、膜のみが残

## 3) RANTES の赤血球への吸着は極めて短時間に行われる

赤血球を RANTES を 1ng/ml、および 10ng/ml 含む培養液 (RPMI1640) 内で 10分、1時間、3時間、6時間培養し、培養上清中の RANTES 濃度を測定した(図5)。さらに、洗浄後の赤血球を 1.5 倍の容積の蒸留水に浮遊して溶血させた上清の RANTES 濃度を測定した(図5)。赤血球を除いた培養上清中の RANTES 濃度は赤血球との培養後 10分ですでに十分の一まで減少していた。一方、赤血球内

RANTES 濃度は培養時間 10 分以内という極めて早い段階でプラトーに達していた。

RANTES was rapidly absorbed by RBC. ①



RANTES was rapidly absorbed by RBC. ②

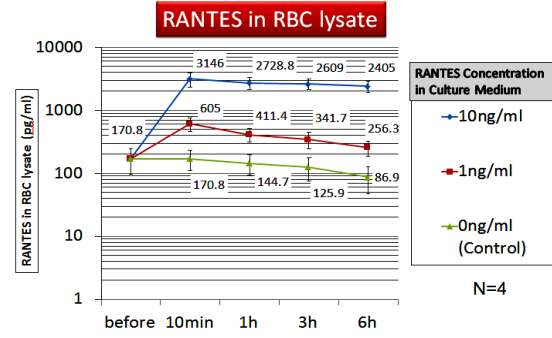


図5、RANTES 含有培地に赤血球を入れた場合の上清および赤血球内の RANTES 濃度の変化、赤血球への RANTES 吸着はすみやかに起こなわれていることが解る。(Mean ± SE で表示)

4) RANTES に長時間曝されると赤血球上の DARC 発現は低下する

培地に RANTES(10nM)を添加して、赤血球を 24 時間培養した場合、無添加の場合に比べて DARC 発現が低下することが解った(図6)。Internalize したことが推定されるが、細胞内 DARC については今後検討予定である。

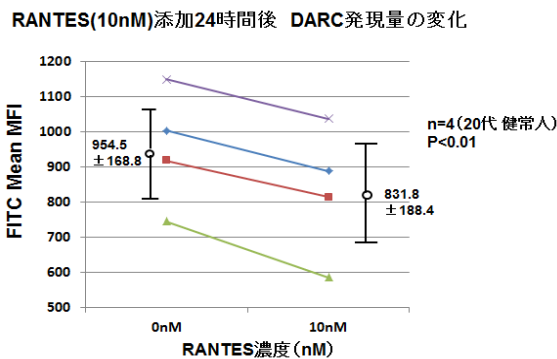


図6、RANTES 添加 24 時間後の DARC 発現量の変化 DARC 発現は RANTES によって低下する。(Mean ± SE で表示)

5) 老化した赤血球の DARC 発現は低下している

赤血球寿命は 120 日あまりである。4)で赤血球表面の DARC 発現は RANTES 曝露により若干減少することが観察されたため、生体内の赤血球は長期間にわたって DARC 親和性ケモカインに曝露されることにより、DARC 発現が低下している可能性がある。そこで老化赤血球と若い赤血球の DARC 発現を比較検討した。赤血球は老化に伴いサイズが小さくなると報告されており(図7)、流血中に出たばかりの赤血球と数か月流血中にあった赤血球のサイズに差が生じる。そこで我々はより多

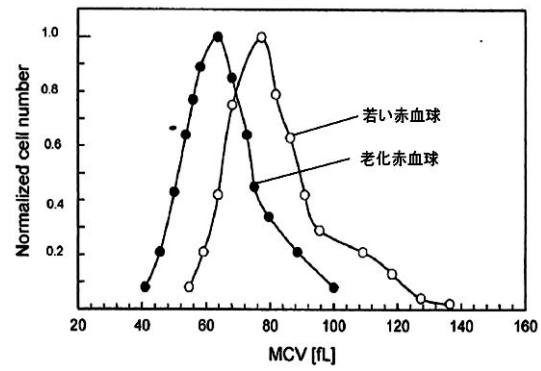


図7、若い赤血球と老化赤血球のサイズの差 Lasch J, et al, Clin Chem Lab Med 2000;38:629-32 より引用

くの若い赤血球が含まれると予想されるエリアとして、細胞サイズの指標である FSC の高い領域を選び、全体の細胞数の約 25%を占めるように設定した(図8、エリアA)、反対に老化赤血球が多いと推定される FSC の低い領域を選び、全体の細胞数の約 25%を占めるように設定した(図8、エリアB)。FCM サイトグラム上 RBC 細胞集団の FSC 上位 25%をゲートした場合には、Lasch ら(2000)の

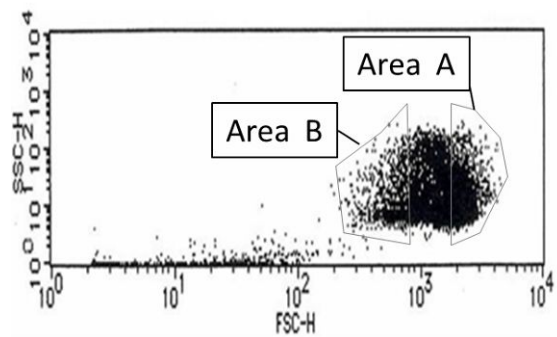
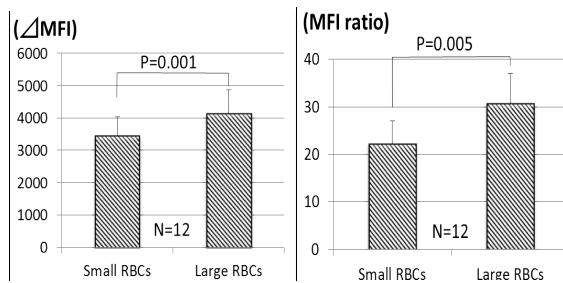


図8、赤血球サイトグラムによる分画設定 A,B 各々に約 25%の細胞が分画されるように設定する。

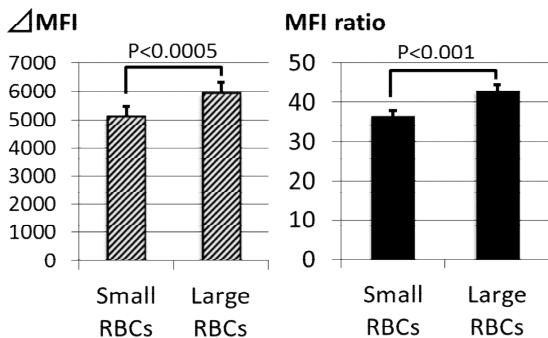


counterflow centrifugation 法による 8 分画のうち若い 2 分画が 40% 前後 (38 ~ 45%) 含まれ、最も多い比率を占めると推定された (図 7 を元にした解析による)。一方、FSC 下位 25% をゲートした場合は、同様に若い 2 分画が 40% 前後 (32 ~ 49%)、と最も多い比率を占めると推定された。

上記 Area A を Large RBCs、Area B を Small RBCs とすると、DARC 発現量の指標の MFI、発現密度の指標としての MFI ratio とともに Small RBCs で有意に低く、老化赤血球で DARC 発現の低下していることが確認された (図 9)。



**図 9、赤血球の加齢に伴う DARC 発現の変化**  
老化赤血球の比率の高い Small RBC 分画と若い赤血球の比率の高い Large RBCs 分画の DARC 発現比較を示す。MFI、MFI ratio とともに Small RBCs で有意に低い。(Mean ± SE で表示)

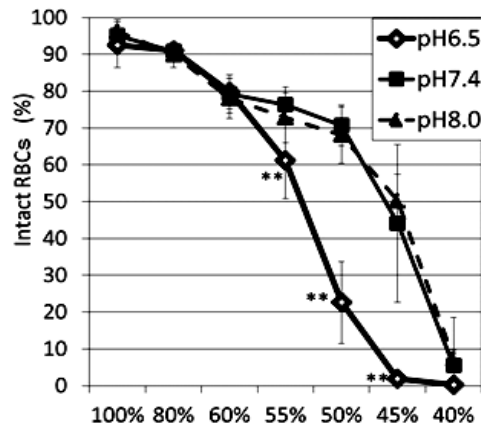


**図 10、赤血球老化に伴う CD47 の低下**  
(Mean ± SE で表示)

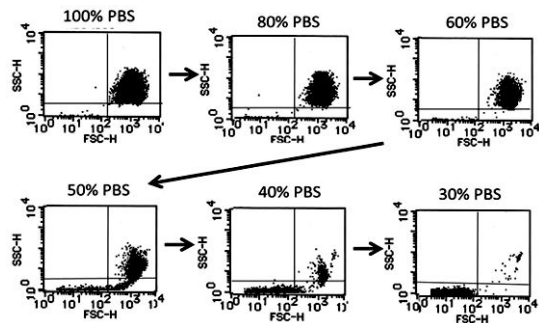
さらに、Area A と Area B の赤血球について、赤血球の老化に伴って発現が低下すると報告されている CD47 の発現について確認したところ、Area A が Area B に比して有意に CD47 発現の高いことが確認された (図 10)。

**6) 赤血球膜の Integrity は浸透圧変化、環境の pH 変化に影響を受ける**  
本研究を進展させる研究手技として、フロー

サイトメトリーによる赤血球膜機能評価法の開発を行った (図 11、Yamamoto A, et al, Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility, J Lab Autom 2014; doi: 10.1177/2211068214532254.jala.sagepub.com)。赤血球膜の Integrity は、蓄積したケモカインの保持に重要と考えられるが、新たに開発された方法においても赤血球形態および膜の Integrity が浸透圧変化、環境の pH 変化に影響を受けることが確認された (図 12)。



**図 12、pH 低下時の赤血球膜浸透圧抵抗性低下 (Mean ± SE で表示)**



**図 11、フローサイトメトリーによる赤血球膜浸透圧抵抗性評価**

SSC vs FSC サイトグラムを 4 分画し Right Upper Quadrant に残る Intact RBC の割合によって、浸透圧抵抗性を評価できる。

## 6) 考察

本研究は現在継続中であるが現在まで確認された事項をまとめると以下のようになる。

- 赤血球内には DARC 親和性ケモカインが蓄積している。
- 赤血球表面にはケモカインは殆どなく、赤血球内に存在する。
- 赤血球による DARC 親和性ケモカインである RANTES の吸着は速やかに行われる。

- DARC 親和性ケモカイン存在化で赤血球表面の DARC 発現は低下する。
- 赤血球分画では老化赤血球を多く含む分画で DARC 発現は発現量、密度ともに低下する。

以上より、赤血球は炎症局所などで産生される DARC 親和性ケモカインを局所から速やかにスカベンジし、細胞内に貯留していると考えられる。また、RANTES 存在化で DARC 発現が低下することから、DARC はケモカインとの結合によって Internalize すると考えられる。その一生にわたって長期間血流中に存在するにつれて、老化した赤血球は DARC 親和性ケモカインを取り込みながら、DARC 発現量を低下させていると考えられた。

本研究でさらに補強すべきは、以下の点である。ア) DARC を通じて細胞内に DARC 親和性ケモカインを取り込まれるのか？ イ) DARC が Internalize しているのか？ Internalize しているのであれば、老化赤血球では細胞内 DARC 量は増加するのか？ 老化赤血球では細胞内 DARC 量は増加するのか？ ウ) 一度細胞内にとりこまれた DARC 親和性ケモカインは炎症局所などの低 pH 環境や、赤血球の老化に伴う膜機能の低下では再放出されるのか？ エ) DARC 親和性のない TARC や Eotaxin2 などのケモカインは蓄積されていないのか？ オ) 喘息やアトピー性皮膚炎など慢性アレルギー疾患患者では、赤血球内の DARC 親和性ケモカイン含量は多いのか？ また、それが疾患コントロールの臨床指標と成り得るのか？ 等である。ア)イ)ウ)エ)については、現在検討が続いている。オ)については多くの例での臨床研究が必要であり、今後の検討課題である。

## 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 2 件)

- 1, Yamamoto A, Saito N, Yamauchi Y, Masahide Takeda M, Ueki S, Itoga M, Kojima K, Kayaba H, Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility, J Lab Autom 2014; doi:10.1177/2211068214532254jala.

sagapub.com

- 2, 山本絢子、齋藤紀先、櫛引美穂子、小笠原脩、木津綾乃、蔦谷昭司、秋元広之、小島佳也、萱場広之、赤血球ケモカインの役割を探る、日臨化東北会誌 2014; 23:18-21.

[学会発表](計 6 件)

- 1, 萱場広之、齋藤紀先、山本絢子、小島佳也、I 型アレルギーと炎症マーカー、第 53 回日本臨床化学会年次学術集会、8 月 30 日、徳島市、2013
- 2, Kayaba H, Shiratori T, Yamauti Y, Saito N, Chihara J, Kushibiki M, Akimoto H, Tsutaya S, Kojima K, Red Blood Cells absorb and store DARC-affinity chemokines, The 12<sup>th</sup> ASCPaLM, Nov.29 -Dec.1, 2012, Kyoto, Japan.
- 3, Takeda M, Ito W, Ueki S, Hirasawa H, Fujita M; Konno Y, Chihara M, Itoga M, Moritoki Y, Kobayashi Y, Kayaba H, Chihara J, The Features of Airway Remodeling Are More Severe in Female Mice, XXII World Allergy Congress, Dec 3-8, 2011, Cancun, Mexico
- 4, 山内由美子、萱場広之、鎌田由美子、糸賀正道、竹田正秀、守時由紀、伊藤亘、荏原順一、アレルギー・炎症に赤血球が果たす役割は何か?、第 58 回日本臨床検査医学会、11 月 19 日、岡山、2011
- 5, 萱場広之、山内由美子、鎌田由美子、糸賀正道、竹田正秀、守時由紀、伊藤亘、荏原順一、フローサイトメトリーを用いた赤血球形態と膜抵抗評価(第二報) 第 58 回日本臨床検査医学会、11 月 18 日、岡山、2011
- 6, 山内由美子、萱場広之、木原純子、鎌田由美子、荏原真美、糸賀正道、竹田正秀、小林良樹、守時由紀、伊藤亘、荏原順一、赤血球がアレルギーに果たす役割に関する検討、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会、11 月 12 日、東京、2011

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

萱場広之 (KAYABA Hiroyuki)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 70224706

### (2) 研究分担者

荏原順一 (CHIHARA Junichi)  
秋田大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 80197615

### (3) 連携研究者

なし