

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659282

研究課題名(和文) 赤血球のaging選別機構における脾微小血管透過性応答の機構解析

研究課題名(英文) Contribution of vascular permeability for aging erythrocyte selection in spleen

研究代表者

橋口 照人 (Hashiguchi, Teruto)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70250917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究成果は、脾臓・リンパ節の微小循環における低次元の血球貪食機構が鉄代謝系の修飾、免疫系の修飾に密接に関連していることを示唆するものである。更に、これらの生理的機構に性差のあること、加齢による修飾のあることが示唆された。これらのシステムの相互作用は細胞の機能維持にとって必須の分子である鉄の代謝・ホメオスタシスを厳密に調節している。脾・リンパ節の血管透過性と血球貪食機構が鉄代謝・免疫系の調節に厳密にリンクしている可能性が示唆された。血管外に漏出した赤血球に対する低次元の血球貪食機構のアイドリングが免疫系の調節ならびに鉄代謝とリンクしているとする新しい生理機構の存在を提案することができた。

研究成果の概要(英文)：It has recently been reported that monocyte-derived dendritic cells perform "hemophagocytosis" to fine tune excessive immune responses. We generated CD19Cre/hVEGF-Afl mice that express human VEGF-A specifically in B-cells. We have shown that B-Cell derived VEGF-A promotes expansion of high endothelial venule (HEV) like structures within LNs accompanied by suppressing the ensuing immune responses. In this study we found that 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. We concluded that 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. Our observations, "integrated immune system" will contribute to develop the new concept about B-cell biology.

研究分野：病態検査学

キーワード：脾臓 リンパ節 赤血球 血管透過性 血球貪食 免疫 鉄代謝 VEGF-A

1. 研究開始当初の背景

我々は POEMS 症候群の血中において血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor-A 以下 VEGF-A) が著明に上昇していることを報告 (Watanabe O. et al. *Lancet*, 1996) して以来、本症候群の病態における VEGF-A の関与について一連の研究を重ねてきた。そして、それらの知見を一般免疫学の機序として普遍化し、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システム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 (Shrestha B. et al. *J Immunol* 184(9):4819-26, 2010)。脾臓におけるヘモジデリンの沈着が B 細胞特異的 VEGF-A 発現 tg マウス (B cell VEGF-A tg マウス) において著減している。この観察は B 細胞産生 VEGF-A が血管透過性作用を介して脾臓における赤血球ホメオスターシスを調節している可能性を示唆する。

2. 研究の目的

POEMS 症候群のこれまでの一連の研究を通して着想に至った、血管内皮細胞増殖因子 (以下 VEGF-A) の主要な生理活性である血管透過性亢進作用の本質の一つが脾類洞における血管応答を介した赤血球選別機構の制御にあるとする仮説 (preliminary データ) を証明することを本申請の目的とした。VEGF-A が血管透過性亢進作用と血管新生作用をリンクする唯一の分子であることには必然的理由が存在するはずである。脾類洞における赤血球の選別制御はシステム的な oxygen delivery の制御であり、細胞-組織-臓器-固体のエネルギー代謝レベルを調節し、そこに不可避的に発生する活性酸素レベルを調節する。本研究は oxygen delivery の制御に関与する VEGF-A の循環赤血球 in-out 制御の新規概念の提唱であり、活性酸素による老化と一線上にある多発性脳梗塞、認知症等の病態理解にも寄与できると考える。本申請においては脾類洞における B 細胞 VEGF-A の赤血球選別制御機構を分子細胞レベルにおいて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

3 年計画とし 1-2 年目は、既に作出済みである免疫 B 細胞特異的 VEGF-A 産生 tg マウスを用いる。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。再現性のある preliminary データとして得られた脾組織の構築変化の詳細な解析および赤血球代謝/oxygen delivery に関連する基礎データを収集することにより VEGF-A の血管透過性亢進作用と脾臓における赤血球選別機構の調節の関連を明確にする。加えてマウスレベルでの加齢性疾患への関与について検討する。3 年目 (26 年度) は、ヒト加齢性疾患への応用

と考察を展開する。認知症、虚血性疾患 (多発性脳梗塞) をモデル病態とし、病態の臨床パラメーター (血液所見、脳 MRI 所見等) と (脾組織の採取は困難であるため) 末梢血 B 細胞における VEGF-A の発現量の解析から本申請の基本仮説の立証を試みる。

4. 研究成果

54~55 週齢の “メス” CD19^{Cre}/hVEGF-A^{fl} マウスにおいて、リンパ節における血球貪食と鉄欠乏性貧血に類似の貧血が観察されることを見出した。今回の成果は、微小循環における低次元の血球貪食と鉄代謝系の修飾、免疫系の修飾が相互に関連する生理的機構の存在を示唆するものである。さらに、これらの生理的機構に性差のあること、加齢による修飾のあることが示唆され、性差医学、加齢医学への更なる展開が期待される結果となった。赤血球が溶血等にて血管内で破壊された時のヘモグロビンの代謝機構は急性期蛋白として知られるハプトグロビン、さらにはヘモペキシン、トランスフェリンなど蛋白分画を構成するメジャー分子により重厚に保護されている。そしてこれらのシステムは細胞の生命維持にとって最重要分子の一つである鉄の代謝・ホメオスターシスを厳密に調節している。鉄代謝への精密な制御機構の存在は、血管外に漏出した赤血球に対しても低次元のレベルにおいて生理的に機能している可能性を予測させた。血管外に漏出した赤血球に対する低次元の血球貪食のアイドリングが免疫系の調節ならびに鉄代謝とリンクしているとする新しい生理機構の存在を提案することができた。

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 9 件)

1. Hatanaka M, Higashi Y, Fukushige T, Baba N, Kawai K, Hashiguchi T, Su J, Zeng W, Chen X, Kanekura T. Cleaved CD147 shed from the surface of malignant melanoma cells activates MMP2 produced by fibroblasts. *Anticancer Res.* 2014;34(12): 7091- 7096. 査読有

2. Kawano H, Sakamoto T, Ito T, Miyata K, Hashiguchi T, Maruyama I. Hyaluronan protection of corneal endothelial cells against extracellular histones after phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg.* 2014;40(11):1885-1893. 査読有

3. Takenouchi K, Shrestha B, Yamakuchi M, Yoshinaga N, Arimura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Feil R, Kawahara K, Sakamoto T, Maruyama I, Hashiguchi T. Upregulation

of non- β cell-derived vascular endothelial growth factor A increases small clusters of insulin-producing cells in the pancreas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122(5):308-315. 査読有

4. Kawano H, Ito T, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I, Hisatomi T, Nakamura M, Sakamoto T. Toxic effects of extracellular histones and their neutralization by vitreous in retinal detachment. *Lab Invest*. 2014;94(5):569-585. 査読有

5. Furukawa Y, Hashiguchi T, Minami R, Yamamoto M, Takashima H. Exacerbation of microcytic anemia associated with cessation of anti-retroviral therapy in an HIV-1-infected patient with beta thalassemia. *J Infect Chemother*. 2014;20(6):387-389. 査読有

6. Ochiai R, Sugiura Y, Shioya Y, Otsuka K, Katsuragi Y, Hashiguchi T. Coffee polyphenols improve peripheral endothelial function after glucose loading in healthy male adults. *Nutr Res*. 2014;34(2):155-159. 査読有

7. Kohjitani A, Miyata M, Iwase Y, Ohno S, Tohya A, Manabe Y, Hashiguchi T, Sugiyama K. Associations between the autonomic nervous system and the second derivative of the finger photoplethysmogram indices. *J Atheroscler Thromb*. 2014;21(5):501-508. 査読有

8. Kodama Y, Okamoto Y, Hashiguchi T, Shinkoda Y, Nishikawa T, Tanabe T, Kawano Y. Vascular endothelial growth factor corrected for platelet count and hematocrit is associated with the clinical course of aplastic anemia in children. *Int J Hematol*. 2012;95(5):494-499. 査読有

9. Maenosono R, Oketani N, Ishida S, Iriki Y, Ichiki H, Okui H, Ninomiya Y, Hamasaki S, Namino F, Matsushita M, Tei C, Hashiguchi T. Effectiveness of esophagus detection by three-dimensional electroanatomical mapping to avoid esophageal injury during ablation of atrial fibrillation. *J Cardiol*. 2012;60(2):119-125. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

【国際学会】

1. Shrestha B, Ito T, Miura N, Takenouchi K, Panta S, Yamakuchi M, Maruyama I, Hashiguchi T. Novel Insight of B Cell-Derived VEGF-A: Fine Tuning the Immune

Response Through Hemophagocytosis. *44th Annual Meeting of the German Society for Immunology*. 17 - 20 September 2014, BONN

【国内学会 総会】

1. Shrestha B, 伊藤隆史, 郡山豊泰, 竹之内和則, 大山陽子, 清水利昭, 山口宗一, 丸山征郎, 橋口照人: Hemophagocytosis as a process of fine tuning immune system in vivo. 第61回日本臨床検査医学会学術集会, 2014年11月22~25日, 福岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1. 名称: がん転移マーカーおよびそれを用いた診断

発明者: 橋口照人 他

権利者: 鹿児島大学・(株)プロトセラ

種類:

番号: 特願 2012-168064

出願年月日: 2012/7/30

国内外の別: 日本

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋口 照人 (HASHIGUCHI TERUTO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 70250917

(2) 研究分担者

伊藤 隆史 (ITO TAKASHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任講師

研究者番号: 20381171

大山 陽子 (OYAMA YOKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・特任助教

研究者番号: 20583470

清水 利昭 (SHIMIZU TOSHIAKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 50468055

(3) 連携研究者

山口 宗一 (YAMAKUCHI MUNEKAZU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 60709301

竹之内 和則 (TAKENOUCHI KAZUNORI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
医員
研究者番号：30646758