

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15199

研究課題名(和文)炎症性マクロファージ表面に誘導されるカルレティキュリンが持つ自己防衛効果の解析

研究課題名(英文) Targeting inflammatory polarization of macrophages and cell surface calreticulin in hemophagocytic lymphohistiocytosis

研究代表者

林 嘉宏 (Hayashi, Yoshihiro)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：30802590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：血球貪食性リンパ組織球症(HLH)は、遺伝的背景あるいは多彩な基礎疾患をベースとして発症し、過度の炎症性免疫の亢進から多臓器不全に至る致死率の高い症候群である。

細胞株および遺伝子改変マウスを用いた検討により、HLHの病態において、マクロファージの炎症性サブタイプへの極性変化と細胞表面へのカルレティキュリン発現誘導の関連性が明らかとなった。一方、カルレティキュリンはパーフォリン阻害因子としての機能が報告されており、HLH病態進行におけるカルレティキュリン阻害効果については今後十分に検討していく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血球貪食症候群(HLH)の病態形成において炎症性マクロファージが中心的な役割を果たす。このマクロファージを標的とした治療は、HLHの新規治療戦略構築へとつながる。本研究において、種々の細胞および遺伝子改変マウスを用いた検討により、炎症性局在変化に伴って、マクロファージ表面にパーフォリン阻害作用を持つカルレティキュリンが誘導されることが明らかとなった。マクロファージの極性変化やカルレティキュリンの阻害による病態への影響については、今後の研究において明らかにしていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a life-threatening hematologic disorder of severe hyper-inflammation caused by uncontrolled proliferation of activated immune cells. We expected to reveal essential common axis for HLH development, and provide the clue for the targeted treatments for a significant population of HLH patients.

By focusing on type I polarization of macrophages, we confirmed that calreticulin in a cell surface form is induced on macrophages during type I inflammatory polarization. Pharmacological and genetic inhibition of Hif1a and Nos2 signaling, critical factors for type I polarization, did not block type I polarization of macrophages in HLH mice, suggesting the existence of other critical factor for type I polarization. As calreticulin functions as a perforin inhibitor, future study will be needed to investigate whether calreticulin-perforin axis could play a central role at synapse between phagocytes-effectors and HLH pathogenesis.

研究分野：血液学

キーワード：血球貪食症候群 マクロファージ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血球貪食性リンパ組織球症 (Hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH) は、マクロファージ、樹状細胞、リンパ球を中心とした免疫細胞の制御破綻に伴って過度の炎症亢進状態を来とし、数日のうちに多臓器不全に至る致死率の高い症候群である。ステロイドや抗癌剤を中心とした免疫抑制療法が現在もなお標準的な治療戦略であるが、治療効果と合併症の両面において改善すべき点が多く、新規治療戦略の構築は喫緊の課題である。

HLH は、原発性 (家族性) と二次性に大きく分類される。原発性 HLH は、NK 細胞や T 細胞の細胞傷害性顆粒 (パーフォリンなど) 形成に関与する様々な遺伝子の変異が原因となり、感染症などを契機として HLH を発症する。NK 細胞や T 細胞の細胞傷害能低下により、病原体の排除が滞ることが HLH 発症要因としてあげられる。また、NK 細胞や T 細胞は活性化された貪食細胞の沈静化も担っていることから、原発性 HLH では一旦活性化されたマクロファージや樹状細胞が排除されずに炎症がエスカレートしていく。一方、二次性 HLH は、悪性腫瘍や重症感染症、自己免疫性疾患などの基礎疾患をベースとして発症する。しかし、原発性 HLH とは異なり二次性 HLH では NK・T 細胞の細胞傷害能が保たれている場合が多く、貪食細胞の活性化が収束に向かわなくなる原因や、同一の基礎疾患を持つ患者の中でどの症例がどのようにして HLH に進展していくのかについての詳細は全くわかっていない。

研究代表者らは、HLH 患者の血球細胞の遺伝子発現データベースの解析と原発性 HLH マウスモデルおよび二次性 HLH マウスモデルの詳細な解析から、原発性 HLH と二次性 HLH の病態に共通する重要な病態促進因子として、Hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1A) の発現亢進とマクロファージの炎症性サブタイプへの極性変化を見出した (*Haematologica* 2017)。HIF1A は様々な免疫細胞の活性化において中心的な役割を担うことが知られている。この HIF1A シグナル経路はインターフェロン γ (IFN γ) あるいはトール様受容体 (TLR) シグナルの下流に位置し、マクロファージにおける HIF1A シグナルの亢進は炎症性マクロファージを誘導し、HLH の発症に繋がることを明らかにした。さらに、マウスモデルを用いた予備的な検討で、HIF1A シグナルの活性化によりマクロファージの細胞表面にカルレティキュリンが誘導されるという結果を得ていた。カルレティキュリンは小胞体に存在する Ca^{2+} 結合性の分子シャペロンである。アントラサイクリン系抗癌剤投与時や細胞のアポトーシスなどの際に小胞体から輸送され細胞表面に発現することが知られている。特筆すべきことに、カルレティキュリンが細胞傷害性顆粒であるパーフォリンの働きを抑制することが報告されている (Andrin, *et al. Biochemistry* 1998; Fraser, *et al. The Journal of Immunology* 2000)。従って、研究代表者らの検討結果から、活性化された炎症性マクロファージが自身の細胞表面にカルレティキュリンの発現を誘導することで、パーフォリン等の細胞傷害性顆粒による沈静下を免れている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、マクロファージの炎症性極性変化が HLH 病態形成に及ぼす影響、マクロファージ細胞表面に発現するカルレティキュリンの役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

炎症性マクロファージへの極性変化と細胞表面へのカルレティキュリン誘導との関連性を *in vitro* (RAW 264.7 細胞) および *in vivo* (Myc 欠損マウス) で確認した。マクロファージの炎症性サブタイプへの極性変化が HLH の病態形成に及ぼす影響について検討するために、非メチル化 CpG-DNA 投与 HLH モデルマウスにおいてマクロファージ極性変化を標的とした *in vivo* 薬物的阻害を行った。また、マクロファージの炎症性極性変化に重要な因子のノックアウトアレルを用いた検討も行った。

4. 研究成果

非炎症性 M2 マクロファージ誘導に中心的な役割を担う Myc を血液細胞中で欠損させたマウス (Mx1-Cre/c-Myc Δ/Δ mice) を用いた解析により、骨髄中マクロファージでは *Nos2* mRNA の発現亢進、*Arg1* mRNA の発現低下がみられ、炎症性サブタイプへの誘導 (CD80、CD11c 発現上昇) が促進された。また、フローサイトメトリー解析により、この炎症性マクロファージ細胞表面にはカルレティキュリンの発現誘導が確認された。マウスマクロファージ細胞株を用いた *in vitro* での検討においても、炎症性マクロファージ誘導 (IFN γ 存在下で培養) に伴い細胞表面のカルレティキュリン発現が増加した。これらの結果は、マクロファージの炎症性サブタイプへの極性変化と細胞表面へのカルレティキュリン発現誘導の関連性を示すものである。

一方、当初計画していた HIF1A 阻害剤等によるマクロファージ極性変化や病態進行の抑制効果は確認できなかった。炎症性マクロファージへの局在変化に重要な NOS2 および HIF1A シグナル経路を阻害するため、血球細胞において NOS2、HIF1A および ARNT (HIF1A とダイマーを

形成して DNA に結合する) をロックアウトしたマウスを用いた検討を行った。しかし、マクロファージ極性変化の *in vivo* 抑制効果はみられず、非メチル化 CpG-DNA 投与によって HLH の病態発症および進行が依然として確認された。また、細胞表面に誘導されたカルレティキュリンを阻害することによる HLH 病態進行への影響については期間内に検証を終えることができなかったため、今後の研究において明らかにしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----