

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07060

研究課題名（和文）分泌型ヘムタンパク質によるマクロファージの貪食抑制機構の解明

研究課題名（英文）The regulatory mechanism of macrophage phagocytosis by secretory hemprotein neudesin

研究代表者

中山 喜明（NAKAYAMA, Yoshiaki）

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40512455

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：これまで主に神経系での機能解析がされてきて、免疫細胞に対する作用が不明であった分泌因子neudesinについて研究を進めた。そのなかで、脾臓において老化赤血球を認識し体内循環から貪食除去する赤脾髄マクロファージの機能をneudesinが調節しており、循環赤血球の新陳代謝を制御していることを明らかにした。neudesinは、マクロファージに直接作用することで老化赤血球の貪食に関わるFc受容体の細胞表面発現を抑制し、老化赤血球の代謝を抑制する、新たな貪食抑制性サイトカインとして機能することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤血球は酸素を身体中に運ぶ重要な役割を果たしているが、正常に老化赤血球が体内循環から取り除かれず、老化赤血球の蓄積が起こると、毛細血管の閉塞や体中への酸素供給不全につながることで知られており、血液の正常な機能に悪影響を及ぼすことがある。本研究により分泌因子neudesinが赤血球の代謝を制御することが明らかにしたことから、neudesinシグナルを制御することにより、赤血球の代謝促進や、貧血あるいは造血障害などの赤血球関連疾患において新たな治療法の開発につながることで期待される。

研究成果の概要（英文）：Previous studies primarily focused on the functional analysis of neudesin in the nervous system, and its effects on immune cells remained unknown. We conducted research to investigate the role of the secretory factor neudesin in this regard. Our findings revealed that neudesin regulates the function of red pulp macrophages in the spleen, which recognize and phagocytose aged red blood cells, thereby removing them from circulation. We demonstrated that neudesin controls the metabolism of circulating red blood cells. Specifically, neudesin directly acts on macrophages and suppresses the cell surface expression of Fc receptors involved in the phagocytosis of aged red blood cells. This leads to the inhibition of metabolic processes in aged red blood cells. Consequently, neudesin functions as a novel phagocytosis-inhibitory cytokine.

研究分野：免疫学

キーワード：赤血球代謝 マクロファージ サイトカイン 貪食受容体

1. 研究開始当初の背景

骨髄中で造血された赤血球は血液循環に入り、ヒトで約 120 日、マウスで約 30 日の間、全身への酸素運搬を行う。しかしながら、循環赤血球は、血管内で物理的ストレスや酸化ストレスにさらされることで細胞膜構造の柔軟性が低下(赤血球老化)し、毛細血管梗塞などの発症リスクとなる。これを避けるため、生体内には老化した赤血球を適切に代謝する監視機構が存在する。役割を全うした老化赤血球は、ホスファチジルセリンの細胞表面への露出や、自己抗体に認識される Band3 膜タンパク凝集など、様々な“eat me”シグナルを提示し、これらのシグナルを脾臓の赤脾髄マクロファージや肝臓のクッパー細胞が受け取ることで、貪食が開始される。近年の研究により、炎症性サイトカインや CD47-SIRP による“don't eat me”シグナルなども、マクロファージの赤血球貪食過程を調節することが明らかにされてきている(Klei TRL et al., Front Immunol (2017) 8:73)。一方で、多血時にはこれらのシグナルとは独立して、赤脾髄マクロファージによる赤血球の貪食が亢進することが報告されており(Bogdanova A et al., Blood, (2007) 110(2); 762-769.)。マクロファージによる赤血球貪食過程には、生体の赤血球恒常性を感知し、需要に応じて貪食能を調節する制御機構の存在が示唆されるが、その詳細なメカニズムは分かっていない。

申請者は、分泌型ヘムタンパク質 Neudesin の研究を行うなかで、Neudesin 遺伝子が薬剤による溶血性貧血マウスの脾臓において強く誘導されることを発見した。さらには Neudesin 遺伝子欠損マウスでは、マクロファージの赤血球貪食能の亢進による赤血球寿命の短縮や、溶血性貧血誘導時の回復遅延などの症状を示すことを、これまでに見出している。これらの結果から、Neudesin が赤血球の異常を感知するセンサー分子として働き、赤脾髄マクロファージの赤血球貪食を抑制している可能性が示唆されるが、その分子機構は未だ不明である。

2. 研究の目的

上述したように、申請者は生体において赤血球の異常を感知し、マクロファージによる赤血球貪食を抑制する分子として Neudesin が機能している可能性を見出した。そこで本研究では、ヘム結合タンパク質である Neudesin を中心とした新たなマクロファージ貪食抑制機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス(WT)および Neudesin 遺伝子欠損マウス(KO)に Sulfo-NHS-Biotin を静脈投与することで、循環赤血球標識した。それぞれの赤血球を採取のち、両遺伝型マウスに輸血し、1 週間ごとに部分採血をすることで標識赤血球の割合を測定した。また、麻酔下で 4 週齢の両遺伝型マウスから脾摘のち、4 週間後に Sulfo-NHS-Biotin を静脈投与することで、循環赤血球標識した。1 週間ごとに部分採血をすることで標識赤血球の割合を測定した。

(2) WT マウスより採取した赤血球を PKH26 で蛍光標識し、WT および KO マウスに輸血した。輸血 3 日後に脾臓細胞のうち PKH26 陽性細胞をフローサイトメトリーにより検出した。さらに、WT マウスおよび KO マウスより脾臓を採取し、赤脾髄マクロファージ(RPM)マーカーである蛍光標識 F4/80 抗体とともに貪食受容体タンパク質に対する蛍光標識抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーにより RPM 細胞表面に存在する貪食受容体タンパク質量を測定した。

(3) WT マウスおよび KO マウスの脛骨から骨髄細胞を回収し、M-CSF 存在下で骨髄由来マクロファージ(BMDM)へと分化誘導した。それぞれの BMDM に対し、蛍光標識した赤血球・細胞死を誘導した胸腺細胞・大腸菌死菌を加え 1 時間培養し、培養マクロファージによる貪食能を測定した。また、この際、両遺伝型 BMDM に対し組換え Neudesin タンパク質や MEK 阻害剤である U0126 を加えたものを準備し、貪食能を測定した。

4. 研究成果

(1) KO マウスにおける赤血球寿命の短縮の原因を探るため、WT マウスと KO マウスからそれぞれ赤血球を標識のち、両遺伝型マウスに輸血し赤血球寿命の測定を行なった。WT マウスへ輸血を行なった際には、WT・KO マウス由来の赤血球の寿命に異常は見られなかったが、KO マウスへ輸血を行なった際には、いずれの遺伝型由来の赤血球も寿命の短縮が見られた(図 1A)。以上の結果から、KO マウスにおける赤血球寿命の短

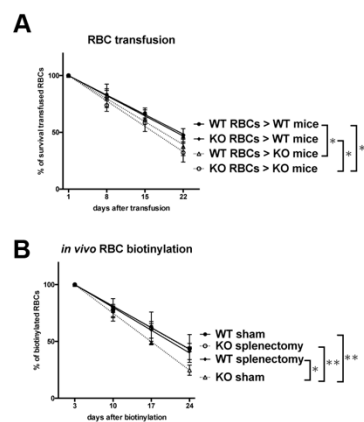


図 1 赤血球の寿命測定

縮の原因は、KO マウスの赤血球自身の性質によるものではなく、赤血球を取り巻く環境によるものであることが明らかになった。さらに赤血球寿命短縮の原因が脾臓にあるかどうかを探るために、WT マウスと KO マウスから脾臓摘出を行なったのちに、赤血球寿命を測定したところ、KO マウスで見られていた赤血球寿命の短縮がほとんど消失した(図 1B)。この結果から、KO マウスにおける赤血球寿命の短縮は脾臓の異常によるものであることが明らかとなった。

(2) KO マウスにおける赤血球寿命の短縮の原因として、脾臓に存在する RPM の貪食異常による可能性が考えられたことから、蛍光標識した赤血球を輸血したのちの RPM による標識赤血球の貪食能を測定した。WT マウスと比較して KO マウスの RPM では輸血後 3 日間における標識赤血球の貪食能が亢進していた(図 2A,B)。さらに RPM による貪食異常に関わる貪食受容体を同定するため、既知の貪食受容体の細胞表面発現量を測定したところ、抗体の Fc 領域に対する受容体である Fc 受容体 1 から 4 の発現量を KO マウスの RPM において増加していることを見出した。赤血球は老化により細胞膜表面に存在する Band3 タンパク質が凝集し、血液中に元々存在する抗凝集 Band3 抗体により認識される。RPM はこの抗体の結合を細胞表面上の Fc 受容体で認識し、老化赤血球を貪食することから、KO マウスにおける赤血球寿命の短縮は、RPM 細胞表面における Fc 受容体の発現量増加に起因することが示唆された。

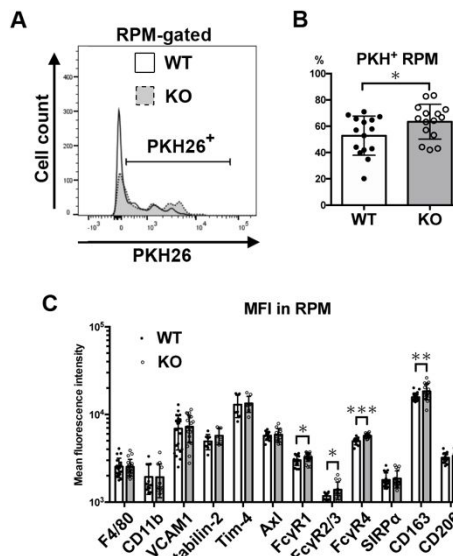


図 2 赤脾髄マクロファージによる赤血球貪食

(3) Neudesin によるマクロファージ貪食抑制の詳細な機序を探るために、BMDM を用いた解析を行なった。WT および KO の BMDM に対し、蛍光標識した赤血球、細胞死を誘導した胸腺細胞、大腸菌死菌を添加し、それぞれに対する貪食能を測定したところ、マウスを用いた研究結果と同様に、KO マウス由来の BMDM では赤血球の貪食能が亢進していた(図 3A)。また、この赤血球貪食能の亢進は、細胞表面上の Fc 受容体 1 の発現量と相関しており、BMDM に対し事前に組換え Neudesin タンパク質を添加することで貪食能の亢進と Fc 受容体 1 の発現量の増加は消失した(図 3B,C)。これらの結果から、組織マクロファージである RPM だけでなく、一般的に培養マクロファージとして用いられる BMDM においても Neudesin が分泌因子として作用し、Fc 受容体の発現を抑制する抑制性サイトカインとしての機能を有することが示唆された。さらに Neudesin による赤血球貪食抑制に関わる細胞内シグナル経路を探るために、既知のシグナル経路の活性化について調べたところ、KO マウスの BMDM では MAPK シグナルの一つである ERK1/2 のリン酸化が減少していること、組換え Neudesin タンパク質の添加により ERK1/2 のリン酸化が亢進することを見出した(図 3D)。また、WT および KO 由来の BMDM に対し事前に ERK シグナル阻害剤である U0126 で処理を行なったところ、WT の BMDM のみで赤血球貪食の亢進および Fc 受容体 1 の発現量の増加が見られ、KO の BMDM では変化は見られなかった(図 3E,F)。以上の結果から、Neudesin は MAPK 経路の一つである ERK1/2 シグナルを活性化することでマクロファージにおける Fc 受容体の発現量を抑制し、赤血球貪食を制御していることを明らかにした。

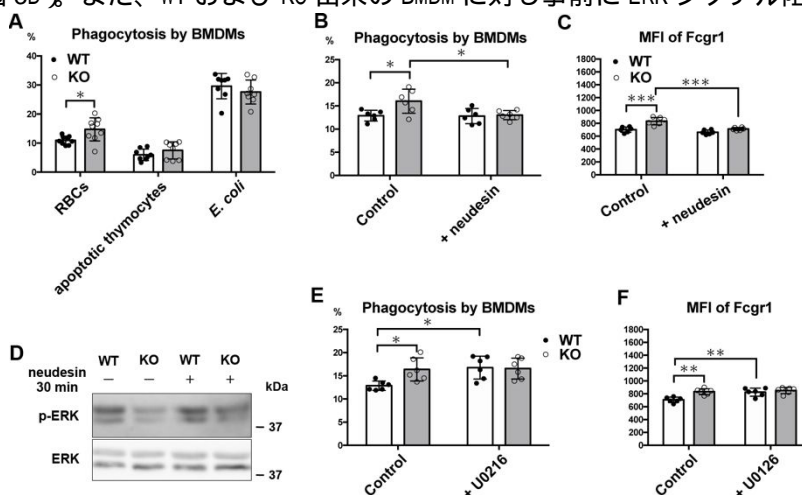


図 3 Neudesinによる培養マクロファージの赤血球貪食抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲岡 浩輝、中山 喜明、西山 侑志、長谷川 潤、増田 有紀、伊藤 信行、小西 守周
2. 発表標題 分泌型タンパク質neudesinによる炎症性マクロファージ調節機構の解析
3. 学会等名 第21回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本 優樹、中山 喜明、増田 有紀、清水 涼平、伊藤 信行、小西 守周
2. 発表標題 分泌タンパク質neudesinは炎症性マクロファージに作用しJak/Stat/iNOS経路を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	小西 守周 (Konishi Morichika) (00322165)	神戸薬科大学・薬学部・教授 (34512)	
研究分担者	野中 元裕 (Nonaka Motohiro) (70514173)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

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
---------	---------