

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16914

研究課題名(和文) 有核赤血球による胎児および新生児の免疫抑制機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of Fetal and Neonatal Immunosuppression by Nucleated Erythrocytes

研究代表者

竹内 秀輔 (Takeuchi, Shusuke)

筑波大学・附属病院・病院助教

研究者番号：80828046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円

研究成果の概要(和文)：臍帯血由来の有核赤血球とLPS刺激した単球を非接触条件で共培養するとIL-10産生が増加する。この抑制作用を介在する物質の探索を行った。有核赤血球は臍帯血に豊富に含まれ、胎児期は生理的多血で赤血球寿命も短縮している。多量のヘモグロビン処理にHO-1が重要であり、CD163-HO軸に関連する物質と推定した。

CD163-HO軸の関与を確認するために、共培養に抗CD163抗体やHO-1阻害作用のZnPP-Iを添加し、IL-10の産生減少を確認した。有核赤血球はCD163のリガンドであるヘモグロビン・ハプトグロビン複合体に必要なハプトグロビンを産生すると推定し、ELISAとPCRにより確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有核赤血球はハプトグロビンの産生を介して胎児期の免疫抑制環境の維持に関与している可能性がある。また、有核赤血球は胎児期のみならず敗血症や自己炎症性疾患などでも末梢血中に出現する。成人骨髓由来有核赤血球もハプトグロビン遺伝子の増加が示されており、周産期だけでなく小児期以降にも免疫抑制機構として作用している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have hypothesized previously shown that cord blood-derived CD45-NRBCs and adult peripheral blood-derived monocytes under LPS stimulated indirect co-culture system, increased IL-10 and decreased TNF- $\alpha$  secretion which suggests the immunosuppressive function of CD45-NRBCs via unknown soluble factor. We hypothesized that NRBCs secrete haptoglobin and induce immunosuppressive function of monocytes by activating the CD163-HO-1 axis. We confirmed the immunosuppressive function of CD45-NRBC by co-culturing with cord blood derived monocytes under LPS stimulation in indirect co-culture system. Immunosuppressive response decreased when the co-culture medium was supplemented with anti-CD163 blocking antibody or HO-1 inhibitor ZnPP-I. Haptoglobin levels in the culture medium with NRBCs were high and expressed haptoglobin gene. Thus, CD45-NRBCs secrete haptoglobin and activates the immunosuppressive function of monocytes.

研究分野：小児科学

キーワード：ハプトグロビン 有核赤血球 臍帯血 IL-10 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

有核赤血球は赤血球の前駆細胞で成人では骨髓にのみ認められるが、妊婦や新生児では末梢血にも出現する<sup>1</sup>。近年、その免疫抑制作用が明らかにされている<sup>2</sup>。有核赤血球は3段階に分類され、プロ赤芽球 (pro-EB) は有核赤血球の約5%、好塩基性赤芽球 (baso-EB) は有核赤血球の約10%、多色性または正色性赤芽球 (poly/ortho-EB) は有核赤血球の約85%を占める<sup>3</sup>。赤血球形成において、CD71、CD117、CD105の明瞭な発現が最も未熟な段階で観察され、CD117発現はbaso-EBで、CD105発現はpoly/Ortho-EBで失われ、CD45発現も分化とともに徐々に減少する。赤血球分化に関連する発現遺伝子数も徐々に減少し、赤血球機能に関する遺伝子発現が増加する。免疫調節に関連する遺伝子はCD45-有核赤血球に発現していることが示されている<sup>4</sup>。アルギナーゼ-2や活性酸素<sup>5,6,7,8</sup>を介したCD45+有核赤血球の免疫抑制作用については多くの報告がある。それらではCD45-有核赤血球は活性酸素などを持たないため免疫抑制活性を持たないとされてきたが<sup>5</sup>、我々はCD45-有核赤血球がLPSにより活性化された単球のIL-10産生を増加させ、自然免疫を抑制することを報告した<sup>9</sup>。CD45-有核赤血球がどのように単球からのIL-10産生を増加させているのか、このメカニズムはまだ明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

我々是有核赤血球とLPS刺激した単球を非接触下に共培養することで免疫抑制作用を認めることから、何らかの液性因子を介した作用であると考えた。H0-1欠損症では、末梢血中の有核赤血球数が増加し、血漿遊離ヘモグロビンやハプトグロビンの増加を呈する、重度の溶血と慢性炎症を引き起こす<sup>10</sup>。肝臓で合成される急性期タンパク質であるハプトグロビンの血漿中濃度は、炎症性疾患の重症度と相関し<sup>11</sup>、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を形成して増加する血漿遊離ヘモグロビンが無毒化し、食細胞の細胞表面に発現するB群スカベンジャー受容体システインリッチスーパーファミリーCD163に結合する<sup>12</sup>。その後、この分子複合体はエンドサイトーシスされ、リソソーム内でヘムオキシゲナーゼ1 (H0-1) によって分解され、抗炎症性サイトカインであるIL-10の産生が促進される<sup>13</sup>。したがって、我々は、NRBCがハプトグロビンを分泌することで、有毒な無血漿ヘモグロビンの除去が促進され、赤芽球脾島の鉄効率が改善され、それによって食細胞のCD163-H0-1系を介して抗炎症反応が誘導されるのではないかと考えた。

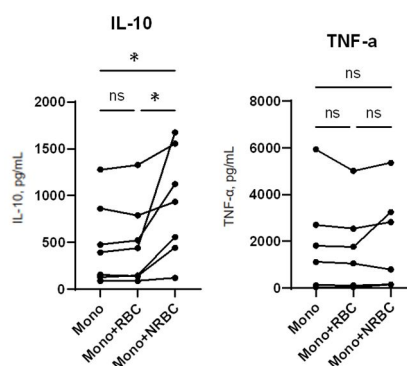
## 3. 研究の方法

ヒト臍帯血から単核球分離し、赤血球は分離後の沈下層から採取した。単核細胞から単球と有核赤血球をマイクロビーズおよびフローサイトメーターを用いてそれぞれ単離し、単球をLPS刺激し、トランスウェルプレートを用いて非接触下有核赤血球と共培養した。有核赤血球のコントロールとして赤血球を用いた。本研究は、筑波大学附属病院倫理審査委員会の承認を得た(R02-321)。参加者から書面によるインフォームドコンセントを得た。

## 4. 研究成果

(1) LPS刺激単球と臍帯血由来有核赤血球の非接触共培養によるIL-10産生増加

我々は以前、成人単球からの炎症性サイトカイン産生が臍帯血(CB)由来有核赤血球(NRBC)の存在下で抑制されることを報告した<sup>9</sup>。本研究では、新生児の免疫調節機構を反映させるため、成体単球の代わりに同じ臍帯血由来の単球とNRBCを用いた。しかし、CB単球は胎児の免疫抑制環境の影響を受けており、免疫応答は成人単球のそれとは異



なる<sup>9</sup>。まず NRBC が CB 由来単球の炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。CB 由来赤血球 (RBC) または NRBC と単球 (Mono) を非接触条件で共培養した後、サイトカイン産生を解析した。図 1A に示すように、NRBC の存在下で有意な IL-10 産生の増加が観察された ( $P < 0.05$ )。しかし、成人単球とは対照的に、CB 由来の Mono は TNF- $\alpha$  を産生は少なく、NRBC の存在下でも差はなかった (図 1B)。成人単球と比較して、CB 由来単球の細胞表面には LPS 受容体 toll-like receptor 4 の発現が少なく、TNF- $\alpha$  の産生能も低い<sup>14</sup>。したがって、CB 由来単球を用いた共培養系では、先行研究<sup>9</sup>のように、LPS 刺激による TNF- $\alpha$  産生の増加や、NRBC との共培養による TNF- $\alpha$  産生の抑制が観察できなかったと推測した。

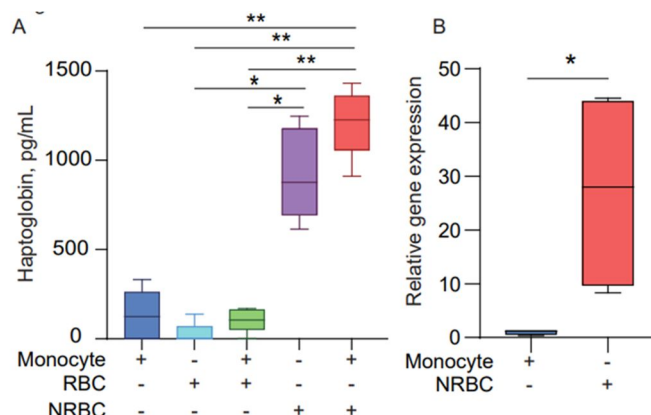
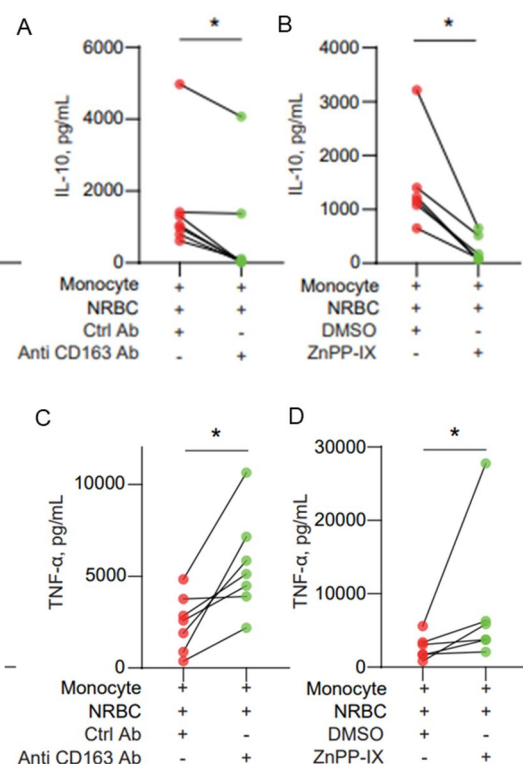
(2) Hp-HO1 系の活性化は、単球において IL-10 を増加させ、TNF- $\alpha$  産生を減少させた。

CD163-HO-1 系が、NRBC 存在下での IL-10 産生増加に関与しているかどうかを評価するために、抗 CD163 ブロッキング抗体<sup>12</sup> またはアイソタイプ IgG コントロール抗体、HO-1 阻害剤亜鉛プロトポルフィリン (ZnPP-IX)<sup>15</sup> または DMSO キャリアコントロールを共培養液に添加し、LPS で刺激した後、IL-10 と TNF- $\alpha$ 。抗 CD163 ブロッキング抗体または ZnPP-IX を添加することで、IL-10 産生に対する NRBC のプラス効果は、対照サンプルと比較して有意に減少した ( $P < 0.05$ 、図 2A および B)。この観察は、単球に対する NRBC の抗炎症機能が、単球の CD163-HO-1 系の活性化によって媒介されることを示唆している。驚くべきことに、TNF- $\alpha$  産生は、対照試料と比較して有意に増加した ( $P < 0.05$ 、図 2C および D)。この観察結果は、CB 由来の単球は TLR-4 の発現が低いにもかかわらず、LPS 刺激により TNF- $\alpha$  を産生する能力を

保持しており、STAT3 を欠失させたマクロファージでは TLR 刺激により正常マクロファージよりも TNF- $\alpha$  産生が増強することと合致した<sup>16</sup>。

(3) 有核赤血球はハプトグロビンを分泌し、単球の抗炎症反応を誘導する。

次に、CD163 受容体のリガンドであるハプトグロビン-ヘモグロビン複合体が、LPS 刺激単球と NRBC の非接触共培養において抗炎症機能を介するかどうかを解析した。ELISA 法を用いて培養液中のハプトグロビン濃度を測定したところ、培養液中のハプトグロビン濃度が有意に上昇していることがわかった ( $P < 0.01$ )。NRBC とは対照的に、RBC はハプトグロビン産生を誘導しなかった (図 3A)。さらに、ハプトグロビン遺伝子 (HP) の mRNA 発現は、共培養後の精製 NRBC では有意に増加したが、単球では増加しなかった ( $P < 0.05$ 、図 3B)。これらの結果から、ハプトグロビンは NRBC によって産生されることが示唆された。総合すると、非接触共培養系における



LPS 刺激単球に対する NRBC の抗炎症作用は、NRBC 由来のハプトグロビンがヘモグロビンと複合体を形成し、単球の CD163-HO-1 系を活性化することによって媒介されていた。

#### (4) データの限界と展望

本研究では、NRBC からのハプトグロビン合成と分泌の制御機構を解明することはできなかった。健康成人の骨髓由来 NRBC でも、CD45-NRBC におけるハプトグロビン産生経路の相対的活性化が示されている<sup>7</sup>。このことは、NRBC が安定した生理的状态でハプトグロビンを産生し、成人の骨髓や胎児・新生児の末梢などの造血が活発な領域で、遊離ヘモグロビンによって引き起こされる炎症を抑制している可能性を示唆している<sup>17</sup>。しかし、ハプトグロビンは IL-6 などの炎症性サイトカインによって血漿中で増加する<sup>18</sup>。末梢血中の NRBC の数は、エリスロポエチンによる造血刺激よりも IL-6 に相関して増加する<sup>19</sup>。これらの知見は、NRBC が造血環境の恒常性を維持するだけでなく、宿主にダメージを与えかねないさらなる炎症を抑制するために、炎症状態においてハプトグロビン濃度を積極的に上昇させることを示唆している。NRBC からのハプトグロビンの制御機構と生理的役割に関するさらなる研究が必要である。

#### (5) 結論

本研究において、我々は NRBC が単球に対して抗炎症作用を惹起する液性因子を同定した。我々は、CB 由来の CD45-NRBC が、炎症状態においてハプトグロビンを分泌し、CD163-HO-1 系を活性化し、IL-10 産生を誘導することによって、食細胞に免疫制御を及ぼすことを観察した。NRBC からの免疫抑制性ハプトグロビンの分泌は、造血が活発な場合に一定の割合で生じる無効造血から漏出する遊離ヘモグロビンによる炎症の誘発を抑制するための合理的なメカニズムであると思われる<sup>17</sup>。さらに、末梢 NRBC 数は新生児敗血症の発症および炎症性疾患の重症度と相関している。同様に、PMA 刺激活性化好中球はハプトグロビンを放出することが知られている<sup>21</sup>。したがって、NRBC はハプトグロビンを分泌することによって、全身性の炎症を積極的に抑制している可能性がある。NRBC からのハプトグロビンの制御機構と生理的役割に関するさらなる研究が必要である。

#### 引用文献

- Hermansen MC. Nucleated red blood cells in the fetus and newborn. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2001 May;84(3):F211-5.
- Elahi S, Ertelt JM, Kinder JM, et al. Immunosuppressive CD71(+) erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature*. 2013;504(7478):158-162.
- Katiyar S, Shah A, Rahman K, Tripathy NK, Kashyap R, Nityanand S, Chaturvedi CP. Analysis of Immunophenotypic Changes during Ex Vivo Human Erythropoiesis and Its Application in the Study of Normal and Defective Erythropoiesis. *Cells*. 2023 May 2;12(9):1303.
- Mello FV, Land MGP, Costa ES, et al. Maturation-associated gene expression profiles during normal human bone marrow erythropoiesis. *Cell Death Discov*. 2019 Feb 28;5:69.
- Elahi S, Vega-López MA, Herman-Miguel V, Ramírez-Estudillo C, Mancilla-Ramírez J, Motyka B, West L, Oyegbami O. CD71<sup>+</sup> Erythroid Cells in Human Neonates Exhibit Immunosuppressive Properties and Compromise Immune Response Against Systemic Infection in Neonatal Mice. *Front Immunol*. 2020 Nov 24;11:59743
- Shahbaz S, Xu L, Osman M, Sligl W, Shields J, Joyce M, Tyrrell DL, Oyegbami O, Elahi S. Erythroid precursors and progenitors suppress adaptive immunity and get invaded by SARS-CoV-2. *Stem Cell Reports*. 2021 May 11;16(5):1165-1181.

Zhao L, He R, Long H, Guo B, Jia Q, Qin D, Liu SQ, Wang Z, Xiang T, Zhang J, Tan Y, Huang J, Chen J, Wang F, Xiao M, Gao J, Yang X, Zeng H, Wang X, Hu C, Alexander PB, Symonds ALJ, Yu J, Wan Y, Li QJ, Ye L, Zhu B. Late-stage tumors induce anemia and immunosuppressive extramedullary erythroid progenitor cells. *Nat Med*. 2018 Oct;24(10):1536-1544.

Chen J, Qiao YD, Li X, Xu JL, Ye QJ, Jiang N, Zhang H, Wu XY. Intratumoral CD45<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup> erythroid cells induce immune tolerance and predict tumor recurrence in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2021 Feb 28;499:85-98.

Cui L, Takada H, Takimoto T, Fujiyoshi J, Ishimura M, Hara T. Immunoregulatory function of neonatal nucleated red blood cells in humans. *Immunobiology*. 2016;221(8):853-861.

Yachie A, Niida Y, Wada T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*. 1999;103(1):129-135.

Wang YP, Kinzie E, Berger FG, Lim SK, Baumann H. Haptoglobin, an inflammation-inducible plasma protein. *Redox Rep*. 2001;6(6):379-385.

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001 11;409(6817):198-201.

Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, et al. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis - Antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res*. 2004;94(1):119-126.

Huang ZJ, Huang J, Pan J, et al. An impaired inflammatory cytokine response to gram-negative LPS in human neonates is associated with the defective TLR-mediated signaling pathway. *J Clin Immunol*. 2015;35(2):218-26.

Yang G, Nguyen X, Ou J, Rekulapelli P, Stevenson DK, Dennery PA. Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis. *Blood*. 2001;97(5):1306-1313.

Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Förster I, Akira S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*. 1999 Jan;10(1):39-49.

di Masi A, De Simone G, Ciaccio C, D'Orso S, Coletta M, Ascenzi P. Haptoglobin: from hemoglobin scavenging to human health. *Mol Aspects Med*. 2020;73:100851.

Theilgaard-Mönch K, Jacobsen LC, Nielsen MJ, et al. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):353-61.

Ferber A, Minior VK, Bornstein E, Divon MY. Fetal "nonreassuring status" is associated with elevation of nucleated red blood cell counts and interleukin-6. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 May;192(5):1427-9.

Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem*. 1999 Jun 4;274(23):16513-21.

- ②1 Theilgaard-Mönch K, Jacobsen LC, Nielsen MJ, et al. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):353-61.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------|
| 1 . 発表者名<br>竹内秀輔、藤山聡、永藤元道、岡田侑樹、花木麻衣、中村由里、金井雄、日高大介、眞弓みゆき、小畠真奈、宮園弥生、濱田洋実、高田英俊 |
| 2 . 発表標題<br>有核赤血球による自然免疫制御機序の解明                                             |
| 3 . 学会等名<br>第49回日本臨床免疫学会総会                                                  |
| 4 . 発表年<br>2021年                                                            |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---------|---------|