

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500387

研究課題名（和文） 血球貪食症候を主徴とするリソソーム病の新規病態モデルの確立

研究課題名（英文） Characterization of AEP/Legumain-deficient mice as a new model of lysosome disease

研究代表者

橋本 憲佳 (HASHIMOTO NORIYOSHI)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授

研究者番号：50242524

研究成果の概要（和文）：リソソームに局在するプロテアーゼであるアスパラギンエンドペプチダーゼ（AEP）を欠損するマウスの骨髄には、リソソーム病であるゴーシェ病に出現するゴーシェ細胞様の血球貪食細胞が蓄積することから、AEP欠損マウスをリソソーム病を自然発症する新規動物モデルとして位置づけ、その特徴付けを行った。遺伝子発現解析は老化赤血球の排除機構亢進を示唆するものの培養系に移すと再現しないが、病態発症初期における骨髄局所におけるマクロファージの分化・増殖状態の異常が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Asparagine endopeptidase (AEP) is a lysosomal cysteine protease. We have characterized AEP-deficient mice as a disease model of human hemophagocytic syndrome, which developed hemophagocytosis especially in bone marrow. A part of hemophagocytes resembled Gaucher cells in Gaucher disease, one of lysosomal storage disease. We have conducted further examinations so as to characterize AEP-deficient mice as a new model of lysosomal disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：血球貪食症候群，リソソーム病，ゴーシェ細胞，遺伝子改変動物，病態モデル，マクロファージ，赤血球，血液疾患

## 1. 研究開始当初の背景

本助成事業による先行研究課題（18500325）において、アスパラギンエンドペプチダーゼ（AEP）遺伝子欠損マウスを解析し、体温上昇，貧血，肝脾腫，骨髄や脾臓における血球貪食細胞の出現など，ヒト血球貪食症候群（HPS）の病態をよく再現

したモデルマウスとして位置づけた。血球貪食細胞はマクロファージであり赤血球貪食能は上昇し，一部でリソソーム病であるゴーシェ病に特徴的なゴーシェ細胞様の特徴も示した。リソソーム酵素であるAEPの欠損により貪食作用の亢進と血球分解産物の異常な蓄積を生じ，

HPS 様病態形成に深く関わっていることが示唆された。その後の解析によりマウスの遺伝背景を解析が進んでいる標準的な近交系である C57BL/6 系統に置き換えると、ゴーシェ細胞様の特徴が顕著となる。ゴーシェ病はスフィンゴリピドーシスに分類されるリソソーム病であることから、AEP 遺伝子がリソソーム病の新たな関連遺伝子ではないかとの着想に至った。AEP 遺伝子欠損マウスの病態がマクロファージの活性化とリソソーム機能異常により引き起こされるのであれば、その病態発症機序を詳細に解析することで、未だ根治療法の確立していない家族性・二次性を含めた HPS やゴーシェ病をはじめとするリソソーム病の治療法開発のための有用な実験動物モデルを提供できると考えた。

## 2. 研究の目的

AEP はリソソームに局在するプロテアーゼであるので、マクロファージ内部でのタンパク質分解能の異常が予想されるが、マクロファージの食食能も有意に上昇していること、AEP 欠損マウスの赤血球膜タンパク質に異常が見つかったこと、赤血球食食マクロファージが骨髄全域に高度に蓄積していることから、単なるタンパク質分解異常ではなく、AEP の欠損がマクロファージの広範な機能に影響していることが予想される。本研究では AEP 欠損によりマクロファージが血球食食に到る機序を理解することを目的に、マクロファージと生体との相互連関という視点で、広範高頻度の血球食食を誘引する分子の同定を行う。本モデルはヒトのパーフォリン欠損家系に見られる家族性 HPS とは作用機序が異なること、従って HPS を LCM ウィルス感染により再現したパーフォリン欠損動物モデルとは異なり、発症と病態増悪がより緩徐な自然発症モデルであること、ゴーシェ細胞様の形態も示すことからリソソーム病の新たな動物モデルである可能性があり、これまでの研究を発展的に展開して世界に先駆けて新たな動物モデルを提供することをめざす。

## 3. 研究の方法

上述の先行研究課題により、AEP 遺伝子はヒトの血球食食症候群 (HPS) の中でも原因遺伝子未同定の家族性 HPS の原因遺伝子の候補であり、AEP 欠損マウスは HPS の病態が緩慢に進行する唯一の自然発症モデルであること、リソソーム病であるゴーシェ病に出現するゴーシェ細胞に酷似した形態の食食細胞も出現することを明かした。本研究課題では、血球食食細胞がゴーシェ細胞様の形態を顕著に示す C57BL/6 系統にコンジュニク化した AEP 欠損マウスにおけるマクロファ

ージと食食される赤血球の性状及び機能を、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析技術も動員して詳細に検討する。さらに AEP 欠損による血球食食マクロファージの出現機序について、関連する分子の同定を行い、未だ根治療法の確立していない HPS あるいはリソソーム病の治療法開発を支援する動物モデルの確立を目指す。

(1) 腹腔マクロファージによる赤血球食食：チオグリコレートにより活性化した滲出性腹腔マクロファージを調製し、IgG でオプソニン化した赤血球、あるいは脂質過酸化剤で処理した赤血球と共培養してマクロファージの食食能と食食後の分解動態を測定した。さらにフェノタイプの異なる常在性マクロファージにおける赤血球食食能も同様に測定した。

(2) マイクロアレイによる骨髄における遺伝子発現変化の網羅的解析：ヒトの HPS で見られる末梢血中 IFN $\gamma$  などのサイトカイン上昇は、AEP 欠損マウスではほとんど見られないので、血球食食に関わるサイトカイン関連遺伝子発現の網羅的な探索を目的に、前発症期の幼齢マウスと発症期の加齢マウスの骨髄から RNA を抽出し、一色法によるマイクロアレイを行って、若齢/加齢、AEP 欠損/正常対照の四者間の遺伝子発現の比較を行った。

(3) 骨髄細胞由来の誘導マクロファージによる赤血球食食：腹腔マクロファージによる食食試験では骨髄で見られる顕著な血球食食を説明しうる結果を得られなかったため、各遺伝子型及び、血球食食病態出現前後のマウスの骨髄から誘導した培養マクロファージを調整して、赤血球食食試験を行った。赤血球標識法については、フォスファチジルセリンを介した細胞接着に関与する分子の遺伝子発現上昇が示唆されたので、オプソニン化赤血球に加えて、t-BHP 等の脂質過酸化剤により老化させた赤血球を用いた食食試験を行い、AEP 欠損マウスの病態を再現する実験系を探索した。

(4) 末梢赤血球を用いた赤血球老化試験：遺伝子発現解析により老化赤血球の排除に関わる分子の発現上昇を認めたため、各遺伝子型マウスの末梢赤血球に脂質過酸化剤や栄養枯渇、加温などのストレスを負荷して老化を促進させ、赤血球膜の不斉性破綻の指標となるフォスファチジルセリンをフローサイトメトリーにより測定した。

(5) 遺伝子発現のパスウェイ解析と破骨細胞分化経路の主要関連因子の発現解析：マイクロアレイデータのパスウェイ解析により、マ

クローファージと同じ細胞系譜である破骨細胞の分化誘導に関わる調節分子の発現上昇が観察されたことから、破骨細胞分化に関わる重要な受容体や転写因子、調節因子 (RANK, RANKL, Oscar, Trem2, NFATc1, Ctsk, Tnfrsf11b 等) の発現動態を、定量的 RT-PCR 法により定量した。合わせて、破骨細胞の活性化と関連する血中カルシウム濃度の測定やマイクロ CT による骨密度及び骨量測定を行った。

(6)マクロファージ分化の免疫組織化学的解析：血球貪食症状の発生初期におけるマクロファージの分化・増殖動態を探索するため、骨髄組織標本の汎マクロファージマーカーによる免疫組織染色を行い、各遺伝子型間での比較を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)腹腔マクロファージの貪食能

加齢した B6;129 背景の AEP 欠損マウスの骨髄では、形態を保った成熟赤血球を多数貪食したマクロファージが多数観察され、血球貪食症候群様の病態を示すが、ゴーシェ細胞様の形態を示すマクロファージも見られる。C57BL/6 背景では、さらにゴーシェ細胞様の形態が顕著に見られることから、マクロファージによる赤血球の貪食異常と分解異常の両面から原因を探るべく、C57BL/6 背景のマウス腹腔マクロファージによる検討を行った。チオグリコレートによる滲出性マクロファージでは病態を説明しうる差が見られないため、常在性マクロファージによる検討を加えたが、明らかな違いは見いだせなかった。貪食させる赤血球についても末梢より分離した赤血球をオプソニン化して用いるのに加え、過酸化処理した赤血球による検討も加えたが、AEP 欠損マウスと対照群の赤血球貪食に大きな違いはなく、分解遅延も観察されなかった。

##### (2)マイクロアレイ解析

骨髄から調整した RNA を用いてマイクロアレイにより網羅的に遺伝子発現の違いを検索したところ、AEP 欠損マウスでは共に 50 強の遺伝子発現が増加ないし減少していた。病態との関連が疑われる遺伝子も幾つか見いだせたが、HPS と直接関連しそうなサイトカイン遺伝子の発現変化は見られなかった。

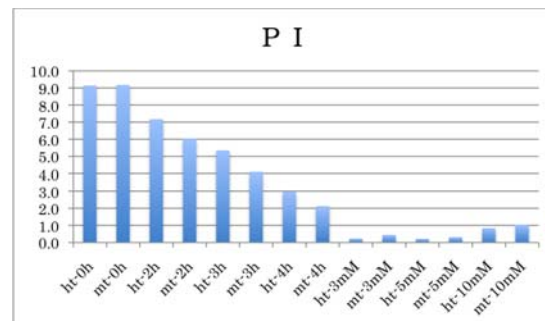


図:AEP 欠損により 1.5 倍以上の発現上昇(左),

同・減少(右)の見られた遺伝子数

##### (3)培養マクロファージの貪食能

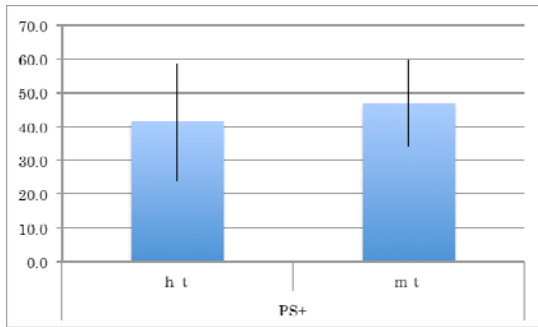
腹腔マクロファージによる貪食試験に大きな差が見られなかったため、骨髄細胞から分化因子によりマクロファージを誘導して得た骨髄由来の培養マクロファージを用いて、末梢赤血球の貪食及び貪食した赤血球の分解動態を解析した。その結果、骨髄細胞の由来する AEP 遺伝子の遺伝子型によらず、骨髄誘導マクロファージは、オプソニン化赤血球を効率よく貪食した。さらに、貪食後の赤血球の分解動態にも異常は認められなかった。AEP 欠損マウスの骨髄を由来とするマクロファージ単独での機能には異常がないことが示唆された。



図：オプソニン化赤血球貪食後の分解動態と t-BHP 処理赤血球の貪食動態

##### (4)赤血球老化

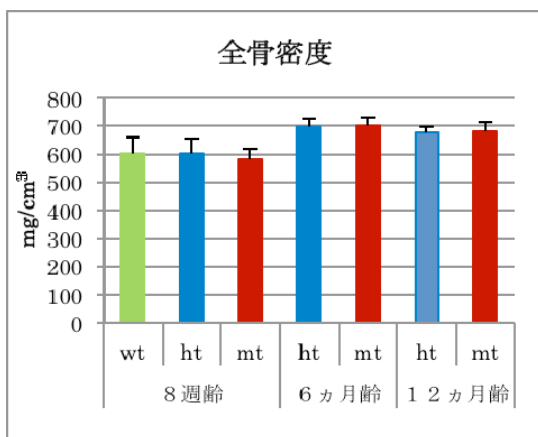
マイクロアレイの解析から、AEP 欠損マウスの骨髄では、加齢時にフォスファチジルセリンを介した貪食亢進を示唆する遺伝子発現の増加が示唆されたので、AEP 欠損マウスの加齢個体における赤血球老化の異常について解析を進めた。ファゴソーム形成に関わる分子の発現も骨髄で顕著に増加していることが分かったので、赤血球を貪食したマクロファージの出現が脾臓ではなく骨髄に限局していることと併せると、骨髄における赤血球造血過程に何らかの異常があることが予想されたが、加齢個体の抹消赤血球を栄養枯渇や加温等の老化促進のための負荷処理を行ったのちにフローサイトメトリにより赤血球表面抗原の状態を観察したものの、AEP 欠損による赤血球の老化促進は観察されず、骨髄における病態形成は、骨髄局所における細胞分化・増殖に起因するものと思われる。



図：血液保存液中 37°C, 36 時間後の赤血球表面のフォスファチジルセリン陽性率

#### (5)破骨細胞分化の解析

マイクロアレイによる骨髄中での遺伝子発現のパスウェイ解析を行ったところ、マクロファージと同じ細胞系譜である破骨細胞の分化シグナルが過剰に入力されている可能性が示唆されたことから、破骨細胞の分化過程で重要な種々のマーカー遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法により解析した。しかしながら、破骨細胞の分化異常を示唆するような遺伝子発現の結果は観察されず、さらにマイクロCT による骨密度および骨塩量の測定結果にも異常は見られなかった。

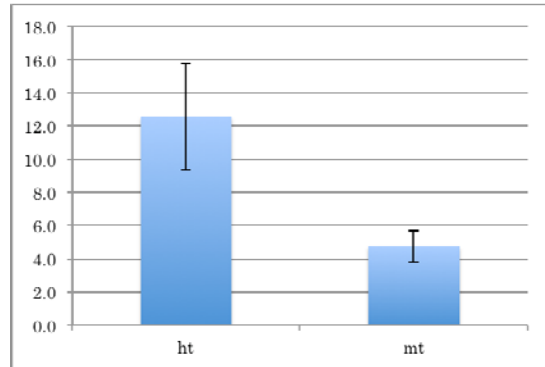


図：骨密度の加齢変化

#### (6)マクロファージ分化マーカーの解析

パスウェイ解析により間葉系細胞の正の増殖調節因子の発現低下も観察された。骨髄中の赤血球貪食細胞を分離・同定することは困難であることから、汎単球・マクロファージ系の細胞マーカーに対する免疫染色により、骨髄中におけるマクロファージ系細胞の細胞動態を、月齢を遡って検索した。その結果、血球貪食病態発生早期において、マーカー陽性細胞数の減少と染色強度の減弱が観察された。骨髄細胞を *in vitro* で分化誘導したマクロファージや腹腔マクロファージによる赤血球貪食は、AEP を欠損したマウスにおいても骨髄中の病態を十分に説明するものではなかったが、骨髄局所においては、マクロファージの増殖および分化状態に異

常のあることが示唆された。



図：CD68 陽性細胞数 (4 ヶ月齢；視野平均)

今後は、汎単球・マクロファージ系マーカーの陽性細胞数と陽性強度の減少が観察されたので、他のマクロファージ分化マーカーを含めて、骨髄中における血球貪食病態の発症早期および前発症期における関連分子の発現動態を詳細に解析し、出生時から AEP を欠損しているマウスが加齢と共に血球貪食病態を発症する機構の解明を通して、病態モデルの確立を目指したい。

#### 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 1 件)

浅野雅秀, 橋本憲佳, Asparaginyl endopeptidase 欠損マウスにおける血球貪食症候群様病態について, 査読無, 血液内科, 63(6), 2011, 634 - 639 (総説)

<http://www.kahyo.com/item/KS201112-636>

[学会発表] (計 2 件)

①橋本憲佳, AEP/Legumain 欠損マウス骨髄における血球貪食症候群様病態の解析, 第 58 回日本実験動物学会総会, 2011 年 5 月 25 日, タワーホール船堀 (東京)

②橋本憲佳, AEP/Legumain 欠損マウスにおける血球貪食症候群様病態の解析, 第 56 回日本実験動物学会, 2009 年 5 月 15 日, 大宮ソニックシティ (埼玉県)

[その他]

ホームページ等

<http://kiea.w3.kanazawa-u.ac.jp/tglab/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 憲佳 (HASHIMOTO NORIYOSHI)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授

研究者番号：50242524

(2)研究分担者

浅野 雅秀 (ASANO MASAHIDE)  
金沢大学・学際科学実験センター・教授  
研究者番号：50251450

(3)連携研究者

該当なし