

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08283

研究課題名（和文）スフィンゴリン脂質によるFc受容体のリガンド親和性調節機構の解明

研究課題名（英文）Regulation in affinity of Fc receptor by sphingolipids

研究代表者

大久保 光修（OKUBO, Koshu）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：60749125

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）：スフィンゴリン脂質の一つLacCerと、そのリガンドである α -glucanが、LacCer以下の細胞内経路；Lyn kinaseとSHP-1を含むリン酸化経路を活性化させる。この経路の最終的なターゲットはFc受容体IIAのITAMであり、ITAMのリン酸化にはNADPHオキシダーゼ、PKC 等の活性酸素種（ROS）産生の調整経路が関連していることが示唆された。また、好中球表面のFc 受容体IIAと免疫複合体との接着がSTIM1およびPKC依存性であった。好中球のFc 受容体IIAエフェクター機能において、免疫複合体との接着がSTIM1、PKC 等の分子によって制御されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では α -glucan/LacCer/Lyn/SHP-1という一連の経路について、そのメカニズムとしてFc 受容体IIAのITAMのリン酸化の関与や重要な分子STIM1やPKC の関わりを示した。その意義はこの経路が発症に関わるとされている疾患群、例えばループス腎炎などの自己免疫性腎炎に対する、腎臓機能の保護、生命予後の改善のための創薬対象の探索に役立つという意義がある。

研究成果の概要（英文）：Lactosylceramide, one of sphingolipids, and its ligand α -glucan activates intracellular phosphorylation pathway including Lyn kinase and SHP-1. Downstream target of this pathway was ITAM of Fc RIIA, and could relate to ROS generation system such as NADPH oxidase or PKC . Attachment of immune complex and Fc RIIA was dependent on STIM1 or PKC . And neutrophil's effector function of Fc RIIA was regulated by STIM1 or PKC .

研究分野：腎臓内科

キーワード：Fc受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好中球は人体において自然免疫機構を担う代表的な細胞であり、生体防御機能を持つ白血球に属する細胞種である。好中球は外来微生物を排除するための武器、すなわち「エフェクター機能」を備えているが、この機能が何らかの原因により制御不全に陥ってしまうと自己組織への攻撃が生じ臓器障害及び病態の形成に至ってしまう。これまでの既報から、細胞膜上に発現する Fc 受容体 IIA は免疫複合体のセンサーとして機能し、好中球エフェクター機能を不適切に作動させる引き金となることが知られている。申請者は Fc 受容体 IIA を制御する可能性のある分子スフィンゴリン脂質(lactosylceramide, LacCer)に注目した。

申請者は、好中球エフェクター機能を不適切に作動させ自己への攻撃・臓器障害及び病態の形成へ至らしめる Fc 受容体 IIA が LacCer に制御されているという仮説を立てた。このような背景のもと、LacCer の下流の経路に存在する Lyn kinase や脱リン酸化酵素である SHP-1、そしてそのターゲットである Fc 受容体 IIA にフォーカスを当て、どのようなメカニズムによって Lyn kinase 依存性に SHP-1 が活性化されるのか、活性化された SHP-1 のターゲットとなる分子は何か、Fc 受容体 IIA の免疫複合体へのリガンド親和性の低下は生体内ではどのような条件下で起こるのかを探究した。

2. 研究の目的

本研究では -glucan/LacCer/Lyn/SHP-1 という複数の分子が関連する一連の cascade について、さらに詳細なメカニズム(ITAM のリン酸化の有無、その時間経過、メカニズムに関わる分子群の同定)について追究する。それにより得られた知見は、将来的に Fc 受容体 IIA が介在する自己免疫疾患 - その代表的な一例としてはループス腎炎と呼ばれる全身性エリテマトーデスに合併する自己免疫性腎炎であり、腎臓機能の維持ひいては生命予後の改善のための創薬対象の探索に役立てることができる。

3. 研究の方法

申請者は好中球と免疫複合体の接着を顕微鏡下で観察・定量する *in vitro* の実験系を採用した。スライドグラスに免疫複合体(任意のリガンドを選択可能だが本研究においては Fc 受容体 IIA のリガンドである免疫複合体(厳密には免疫複合体の抗体 Fc 部位)を使用)を付着させた。そしてメディウム中に一定数に調整した好中球を流し込むことでリガンドと好中球が接触(つまり免疫複合体側の Fc 部分と好中球側の Fc 受容体 IIA が接触)するため、顕微鏡下で接着した好中球数をカウントすることで Fc 受容体 IIA のリガンド親和性を定量するという方法である。この方法により LacCer のリガンドである -glucan(真菌細胞壁の構成成分)の外因的な投与や、また LacCer 以下の細胞内経路における主要分子、Lyn kinase および SHP-1 阻害剤等の投与を行うことで各分子が Fc 受容体 IIA のリガンド親和性に対して果たす役割を検証可能となる。またこの一連の経路において、細胞内リン酸化シグナルの活性化については、リン酸化部位に対する抗体を用いたウェスタンブロット法により確認した。また、好中球における ROS 産生の定量について、マウス由来好中球に対する免疫複合体による架橋刺激を契機に発生する Fc 受容体 IIA 依存性 ROS 産生を測定した。また、*in vivo* においては過去の研究から確立されている動物モデル(マウス)を用いた腎への免疫複合体依存性好中球浸潤を採用した。この方法では免疫複合体を含む腎毒性血清をマウスへ注射することで、腎毛細血管に免疫複合体が沈着、沈着した免疫複合体に接着する好中球を腎臓を観察することで定量した。

4. 研究成果

申請者は LacCer のリガンドの一つである -glucan が、LacCer 以下の細胞内経路 ; Lyn kinase と SHP-1 を含むリン酸化経路を活性化させることを見出した。

-glucan を投与すると、これが白血球表面に接着する。その後細胞内に存在する Lyn kinase が活性化し、これにより脱リン酸化酵素である SHP-1 のリン酸化が進展する。これまで、SHP-1 が Lyn kinase によりリン酸化されるチロシン基として Y536、Y564 が知られていた。-glucan を投与後、Y536、Y564 両者ともリン酸化が促進し約 30 分程度でピークとなる。この際、結果的に Fc 受容体 IIA の免疫複合体へのリガンド親和性が低下するが、Fc 受容体 IIA の細胞内ドメインである ITAM のリン酸化が重要なステップとなっていることを Fc 受容体 IIA の ITAM 変異細胞を用いた実験により見出した。

また、-glucan が Fc 受容体 IIA と免疫複合体との結合を抑制するのは、複数の受容体とリガンドの結合能の総和 = avidity であるのか、1 つの Fc 受容体 IIA の 1 つのリガンド(免疫複合体)に対する親和性 = affinity であるのかを確認するため、免疫複合体をスライドグラス上に層化し、細胞との接着を観察した。結果として -glucan の投与は複数の受容体-リガンドの関与する avidity に影響を与えないことが確認された。この結果は -glucan が影響する接着のメカニズムとして avidity ではなく、受容体とリガンドの 1:1 の親和性すなわち affinity であることが裏付けられた。

次に、 α -glucan/LacCer/Lyn/SHP-1の一連の経路にFc受容体IIAの細胞内ドメインのITAMがどのように関わっているのか探究した。申請者らはITAMのリン酸化にNADPHオキシダーゼ、PKC等の活性酸素種産生の調整経路と、STIM1と呼ばれる細胞内カルシウム濃度調整機構が関与していると仮説を立てた。つまり、Fc受容体IIA依存性ROS産生はその細胞内ドメインITAMが活性化し、カルシウム濃度上昇を感知したNADPHによる過酸化水素の産生、それに続くPKCの活性化が主要な役割を持つと考えFc受容体IIA依存性ROS産生に関与する分子を解析した。マウス由来好中球を抽出し、活性化好中球が産生するROSを評価するためマウス骨髄由来好中球を採取した。マウス大腿骨および脛骨・腓骨から骨髄を抽出し、メディウム中に懸濁、遠心分離法により好中球を採取した。好中球への免疫複合体投与後に発生するROS産生においては、刺激後数十秒でROS産生が活性化されるが1分程度でピークアウトする。その後ROS産生は数分かけて減弱していく。このROS産生を評価したところSTIM1ノックアウトマウス由来好中球では、免疫複合体による架橋刺激を契機に発生するFc受容体IIA依存性ROS産生が抑制されることが分かった。一方で、PKCノックアウトマウス由来好中球においては部分的な抑制に留まった。さらにPKCアクチベータによるROS産生に対しては、STIM1ノックアウトマウス由来好中球においてもPKCノックアウトマウス由来好中球において失われることを見出した。つまりFc受容体IIA依存性ROS産生においてSTIM1およびPKCは重要な役割を持つ分子群であると結論付けた。

一方、Fc受容体IIA依存性ROS産生においてSTIM1およびPKCは重要な役割を持つ分子群であること、*in vivo*における意義について検討した。これまでにFc受容体IIA依存性ROS産生の結果生じる免疫複合体とFc受容体IIAの親和性=affinityの上昇が、マウス腎系球体における好中球と血管内皮細胞の接着と深く関わっていることが分かっているが、この現象にSTIM1およびPKCがどのように関与しているのかを検討した。すなわち、PKC、STIM1ノックアウトマウスにおいて、腎毒性血清投与後に腎へ浸潤する好中球数に変化があるかを観察した。PKC、STIM1ノックアウトマウスでは、腎への浸潤好中球が抑制されることから、腎毒性血清投与後のFc受容体IIA依存性好中球浸潤においてPKC、STIM1は重要な役割を果たす分子であることが示唆された。また、Fc受容体IIAのリガンド親和性がSTIM1に依存しているという想定のもと、この一連の経路を*in vivo*で再現するために腎虚血再灌流モデル(IRI)の構築を行った。IRIにおいてはFc受容体IIA依存性と既に分かっているエフェクター機能の活性化マーカーの上昇が再現されず、Fc受容体IIAのリガンド親和性がSTIM1に依存していることは直接的には示されなかった。一方、*in vitro*においては好中球表面のFc受容体IIAと免疫複合体との接着およびそれに続く拡大(crawling)がSTIM1およびPKC依存性であることを見出した。以上から、好中球エフェクター機能の中でも自己免疫疾患に続発する腎不全を惹起すると考えられているFc受容体IIA機能において、特に免疫複合体との接着を介した組織障害がSTIM1、PKC等の分子によって制御されている可能性が示唆された。

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
研究分担者	平橋 淳一 (Hirahashi Junichi) (70296573)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

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