

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20932

研究課題名（和文）生体イメージングによる、血球貪食症候群における血球貪食機構とその機能的役割の検討

研究課題名（英文）Analysis of hemophagocytic mechanism and the role of engulfing macrophages in hemophagocytic lymphohistiocytosis

研究代表者

藤井 健太郎 (Fujii, Kentaro)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90908328

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究においては、致死的な疾患である血球貪食症候群において、サイトカインストームを背景に起きてくる血球減少の原因と言われる異常に血球を貪食するマクロファージについて解析を行った。まず、生体イメージングを用いて、このマクロファージを生体内で実際に観察することにより、このマクロファージの貪食様式が、定常状態で行われる貪食様式とは異なることを発見した。この結果、定常状態において存在する組織常在性のマクロファージとは別の機能を持った細胞であることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、血球貪食マクロファージは「異常な活性化によって“生きたまま”の造血系細胞を飲み込んでいる」のであり、「高サイトカイン状態で造血系細胞のアポトーシスが過剰に誘導されることで、マクロファージによる貪食処理が亢進している」のではないことが明らかになった。これは、従来の形態学的解析では正確に評価できなかったことである。引き続き、貪食機構を解明することで“致死的な病態である血球貪食症候群においてマクロファージが治療ターゲットになり得るか”を明らかにし、病態理解・治療薬開発の基盤となる研究になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I analyzed macrophages that abnormally engulf blood cells, which are thought to be the cause of pancytopenia associated with cytokine storms in hemophagocytic lymphohistiocytosis, a fatal disease. I observed these macrophages by intravital imaging and found that their phagocytosis mechanism was different from that of macrophages in the steady state. This result suggests that these cells may have different functions from the tissue-resident macrophages that engulf apoptotic cells in the steady state.

研究分野：自己免疫・自己炎症性疾患

キーワード：血球貪食症候群

1. 研究開始当初の背景

血球貪食症候群は、最も重篤で致死的な疾患の一つであり、高サイトカイン血症の発症を早期に発見し強力な免疫抑制療法を行うが、実際に救命出来ない例も多い。特に、感染症をきっかけとして発症する場合には、免疫抑制療法を行うことで感染症治療に難渋するケースが多く、高サイトカイン血症の治療と並行して貪食細胞をターゲットとした治療が望まれている。

血球貪食症候群の知見は、主に一次性 HLH の解析から得られたものである。NK 細胞や細胞障害性 T 細胞の細胞障害活性の遺伝的異常により、標的細胞を効率的に処理できず長期にわたる免疫シナプスの形成が起こり、高 IFN を引き起こした結果として血球貪食が起こるとされる (Schmid.et al.,2010、Jenkins.et al.,2015)。さらに、IFN や TLR 刺激による血球貪食モデルマウスが作成され、IFN と IL-10 のサイトカインバランスの破綻により血球貪食が起こることが示唆されている (Zoller.et al.,2011、Edward.et al.,2011、Scott.et al.,2013)。最近、TLR7 や TLR9 シグナルによって、骨髄由来単球から、貪食能の高いマクロファージが誘導されることが示された (Akilesh. et al.,2019) が、貪食能が高い理由や、その炎症環境に対する機能的役割については検討されていない。

血球貪食マクロファージの炎症環境における役割に関しては、臨床検体を用いた研究により、炎症性サイトカインを産生しているという報告 (Billiau.et al.,2005) がある一方で、M2 マクロファージの活性化マーカーである CD163 が陽性になるため、抗炎症性に働くとする研究もあり、これまではっきりと評価は定まっていない (Crayne.et al.,2019)。さらに、高サイトカイン血症によって eat me シグナル発現が増強した赤血球を貪食することで IL-10 を産生するという報告 (Ohyagi.et al.,2013) が認められる一方、生きた細胞を貪食する系では IL-10 の産生はされない (Ishidome.et al.,2017) という報告も認められる。

このように、申請者が、この病気の本態について調べたところ、マクロファージは炎症を増悪するという報告と抗炎症に働くという報告が混在していることに気づいた。これらの報告において、被貪食血球が生きているか、アポトーシスを起こした細胞であるかがはっきりしておらず、この点に関しては臨床検体を用いた報告でも、十分に検討されてなかった。

2. 研究の目的

血球貪食症候群における血球貪食の実態について明らかにする。特に血球貪食は、「マクロファージの異常な活性化によって“生きたまま”の造血系細胞が飲み込まれている (貪食機能の異常)」のか、「高サイトカイン状態で造血系細胞のアポトーシスが過剰に誘導されることで、マクロファージによる貪食処理 (エフェロサイトーシス) が亢進している (貪食機能は正常)」のかを、明らかにする。従来の形態学的解析では、血球貪食症候群において貪食された細胞の細胞死がどのタイミングどのように起きるかを正確に評価できないためという課題を克服し、この疑問に答えるため、最新の生体イメージングの時空間的解析能を利用し、組織切片では評価できない「被貪食前の血球の細胞死の有無」を評価し、貪食機構を解明する。

また、近年、貪食行為が貪食細胞の機能に与える影響が、特にエフェロサイトーシスにおいて徐々に明らかにされてきており、本研究においては、疾患特異的な貪食マクロファージの機能を、トランスクリプトーム・エピゲノム解析を応用することで解析する。これらの研究により、「被貪食血球の生死が貪食マクロファージの炎症増悪、抗炎症・組織再生能に与える影響」について考察する。本研究は、“致死的な病態である血球貪食症候群においてマクロファージが治療ターゲットになり得るか”を明らかにし、病態理解・治療薬開発の基盤となる研究になることが期待される。

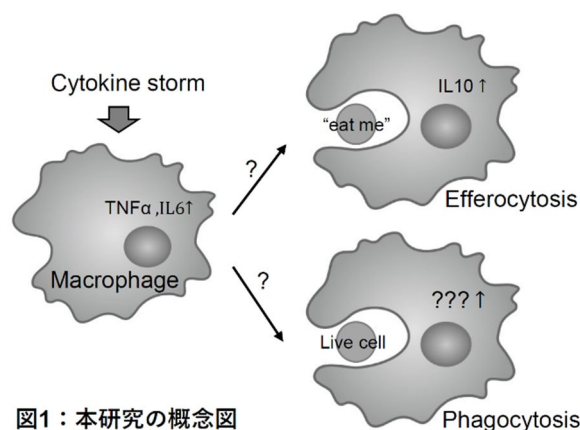


図1：本研究の概念図

3. 研究の方法

二光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングによって、生体内で起こる現象を直接観察し、その現象を正確に評価し解析する手法を用い、in vivo で、血球貪食マクロファージの貪食機構がファゴサイトーシスであるかエフェロサイトーシスであるかを被貪食血球の生死を可視化することではっきりさせる。

また、RNAseqなどのトランスクリプトーム解析を行い、このような疾患特異的な貪食マクロファージがどのような機能を持つのかを解析する。

4. 研究成果

申請者は、LysM-cre Rosa-tdTomato マウス、Cx3Cr1-cre Rosa-tdTomato マウスなど、マクロファージを含む骨髄系細胞を特異的に蛍光タンパクで標識したマウスを、生体イメージング技術を用いて観察することにより、肝臓や骨髄のマクロファージが血球を貪食する瞬間の撮影に取り組んだ。

まず定常状態では、Cell tracerなどで染色した血球細胞を移入しても、マクロファージに貪食されることはなかった。一方で、アポトーシス(caspase3の活性化)を検出の出来る蛍光蛋白(SCAT3.1)を発現させた血球細胞を、スタウロスポリンなどの薬剤によりアポトーシスを誘導した後に移入すると、アポトーシスを起こした血球のみがマクロファージに貪食されることを見いだした(図2)。また、酸性環境下で発現するpH可視化probeを用いて、これらの血球が貪食された後にリソソームで消化されていることを確認した。

次に、既報(Edward.et al.,2011)を参考にしてマウスに血球貪食症候群の発症を評価した。既報では、CpG-ODNを抗IL-10受容体抗体と共に反復投与することで、血球貪食をHE染色で確認しているが視野内の極一部で起こる現象であることが、申請者が同様の実験を行うことで確認できた。申請者らはCpG-ODNに、分解

されにくいphosphorothioate CpG-ODNを使用することで、一視野内で複数の血球貪食マクロファージを検出することを可能とした。上述した生体イメージング技術を用いて、血球貪食症候群におけるマクロファージの血球貪食が、生きた血球を貪食することが可能であるか、貪食後のリソソームでの消化は同様に行われるのかを現在検討中である。引き続き、このマクロファージが疾患特異的に出現するマクロファージであるのか、定常状態で存在するマクロファージの異常活性化であるのかという疑問についても、局在や動態などから考察している。

一般的に、血球をintracellular stainingに染色することで、血球を内包した貪食マクロファージは同定されるが、Fixation and Permeabilizationを行った細胞からトランスクリプトーム解析を行うのは困難とされる。申請者は、蛍光標識を行った血球を移入した細胞がマクロファージ内に内包されている集団を、imaging flowcytometerを利用して同定することで、この問題を解決していた(図3)。これにより、今後、生体イメージングで同定した細胞のトランスクリプトーム解析を行うことが可能になった。

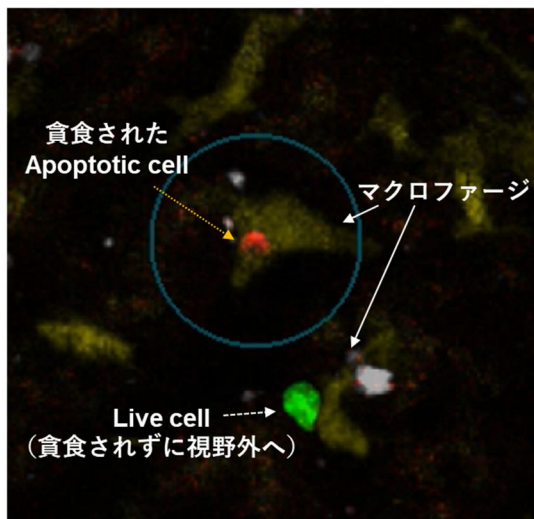


図2



図3; 血球を貪食したマクロファージ

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

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