

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15395

研究課題名（和文）膜型分子CD47によるマクロファージの細胞貪食制御とその分子機序の解明

研究課題名（英文）Importance of dendritic cells in the elimination of CD47-deficient erythrocytes

研究代表者

高井 智子（Takai, Tomoko）

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：90823047

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：死細胞など生体にとって不要な細胞がマクロファージ（M $\phi$ ）に貪食される機序は詳細に検討されているが、正常な細胞がM $\phi$ からの貪食を回避する機序については明らかでない。研究代表者らは、貪食標的細胞上のCD47がM $\phi$ や樹状細胞（DC）上のSIRP $\alpha$ に結合することにより、抗体依存性細胞貪食を強く抑制することを明らかにしている。今回の検討において、CD47遺伝子ノックアウト赤血球（CD47KO RBC）を野生型マウスに投与すると、早期にクリアランスされ、赤脾髄M $\phi$ に取り込まれた。またその際、RPM上のCD36や、脾臓内のcDCの活性化などが、CD47KO RBCのクリアランスに関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに研究代表者らは、CD47-SIRP $\alpha$ 結合を阻害する抗CD47抗体あるいは抗SIRP $\alpha$ 抗体が、リツキシマブなど抗体医薬によるがん細胞のM $\phi$ を介したADCPや抗腫瘍効果を有意に増強することを明らかにし、抗SIRP $\alpha$ 抗体を抗腫瘍薬として用いる臨床開発を進めている。本研究では、貪食標的細胞上のCD47と、マクロファージ（M $\phi$ ）・樹状細胞（DC）上のSIRP $\alpha$ による貪食抑制の機序をより詳細に検討した。本研究の成果は、M $\phi$ による正常あるいは異常細胞の貪食制御の新たな分子機序の解明に繋がると共に、生体の恒常性維持機構の理解やがん・炎症などの病態解明と治療法開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The molecular basis for the regulation of the live cells to escape phagocytosis by macrophage remains not fully understood yet. Interaction of SIRP $\alpha$  expressed on the surface of macrophages with its ligand CD47 expressed on target cells including tumor cells negatively regulates phagocytosis of the latter cells by the former. In this study, we focused on the regulatory mechanisms of the elimination of CD47KO red blood cells (RBCs) in wild type mice. Transfusion of CD47KO RBCs resulted were cleared rapidly from the peripheral blood without opsonization and 50% of the red pulp macrophages (RPMs) phagocytosed the CD47KO RBCs at 2 hours after intravenous injection. We found that CD36 expressed on RPMs may be involved in the phagocytosis of CD47KO RBCs. In addition to RPMs, splenic dendritic cells (DCs) were also activated and may participate in the elimination of CD47KO RBCs in WT mice.

研究分野：病態医化学

キーワード：マクロファージ 樹状細胞 生細胞貪食 CD47 SIRP

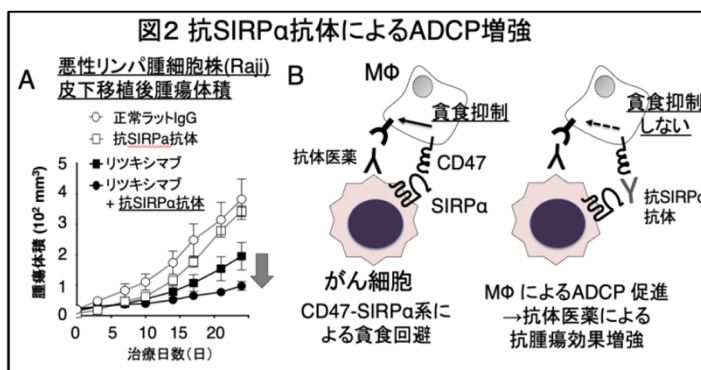
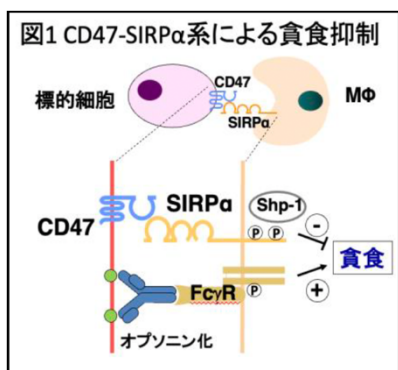
1. 研究開始当初の背景

個体の臓器、組織を形成する様々な細胞は、幹細胞からの増殖・分化を経て固有の機能を発揮した後、適切な時期に脾臓や組織に存在するマクロファージ (MΦ) など食食細胞の作用により捕食・異化される。感染などにより引き起こされる炎症部位では、大量の炎症細胞がその役目を果たすと MΦ により処理され、組織修復が行われる。また、MΦ は、がん細胞の発生を感知しこれを捕食・処理するとともに、他の獲得系免疫細胞を活性化しがん細胞の増殖を抑制する役目を担う。これらの過程が正確かつ適切に行なわれることにより、臓器・組織の恒常性が維持され、個体の生存が可能となる。MΦ が不要あるいは有害な生細胞を食食する分子機序については、かなり解明が進んでいる。例えば、抗体や補体による細胞のオプソニン化が MΦ の受容体を介して食食が刺激されること、アポトーシス細胞の細胞表面に露出したホスファチジルセリンがリガンドとなり MΦ によるアポトーシス細胞の食食が促進されることなどが明らかにされている。一方、正常細胞やがん細胞が如何に MΦ からの食食を回避しているのか、MΦ による細胞食食の抑制に関わる分子機序については十分に明らかでない。

2. 研究の目的

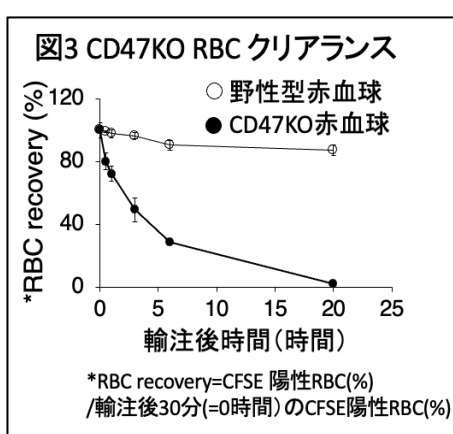
研究代表者は、上記の課題に対して、膜型分子である CD47 の機能に注目して研究を進めている。CD47 は細胞外部分に免疫グロブリン様ドメインを持つ 5 回膜貫通型の分子であり、ユビキタスな発現を示す (Matozaki et al., Trends Cell Biol, 2009, 図 1)。これまで研究代表者の所属する研究室では、抗体によりオプソニン化された食食標的細胞 (血球細胞やがん細胞など) が、MΦ の Fcγ 受容体を介した抗体依存性細胞食食 (ADCP) を受ける際に、食食標的細胞上に発現する CD47 が、MΦ に発現する膜型分子 SIRPα の細胞外領域にトランスに結合することにより、SIRPα の細胞内領域に結合する Shp-1 チロシンホスファターゼの活性化を介して、ADCP を強力に抑制することを明らかにした (図 1)。最近では、この CD47-SIRPα 系による MΦ の細胞食食の抑制的制御は、がん細胞が CD47 を強く発現することにより、がん周囲組織に浸潤する MΦ から、がん細胞が、食食・排除を回避する機構の 1 つとしても注目されている (Murata et al., Cancer Sci., 2018)。

研究代表者の所属する研究室では、CD47-SIRPα 結合を阻害する抗 SIRPα 抗体が、リツキシマブ (抗 CD20 抗体) など抗体医薬によるがん細胞の ADCP を促進し、抗腫瘍効果を有意に増強することを明らかにした (Murata et al., Cancer Sci., 2018, 図 2A ●■)。現在、この抗 SIRPα 抗体を抗腫瘍薬として用いる臨床開発を進めている。しかし、この抗 SIRPα 抗体による抗腫瘍効果は、がん細胞をオプソニン化する抗体の存在下でのみ認められ、抗 SIRPα 抗体単独では認められない (図 2A ○□)。従って、この CD47-SIRPα 結合を介した MΦ の食食抑制は、食食標的細胞がオプソニン化された際の食食促進シグナルに限定した抑制作用であると考えられた (図 2B)。



以前より、CD47 遺伝子ノックアウトマウス由来の CD47 欠損赤血球 (CD47KO RBC) を野生型マウスに輸注すると、非オプソニン化状態であるにもかかわらず、赤脾髄マクロファージ (Red pulp macrophage, RPM) に食食され末梢血中より急速に消失することが知られている (図 3, Oldenberg et al., Science, 2000)。上記のがん細胞と同様に、抗 SIRPα 抗体を投与しても、野生型 RBC の食食の亢進は認めない。このことから、MΦ 上の SIRPα と RBC 上の CD47 の結合が阻害されただけでは、MΦ による標的細胞の食食は増加しないと考えられた。

そこで研究代表者は普段は CD47 によって負に制御されている食食促進分子 X が CD47 欠損細胞上に発現・機能していると想定し、新たな食食制御シグナルを同



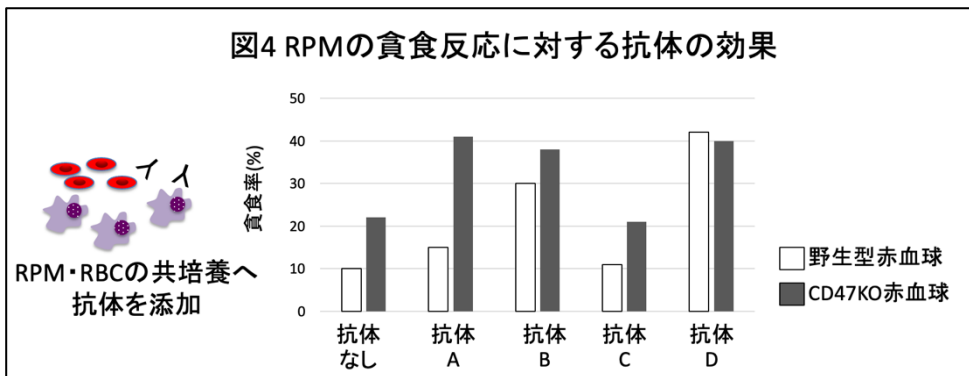
定することを目的とした。本研究の成果は、MΦによる正常あるいは異常細胞の食食制御の新たな分子機序の解明に繋がると共に、生体の恒常性維持機構の理解やがん・炎症などの病態解明と治療法開発に貢献することが期待される。

### 3. 研究の方法

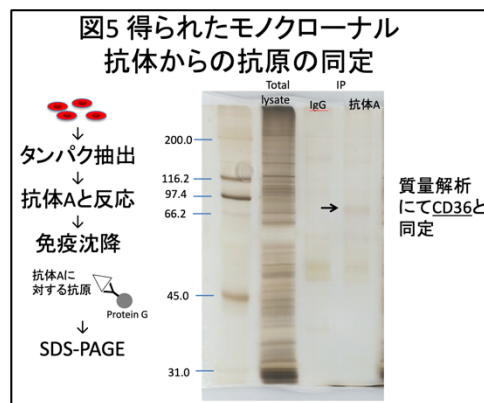
研究代表者は普段はCD47によって負に制御されている食食促進分子Xが、CD47欠損赤血球上には発現・機能していると想定している。このため、CD47欠損マウス赤血球をラットに免疫し、CD47欠損マウス赤血球上の分子を抗原としたモノクローナル抗体を得て、その抗原を同定し、食食促進分子Xの候補となるかを検討することとした。

### 4. 研究成果

上記方法で得たモノクローナル抗体を用いて、RPMのCD47KO RBCに対する食食反応を変化させる性質を持っているかどうかを検討した。RPMと蛍光(CFSE)ラベル



CD47KO RBCを共培養するとRPMはCD47KO RBCを食食し、CFSE陽性となることを確認し、この結果から、in vitroにおいてもRPMはCD47KO RBCを食食すると考えられた。次に得られたモノクローナル抗体を用いて、共培養メディウム内に加え、RPMのCD47KO RBCに対する食食反応が変化するかについて検討した。この結果、CD47KO RBCに対する食食反応をさせる抗体は数種類得られ(図4)、そのうちの1つである、抗体Aについて解析を行った。まずは、抗体Aに対する抗原の同定を試みた。赤血球からタンパク抽出を行い、得た抗体と反応させて免疫沈降を行った。SDS-PAGE、銀染色を行い、抗体Aが認識していると考えられたバンドに対して、質量分析を行い、抗原を同定した(図5)。この結果、抗体AはCD36を認識する抗体であった。CD36はスカベンジャー受容体として知られる2回膜貫通タンパクであり、赤血球上だけでなく、RPM上にも発現していた。そこで抗CD36抗体やCD36欠損マウスを用いた解析を行なったところ、RPMにおけるCD36の欠損は、RPMの食食反応を低下させる可能性が考えられた。現在、食食促進分子Xに対する抗体を見つけられてはいないが、CD36はRPMの食食において重要な役割を持つ分子の1つであると考えられた。



また、CD47KO RBCの食食を促進するような、他の免疫細胞の働きやサイトカインなどのシグナルが存在する可能性も考えられたため、in vivoにおいても検討を行った。CFSEラベルしたCD47KO RBC輸注後2時間において、50%以上のRPMはCFSE陽性となり、RPMはCD47KO RBCに対して非常に強い食食反応を示すと考えられる。さらに、最近研究代表者は、CD47KO RBC輸注により、脾臓内のCD11c陽性樹状細胞(classical dendritic cell, cDC)が活性化され、chloclonate liposomeによりDC、RPMを除去すると、CD47KO RBCのクリアランスはほぼ完全に抑制されることを確認した。DCを除去したマウス(ジフテリア毒素誘導性DC欠損マウス)においてもクリアランスは抑制され、CD47KO RBCの急速なクリアランスにcDCが関与すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田陽二、坂本茉莉子、高井智子、齊藤泰之、小谷武徳、的崎尚
2. 発表標題 マクロファージ SIRP-1を標的とした新たながん免疫療法
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小谷武徳、高井智子、齊藤泰之、村田陽二、的崎尚
2. 発表標題 マクロファージによるがん細胞貪食を制御する分子基盤の解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小谷 武徳、高井智子、小森里美、齊藤 泰之、村田 陽二、的崎 尚
2. 発表標題 細胞間シグナルCD47-SIRP系による細胞貪食制御機序とその新規がん治療への応用
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuyuki Saito, Satomi Komori, Hiroki Yoshida, risa Sugihara, Tomoko Takai, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki
2. 発表標題 Dendritic cells regulate peripheral T cell survival through the CD47-SIRP signaling
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satomi Komori, Yasuyuki Saito, Taichi Nishimura, Hiroki Yoshida, Risa Sugihara, Tomoko Takai, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki
2. 発表標題 SIRP and CD47 promote cDC2 survival through the regulation of transcriptional factor Nr4a3
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高井智子、小谷武徳、斎藤泰之、村田陽二、的崎尚
2. 発表標題 CD47欠損細胞の排除における樹状細胞の重要性
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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