

血球細胞寿命を制御する新たな分子基盤の解明

齊藤泰之

神戸大学大学院医学研究科 シグナル統合学分野

【研究の背景】

受容体型膜タンパクである Signal regularity protein α (SIRP α) は細胞外領域 (N 末端側) を介してリガンドである CD47 と結合する。その結果、SIRP α の細胞内領域のリン酸化によりチロシンフォスファターゼ SHP-1 が SIRP α の細胞内領域に結合し、抑制系のシグナルを伝達する。SIRP α は免疫細胞のうち、樹状細胞 (DC)、マクロファージなどの貪食細胞に特異的に発現する一方、CD47 は血球・非血球全ての細胞に発現する。申請者の属する研究室では CD47 欠損ならびに SIRP α 欠損マウスを用いた検討から、CD47-SIRP α 系による貪食細胞の貪食制御機構を明らかにしてきた。しかしながら、この貪食制御機構について明らかになってない点が幾つかある。① CD47 欠損マウス由来の血液細胞は野生型マウスに投与すると速やかに排除されるにも関わらず、CD47 欠損マウスや SIRP α 欠損マウスの血球数には大きな異常は認めない^{1, 2)}。さらに、in vitro における貪食実験においても、CD47 欠損赤血球は野生型由来のマクロファージにより貪食されるが、CD47 欠損マウス由来あるいは SIRP α 欠損マウス由来の脾臓マクロファージではこの貪食効果が抑制された^{1, 3)}。すなわち、CD47-SIRP α 系による細胞貪食の抑制機構には、標的細胞側の CD47 の発現のみならず、貪食細胞側の CD47 と SIRP α の両方による DC・マクロファージの機能制御が関与すると考えられる。

【目 的】

本課題においては、CD47-SIRP α 系による DC・マクロファージを介した血球細胞の寿命制御の全容を明らかにすることを目的とする。

【方 法】

本課題では、全身性 CD47 欠損マウス (*Cd47*^{-/-})⁴⁾ に加え、CD47 loxP マウス⁴⁾ に白血球依存性 Cre マウスを掛け合わせることで、白血球特異的に CD47 を欠損させたマウスを作製した。免疫細胞の単離にはセルソーター (BD FACSAriaIII) を用い、単離した細胞より total RNA を抽出、RT-PCR により cDNA ライブラリを作製したのちに次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析をおこなった。また、CHO/Ras 細胞に CD47 や SIRP α (とこれらの変異体) を強制発現させた細胞を作製し、CD47 と SIRP α との相互作用を調べた。

【結 果】

これまでの文献で示されているように、全身性に CD47 を欠損させた *Cd47*^{-/-} マウスより単離した細胞 (赤血球、白血球) を野生型マウスに投与した際に CD47 欠損細胞が野生型マウスの体内で速やか (24 時間以内) に排除されることから、CD47 が発現しない細胞は非自己と認識された結果野生型マウスの体内で排除されることを確認した。一方、*Cd47*^{-/-} マウス自身は血球細胞の数に異常は認めないこと、CD47 欠損血球を *Cd47*^{-/-} マウスに投与した際、CD47 欠損血球は *Cd47*^{-/-} マウスより排除されないことから、CD47 欠損細胞の排除には標的細胞以外の細胞での CD47 の発現が重要であると考えられた。そこで標的細胞のみに CD47 を欠損させることを目的に、白血球特異的に CD47 を欠損させたマウスを作製し、仮説通りの結

果を得ることができた(論文未発表のため具体的な情報は割愛します)。さらに現在、CD47 欠損細胞の排除に関与する分子機構を解明するために白血球特異的 CD47 欠損マウスより単離した細胞を用いて RNA-seq 解析を行い、炎症性変化や細胞死に関連する遺伝子発現の増加を認めた。一方、同一細胞上の CD47 と SIRP α との結合様式についても SIRP α と CD47 を共発現させた培養細胞において、これまでの報告とは異なった結合様式を呈する可能性を見出している。

【考 察】

今回の研究成果により、CD47 は赤血球のみならず白血球においても CD47-SIRP α 系を介した自己/非自己の認識機構が存在することが示唆され、その機序として赤血球とは異なった認識機構が存在する可能性が高い。さらに、CD47-SIRP α 結合に関しても、新たな結合様式を見出しつつある。老化した血液細胞において CD47 の発現が減少する報告もあり、本研究成果は血球寿命における新たな制御機構につながる可能性が示唆される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年の研究から、貪食細胞の多様性が明らかとなり、DC・マクロファージの重要性が再認識されつつある。実際に CD47-SIRP α 結合を標的とした薬剤の開発が世界中で進んでいる。本研究成果により、貪食細胞の機能を制御する新たな分子基盤として研究の発展性が期待されるだけでなく、標的細胞をがん細胞とすることで、がんに対する新規免疫療法の開発につながることを期待される。

【参考・引用文献】

1. Oldenborg, P.-A., Zheleznyak, A., Lagenaur, C.F., Gresham, H.D., and Lindberg, F.P. (2000). Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288, 2051-2054.
2. Ishikawa-Sekigami, T., Kaneko, Y., Okazawa, H., Tomizawa, T., Okajo, J., Saito, Y., Okuzawa, C., Sugawara-Yokoo, M., Nishiyama, U., Ohnishi, H., et al. (2006). SHPS-1 promotes the survival of circulating erythrocytes through inhibition of phagocytosis by splenic macrophages. *Blood* 107, 341-348.
3. Ishikawa-Sekigami, T., Kaneko, Y., Saito, Y., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Oldenborg, P.A., Nojima Y, Matozaki T. (2006) Enhanced phagocytosis of CD47-deficient red blood cells by splenic macrophages requires SHPS-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343, 1197-1200.
4. Saito, Y., Respatika, D., Komori, S., Washio, K., Nishimura, T., Kotani, T., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Kaneko, Y., et al. (2017). SIRP α (+) dendritic cells regulate homeostasis of fibroblastic reticular cells via TNF receptor ligands in the adult spleen. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 201711345-E10160.