

52. マクロファージによる生体恒常性維持の分子基盤

的崎 尚

神戸大学 大学院医学研究科 生化学・分子生物学講座 シグナル統合学分野

Key words : マクロファージ, CD47-SIRP α 系, Eat me シグナル, 貪食

緒言

生体の臓器、組織を形成する様々な種類の細胞は、生理的な条件下で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 (M Φ) など貪食細胞の作用により捕食・異化される。炎症では、大量に増殖した炎症性細胞がその役目を果たすと適切に貪食細胞により処理され、その後、組織修復が円滑に行われる。また、M Φ 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われることにより、組織・臓器そして生体の恒常性が維持される。しかし、老化細胞、炎症性細胞やがん細胞などの異常な生細胞を M Φ が如何にして認識し捕食、異化するのか、さらには健康な生細胞はいかに M Φ からの貪食を回避しているのか、その分子機構については多くが不明である。

これまでに研究代表者は、上記の M Φ による正常・異常な生細胞の認識機序の鍵となると考えられる細胞間シグナル“CD47-SIRP α 系”を見出していた。SIRP α は、研究代表者が発見した 1 回膜貫通型のレセプター型分子であり、その細胞外領域を介してリガンドであり 5 回膜貫通型分子である CD47 とトランスに結合する [1, 2]。SIRP α は、M Φ など骨髄系細胞に高度に発現するが、その他の血液細胞には発現が認められない。一方、CD47はユビキタスに発現する。研究代表者や欧米の研究者らによる、CD47 あるいは SIRP α 遺伝子欠損 (KO) マウス、また CD47-SIRP α 結合を阻害する抗体などを用いた検討から、血液細胞やがん細胞上に発現する CD47 は M Φ 上に発現する SIRP α に結合することにより、Fc γ 受容体などを介し促進される細胞貪食を抑制することを明らかにしてきた。

これまでの研究成果から、貪食標的となる細胞上の CD47 が M Φ による貪食を抑制する機序は 2 つあることを研究代表者は想定している。第一は、CD47 が M Φ の SIRP α に結合することで M Φ の抗体依存性貪食 (ADCP) 活性などを直接抑制することであるが、第二は、CD47 が血球細胞やがん細胞上に備わっている M Φ に対する未同定の「Eat me シグナル分子 X」の機能を抑え込むことで M Φ からの貪食を回避する役割である。さらに、最近の我々の検討では、M Φ に発現する CD47 がインテグリン β 3、Fc γ 受容体とシスに複合体形成すると共に、SIRP α とシスあるいはトランスに相互作用して細胞貪食を制御していることが明らかになりつつある。そこで、本研究では、上記の独自に得ている知見を踏まえ、CD47-SIRP α 系による M Φ の生細胞貪食制御の全容を分子レベルで解明しようと試みた。さらに、その成果を、貪食細胞を利用した新たながん治療法の開発に応用しようと試みた。

方法

1. マウス CD47 欠損赤血球タンパク質を認識するラットモノクローナル抗体の作製

CD47 KO マウスから採血した血液を Wister ラットに注射することで免疫した。最初の免疫から 4 週間後にラットからリンパ節を採取し、ラット由来リンパ節細胞とマウス骨髄腫由来の細胞株である P3U1 細胞を融合させることによってハイブリドーマを作製し、マウス CD47 欠損赤血球タンパク質を抗原とするラットモノクローナル抗体を得た。

2. 野生型および CD47 欠損赤血球の膜タンパク質についての生化学的比較

野生型および CD47 KO マウスから採血した血液を溶血させることで赤血球ゴースト (赤血球膜) を作製し、赤血球

ゴーストタンパク質を可溶化後、SDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後のゲルについて銀染色を行い、さらにこの銀染色によって得られたタンパク質バンドにつき、質量分析を行った。

3. 脾臓MΦによる赤血球の *in vitro* 貪食実験

野生型、CD47欠損ならびにSIRP α 欠損マウス脾臓より単離したMΦを24wellプレートに播種した。その後CFSEによりラベルした野生型もしくはCD47欠損マウス由来血液を加え、*in vitro*での貪食実験を行った。2時間後にMΦを回収し、赤血球を取り込んだMΦの比率(CFSE+F4/80+)をフローサイトメトリーにより算出した。

4. 近接ライゲーシオンアッセイ

Duolink PLAキット(Sigma-Aldrich社)を用い、マウスCD47およびSIRP α 結合プローブを作製した。これらのプローブをマウスCD47およびSIRP α を発現するプラスミドを導入したCHO/Ras細胞に結合、反応させ、共焦点顕微鏡下にてCD47とSIRP α 結合シグナルの観察を行った。

5. CRISPR-Cas9システムを用いたCD47発現欠損(CD47 KO)がん細胞株の樹立

マウスCD47に対するsgRNAとCas9を発現するプラスミドをマウス由来がん細胞に導入することで、CD47の発現を失ったCD47 KOがん細胞株を樹立した。

6. 腫瘍モデルマウスの作製

6~8週令の雌の野生型マウスの皮下に、野生型マウス由来がん細胞もしくはCD47KOがん細胞を移植し、皮下に形成された腫瘍の短径(a)と長径(b)を、デジタルノギスを用い経時的に測定することで、腫瘍体積($[a \times b^2] / 2$)を求めた。

7. マウスCD47のノックダウン

マウスCD47に対するsiRNAもしくはコントロールsiRNAをマウス由来がん細胞に対してLipofectamine RNAiMAX(Thermo Fisher Scientific社)を用い導入することで、CD47のノックダウンを行った。ノックダウンの効率はsiRNA導入2日後にFACSにて確認した。

結果および考察

1. 貪食標的となる生細胞に発現するCD47の機能解析

CD47を欠損した細胞で現れると想定している「Eat me シグナル分子X」の同定を行うことを目的に、野生型およびCD47欠損赤血球の膜タンパク質についてSDS-PAGE後に銀染色を行い、タンパク質バンドにつき比較した。その結果、野生型およびCD47欠損赤血球の膜タンパク質間で発現量の異なるタンパク質を目視では見出すことができなかった(図1)。また、この銀染色によって得られた全てのバンドについて質量分析を行ったが、やはり野生型およびCD47欠損赤血球間での違いは認められなかった。

そこで別のアプローチとして、マウスのCD47欠損赤血球をラットに免疫することで「Eat me シグナル分子X」に対するラットモノクローナル抗体の作製も試みた。その結果、CD47欠損赤血球の膜タンパク質を認識する多くのラットモノクローナル抗体が得られた。さらに、脾臓MΦによる赤血球貪食における得られたラットモノクローナル抗体の作用についても評価を行った。通常、野生型の脾臓MΦは野生型赤血球よりもCD47欠損赤血球を多く貪食するが(図2a)、得られた抗体の中には脾臓MΦのCD47欠損赤血球に対する貪食に対して機能する傾向のあるものも見られ(データは示さない)、このような抗体が認識する抗原タンパク質が「Eat me シグナル分子X」である可能性がある。そこで現在、この抗体を用いた抗原タンパク質のアフィニティー精製、同定を進めている。

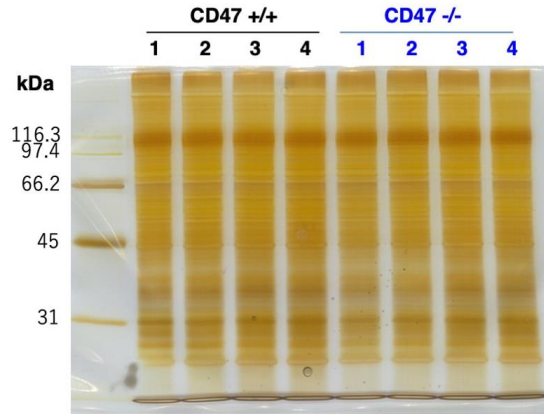


図 1. 野生型および CD47 欠損赤血球の膜タンパク質についての比較
 野生型マウス (CD47^{+/+}) および CD47 KO マウス (CD47^{-/-}) 各 4 匹の赤血球膜タンパク質
 について SDS-PAGE を行い、銀染色により検出した。

2. MΦ に発現する CD47-SIRPα 系の機能解析

研究代表者らは CD47 KO マウス由来赤血球を野生型マウスに輸血すると、非オプソニン化状態であるにも関わらず末梢血中より急速に消失し、また *in vitro* においても非オプソニン化 CD47 欠損赤血球は野生型マウス由来の脾臓 MΦ により効率よく貪食されることを見出していた (図 2a)。一方で、CD47 全身欠損マウスにおいては貧血を認めず、SIRPα 欠損マウスにおいても軽度の貧血のみであることから、MΦ 上の CD47 および SIRPα の発現が CD47 欠損赤血球の貪食に重要であることが推測された。そこで CD47 および SIRPα 欠損マウス由来脾臓 MΦ を用いて CD47 欠損赤血球に対する貪食を *in vitro* で検討したところ、CD47 欠損赤血球に対する MΦ の貪食率は、CD47 欠損および SIRPα 欠損脾臓 MΦ で低下していることが明らかとなった (図 2b)。さらに、CD47 と SIRPα を共発現させた細胞株を用い、近接ライゲーションアッセイ (PLA) によって同一細胞上の CD47 と SIRPα 結合を共焦点顕微鏡下にて確認した (データは示さない)。このことから、MΦ 上での CD47 と SIRPα のシス結合が、CD47 欠損赤血球に対する貪食作用を制御している可能性を有すると考えられた。

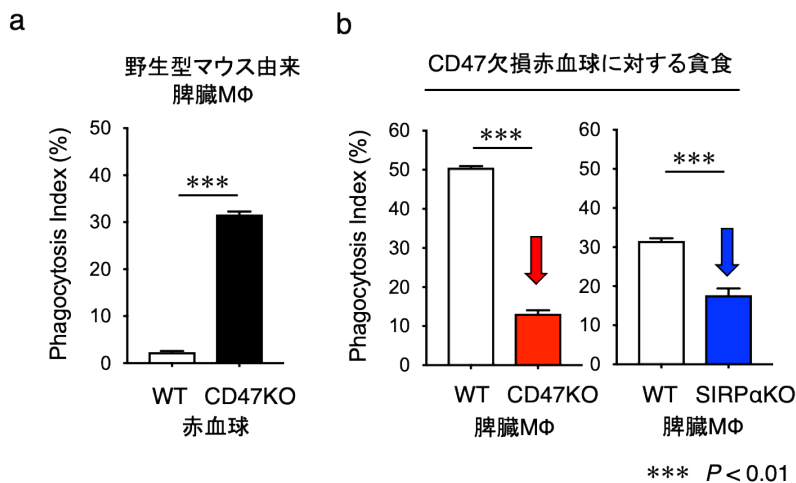


図 2. CD47 欠損赤血球に対する脾臓 MΦ による *in vitro* 貪食能の検討

- 野生型もしくは CD47 欠損赤血球と野生型由来脾臓 MΦ を共培養し、フローサイトメトリーを用いて赤血球を取り込んだ脾臓 MΦ の比率を Phagocytosis index として算出した。
- CD47 欠損赤血球と CD47 もしくは SIRPα 欠損マウス由来脾臓 MΦ を共培養し、a) 同様フローサイトメトリーを用いて Phagocytosis index として算出した。
 P 値は Student t 検定を用いて求めた (a, b)。

3. CD47 ノックダウン (KD) を利用したがん治療法の開発

これまでに、研究代表者らは MΦ とがん細胞間で形成される CD47-SIRP α 系が、MΦ によるがん細胞の貪食を抑制的に制御することを見出ししていた [3, 4]。このことから、生体内でのがん細胞における CD47 の発現抑制が MΦ によるがん細胞の貪食排除を高め効果的な抗腫瘍効果を惹起する可能性が想定された。そこで、CRISPR-Cas9 システムを利用し、CD47 の発現を失ったマウス由来がん細胞 (CD47 KO がん細胞) を樹立し (図 3a)、得られた CD47 KO がん細胞が野生型がん細胞に比べマウス生体内において効率的に排除され得るかについて評価を行った。その結果、CD47 KO がん細胞は、マウスの皮下に移植された際、野生型がん細胞に比べその腫瘍形成が著明に抑制されることが明らかとなった (図 3b)。さらに、*in vitro*での MΦ によるがん細胞の貪食実験を行ったところ、CD47 KO がん細胞では、野生型がん細胞に比べ、MΦ による貪食作用に対する感受性が高まっていることが確認された (データは示さない)。これらの実験結果から、生体内でのがん細胞の CD47 発現抑制が、MΦ によるがん細胞の貪食排除を高め、効果的な抗腫瘍効果をもたらす可能性が強く示唆された。

生体内において特定の遺伝子の発現を抑制する方法の一つとして、標的分子に対する siRNA を用いる方法が挙げられる。また、siRNA をリポソームに内包しそれを投与することで、正常な組織に比べ、腫瘍組織に siRNA が効率的に到達することが知られている。そこで、生体内でのがん細胞の CD47 の発現抑制を行う目的で、マウス由来がん細胞を用いマウス CD47 の発現を抑制する siRNA の検索を進め、図 4 で示すように CD47 の発現を効果的に抑制する siRNA (CD47 siRNA) を取得するに至った。この結果をもとに、リポソームに内包したマウス CD47siRNA を用い、*in vitro* および *in vivo*において MΦ を介した抗腫瘍効果を増強するかについて解析を進めるに至った。

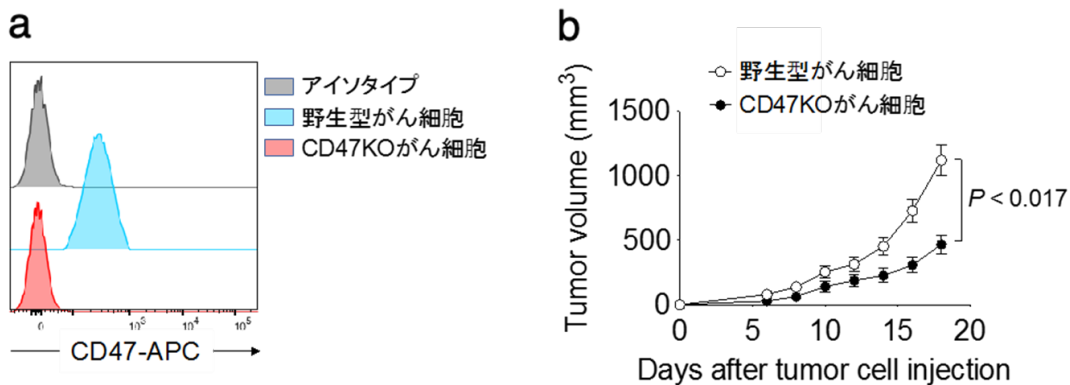


図 3. CD47 発現欠損がん細胞株の樹立とマウス生体内におけるその腫瘍形成

- CRISPR-Cas9 システムを用い作製した CD47 発現欠損 (CD47KO) がん細胞 (マウス由来がん細胞) と野生型がん細胞における FACS による CD47 の発現解析。
- マウス皮下に移植された CD47KO がん細胞 (マウス由来がん細胞) と野生型がん細胞による腫瘍形成。P 値は Two-way repeated-measures ANOVA (グリーンハウス・ゲイサーの補正を伴う) 後に Šídák 法による多重比較検定を行い求めた。

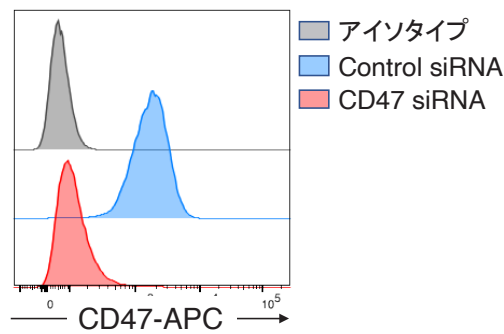


図 4. マウス由来がん細胞における CD47 特異的 siRNA による CD47 の発現抑制
 CD47 特異的 siRNA (CD47 siRNA) もしくはコントロール siRNA (Control siRNA) を
 導入したマウス由来がん細胞における FACS による CD47 の発現解析。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、神戸大学大学院医学研究科生化学・分子生物学講座シグナル統合学分野の村田陽二准教授、齋藤泰之講師、小谷武徳助教である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRP α signalling pathway. *Trends Cell Biol.* 2009 Feb;19(2):72-80. Epub 2009 Jan 12. PMID: 19144521 DOI: 10.1016/j.tcb.2008.12.001.
- 2) Murata Y, Kotani T, Ohnishi H, Matozaki T. The CD47-SIRP α signalling system: its physiological roles and therapeutic application. *J Biochem.* 2014 Jun;155(6):335-44. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24627525 DOI: 10.1093/jb/mvu017.
- 3) Yanagita T, Murata Y, Tanaka D, Motegi SI, Arai E, Daniwijaya EW, Hazama D, Washio K, Saito Y, Kotani T, Ohnishi H, Oldenborg PA, Garcia NV, Miyasaka M, Ishikawa O, Kanai Y, Komori T, Matozaki T. Anti-SIRP α antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. *JCI Insight.* 2017 Jan 12;2(1):e89140. PMID: 28097229 DOI: 10.1172/jci.insight.89140.
- 4) Murata Y, Saito Y, Kotani T, Matozaki T. CD47-signal regulatory protein α signaling system and its application to cancer immunotherapy. *Cancer Sci.* 2018 Aug;109(8):2349-2357. Epub 2018 Jul 4. PMID: 29873856 DOI: 10.1111/cas.13663.