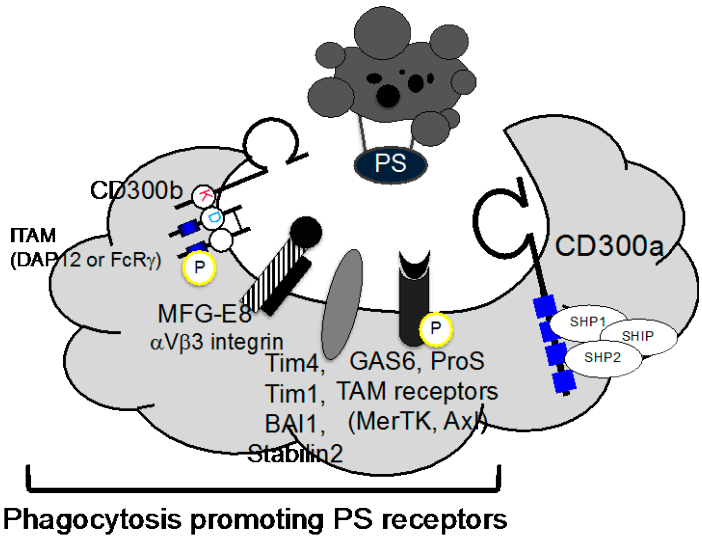
30　死細胞の貪食を制御する機構の解明	小田　ちぐさ

【目的】アポトーシス細胞の貪食は貪食細胞に発現するホスファチジルセリン(Phosphatidylserine, PS) 受容体が担っているが、その制御機構については充分に解明されていない。我々は、マクロファージなどの骨髄球系細胞に発現する抑制性免疫受容体である CD300a を同定し、CD300a が新しい PS 受容体であることを明らかにしてきたが、最近、マクロファージ上に発現する CD300a がアポトーシス細胞上の PS と結合して、貪食を抑制するというこれまで知られていなかった現象を見いだした。本研究では、CD300a による死細胞の貪食抑制のメカニズムと、その病理学的意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】CD300a 遺伝子欠損マウス、およびコントロールマウスからの腹腔マクロファージを用いて、pH 感受性の蛍光でラベルした死細胞を貪食させ、その割合をフローサイトメトリー法にて解析した。さらに、マウスモデルとして、腎虚血再灌流モデルを作製し、マクロファージ上で CD300a が欠損しているコンディショナルノックアウトマウス(*Cd300a*$^{f1/f1}$ *Lyz2*-Cre マウス)およびコントロールマウスを用いた腎機能、腎組織病理学的解析を行なった。

【結果】CD300a による死細胞に対する貪食抑制は、マクロファージ上の貪食を促進する活性化 PS 受容体を標的としていることを明らかにした。また、CD300a が死細胞の貪食を抑制していることによる病理学的意義を明らかにするために、死細胞が短時間に多く出現する急性虚血性疾患のマウスモデルとして、マウス腎虚血再灌流モデルを作製した。マクロファージ上の CD300a 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスでは、コントロールマウスと比較して腎機能が保たれ、腎組織における腎障害の程度が軽度であった。これらのことから、CD300a は貪食を制御する新たな PS 受容体であり、死細胞の貪食を制御することで虚血性疾患の新たな治療法が提起できる可能性が生じた。

CD300a によるマクロファージ上の貪食抑制



30. 死細胞の貪食を制御する機構の解明

小田　ちぐさ

筑波大学 医学医療系 生命医科学域 免疫制御医学

Key words：貪食，CD300a，死細胞，ホスファチジルセリン，マクロファージ

緒　言

ヒトの体内では毎秒 100 万個以上の細胞にアポトーシスが誘導されるが、通常はマクロファージなどの貪食細胞によるアポトーシス細胞の貪食が速やかに行われているために、生体の恒常性が維持されている。しかし一方で、貪食機能の過度の亢進は、貪食されるべきでない生細胞の貪食による、血球貪食症候群などの疾患につながる。したがって、生体には貪食機能の適切な制御が必須である。

貪食は、死細胞や活性化した細胞で表出してくる、膜リン脂質であるホスファチジルセリン（phosphatidylserine：PS）を目印に、貪食細胞上の Tim-1、Tim-3、Stabilin-2、BAI1、GAS6-TAM receptor や MFG-E8（Milk fat globle-EGF-factor 8）- integrin などの PS 受容体が結合することによって、開始されることが知られている。この PS と結合する貪食細胞上の PS 受容体は、貪食を開始、促進させる受容体のみがこれまで報告されている[1]。しかし、PS を介した貪食を負に制御する機構については不明であった。

我々はこれまで、樹状細胞やマクロファージなどの骨髄球系細胞上に発現し、細胞内領域の ITIMs（Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs）を介して、細胞の活性化を負に制御する免疫受容体である CD300a を世界に先駆けて同定し、これが PS 受容体であることを明らかにしてきた［2〜4］（図 1）。さらに、我々は、樹状細胞上の CD300a が、上皮アポトーシス細胞上の PS と結合して、制御性 T 細胞の増殖を制御することにより、バリア組織の恒常性を調節することを見いだした［5］。一方で、マクロファージ上に発現する CD300a が PS と結合して、貪食を抑制しているというこれまで知られていなかった現象を見いだした。この貪食を抑制する CD300a 受容体の存在は、貪食機能が、ただ PS を表出する細胞を食べるだけではなく、厳密に制御されたシステムを有することを意味する。したがって本研究では、 PS 受容体 CD300a による死細胞の貪食抑制メカニズムと、その病理学的意義を明らかにすることを目的とした。

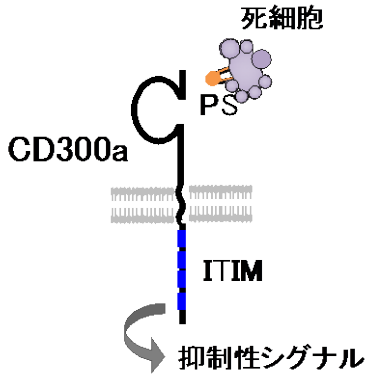


図 1. CD300a 受容体

CD300a は死細胞上の PS と結合して、ITIM（Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs）を介して抑制性シグナルを細胞内に伝達する受容体である。

方　法

1. マウス

CD300a 遺伝子欠損マウス［4］、マクロファージ上で CD300a が欠損しているコンディショナルノックアウトマウス(*Cd300a*$^{f1/f1}$ *Lyz2*-Cre マウス)［6］およびコントロールマウスを使用した。

2. フローサイトメトリー法による貪食機能の解析

CD300a 遺伝子欠損マウス、およびコントロールマウスから腹腔マクロファージを採取した。一方で、マウス胸腺細胞を胸腺から採取し、デキサメサゾン 0.1 mM にて細胞死を誘導した。この胸腺由来死細胞を pH 感受性の蛍光色素（pHRodo）でラベルした。採取した腹腔マクロファージとラベルした胸腺由来死細胞を 20～30 分共培養し、フローサイトメトリー法にて解析を行った。死細胞は、pH 感受性の蛍光色素でラベルされているため、マクロファージに貪食され、ファゴリソソーム内でその pH が変化すると蛍光を発するようになる。したがって、マクロファージで蛍光を発色している蛍光強度を解析することで、マクロファージの貪食機能を解析することが可能であった。

3. 腎虚血モデルの樹立

死細胞が大量に出現してくるマウスモデルとして、腎虚血再灌流モデルを樹立した。マウスを麻酔し、開腹後、腸管を用手的に移動し、腎臓を露出した。左腎動静脈を露出させたのち、右尿管、右腎動静脈を結紮し、右腎臓を摘出した。露出しておいた左腎動静脈をクランプし、20 分間左腎動静脈を閉塞させた。その後、クランプを解除し、閉腹した。血清中の BUN およびクレアチニン（Cre）値を腎機能の指標として評価した。また、24 時間後に腎臓を摘出してホルマリン固定し、腎組織標本を作製した。

結果および考察

1. CD300a による貪食抑制メカニズムの解析

CD300a 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージおよび、野生型マウス由来のマクロファージを採取し、pH 依存性の蛍光ラベルした死細胞を加えて培養したところ、CD300a 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージでは、野生型マウス由来のマクロファージと比較して、死細胞の貪食が亢進していた（図 2）。このことから、マクロファージ上の CD300a は死細胞の貪食を抑制していると考えられた。

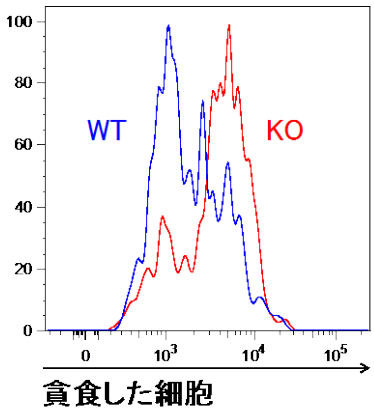


図 2. CD300a は貪食を抑制する
CD300a 遺伝子欠損マウス（KO）由来のマクロファージは野生型マウス（WT）由来のマクロファージと比較して、死細胞をより貪食する。

CD300a は、その細胞内領域の ITIMs により、SHP-1、SHP-2、SHIP をリクルートし、チロシンの脱リン酸化を誘導することにより細胞内活性化シグナルを抑制することから、チロシンリン酸化を介して貪食に関与する PS 受容体である MerTK［7］が CD300a の標的となる貪食促進 PS 受容体である可能性が高いと考えられた。よって、抗 MerTK 中和抗体を用いてマクロファージによる死細胞の貪食を解析したが、抗 MerTK 中和抗体を用いても野生型由来のマクロファージと比較して、CD300a 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージでより貪食能が高かったことから、CD300a が抑制する標的分子は MerTK ではないと考えられた。現在、腹腔マクロファージにおける PS 受容体の発現を詳細に解析し、候補標的分子を探索している（図 3）。CD300a 遺伝子欠損マウス由来のマクロファージで死細胞に対する貪食が亢進しているということは、PS を介した貪食を抑制する機構が存在するということを存在するということを意味する。この貪食促進機能に対する負の制御機構が明らかとなれば、貪食機能を制御することが可能となるため、今後も詳細なメカニズムの解析が必要だと考えている。

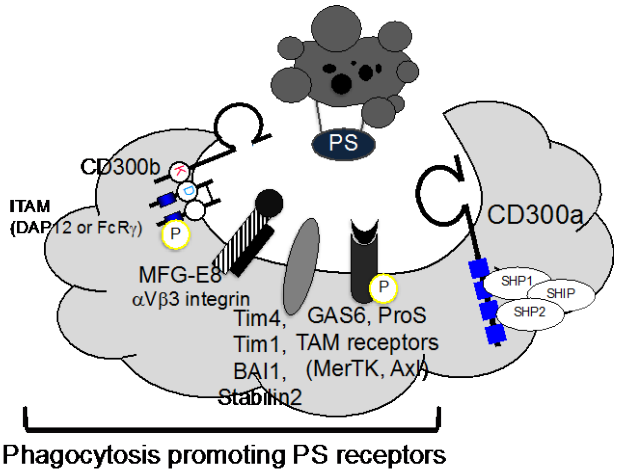


図 3. 貪食促進 PS 受容体と CD300a
CD300a は PS と結合して、貪食を促進させる受容体を抑制する。

2. CD300a による貪食抑制の病理学的意義の解析

死細胞のクリアランスが滞ると、生体内に貯留した壊死細胞から細胞構成成分が遊離することによって、免疫系が活性化し、炎症が起こる［8］。脳、心臓、腎などの臓器が急性虚血に陥った際には、壊死細胞が増加するために炎症が起こり、臓器障害につながっていることが報告されている［9］。この死細胞の増加は、神経、心筋、尿細管上皮細胞などで突然大量に誘導されたアポトーシス細胞が、クリアランスされずに残存し、壊死に陥ったためであるため、アポトーシス細胞に対する貪食を促進させることができれば、炎症を惹起する壊死細胞を減少させることが可能である。

CD300a 遺伝子欠損マウスで認められた死細胞の貪食亢進が生体でも機能しているかを明らかにするため、死細胞が短時間に大量に出現する急性虚血モデルとして、腎虚血再灌流モデルマウスを、マクロファージ上で CD300a が欠損しているコンディショナルノックアウトマウス（*Cd300a*$^{fl/fl}$ *Lyz2*-Cre マウス）およびコントロールマウスに作製した。その結果、マクロファージ上で CD300a が欠損しているコンディショナルノックアウトマウスでは、コントロールマウスと比較して、虚血再灌流 24 時間後の血清 BUN およびクレアチニン値が低いことが明らかとなった。また、生存率の改善も認められ、さらに、腎組織標本においても、腎組織障害が軽度であった。また、腎組織における死細胞の割合もコンディショナルノックアウトマウスでは、コントロールマウスと比較して減少していた。これらのことから、コンディショナルノックアウトマウスでは虚血再灌流による腎障害が改善しており、CD300a が阻害されると、生体においても死細胞に対する貪食が亢進し、その結果、死細胞の貯留の減少に伴う組織障害の軽減につながると考えられた。したがって死細胞の貪食を制御することで、虚血性疾患の新たな治療法が提起できる可能性が生じた。

文　献

1) Elliott MR, Ravichandran KS. The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. Dev Cell. 2016 Jul 25;38(2):147-60. doi: 10.1016/j.devcel.2016.06.029.

2) Yotsumoto K, Okoshi Y, Shibuya K, Yamazaki S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Osawa M, Kuroiwa A, Matsuda Y, Tenen DG, Iwama A, Nakauchi H, Shibuya A. Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and MAIR-II, regulate mast cell and macrophage activation. J Exp Med. 2003 Jul 21;198(2):223-33. PMID: 12874256

3) Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Identification of phosphatidylserine as a ligand for the CD300a immunoreceptor. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 6;417(1):646-50. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.025. Epub 2011 Dec 11. PMID: 22185693

4) Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shoji M, Okoshi Y, Nakano-Yokomizo T, Ohkohchi N, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Nagata S, Shibuya A. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. J Exp Med. 2012 Jul 30;209(8):1493-503. doi: 10.1084/jem.20120096. Epub 2012 Jul 23. PMID: 22826299

5) Nakahashi-Oda C, Udayanga KG, Nakamura Y, Nakazawa Y, Totsuka N, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control the abundance of Treg cells at barrier surfaces. Nat Immunol. 2016 Apr;17(4):441-50. doi: 10.1038/ni.3345. Epub 2016 Feb 8. PMID: 26855029

6) Udayanga KG, Nakamura Y, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Immunoreceptor CD300a on mast cells and dendritic cells regulates neutrophil recruitment in a murine model of sepsis. Int Immunol. 2016 Dec;28(12):611-615. doi: 10.1093/intimm/dxw047. Epub 2016 Nov 11. PMID: 27836913

7) Todt JC, Hu B, Curtis JL. The receptor tyrosine kinase MerTK activates phospholipase C gamma2 during recognition of apoptotic thymocytes by murine macrophages. J Leukoc Biol. 2004 Apr;75(4):705-13. Epub 2004 Jan 2. PMID: 14704368

8) Nagata S. Apoptosis and autoimmune diseases. Ann N Y Acad Sci. 2010 Oct;1209:10-6. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05749.x. Review. PMID: 20958310

9) Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. Nat Med. 2011 Nov 7;17(11):1391-401. doi: 10.1038/nm.2507. Review. PMID: 22064429