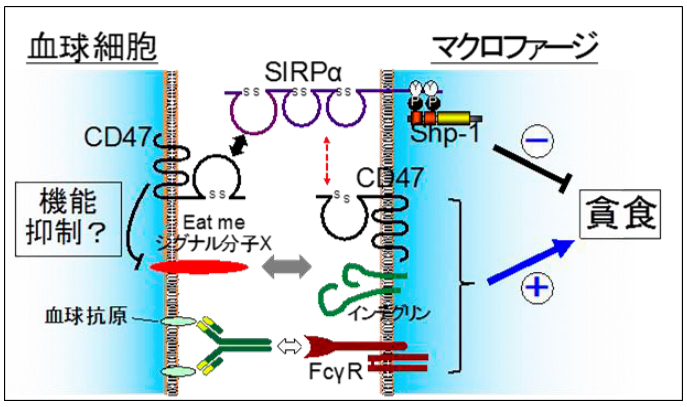
52　マクロファージによる生体恒常性維持の分子基盤	的崎　尚

【目的】老化細胞、炎症性細胞やがん細胞などの異常な生細胞をマクロファージ（MΦ）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 MΦ 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。一方で、これまでに研究代表者は、MΦ 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−SIRPα系”を見出していた。SIRPα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。本研究では、研究代表者が独自に得てきたこれまでの知見を踏まえ、CD47−SIRPα系による MΦ 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】CD47 を欠損した細胞で現れると想定している MΦ に対する「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生化学的な解析を行った。さらに、Eat me シグナル分子 X に対する機能阻害抗体の作製を試みた。また、脾臓 MΦ 上に発現する CD47 や SIRPαの CD47 欠損赤血球の貪食における役割を明らかにすることを目的として、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。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）による同一細胞上での CD47 と SIRPαの結合を解析した。最後に、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、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。さらに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 の検索を進めた。

【結果】MΦ に対する「Eat me シグナル分子 X」になりうる野生型および 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については見出せなかったが、「Eat me シグナル分子 X」の機能を制御している可能性のあるラットモノクローナル抗体を得た。現在、この抗体が認識するタンパク質についてこの抗体を用いたアフィニティー精製、同定を進めている。一方で、MΦ 側の CD47 や SIRPαはシス結合する可能性や、MΦ 上の CD47 や SIRPαは CD47 欠損赤血球に対する貪食作用を正に制御している可能性も見出した。さらに、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、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を明らかにした。また、CD47 の発現を抑制する siRNA の検索を進めた結果、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 CD47 siRNA 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現在解析を進めている。

CD47–SIRPα系によるマクロファージの新たな貪食制御機構



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–SIRPα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（MΦ）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、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MΦ 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 MΦ 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 MΦ 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−SIRPα系”を見出していた。SIRPα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］。SIRPαは、MΦ 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 SIRPα遺伝子欠損（KO）マウス、また CD47−SIRPα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 MΦ 上に発現する SIRPαに結合することにより、Fcγ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 MΦ 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 MΦ の SIRPα に結合することで MΦ 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 MΦ 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 MΦ 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、MΦ に発現する CD47 がインテグリンβ3、Fcγ受容体とシスに複合体形成すると共に、SIRPα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-SIRPα系による MΦ 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 SIRPα 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. 近接ライゲーションアッセイ

Duolink PLA キット（Sigma-Aldrich 社）を用い、マウス CD47 および SIRPα 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 SIRPα 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 SIRPα 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。

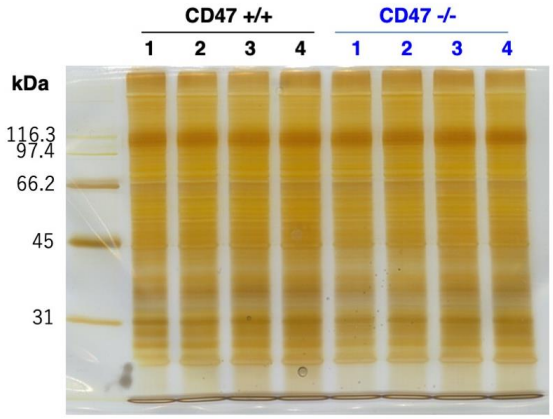


図 1. 野生型および CD47 欠損赤血球の膜タンパク質についての比較
野生型マウス（$CD47^{+/+}$）および CD47 KO マウス（$CD47^{-/-}$）各 4 匹の赤血球膜タンパク質について SDS-PAGE を行い、銀染色により検出した。

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。

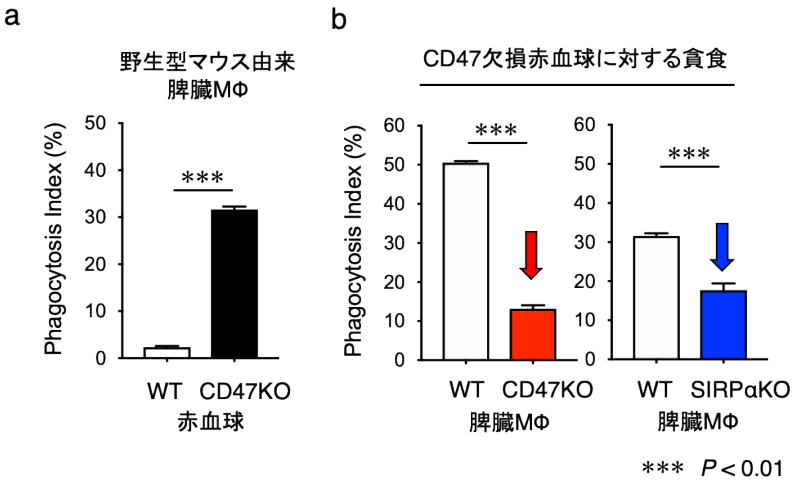


図 2. CD47 欠損赤血球に対する脾臓 MΦ による *in vitro* 貪食能の検討
a) 野生型もしくは CD47 欠損赤血球と野生型由来脾臓 MΦ を共培養し、フローサイトメトリーを用いて赤血球を取り込んだ脾臓 MΦ の比率を Phagocytosis index として算出した。
b) CD47 欠損赤血球と CD47 もしくは SIRPα欠損マウス由来脾臓 MΦ を共培養し、a）同様フローサイトメトリーを用いて Phagocytosis index として算出した。
P 値は Student t 検定を用いて求めた（a、b）。

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。

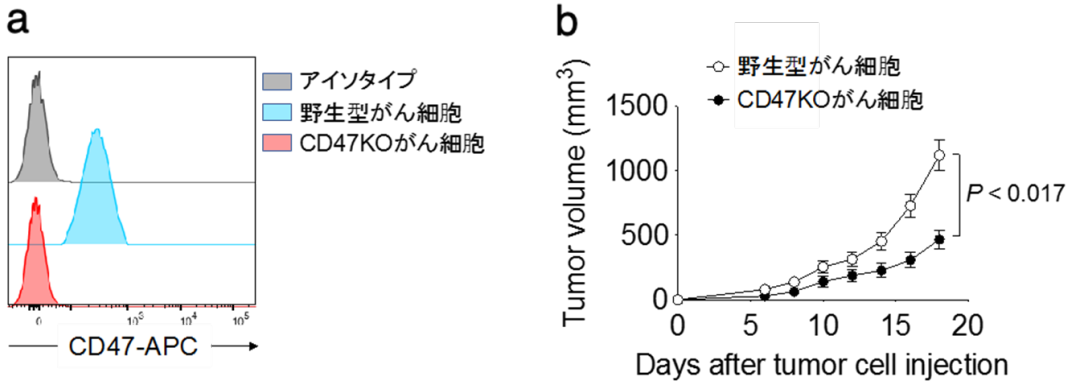


図 3. CD47 発現欠損がん細胞株の樹立とマウス生体内におけるその腫瘍形成

a） 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。

b） 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・ガ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。

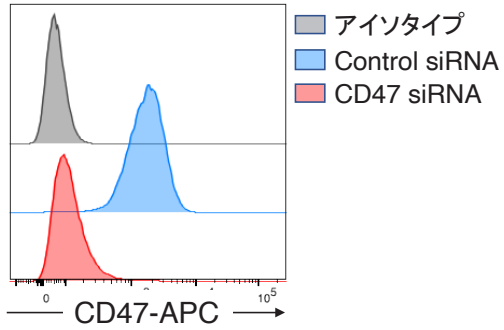


図 4. マウス由来がん細胞における CD47 特異的 siRNA による CD47 の発現抑制
CD47 特異的 siRNA（CD47 siRNA）もしくはコントロール siRNA（Control siRNA）を導入したマウス由来がん細胞における FACS による CD47 の発現解析。

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-SIRPalpha 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-SIRPα 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.