

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18500325  
 研究課題名（和文） 血球貪食症候を自然発症する新規動物モデルの開発と発症機構の解析  
 研究課題名（英文） Characterization of AEP/Legumain-deficient mice as a model of hemophagocytic syndrome-like disease

研究代表者  
 橋本 憲佳（HASHIMOTO NORIYOSHI）  
 金沢大学・学際科学実験センター・准教授  
 研究者番号：50242524

## 研究成果の概要：

アスパラギンエンドペプチダーゼ（AEP）遺伝子欠損マウスを解析し、体温上昇、貧血、肝脾腫、骨髄や脾臓における血球貪食細胞の出現など、ヒト血球貪食症候群（HPS）の病態をよく再現したモデルマウスとして位置づけた。血球貪食細胞はマクロファージであり赤血球貪食能は上昇し、一部でリソソーム病であるゴーシェ病に特徴的なゴーシェ細胞様の特徴も示した。リソソーム酵素である AEP の欠損により貪食作用の亢進と血球分解産物の異常な蓄積を生じ、HPS 様病態形成に深く関わっていることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：病態モデル，血球貪食症候群，Legumain，AEP，リソソーム蓄積症，プロテアーゼ，リソソーム病

## 1. 研究開始当初の背景

機能未知のリソソーム局在システインプロテアーゼである AEP を欠損したマウスに、加齢に伴って出現した脾臓肥大を解析する

過程で発見した血球貪食病態を、ヒトの難治性血液疾患である血球貪食症候群（Hemophagocytic syndrome; HPS）の新規動物モデルと位置付けてその特徴付けを計画

した。HPSのうち一次性HPSについては、患者の家系にパーフォリン遺伝子の変異が発見され、パーフォリン機能欠損や標的細胞傷害蛋白の移送に関与する物質の異常によることが解明されつつある。しかしながら遺伝性のHPSはむしろ稀で、多くが2次性HPSであり、しかもウイルス感染やリンパ腫、さらに自己免疫疾患などの多岐にわたる疾患に付随して発症することから、血球貪食病態にもっとも重要な役割を果たす細胞が何なのか、強い相関が見られる高サイトカイン血症についても、最も重要なサイトカインが何なのかについては、適当な動物モデルがなかったために不明であった。ウイルス感染関連HPSについては、遺伝子改変によりウイルス感染後短期間で100%致死となる動物モデルが見いだされたが、本研究で用いるLegumain(アスパラギンエンドペプチダーゼ; AEP)遺伝子欠損マウスも遺伝子改変マウスである。

このマウスは発育初期に若干の成長遅延があるものの、妊孕性にも問題がなく、自然発症するHPS病態の進行も穏やかと考えられたが、最大の特徴はHPS病態をウイルス感染によらず自然発症する点にある。本研究により、未だ未知のAEPの機能の一端が解明され、2次性HPS病態発症の分子メカニズムの解明、さらには今だ適当な治療法がない多くの2次性HPSの治療法の開発に道を開くものと考えた。

## 2. 研究の目的

HPSは骨髄、リンパ節、脾臓、脳脊髄液等に赤血球、血小板、有核細胞、リンパ球などの血球を貪食した細胞が出現する難治性の血液疾患である。HPSの原因は遺伝性、腫瘍関連、感染関連、自己免疫関連、薬剤関連、原因不明など様々で、詳しい病因については、血球貪食病態発現への高サイトカイン血症の関与が知られている程度で、適当な疾患動物モデルがないことから詳しい解析が行われず不明な点が多い。一方、マウスのAEP遺伝子をノックアウトすると、加齢に伴って骨髄および脾臓に赤血球貪食マクロファージが多数出現した。本マウスをヒトの難治性血液疾患である血球貪食症候群の新しい動物モデルと位置づけ、その病態を詳細に解析し、AEPと血球貪食症候群との因果関係とその発症機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 血球貪食病態：経時的にB6;129交雑系AEP欠損マウスのヘテロおよびホモ個体から骨髄および脾臓を摘出して病理学的に解析し、血球貪食病態の出現時期を特定した。

(2) 脾臓肥大に伴う、骨髄および脾臓にお

ける細胞構成比の変化の検索：経時的に脾細胞や骨髄細胞を各種の細胞表面マーカーで解析し、増加している細胞の同定を行って脾臓肥大の原因となる細胞種を同定し、血球貪食病態との関連性について検討した。

(3) 赤血球貪食細胞の解析：AEP欠損マウスでは加齢に伴う貧血と多染性の赤血球が末梢血に多数観察されたので、末梢血の塗沫標本をニューメチレンブルー染色して、網状赤血球の検出を行った。また、骨髄の赤血球貪食細胞を同定するために、サイトスピンによる標本を作製し、細胞表面マーカーで染色して細胞種を同定した。

(4) 血球貪食病態に付随する各種所見の検索：血球貪食病態の検索と同時期に、直腸温の測定、抹消血中のIFN- $\gamma$ 、IL-4、TNF $\alpha$ 、M-CSFなどの各種サイトカイン・ケモカインのELISA法による測定、血球数の計数などを行い、血球貪食病態に付随して現れる所見を同定した。

(5) 腹腔マクロファージによる赤血球貪食：チオグリコレートにより活性化した腹腔マクロファージを調製し、蛍光ビーズやIgGでオプソニン化した赤血球と共培養してマクロファージの貪食能を測定した。また、オプソニン化していない赤血球の貪食について、培養時間を延長して測定した。さらに貪食された赤血球の分解動態を、クロロキンなどの阻害剤を併用するなどして培養した後、細胞を溶解してヘモグロビンに対するウェスタンブロットにより測定した。

(6) 遺伝背景による影響：C57BL/6背景のAEP欠損マウスを作出し、病態発現における遺伝背景の影響を骨髄の病理学的検索により検討した。

## 4. 研究成果

加齢個体の骨髄で顕著に出現した赤血球貪食像は、脾臓肥大の見られない3ヶ月齢で既に顕著に出現しており、サイトスピンによる検索によって、貪食されているのは赤血球のみではなく、ヒトHPS同様に、有核細胞の貪食像も観察された。膜抗原の検索により、貪食細胞はマクロファージ系の細胞であることが確認され、ヒトのHPS様病態を自然発症することが示唆された。貧血を示すヘマトクリット値の低下は6ヶ月齢で有意に見られたが、特殊染色により網状赤血球を観察すると、3ヶ月齢で既に有意に上昇しており造血の亢進が示唆されるとともに、体温の上昇についても3ヶ月齢で既に1℃以上の上昇が見られた。腫大した脾臓の細胞構成は成熟リ

ンパ球ではなく、未熟な赤芽球系及びミエロイド系の細胞であり骨髄における血球貪食病態進行に伴う髄外造血を反映したものであった。また、白血球や血小板の減少は観察した全ての期間にわたりヒトの症例のように減少しておらず、白血球数はむしろ上昇傾向にあり、ヒト HPS で見られる高サイトカイン血症についても、TNF $\alpha$  の血中値の上昇が一部の個体でのみ観察され、IFN $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4、M-CSF は正常であったことから、本モデルはヒト HPS の全症例を再現するモデルではなく、一部の病態を再現する病態モデルであることが示唆された。

一方、AEP にはカスパーゼ I (ICE) 様活性が報告されている。ICE の関与が示されている Fas リガンドにより誘導される IL-1 $\beta$  の成熟型へのプロセッシングが、ICE の KO マウスで残存していることから AEP の関与が疑われたが、FasL を発現する細胞の移植によっても IL-1 $\beta$  の産生上昇は見られず、AEP の関与は観察されなかった。

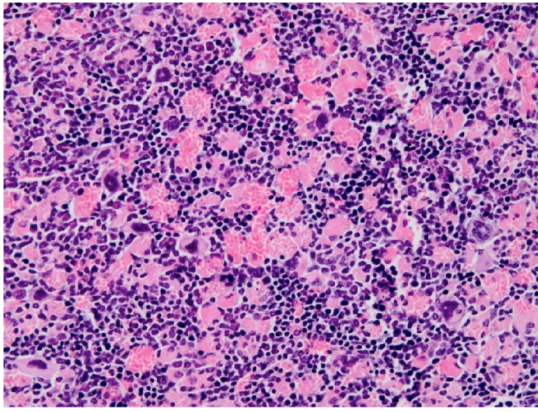
マウスの遺伝背景を C57BL/6 にすると、B6;129 背景で観察された体温上昇は観察されなかったが、骨髄における血球貪食像は 6 ヶ月令でも顕著に観察された。さらにリソソーム病であるゴーシェ病に特徴的なゴーシェ細胞に形態が類似した、細胞質が好酸性/層板状に染色される組織球が多数観察された。この細胞は B6;129 背景でも観察できるが、C57BL/6 背景では特に比較的若齢の個体でも多く観察された。ゴーシェ様細胞はその形態的特徴に加えて自家蛍光や PAS 陽性であるなど、糖脂質であるグルコセラブロシドがリソソームに蓄積するゴーシェ細胞の特徴をよく保っており、グルコセラブロシドが赤血球脂質成分の主要な構成要素であることを合わせると、貪食された赤血球脂質成分の分解異常がこのような特徴的病態を引き起こしていることが予想され、AEP 欠損マウスがリソソーム病の新たな自然発症モデルとなる可能性も視野に入れる必要が生じた。これまで AEP はもとより、蛋白質分解酵素の異常がリソソーム病の原因となっていることを示唆する報告はなく、リソソーム病研究の新たな新展開が期待される。

尚、C57BL/6 背景では水腎が多発しており、既に報告した腎尿細管での超微形態的なリソソーム蓄積症様病態が遺伝背景を変えることにより形態的にも顕在化したものと推察される。一方、脾臓や骨髄で顕著に出現する CD68 及び F4/80 両陽性細胞の血球貪食像が組織球側の異常によるのか、赤血球の異常によるのかを明らかにするため、腹腔マクロファージによる蛍光ビーズの取込を測定したところ、僅かながらも有意な取込増が観察された。さらに、12 ヶ月齢マウス由来のオプソニン化赤血球とチオグリコレート誘発腹

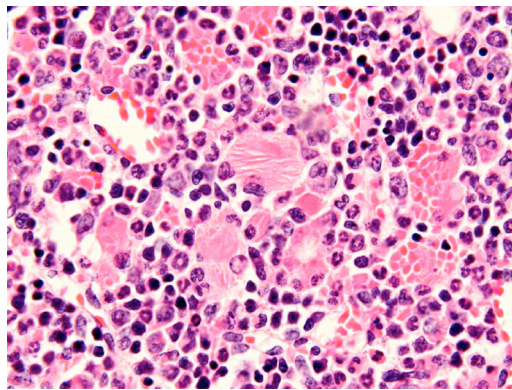
腔マクロファージを用いて赤血球貪食を測定したところ、AEP 欠損マウス由来のマクロファージで有意な貪食上昇が観察されたが、赤血球の由来するマウスの遺伝子型による差は見られなかった。貪食時間を延長してオプソニン化しない赤血球の貪食を比較しても同様に赤血球の由来するマウスの遺伝子型による差はなかった。脾臓肥大や脾臓・骨髄の血球貪食病態の出現時期が 3-6 ヶ月令以降であることを合わせると、血球貪食症候群様病態は加齢に伴いマクロファージにおいて、AEP 欠損に対する代償性機能が低下することによって引き起こされることが示唆される。しかしながら腹腔マクロファージによる貪食能の上昇はそれほど大きくなく、AEP 欠損マウスの骨髄に多数存在する組織球がリソソーム蓄積症と関連するのかを検討する余地があると思われた。

一方で AEP 欠損マウスの赤血球膜蛋白質に異常が観察されたことから、腹腔マクロファージによる試験では検出できていないものの、赤血球の成熟や老化の異常により貪食作用が亢進し HPS 様病態の悪化につながっている可能性も示唆された。AEP 欠損マウスにおける HPS 様病態発現の分子機序は未だ不明であるが、リソソーム酵素である AEP の欠損が血球分解産物の異常な蓄積を生じ、HPS 様の病態形成に深く関わっていることが示唆された。AEP 欠損マウスは末梢血中のサイトカイン上昇は見られないものの、ヒト HPS の病態をよく再現したモデルマウスとして位置づけることができた。遺伝子の改変により HPS 様病態を自然発症するマウスモデルは今までに報告されておらず、これらの成果は海外においても高く評価され、米国科学アカデミー紀要に掲載された。

AEP 遺伝子欠損マウスは、マクロファージの機能異常によりヒトの難治性血液疾患である血球貪食症候群の緩やかな病態進行を再現できるモデルと性格付けできたが、同時に難治性疾患であるリソソーム病に見られるゴーシェ細胞様のマクロファージが多数出現した。今後は、C57BL/6 背景のマウスの解析を中心に、血球貪食病態発症の分子機構の解明を進めると共に、リソソーム病のモデル動物としての AEP 欠損マウスを血球貪食症候を主徴とするリソソーム病の新規動物モデルと位置づけ、異常マクロファージのより詳細な出現機構の解明を通して、HPS やリソソーム病の治療法の開発に有用な動物モデルの確立を目指したい。



B6;129 背景の加齢個体の骨髄に観察される血球貪食像 (HE 染色)



C57BL/6 背景、6 ヶ月齢個体に観察されたゴーシェ様細胞 (中央)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Chi-Bun Chan, Michiyo Abe, Noriyoshi Hashimoto, Chunhai Hao, Ifor R. Williams, Xia Liu, Shinji Nakao, Akitsugu Yamamoto, Chengyun Zheng, Jan-Inge Henter, Marie Meeths, Magnus Nordenskjold, Shi-Yong Li, Ikuko Hara-Nishimura, Masahide Asano, and Keqiang Ye, Mice lacking asparaginyl endopeptidase develop disorders resembling hemophagocytic syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(2):468-473 (2009). (査読有)

② Zhixue Liu, Sung-Wuk Jang, Xia Liu, Dongmei Cheng, Junmin Peng, Manuel Yepes, Xiao-jiang Li, Steve Matthews, Colin Watts, Masahide Asano, Ikuko Hara-Nishimura, Hongbo R. Luo, and Keqiang Ye, Neuroprotective actions of PIKE-L by inhibition of SET proteolytic degradation by asparagine endopeptidase. Mol Cell. 29(6):665-678 (2008). (査読

有)

③ Yoshikata Morita, Hisazumi Araki, Toshiro Sugimoto, Keisuke Takeuchi, Takuya Yamane, Toshinaga Maeda, Yoshio Yamamoto, Katsuji Nishi, Masahide Asano, Kanae Shirahama-Noda, Mikio Nishimura, Takashi Uzu, Ikuko Hara-Nishimura, Daisuke Koya, Atsunori Kashiwagi, Iwao Ohkubo. Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells. FEBS Lett. 581(7):1417-1424 (2007) (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

① 安陪道代、橋本憲佳、宮石 理、中尾眞二、西村いくこ、浅野雅秀. AEP/Legumain 欠損マウスにおける血球貪食症候群様病態の解析, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007. 12. 11-14, 横浜

② 安陪道代、橋本憲佳、宮石 理、西村いくこ、浅野雅秀. Legumain (AEP) 遺伝子欠損マウスは血球貪食症候群様の病態を呈する. 第 53 回日本実験動物学会, 2006. 5. 11-13, 神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 憲佳 (HASHIMOTO NORIYOSHI)  
金沢大学・学際科学実験センター・准教授  
研究者番号: 50242524

(2) 研究分担者

浅野 雅秀 (ASANO MASAHIDE)  
金沢大学・学際科学実験センター・教授  
研究者番号: 50251450

(3) 連携研究者