

[原著]

## GM-CSF 刺激によるマクロファージにおける signal regulatory protein $\alpha$ の発現動態

山田 しょう子<sup>1)</sup>      山口 類<sup>1)</sup>      山本 隆敏<sup>2)</sup>  
坂本 亜里紗<sup>2)</sup>      檜原 真二<sup>2)</sup>      杉内 博幸<sup>2)</sup>  
山口 康雄<sup>1)</sup>

Production of signal regulatory protein  $\alpha$  by GM-CSF-dependent macrophages

Shoko YAMADA, Rui YAMAGUCHI, Takatoshi YAMAMOTO, Arisa SAKAMOTO,  
Shinji NARAHARA, Hiroyuki SUGIUCHI and Yasuo YAMAGUCHI

1) 熊本保健科学大学大学院研究科

2) 熊本保健科学大学医学検査学科

### 要旨

Signal regulatory protein  $\alpha$  (SIRP  $\alpha$ ) はマクロファージの細胞表面に表出する阻害受容体シグナル制御タンパクの一つである。正常細胞は糖タンパクである CD47 を細胞表面に提示している。CD47 は細胞外基質タンパクと反応するインテグリン関連タンパク質 (integrin-associated protein, IAP) として同定された。SIRP  $\alpha$  と CD47 の結合により、マクロファージの貪食作用が抑制される。従って、CD47 は自己を認識する標識として、貪食作用を制御しているタンパク質である。本研究では、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor: GM-CSF) により SIRP  $\alpha$  の発現が増強することが判明した。細胞内シグナル伝達経路の解析では、PD980590 (inhibitor of extracellular signal-regulated kinase: ERK) や PDTC (antioxidant and NF- $\kappa$ B inhibitor) の前投与により GM-CSF 刺激による SIRP  $\alpha$  の発現が抑制された。従って、GM-CSF 刺激により、ERK を介して SIRP  $\alpha$  が産生されることが示唆された。各種侵襲により誘発される全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) では、産生される炎症性サイトカインにより免疫反応が活性化され、病原微生物の除去が行われる。一方、抗炎症性サイトカインが優位に増加する代償性抗炎症反応症候群 (compensatory anti-inflammatory response syndrome: CARS) では、免疫反応が抑制される。CARS では GM-CSF の産生が抑制される。一方、IL-10 の産生は過剰となる。また、IL-10 は GM-CSF 刺激による ERK の活性を抑制する。従って、CARS を発症した患者では、GM-CSF の低下及び IL-10 の過剰産生により SIRP  $\alpha$  の発現が抑制され、マクロファージによる血球貪食現象を併発する可能性が示唆された。

キーワード : signal regulatory protein  $\alpha$ , CD47, 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子,  
血球貪食症候群

### 1. 緒言 (はじめに)

血球貪食症候群 (Hemophagocytic syndrome : HPS) は、骨髄やリンパ節など網内系における組織

球・マクロファージによる血球貪食を特徴とする疾患である。一次性 (原発性) と基礎疾患に起因して発症する二次性 (反応性) に大別される。成人に発症する HPS は、二次性であり、感染症、悪性腫瘍、

自己免疫疾患を基礎疾患として発症することが多い。感染症に続発する HPS は、感染症関連血球貪食症候群 (infection-associated hemophagocytic syndrome ; IAHS) に分類される。特に細菌による HPS は細菌関連血球貪食症候群 bacteria-associated hemophagocytic syndrome (BAHS) である。多くの二次性 HPS においては、活性化 T 細胞やマクロファージ由来のサイトカインがその発症及び病態形成に関与していると推測されている。

侵襲に対する生体反応に関して、1991年に開催されたアメリカ胸部疾患学会とアメリカ Critical Care Medicine 学会との合同カンファレンスの統一見解として全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) という疾患概念が提唱された<sup>1,2)</sup>。そして、SIRS は高サイトカイン血症の病態と認識されるようになった。従って、現在の敗血症の定義は、感染によって惹起される SIRS (infection-induced SIRS) と考えられる。つまり、血液培養で病原微生物の検出 (菌血症) あるいは血液中に病原微生物の毒素の検出 (エンドキシン血症) は、必ずしも敗血症の診断に必要な。サイトカインの産生過剰によるサイトカイン・ストームを形成した SIRS では、それによって活性化された組織球・マクロファージは、周囲の自己血球を貪食することが報告されている。しかし、自己・非自己を認識する免疫細胞がどうして、自己の細胞を貪食するのかについては不明な点が多い。骨髄、リンパ節、脾臓、脳脊髄液中に赤血球、血小板、有核細胞、リンパ球などの血球を貪食した細胞が認められることがある。正常細胞は表面にインテグリン関連蛋白質である cluster of differentiation 47 (CD47) を提示している<sup>3)</sup>。CD47はマクロファージの SIRP  $\alpha$  (阻害受容体シグナル制御蛋白  $\alpha$ ) と結合し、マクロファージに対する抗貪食シグナルを誘導する。これによって、正常細胞はマクロファージの貪食機能を回避していると考えられている<sup>4)</sup>。granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) や macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) の刺激により単球はマクロファージへ分化する<sup>5)</sup>。本研究では、GM-CSF 刺激によるマクロファージにおける SIRP  $\alpha$  の発現機序について検討した。

## II. 方法

### 1. ヒト末梢血単球の分離

健康成人ボランティアよりヘパリン加静脈血を採取した (熊本保健科学大学倫理審査: 2015-03)。Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA) を用いた密度勾配遠心分離法で単核球分画を採取した<sup>6)</sup>。

### 2. 末梢血単球の分化

Recombinant GM-CSF は Tocris Bioscience (Bristol, UK) より購入した。得られた末梢血単球分画に RPMI1640 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) を加えて、1500rpm で5分間遠心し上清を除去して RPMI1640 2mL を加えて、0.5% トリパンブルー溶液で染色し細胞数を計測した。単球分離後、RPMI1640 + 10 % FCS を加えて、1時間培養した。培地を除去し、RPMI1640 + 10 % FCS (Thermo Fischer Scientific) で2回洗浄を行った。そして、RPMI1640 + 10 % FCS + GM-CSF (10 ng/mL) を加えて培養した。3日目に培養液を除去し、新たな RPMI1640 + 10 % FCS + GM-CSF (10 ng/mL) を添加した。培養9日目のマクロファージを GM-CSF-dependent macrophages (day 9) として実験に用いた。

### 3. GM-CSF 刺激における細胞内蛋白分画の時間的推移

上記の方法で GM-CSF-dependent macrophages を作製した。GM-CSF-dependent macrophages (0, 1, 3, 5, 7, 9 day) の whole-cell lysate を用いて、Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining<sup>7)</sup> により蛋白分画の経時的推移を検索した。Whole-cell lysates (12  $\mu$ g) を e-PAGEL mini precast polyacrylamide gels (90  $\times$  83 mm) (Atto, Tokyo, Japan) に注入し、30 mA, 50分 (AE-8135 myPowerII 300, Atto) の条件で、AE-6530 mPAGE electrophoresis system (Atto) を用いて電気泳動を行った。ゲルの5分間洗浄を3回行った。そして、Bio-Safe Coomassie stain (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて、1時間染色を実施した。Gel Doc EZ system (Bio-Rad) を用いて画像化を実施した。

### 4. GM-CSF 刺激による分化過程の signal regulatory

### protein $\alpha$ (SIRP $\alpha$ ) mRNA の発現 : RNA の抽出及び RT-PCR 法

培養上清を取り除き, ISOGEN RNA kit 1ml を加えマクロファージを溶解させた。クロロホルムを 0.2ml 加え, 12,000g, 15min, 4°C にて遠心を行った。遠心後, 水層部分を別のエッペンチューブに移し, イソプロパノール 0.5ml を加え 12,000g, 10min, 4°C で遠心を行った。RNA 沈殿以外を取り除き, 70% エタノール 1ml を加え混和後, 7,500g, 5min, 4°C にて遠心を行った。70% エタノールを取り除き, 乾燥後 pH8.0 TE Buffer 80  $\mu$ l にて溶解した。RNA の OD 比 (260/280) が 1.8 以上になることを確認した。0.5  $\mu$ g の RNA を PrimeScript™ Reverse Transcriptase (タカラバイオ) で逆転写を行った。逆転写後, cDNA 生成物 5  $\mu$ L を目的の遺伝子を増幅する primer 5 nM, TaKaRa Ex Taq HS を用いて PCR を行った。PCR 産物の解析はアガロース電気泳動を用いた。アガロースゲルの濃度は 2% とし, 100V で約 40 分電気泳動を行った。電気泳動後はエチジウム・ブロミド溶液で染色を行い, バンドを観察した。Forward primer 及び Reverse primer は,

$\beta$ -actin sense: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'  
 antisense: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'  
 SIRP  $\alpha$  sense: 5'-AAACATCTATATTGTGGTG-3'  
 antisense: 5'-CCATTCACCTCCTCGGGACCTG-3'

### 5. Monocyte (0 day) と GM-CSF-dependent macrophages (9 day) における SIRP $\alpha$ の発現の比較

Monocyte (0 day) 及び GM-CSF-dependent macrophages (9 day) の whole-cell lysates を用いて, western blotting により SIRP  $\alpha$  の発現を比較した。

### 6. Western blotting

細胞破砕液を e-PAGEL (5-20%) (ATTO

corporation, Tokyo) を用いて, SDS-PAGE 電気泳動を行った。電気泳動条件 30 mA, 55 min とした。iBlot® 2 Dry Blotting System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) を用いて Nitrocellulose membrane へ転写した。転写後, PBS (R & D systems, Minneapolis, MN) + 10 % skim milk (Wako, Osaka) を用いて 1 時間振とうしてブロッキングを実施した。ブロッキング後, PBS + 10 % skim milk を除いた後に, PBS (R & D systems, Minneapolis, MN) + TweenR 20 (Promega, Madison, WI) で 10 分間振とうした。PBS (R & D systems, Minneapolis, MN) + TweenR 20 を除去し洗浄を行った。この洗浄を三回繰り返した。洗浄後は 1 次抗体 mouse anti-human SIRP  $\alpha$  IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を PBS + 3 % skim milk に希釈し, Nitrocellulose membrane と共に 1 時間振とうした。振とう後, 上記と同様に洗浄を行った。洗浄後, 2 次抗体 guinea pig anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) を PBS + 3 % skim milk で希釈し, Nitrocellulose membrane と共に 1 時間振とうした。振とう後は洗浄を行ったのちに蛍光発色試薬を用いて発色を確認した<sup>8)</sup>。

### 7. SIRP $\alpha$ の発現における GM-CSF 受容体を介する細胞シグナル伝達系の解明

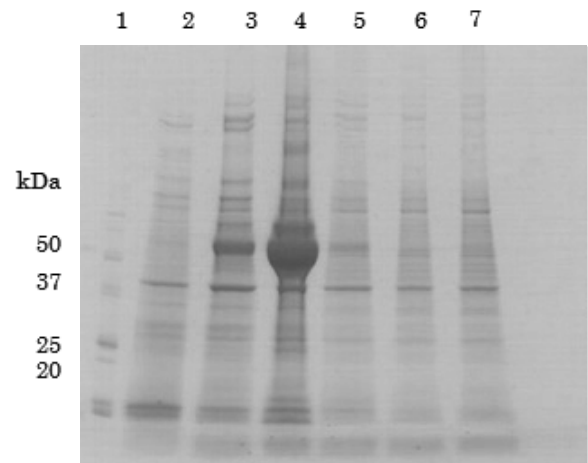
細胞内シグナル伝達経路の解析には PD980590 (Wako, Kanagawa, Japan), TMB-8 (Sigma-Aldrich, Ontario, Canada), SB203580 (Wako), PDTC (Abcam, Cambridge, UK) などの細胞内シグナル伝達阻害剤を用いた。それぞれの阻害剤の作用機序を表 1 に示す。単球採取から 3 日目の無刺激の adherent macrophages を用いて, 各種阻害剤を前投与したマクロファージを GM-CSF (10 ng) で刺激を行い, western blotting を用いて SIRP  $\alpha$  の発現を検索した。

表 1. 各種阻害剤とその作用機序

Chemical agents	Functions
PD980590	Extracellular signal-regulated kinase inhibitor
TMB-8	Intracellular Ca <sup>2+</sup> antagonist
SB203580	Mitogen-activated Protein Kinase p38- $\alpha/\beta$ inhibitor
PDTC	Inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B

### Ⅲ. 結果

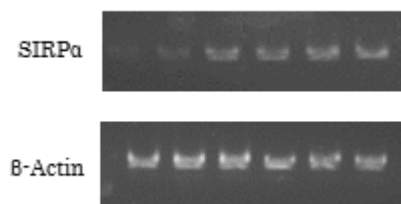
GM-CSF 刺激に伴う Macrophages における蛋白動態の変化を CBB 染色法も用いて検索した。GM-CSF 刺激により蛋白産生系の経日的変化が認められる (図 1)。GM-CSF 刺激により SIRP  $\alpha$  mRNA の発現が経日的に増強した (図 2)。GM-CSF-dependent macrophages (0 day) に比較して、GM-CSF-dependent macrophages (9 day) では SIRP  $\alpha$  の発現が増強した (図 3)。次に、GM-CSF-dependent macrophages による SIRP  $\alpha$  の発現における細胞内シグナル伝達系の解明を目的に、単球の培養 3 日目の adherent macrophages を GM-CSF (10 ng) で刺激し、各種細胞内シグナル伝達系阻害剤を用いて western blotting による SIRP  $\alpha$  の発現の解析を行った。その結果、PD980590 (extracellular signal-regulated kinase inhibitor) 前投与で SIRP  $\alpha$  の発現が著明に抑制さ



1. Markers  
2. GM-CSF-dependent macrophages (0 day)  
3. GM-CSF-dependent macrophages (1 day)  
4. GM-CSF-dependent macrophages (3 day)  
5. GM-CSF-dependent macrophages (7 day)  
6. GM-CSF-dependent macrophages (9 day)

図 1. GM-CSF 刺激における細胞内蛋白分画の経日的推移 (CBB 染色法)

a.



b.

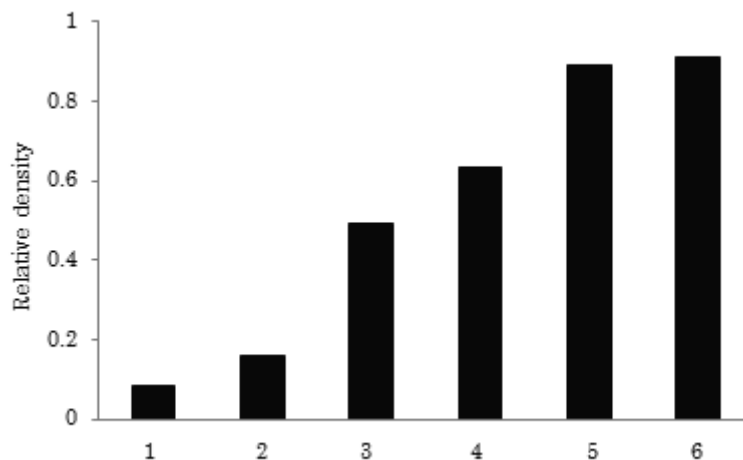


図 2. GM-CSF 刺激によるマクロファージの SIRP  $\alpha$  mRNA の PCR 産物解析

a. PCR 産物のアガロース電気泳動を示す。

b. SIRP  $\alpha$  遺伝子の発現を  $\beta$ -Actin の発現量で補正した Relative density を示す。

れた。一方, TMB-8 (intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist) 及び SB203580 (mitogen-activated protein kinase p38- $\alpha/\beta$  inhibitor) では SIRP  $\alpha$  の発現に部分的阻害が認められた。しかし, PDTC (inhibitor of nuclear factor-kappaB) では顕著な阻害効果は認められた (図4)。

#### IV. 考察

GM-CSF 刺激により, macrophages における SIRP  $\alpha$  mRNA 及びタンパクの発現が増強した。免疫監視機構において, 自然免疫系のマクロファ-

ジは, 異物や老化した細胞, 傷害を受けた細胞を認識し, 貪食によって除去する主要な免疫監視機構の一員である。SIRP  $\alpha$ -CD47 (Cluster of Differentiation 47) 系は, 生体内で “marker of self” あるいは “don't eat me” シグナルとして, マクロファージによる貪食を回避する役割を担っている。この制御システムが破綻すると, 病的な過剰貪食が生じ, 血球貪食症候群を発症する。CD47は組織普遍的に発現する5回細胞膜貫通型のタンパク質であり, 歴史的には細胞接着分子であるインテグリンに関連する分子として同定されたことから, 別名 IAP (integrin-associated protein) とも呼ばれている<sup>9)</sup>。細胞間シ

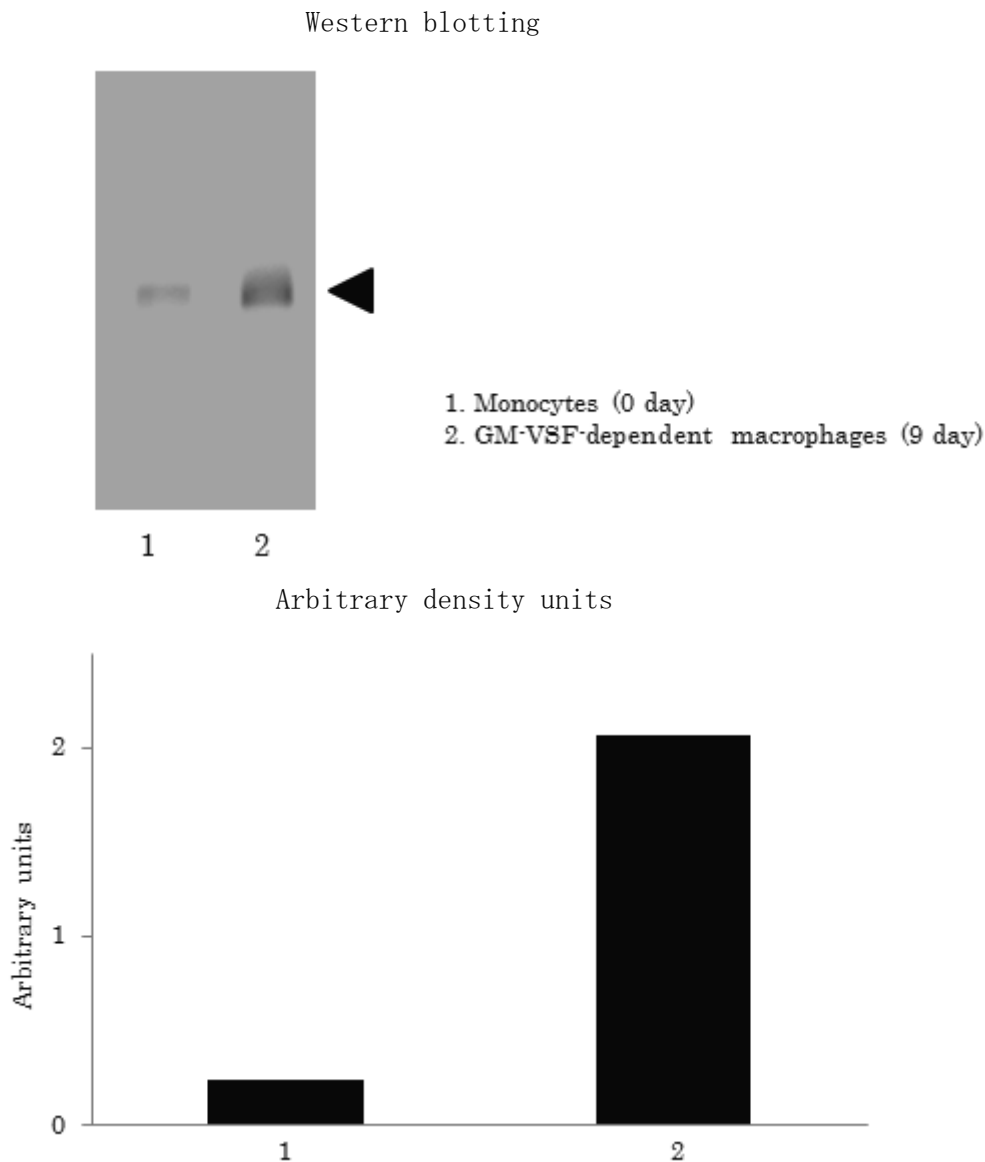


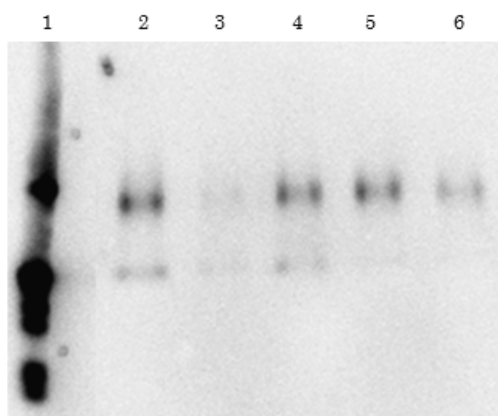
図3. Monocytes (0 day) 及び GM-CSF-dependent macrophages (9 day) における SIRP  $\alpha$  蛋白の発現 Western blotting と Arbitrary density units を示す。

グナル伝達システム CD47-SIRP  $\alpha$  は、1回膜貫通型のレセプター型分子である SIRP  $\alpha$  と、その細胞外領域の生理的なりガンドである5回膜貫通型分子である CD47より構成される。

SIRP  $\alpha$  は1回膜貫通型のレセプター型分子であり、3個の免疫グロブリン様構造を有する細胞外ドメインである Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 (SHPS-

1)<sup>10)</sup> と、これに Src homology 2 (SH2) ドメインをもつ細胞質型チロシンホスファターゼ Src-homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase-2 (SHP-2)<sup>11)</sup> に結合し、これらのホスファターゼが活性化され、下流にシグナルが伝えられる。つまり、膜蛋白質 SHPS-1 は細胞内領域のチロシンリン酸化依存的にチロシンホスファターゼ SHP-2と相互作用し細胞内チロシンリン酸化シグナルを制御する。

#### Western blotting



1. Markers
2. GM-CSF ( $10 \times 10^5$  ng/L)
3. PD980590 ( $1 \times 10^5$   $\mu$ M/L) + GM-CSF ( $10 \times 10^5$  ng/L)
4. TMB-8 ( $10 \times 10^5$   $\mu$ M/L) + GM-CSF ( $10 \times 10^5$  ng/L)
5. SB 203580( $10 \times 10^5$   $\mu$ M/L) + GM-CSF ( $10 \times 10^5$  ng/L)
6. PDTC ( $1 \times 10^5$   $\mu$ M/L) + GM-CSF ( $10 \times 10^5$  ng/L)

#### Arbitrary density units

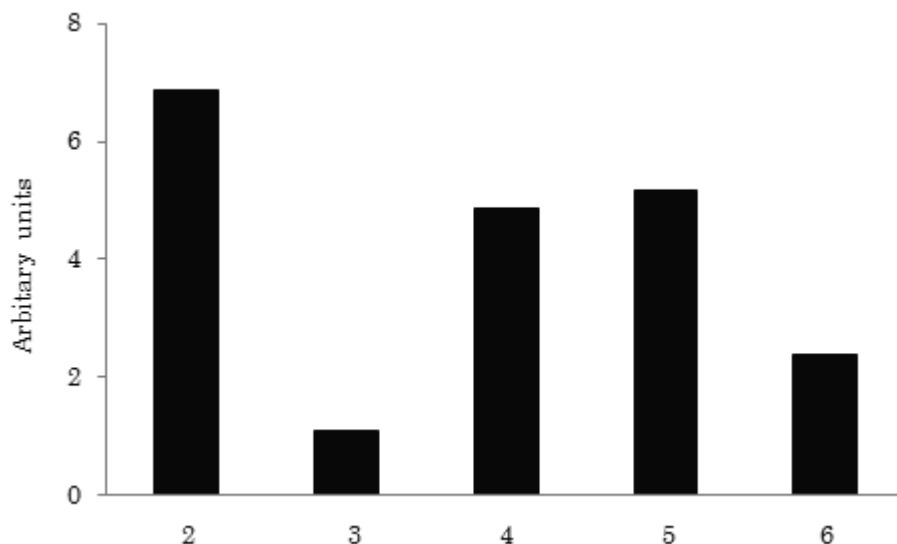


図4. 各種細胞内シグナル伝達系阻害剤と GM-CSF 刺激による SIRP  $\alpha$  の発現

Western blotting と Arbitrary density units を示す。

PD980590: extracellular signal-regulated kinase inhibitor

TMB-8: intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist

SB203580: mitogen-activated protein kinase p38-  $\alpha$  /  $\beta$  inhibitor

PDTC: inhibitor of nuclear factor-kappaB

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

SHPS-1はマクロファージにおいても高発現しているが、SHPS-1 ノックアウトマウスを用いた解析から、赤血球や血小板上に発現するCD47はマクロファージ上のSHPS-1と相互作用して、脾網内系マクロファージによる血球貪食を負に制御していることを明らかになった。つまり、CD47-SHPS-1系がマクロファージによる貪食の負の制御に関わること、更にマクロファージによる自己・非自己の認識機構に関わる可能性を示している。また、SHPS-1ノックアウトマウスでは血小板数の低下ならびに血小板寿命の短縮が認められ、これがマクロファージの貪食能の亢進に起因する可能性が高いと考えられている<sup>12)</sup>。更に、赤血球膜上のCD47がマクロファージ上のSHPS-1と結合することにより、脾網内系でのマクロファージによる赤血球の貪食過程を負に制御することが報告されている<sup>13)</sup>。

侵襲時には単球やマクロファージから大量のサイトカインが分泌され、高サイトカイン血症状態に至ることが判明し、このような高サイトカイン血症を呈する病態を全身性炎症反応症候群 (Systemic inflammatory response syndrome : SIRS) と提唱された<sup>14)</sup>。また、敗血症は感染によって惹起された全身性炎症反応症候群と定義され、その診断には必ずしも血液培養での細菌の証明は必要としない。ま

た、SIRS患者の血液解析で、炎症性サイトカイン産生の高まるSIRSに拮抗する病態として、抗炎症性サイトカインの産生が高まる代償性抗炎症反応症候群 (compensatory anti-inflammatory response syndrome : CARS) が血清学的病態概念として報告された<sup>15, 16)</sup>。CARSが持続している病態では、血中GM-CSF濃度が低下する。その結果、白血球系細胞の機能低下により易感染性となることが知られている。このようなGM-CSFの低下は、SIRP  $\alpha$  の発現に影響を及ぼすものと推察される。CARSに伴い産生が高まる抗炎症性サイトカインの代表的なものとしては、TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) super family, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13や $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone) などがある。この中で、白血球系細胞に影響を及ぼすのがIL-10である。IL-10はGM-CSF刺激によるextracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) の活性化を抑制することが報告されている<sup>17)</sup>。本研究ではGM-CSF刺激によるSIRP  $\alpha$  発現における細胞内シグナル伝達系阻害剤の効果を検索したところERK1の阻害剤であるPD980590の投与により、SIRP  $\alpha$  の発現が抑制された。また、nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B) の阻害剤であるPDTCでもその抑制作用が認められた。

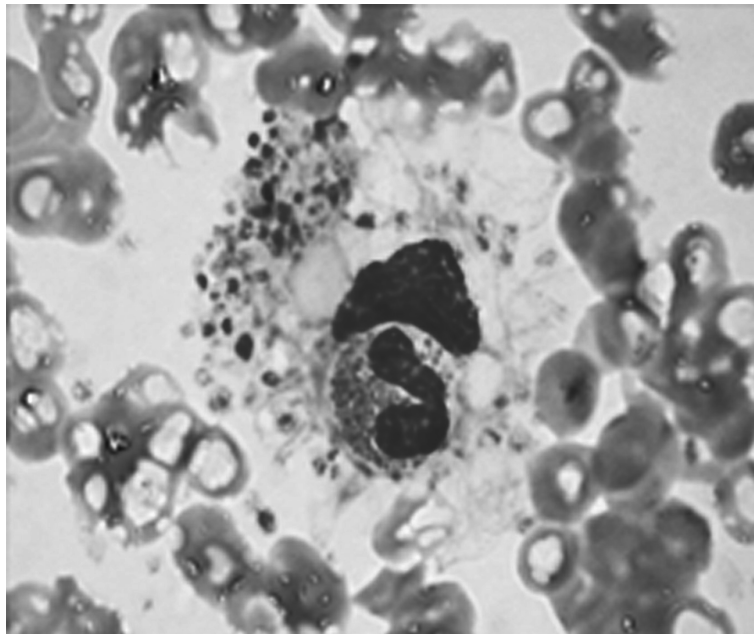


図5. 末梢血液像で認められた血球貪食像

好酸球と血小板を貪食したマクロファージ (×1000)

症例：出血性十二指腸潰瘍 嚥下性肺炎 汎血球減少症 91歳 女性

血小板数：1.3万

以上のように、CARS 状態で IL-10 の産生が増加すると、SIRP  $\alpha$  の発現が抑制される可能性が示唆された。SIRS は症候学的定義により、評価しやすい病態である。しかし、CARS は症候学的定義がなく、あくまでも血清学的病態に過ぎず、抗炎症性サイトカインを測定しない限り明確に評価できない。しかし、SIRS の診断基準である、体温  $<36^{\circ}\text{C}$ 、白血球数  $<4000 \text{ mm}^3$  などの症候に注目することで CARS の可能性が推測できる。このような症例では末梢血中に血球貪食像が認められる可能性があることを周知しておく必要がある。図 5 に末梢血液中に認められた血球貪食像を示す。CARS が遷延すると免疫抑制状態 (immunoparalysis)<sup>18, 19)</sup> に陥り、白血球機能の活性化を低下させ、感染の遷延や新たな感染症を発症し臓器障害へ進展すると考えられている。実際の臨床では、SIRS と CARS がともに生じていると考えられ、混合性拮抗反応症候群 (mixed antagonistic response syndrome: MARS) の状態を呈している<sup>20)</sup>。しかし、敗血症が重症化した場合には、炎症性サイトカインの産生により惹起された炎症反応を沈静化しようとし、いわば生体反応として引き起こされる抗炎症性サイトカインの過剰産生により CRS が発症することになる。このように CARS の発症に伴って IL-10 が過剰産生される<sup>21)</sup>。その結果、血球貪食像が認められると推察された。

## V. 結語

GM-CSF 刺激によりマクロファージには SIRP  $\alpha$  が産生される。しかし、ERK inhibitor である PD980590 を前投与しておくこと、SIRP  $\alpha$  の産生が抑制された。従って、GM-CSF 刺激により ERK を介する細胞内シグナル伝達経路が SIRP  $\alpha$  の発現に重要な役割を演じていることが示唆された。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導頂いた山口類先生 (Western blotting, CBB 染色)、山本隆敏先生 (シグナル阻害実験)、坂本亜里紗先生 (PCR)、楢原真二先生 (遺伝子発現量の分析)、杉内博幸先生 (統計処理)、山口康雄先生 (研究統括) に深謝致します。本研究は熊本保健科学大学学内研究助成 (No. 27-A-01) により実施されたものである。

本研究における利益相反は存在しない。

## 文献

- 1) Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med, 20: 864-874, 1992.
- 2) Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest, 101: 1644-1655, 1992.
- 3) Brown EJ, Frazier WA: Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. Trends Cell Biol, 11: 130-135, 2001.
- 4) Barclay AN, Van den Berg TK: The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP  $\alpha$ ) and CD47: structure, function, and therapeutic target. Annu Rev Immunol, 32: 25-50, 2014.
- 5) Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, et al: Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. J Immunol, 188: 5752-5765, 2012.
- 6) Strieter RM, Remick DG, Lynch JP 3rd, et al: Differential regulation of tumor necrosis factor-alpha in human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes: a cellular and molecular analysis. Am J Respir Cell Mol Biol, 1: 57-63, 1989.
- 7) Arndt C, Koristka S, Feldmann A, et al: Coomassie-Brilliant Blue staining of polyacrylamide gels. Methods Mol Biol, 869: 465-469, 2012.
- 8) Yamaguchi R, Yamamoto T, Sakamoto A, et al: Mechanism of interleukin-13 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophages via protease-



- activated receptor-2. *Blood Cells Mol Dis*, 55:21-26, 2015.
- 9) Brown EJ, Frazier WA: Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*, 11: 130-135, 2001.
- 10) Oshima K, Ruhul Amin AR, Suzuki A, et al: SHPS-1, a multifunctional transmembrane glycoprotein. *FEBS Lett*, 519: 1-7, 2002.
- See comment in PubMed Commons below
- 11) Qu CK: The SHP-2 tyrosine phosphatase: signaling mechanisms and biological functions. *Cell Res*, 10: 279-288, 2000.
- 12) Yamao T, Noguchi T, Takeuchi O, et al: Negative regulation of platelet clearance and of the macrophage phagocytic response by the transmembrane glycoprotein SHPS-1. *J Biol Chem*, 277: 39833-39839, 2002.
- 13) Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, et al: Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*, 288: 2051-2054, 2000.
- 14) Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 1: 1644-55, 1992.
- 15) Bone RC: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*, 24: 1125-1128, 1996.
- 16) Ward NS, Casserly B, Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med* 29: 617-625, 2008
- 17) Dang PM, Elbim C, Marie JC, et al: Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. *FASEB J*, 20: 1504-1506, 2006.
- 18) Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, et al: The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med*, 15: 496-497, 2009.
- 19) Frazier WJ, Hall MW: Immunoparalysis and adverse outcomes from critical illness. *Pediatr Clin North Am*, 55: 647-668, 2008.
- 20) Novotny AR, Reim D, Assfalg V, et al: Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology*, 217: 616-621, 2012.
- 21) van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, et al: Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet*, 351: 950-953, 1998.

(平成28年2月10日受理)

## Production of signal regulatory protein $\alpha$ by GM-CSF-dependent macrophages

Shoko YAMADA, Rui YAMAGUCHI, Takatoshi YAMAMOTO,  
Arisa SAKAMOTO, Shinji NARAHARA, Hiroyuki SUGIUCHI  
and Yasuo YAMAGUCHI

Signal regulatory protein  $\alpha$  (SIRP  $\alpha$ ) is a critical immune inhibitory receptor on macrophages. The ubiquitously expressed cell surface glycoprotein CD47 (integrin-associated protein, IAP) was originally identified as a regulator of integrin-dependent leukocyte responses to extracellular matrix proteins.

Interactions between SIRP  $\alpha$  and CD47 negatively regulate phagocyte activity of macrophages. Thus, CD47 acts as a self marker and prevents macrophage engulfment of host cells. In this study, we found that granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) upregulated SIRP  $\alpha$  expression. In addition, PD980590 (extracellular signal-regulated kinase: ERK) and PDTC (antioxidant and NF- $\kappa$ B inhibitor) reduced protein levels of SIRP  $\alpha$  detected by western blotting. Proinflammatory cytokines mediate the systemic inflammatory response syndrome (SIRS), killing infectious organisms through activation of the immune system. Contrarily, the compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) is a systemic deactivation of the immune system. Indeed, IL-10 can be produced in patients with CARS. IL-10 has been shown to inhibit GM-CSF-induced ERK activity. Thus, IL-10 may be a crucial immunomodulator of SIRP  $\alpha$  production and promote macrophage engulfment of host cells.