

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09545

研究課題名(和文) NETsによる単球分化を介した自己免疫機序の解明

研究課題名(英文) NETs treated monocytes in immune system

研究代表者

坊垣 暁之 (Bohgaki, Toshiyuki)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：50431367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：健康者単球(CD14+細胞)をNETsと共培養することで形態学的には付着性の単球由来マクロファージと異なり、単球由来樹状細胞(monocyte derived DC: mdDC)様のCD14+細胞集団(NETs誘導細胞)が得られた。さらに、NETs誘導細胞のサイトカイン産生能についてリアルタイムPCRを用いてmRNAレベルで検討した所、mdDC、CD14+細胞と比べて、type-I IFNであるIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ の発現亢進が認められた。一方でtype-II IFNであるIFN- $\gamma$ の産生亢進は認められなかった。NETs誘導細胞がIFN signatureに関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human healthy CD14+ cells treated with neutrophil extra cellular traps (NETs) could differentiate into CD14+CD1a-CD11c+HLA-DR+ cells assessed by flow cytometry. Expression levels of type-I interferon mRNA including interferon-alpha and interferon-beta were increased in these cells quantified by real-time PCR. On the other hand, expression levels of interferon-gamma, type-II interferon, mRNA were not significant increased. These expression levels could not be confirmed at the protein levels by western blot or flow cytometry because of its low expression.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) は多彩な自己抗体産生と臓器障害を特徴とする原因不明の自己免疫疾患であり、その病態形成にサイトカイン環境が関与しており、特に、type I interferon (IFN) が注目されている (interferon signature)。SLE では血清中 NETs (neutrophil extracellular traps) による形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell: pDC) からの type I IFN 産生亢進が重要と考えられている。SLE 患者では、末梢血中 pDC 数の減少が報告されており pDC 以外の細胞分画による type I IFN 産生の可能性が考えられる。本研究では NETs により分化誘導された単球由来細胞 (NETs 誘導細胞) の interferon signature への関与を明らかにすることが目的である。計画している検討項目は、NETs 誘導細胞のサイトカイン産生能、NETs 誘導細胞が CD14+ であることから SLE 患者における血清 NETs 濃度と CD14+ 細胞サブセットおよびサイトカイン産生能、Toll like receptor 発現状況と病態との関連の解明である。

## 2. 研究の目的

原因不明の全身性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) は、多彩な自己抗体産生と臓器障害を引き起こす。これまでのところ SLE の発症機序は不明であるが、T 細胞および B 細胞を中心とした獲得免疫の異常、サイトカイン環境の異常、細胞死異常、死細胞の除去過程の異常、Type I interferon (IFN) の経路を含めた自然免疫の異常等が考えられている。申請者は、自己免疫疾患に対する自家末梢血幹細胞移植療法 (autologous peripheral blood stem cell transplantation: aPBSCT) を通して自己免疫疾患の発症・進展におけるサイトカインの役割、SLE 患者における獲得免疫異常と自己抗体産生、臓器障害の関係について報告してきた (Bohgaki T, et al. *Ann Rheum Dis.* 64: 1165-1173, 2005, Bohgaki T, et al. *N Engl J Med.* 357: 2734-2736, 2007, Bohgaki T, et al. *Autoimmun Rev.* 7: 198-203, 2008, Bohgaki T, et al. *J Rheumatol.* 36: 1240-1248, 2009)。aPBSCT の有効性機序の一つとして移植後の免疫システム再構築が挙げられる。有効例では sjTREC (signal joint T cell rearrangement excision circles) で評価した胸腺機能の強い抑制が認められたが、自己免疫抑制に作用する制御性 T 細胞の増加は認められなかった。移植後に二次性 SLE を発症した例について進展過程の詳細な検討を行い、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、interleukin (IL)-6 の血清濃度上昇に続いて血清 IL-17 濃度の上昇、抗 dsDNA 抗体、抗 Sm 抗体、抗カルジオリピン抗体産生が認められ、ループス腎炎、抗リン脂質抗体症候群が発症する過程を明らかにした。IL-17 は、IL-17 産生ヘルパー T 細胞 (Th17) より大量に産生され、分化過程に

TGF- $\beta$  および IL-6 が重要である (Korn T, et al. *Annu Rev Immunol.* 27: 485-517, 2009)。検討症例では、移植後の胸腺機能抑制状態からの T 細胞回復過程で naive CD4+ T 細胞が TGF- $\beta$ 、IL-6 の存在下で Th17 細胞へ分化誘導された可能性が考えられた。さらに、申請者は、アポトーシス関連因子である Bim、カスパーゼ 8 の変異マウスを用いた検討で、ループス様腎炎を自然発症する Bim 変異マウスで T 細胞特異的にカスパーゼ 8 発現抑制を行うと T 細胞でネクロトーシスが誘導され、抗核抗体価の低下、腎炎の改善が得られることを明らかにし、細胞死がループス様病態の促進および抑制の相反する作用に関与することを報告した (Bohgaki T, et al. *J Cell Biol.* 195: 277-291, 2011)。これまで申請者は、自己免疫疾患の発症・進展にサイトカイン・細胞死が関わることを明らかにしてきた。

SLE の病態として T、B 細胞を主体とした獲得免疫の異常について多くの研究が行われてきているが、獲得免疫に加えて単球/マクロファージ、好中球等による自然免疫異常と自己免疫病態の関連が注目されている。単球/マクロファージは、貪食能、抗原提示能、サイトカイン産生能を有しており、SLE 患者では、単球/マクロファージ等の食細胞によるアポトーシス細胞の除去能の低下が指摘されている。除去されなかったアポトーシス細胞は二次性ネクローシスに陥り、自己抗原として自己免疫現象を引き起こす機序が考えられている (Munoz LE, et al. *Nat Rev Rheum.* 6: 280-289, 2010)。単球は、樹状細胞、マクロファージ、破骨細胞、内皮細胞等への分化能を持つことが知られているが、健常者由来単球を SLE 患者血清で培養すると樹状細胞様細胞へ分化し、この過程に IFN- $\alpha$  が関与することが報告されている (Blanco P, et al. *Science.* 294: 1540-1543, 2001)。加えて、末梢血単球は、インフルエンザウイルス感染により速やかに IFN- $\alpha$  産生樹状細胞へと分化する可塑性も報告されている (Cao W, et al. *J Immunol.* 189: 2257-2265, 2012)。自然免疫のもう一方の担い手である好中球は、細菌感染の際に最初に感染部位へ動員され、エラスターゼをはじめとする酵素の働きにより neutrophil extracellular traps (NETs) を形成し細菌の処理に関わっている (Brinkmann V, et al. *Science.* 303, 1532-1535, 2004)。NETs は、通常は細胞外に表出されない核成分が表出されるため、食細胞により除去されなかった二次性ネクローシス細胞とともに自己抗原の供給源として注目される。NETs は、血清中の DNase I により速やかに分解されると考えられており、ヒトにおいて DNase I 欠損により SLE 様病態が誘発されることが報告されている (Yasutomo K, et al. *Nat Genet.* 28: 313-314, 2001)。しかしながら、健常者血清中の DNase I の生理的濃度では NETs 分解は部分的な分解にとどまりマクロファージが処理過程に関わっている (Farrera C, et al. *J Immunol.* 191: 2647-2656,

2013)。SLE 患者では、単球/マクロファージの貪食能の異常が認められるが、NETs 分解能低下を引き起こしている可能性が考えられる。実際、SLE 患者では、血清中 NETs 濃度の上昇が認められ、ループス腎炎との相関が報告されている(Hakkim A, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 107, 9813-9818, 2010)。NETs の SLE 病態形成における作用として toll like receptor (TLR) 7 および 9 を介した形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell: pDC)からの IFN- $\alpha$ 産生亢進が考えられている(Lande R, et al. Sci Transl Med. 3: 73ra19, Garcia-Romo GS, et al. Sci Transl Med. 3: 73ra20, Kaplan MJ. Nat Rev Rheum. 7: 691-699, 2011)。一方、SLE 患者末梢血中の pDC 数の減少が報告されており(Blanco P, et al. Science. 294: 1540-1543, 2001)、末梢血中における NETs の IFN signature への関与は十分に解明されていない。

NETs の免疫システムへの影響について T 細胞受容体を介した T 細胞活性化過程が報告されている(Tillack K, et al. J Immunol. 188: 3150-3159, 2012)。この報告中で、NETs による刺激伝達に NETs と細胞が直接接触することが必要であるものの、DNA 成分を認識し細胞内への刺激伝達に関わる TLR9 が関与しないことが報告されている。B 細胞に対して BAFF 産生亢進を介した活性化に加えて、NETs により自己抗体産生が促される機序が考えられている(Lande R, et al. Sci Transl Med. 3: 73ra19, Kaplan MJ. Nat Rev Rheum. 7: 691-699, 2011)。一方、単球(CD14+細胞)に対する NETs の働きはこれまでの所、十分に検討されていない

### 3. 研究の方法

健常者から得た末梢血より単球を純化し、*in vitro* で NETs による分化能、サイトカイン産生能の評価を行う。単球を *in vitro* で granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)、macrophage colony stimulating factor (M-CSF)、IL-4、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 等の刺激により炎症促進性マクロファージ(M1 マクロファージ: M1)、炎症抑制性マクロファージ(M2 マクロファージ: M2)、mdDC の誘導を行い、比較検討することにより NETs 誘導細胞の形態、機能の評価する。SLE 患者末梢血中における単球サブセットおよびサイトカイン産生能、TLR 発現パターンの検討および SLE の疾患活動性、病態との関連を比較検討することにより、自然免疫で大切な役割を果たしている単球/マクロファージの病態形成への関与を解析する。

### 4. 研究成果

健常者単球(CD14+細胞)を NETs と共培養することで形態学的には付着性の単球由来マクロファージと異なり、単球由来樹状細胞(monocyte derived DC: mdDC)様の CD14+細胞集団(NETs 誘導細胞)が得られた。さらに、NETs 誘導細胞のサイトカイン産生能につい

てリアルタイム PCR を用いて mRNA レベルで検討した所、mdDC、CD14+細胞と比べて、type-I IFN である IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ の発現亢進が認められた。一方で type-II IFN である IFN- $\gamma$  の産生亢進は認められなかった。ウェスタンブロット法、細胞内染色フローサイトメトリー法による蛋白レベルでの type I IFN 発現確認を試みたが発現量が低く十分な比較検討が出来なかった。フローサイトメトリーを用いた表面抗原の検討では、mdDC と異なり、CD14 陽性、CD1a 陰性、HLA-DR 陽性、CD11c 陽性等が認められた。NETs 誘導細胞では、type I IFN 産生に関わる TLR7 の発現亢進が mRNA レベルで確認された。

### 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 1 件)

Shimizu Y, Yasuda S, Kimura T, Nishio S, Kono M, Ohmura K, Shimamura S, Kono M, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Fukasawa Y, Tanaka S, Atsumi T. Interferon-inducible Mx1 protein is highly expressed in renal tissues from treatment-naïve lupus nephritis, but not in those under immunosuppressive treatment. Mod Rheumatol. 2017 Nov 30:1-9. doi: 10.1080/14397595.2017.1404711. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Bohgaki T, Shinsuke Yasuda, Masaru Kato, Kenji Oku, Olga Amengual, Tetsuya Horita, Tatsuya Atsumi. Induction of type-I interferon mRNA in human CD14+ cells treated with neutrophil extracellular traps. 10th European Lupus Meeting, 2016 Oct, Venice, Italy

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

坊垣 暁之 (BOHGAKI, Toshiyuki)  
北海道大学・医学研究院・助教  
研究者番号：50431367

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )