

令和元年6月21日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09661

研究課題名(和文) Siglec-9による活性化好中球細胞死誘導の分子学的機序とその臨床的意義の検討

研究課題名(英文) Molecular mechanism and clinical implications of Siglec-9 induced cell death of activated neutrophils.

研究代表者

加納 原 (Kano, Gen)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：50725306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Siglec-8/IL-5の共刺激による逆説的細胞死増強における、細胞内ROSの産生機序を検討するため、ミトコンドリアとNADPHオキシダーゼ(NOX2)の機能解析を行った。ミトコンドリア膜電位変化、ミトコンドリアROS産生増多は認めず、ミトコンドリアの関与は限定的であった。NOX2の関与については、活性化サブユニットであるp40phox、p47phoxのリン酸化は、ETosisに比し弱いものであった。gp91phoxについては、ETosisやPMA刺激ではその表面発現が増加するのに対し、Siglec-8/IL-5刺激では、細胞内ROS産生が増加している状態でも表面発現は一定であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記成果より、NOX2が細胞表面に露出しない形での特殊な活性化が、細胞内優位のROS増多に関与することが示唆された。一方好中球について、他の研究グループより同様に、活性化サイトカインであるGM-CSF存在下で、Siglec-9刺激による細胞死増強が報告されているものの、今回 Siglec-8と同様にモノクローナル抗体を用いた Siglec-9刺激を行ったところ、その細胞死誘導効果はSiglec-8によるものほど顕著ではなかった。好中球における NOX2は元来、好酸球よりも細胞内優位のROS産生をしていることが知られており、細胞外ROSのダイナミックな調節が好酸球の特異的機能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Upon Siglec-8/IL-5 co-stimulation induced eosinophil cell death, mitochondrial membrane potential change and mitochondrial ROS production, assessed by flow cytometry, were not significant, suggesting no major role of mitochondria. Phosphorylation of NOX2 activating subunits, p40phox and p47phox, were detected with Western blotting and phosphoflow, although the magnitudes were substantially smaller than those observed in PMA or ETosis stimulation. Surface expression of gp91phox, also measured by flow cytometry, was unchanged even when increased intracellular ROS was observed, contrary to the significant upregulation after PMA or ETosis stimulation.

研究分野：免疫学

キーワード：Siglec Cell death neutrophil eosinophil

1. 研究開始当初の背景

Siglec とシアル酸:Sialic acid binding Ig-like lectin(Siglec)は、シアル酸を特異的に認識する糖鎖受容体ファミリーであり、ヒトでは 14 種類、マウスでは 12 種類が同定されている。主として免疫系細胞に発現し、細胞内に抑制性モチーフ(Immunoreceptor tyrosine inhibitory motif; ITIM)をもつことから、Siglec は免疫抑制に働くと考えられている。そのリガンドであるシアル酸は、後口動物の細胞表面に幅広く発現し、とくに粘膜(粘液)中のムチンに豊富である。種々の病原体は、粘膜からの侵入に際し、シアル酸を様々な形で利用するが、*Pseudomonas aeruginosa* などの細菌は、宿主のシアル酸で自らをコーティングすることにより、Siglec を介して宿主の自然免疫反応を減弱させる。また、マウス樹状細胞では、Siglec-G へのシアル酸結合は、LPS など病原体由来分子(PAMPs)による活性化は抑制せず、HMBG1 など自己の組織障害由来分子(DAMPs)による活性化のみを抑制する。これらの事実は、シアル酸-Siglec 系が自然免疫における自己/非自己の識別システムであることを示唆している。

Siglec による活性化細胞死:好酸球・好中球などの顆粒球系では、Siglec による、活性化細胞への細胞死誘導という特殊な作用がみられる。IL-5・GM-CSF・インターフェロン γ などの活性化サイトカインは好酸球・好中球の生存延長(アポトーシス抑制)をもたらし、一方で Siglec-8(好酸球)/Siglec-9(好中球)は細胞死(アポトーシス)を誘導する。しかし Siglec による細胞死は、前記活性化サイトカインの存在下で、逆説的に増強する。したがって Siglec 刺激は活性化した好酸球/好中球を特異的に細胞死誘導できることになり、これらの細胞が関与する疾患への新たな治療法として期待される。しかし、この逆説的な細胞死増強を来す分子学的機序は未解明であり、フローサイトや組織標本で観察しうるマーカーも同定されていないため、生体内で具体的にどういった場面で生じているかを解明することが、臨床応用への課題である。

我々はすでに、Siglec-8 による活性化好酸球死の機序として、(1)IL-5 が MAP キナーゼ ERK をリン酸化、(2)Siglec-8 が Reactive oxygen species (ROS)産生を誘導、(3)ROS により、IL-5 による ERK リン酸化が増強・遷延、という一連のイベントが必須であることを報告した。また、Extracellular DNA trap を伴う細胞死(ETosis)でも ROS/ERK の関与が報告されていることから、その後さらに ETosis と Siglec による活性化細胞死について比較検討を行ったところ、前者は ROS 産生が細胞外優位であるのに対し、後者は DNA 放出を認めず、ROS も細胞内優位であった。この著明な細胞内特異的 ROS 産生は、アポトーシスとも異なる特徴であり、Siglec 誘導性活性化細胞死の生理的役割について検討するうえで、有効な手がかりになると考えられた。

2. 研究の目的

この細胞死における ROS 産生動態の違いがもつ生理学的・臨床的意義を検討するモデルとして、好中球とクローン病/潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患(IBD)の関連に注目される。理由は以下の 2 点である。

活性化好中球のマーカーである CD64 の末梢血中/組織中での発現は、IBD の重症度と相関する。IBD の病勢コントロールに用いられる顆粒球除去療法は、この活性化好中球を排除することで奏効する。ここで Siglec-9—細胞内 ROS 系が生理的な活性化好中球除去機能であるとすれば、少なくとも一部の IBD ではその機能不全が病態に関与している可能性がある。これは同時に、リガンドの静注などにより Siglec-9 を機能させることで、IBD への新規の治療法となりうることも意味する。

好中球における ROS の産生異常と IBD との関連が示されている。例えば、好中球殺菌能不全を呈す原発性免疫不全症である慢性肉芽腫症(CGD)は、NADPH オキシダーゼ(Nox)構成遺伝子の異常により生じるが、約 4 割の CGD 患者は IBD と病理学的に同等の腸管病変を発症する。さらに、超早期(4 歳以下)発症型 IBD など、免疫不全を伴わない IBD 患者の一部でも、Nox の遺伝子変異/多型が同定されている。興味深いことに、これらのうち Nox の p40phox サブユニットに変異をもつ患者では、細胞内 ROS が低下しているが、細胞外 ROS 産生は正常である。つまりこれらの患者では、Siglec-9 による活性化好中球死が機能していない可能性がある。細胞内 ROS を介した Siglec 誘導性細胞死の分子学的機序を解明することで、これら Nox 関連遺伝子異常をもつ IBD の病態解明の手がかりが得られる。

3. 研究の方法

Siglec 誘導性細胞死における、細胞内外 ROS 産生動態の把握のため、リアルタイムな検出法を用いて、各 Nox サブユニット、ミトコンドリアなど候補となる産生部位の関与を含めて評価した。また細胞内 ROS の産生機序を同定すべく、ミトコンドリアと NADPH オキシダーゼ(Nox2)の関与を検討した。

4. 研究成果

Siglec-8 誘導性細胞死において、他の細胞死イベント(ETosis)でみられるミトコンドリア膜電位変化、ミトコンドリア ROS 産生増多は認めず、ミトコンドリアの関与は限定的であることが判明した。Nox2 の関与については、活性化サブユニットである p40phox, p47phox のリン酸化をいずれも認めたが、これも ETosis でみられるリン酸化に比し、弱いものであった。gp91phox

については、ETosis や PMA 刺激ではその表面発現が増加するのに対し、Siglec-8/IL-5 刺激では、細胞内 ROS 産生が増加している状態でも表面発現は一定であった。これらより、NOX2 が細胞表面に露出しない形での特殊な活性化が、細胞内優位の ROS 増多に参与することが示唆された。

好中球についても、他の研究グループより同様に、活性化サイトカインである GM-CSF 存在下で、Siglec-9 刺激による細胞死増強が報告されている。しかし今回 Siglec-8 と同様にモノクローナル抗体を用いた Siglec-9 刺激を行ったところ、その細胞死誘導効果は Siglec-8 によるものほど顕著ではなかった。好中球における NOX2 は元来、好酸球よりも細胞内優位の ROS 産生をしているため、増強効果が得られにくいことが推測され、好酸球と好中球の生理的役割分担を考える上で新たな示唆が得られた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Identification of reactive oxygen production site in Siglec-8 induced eosinophil death. Tomii T and Kano G. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 143(2) AB290: 2019. doi.org/10.1016/j.jaci.2018.12.888 (査読あり)
2. Regulation of Siglec-8-induced intracellular reactive oxygen species production and eosinophil cell death by Src family kinases. Kano G, Bochner BS, Zimmermann N. Immunobiology. 222(2):343-349:2017. doi.org/10.1016/j.imbio.2016.09.006 (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Toshihiro Tomii and Gen Kano. Identification of reactive oxygen production site in Siglec-8 induced eosinophil death. American Society of Allergy, Asthma and Immunology, 2019 Annual Meeting. San Francisco. 2019.2.25.
2. 富井敏宏, 加納原. Siglec-8 誘導性好酸球死における活性酸素産生部位の同定. アレルギー・好酸球研究会 2018. 東京. 2018.9.22.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：該当者なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：該当者なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。