

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08126

研究課題名(和文)食細胞の活性酸素産生異常に起因する炎症重篤化の分子生物学的解析

研究課題名(英文)Effect of MPO and NOX2 deficiency on sterile inflammation and cytokine expression

研究代表者

荒谷 康昭 (Aratani, Yasuaki)

横浜市立大学・理学部・教授

研究者番号：30192470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：好中球やマクロファージは食細胞NADPHオキシダーゼ(NOX2)やミエロペルオキシダーゼ(MPO)によって活性酸素を産生して感染防御を営む。本研究は、両酵素の欠損マウスが易感染性を示すだけでなく、感染非依存的にも重篤肺炎を発症するメカニズムを探った。その結果、(1)死菌刺激を受けたMPO欠損好中球やNOX2欠損マクロファージからの炎症性サイトカインの過剰産生が肺炎重篤化の一因であること、(2)その過剰産生にはdectin-1受容体とMAPキナーゼ類の過剰活性化が関与すること、(3)活性酸素産生異常という自然免疫系異常は、炎症重篤化を導くだけでなく獲得免疫異常も招くこと、を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染によって炎症が重篤化することは肺炎などでよく知られている。一方、病原体が検出されないにも関わらず炎症が進行することもあり、そのような病態はNOX2を欠損したヒトにおいても知られている。しかし、感染非依存的な炎症の進行は発症機構が不明なため治療法に乏しい。本研究は、原因不明の炎症性疾患発症における食細胞機能異常のリスクを知るという基礎研究としての意義がある。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of neutrophils and macrophages is a critical event in the pathogenesis of lung inflammation. Myeloperoxidase (MPO) and phagocyte NADPH oxidase (NOX2) contribute to microbial killing. This study aimed to evaluate the effect of MPO deficiency and NOX2 deficiency on lung inflammation induced by zymosan and nonviable *Candida*. Mice deficient in these enzymes showed more severe pneumonia than wild-type, which exhibited higher lung concentrations of proinflammatory cytokines such as MIP-2 and KC. In vitro, dectin-1 contributed to the production of those cytokines, which was associated with an upregulation of ERK pathway. We also found that NOX2 deficiency exhibits severe thymic atrophy and resulting lymphopenia concomitant with enhanced neutrophilic inflammation in a zymosan-induced systemic inflammation model.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫 好中球 マクロファージ ミエロペルオキシダーゼ NADPHオキシダーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 好中球やマクロファージは自然免疫系に属する白血球であり、初期の感染防御に重要である。いずれの細胞も食細胞 NADPH オキシダーゼ(NOX2)の触媒によって酸素からスーパーオキシド(O_2^-)を産生し、 O_2^- は過酸化水素へと代謝される。さらに好中球では、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)の触媒によって H_2O_2 から次亜塩素酸(HOCl)という好中球特有の活性酸素が生成する。本研究代表者は、自身が作製した MPO ノックアウトマウス (MPO-KO マウス) や、M.Dinauer 氏より分与を受けた NOX2 のノックアウトマウス(CGD マウス)が種々の病原体に易感染性を示し、重篤な肺炎を発症することをすでに報告済みであった。
- (2) ところが、MPO-KO マウスも CGD マウスも、死菌や菌体成分を肺投与しただけでも重篤な肺炎を発症するという興味深い現象も発見するに至っていた。しかし、そのメカニズムは解析途中にあった。

2. 研究の目的

背景(2)で記したような感染非依存的な炎症重篤化のメカニズムを解析することによって、好中球やマクロファージからの活性酸素産生の欠如が、感染非依存的炎症の誘発というリスクも負っている可能性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 酵母菌体成分(ザイモザン)またはカンジダの死菌を野生型、MPO-KO および CGD マウスに経鼻投与もしくは尾静脈投与し、肺やその他の各臓器に集積した炎症細胞種と集積数をフローサイトメトリーで解析した。
- (2) *In vitro* 解析のための好中球はマウス大腿骨髄よりパーコール密度勾配遠心法により単離し、マクロファージはチオグリコレートを腹腔内投与し72時間後の腹腔浸出細胞を使用した。これらの細胞をザイモザンもしくはカンジダ死菌存在下で培養し、培養液中に分泌したサイトカイン(MIP-2 と KC)蛋白量を ELISA 法で測定した。また、それらの遺伝子発現量は、培養後の細胞より RNA を調製しリアルタイム PCR(RT-PCR)法で解析した。
- (3) 遺伝子発現シグナル伝達系の解析は、(2)の方法で単離した細胞をパターン認識受容体の遮蔽抗体あるいはシグナル伝達系酵素群の阻害剤の存在下あるいは非存在下で培養した細胞の破碎液を SDS 電気泳動に供し、シグナル伝達系諸酵素のリン酸化抗体等を用いたウェスタンブロット法で解析した。
- (4) 好中球のザイモザン貪食能は、蛍光ザイモザン存在下で培養後の好中球をフローサイトメーター(FACS)に供して解析した。
- (5) 動物実験は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」等を遵守し、「横浜市立大学における動物実験の実施に関する規程」に準じ、3R の原則を遵守して実施した。また、ノックアウトマウスは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」および「公立大学法人横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科遺伝子組換え実験安全管理規程」に準じ、組換え体として飼育し実験に用いた。

4. 研究成果

- (1) ミエロペルオキシダーゼ欠損好中球におけるサイトカイン過剰産生機構の解析：単離した好中球に、パターン認識受容体に対する遮断抗体の存在下あるいは非存在下でザイモザンを添加し、3時間培養後の MIP-2 遺伝子発現量と分泌量を測定した。その結果、ザイモ

ザン受容体的一种とされる dectin-1 を遮断することによって、遺伝子発現量も分泌量も顕著に低下した。また、シグナル伝達系キナーゼのうち ERK1/2 と p38MAPK を阻害しても MIP-2 分泌量および遺伝子発現量が顕著に低下したことから、p38MAPK/ERK のシグナル伝達経路が関わっていることが示された。ザイモザンの刺激を受けて活性化した MPO 欠損好中球では、p38MAPK は MPO-KO 好中球も野生型好中球も同程度に活性化したが、ERK1/2 は MPO-KO 好中球の方が野生型好中球よりも強く活性化することが、ウェスタンブロット解析によって再現よく示された。

(2) ミエロペルオキシダーゼ欠損好中球における貪食活性促進機構の解析：野生型と MPO-KO マウスから単離した好中球に培養下で蛍光ザイモザンを添加し、30 分ないし 2 時間培養後の好中球を FACS 解析に供し、平均蛍光強度を指標として貪食能を比較した。その結果、2 時間培養後の MPO-KO 好中球は野生型好中球よりも高貪食能を示した。アクチンの重合阻害剤(CK-666)存在下でのザイモザン貪食能を HE 染色法と FACS 解析した結果、好中球のザイモザン貪食量は CK-666 の濃度依存的に減少した。

(3) 好中球からの MIP-2 産生に及ぼすビタミン C の影響：MPO-KO 好中球が MIP-2 を過剰産生するという上記の結果から、好中球が産生する活性酸素量が減少すると MIP-2 産生量が増大するという仮説が立つ。この仮説立証のために、抗酸化物質としてのビタミン C(VitC) が好中球からのサイトカイン産生に及ぼす影響を解析した。単離した野生型好中球にザイモザンと VitC を添加して培養後の MIP-2 遺伝子発現量と分泌量を測定したところ、いずれもザイモザンのみを添加した場合と比較して有意に増大し、VitC はザイモザンで刺激された好中球からの MIP-2 の発現を促進することが明らかとなった。この効果はその他の主要な炎症性サイトカインにおいても再現された。以上から、好中球が産生する活性酸素が VitC によって消去されることによってサイトカイン産生量が増大する可能性が示唆された。

(4) CGD マウスの肺炎重篤化の解析：CGD マウスにカンジダ死菌を経鼻投与すると重篤な好中球性肺炎を誘発すること、CGD マウス肺中では KC を初めとする炎症性サイトカイン類の産生量が野生型マウスよりも顕著に高値を示すこと、KC の中和抗体投与により好中球の集積が抑制されることをすでに明らかにしており、CGD マウス肺における KC の過剰産生が肺炎重篤化の一因であるとの仮説を立てていた。そこで、CGD マウスにおける KC 過剰産生の産生源とそのメカニズムを探った。野生型および CGD マウスから単離したマクロファージに培養下でカンジダ死菌を添加し、KC の遺伝子発現量と分泌量を測定した結果、いずれも CGD マクロファージの方が有意に高値を示したことから、マクロファージが KC の過剰産生源であり、その過剰産生は遺伝子発現レベルで制御されていることが判明した。野生型マクロファージをカンジダ死菌で刺激すると細胞内 Nrf2 量が増加するのに対し、CGD マクロファージでは増加しないことから、CGD マクロファージ中の Nrf2 量が野生型マクロファージに比べて少量であることが、KC 過剰産生の一因である可能性が示唆された。

(5) CGD マウスの獲得免疫異常の解析：野生型および CGD マウスにザイモザンを尾静脈投与し、1 週間後の各臓器の炎症を探ったところ、CGD マウスのみで胸腺の顕著な萎縮が観察された。胸腺細胞数を FACS 解析したところ、CGD マウスでは野生型マウスよりもリンパ球数が顕著に低下していた。以上から、全身が菌体成分に曝された CGD マウスは獲得免疫系にも異常が生じる可能性が示唆された。

(6) まとめ：活性酸素産生異常という自然免疫系の異常が炎症の重篤化を導くだけでなく、獲得免疫の異常も招く可能性を示唆する興味ある結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aratani Yasuaki	4. 巻 640
2. 論文標題 Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 47～52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2018.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagai Kei, Aratani Yasuaki, Shibuya Akira, Yamagata Kunihiro	4. 巻 35
2. 論文標題 Involvement of pentraxin-3 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody production induced by aluminum salt adjuvant	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Exp Rheumatol	6. 最初と最後の頁 735～738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 杉本 遊、高取沙織、荒谷康昭
2. 発表標題 ザイモザン刺激によるミエロペルオキシダーゼ欠損好中球からのMIP-2過剰産生機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒谷康昭
2. 発表標題 MPO欠損とNOX2欠損による非感染性炎症の誘発とサイトカイン過剰産生
3. 学会等名 第25回MPO研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aratani Yasuaki, Endo Daiki, Yamanaka Hiroko, Sugimoto Yu, Tomimoto Yuki, and Ohno Naohito
2. 発表標題 NADPH-oxidase deficiency enhances nonviable <i>Candida albicans</i> -induced lung inflammation.
3. 学会等名 12th International human Peroxidase Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤大樹、富本勇樹、荒谷康昭
2. 発表標題 食細胞NADPHオキシダーゼ欠損マクロファージからのKC過剰産生におけるNrf2の関与
3. 学会等名 第24回MPO研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高取沙織、荒谷康昭
2. 発表標題 野生型およびミエロペルオキシダーゼ欠損好中球からのMIP-2産生におけるTLR2の関与
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉本 遊、荒谷康昭
2. 発表標題 ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスにおけるzymosan誘発性脾臓炎症の重篤化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富本勇樹、遠藤大樹、荒谷康昭
2. 発表標題 食細胞NADPHオキシダーゼ欠損マクロファージにおけるKC過剰産生機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高取沙織、荒谷康昭
2. 発表標題 野生型およびミエロペルオキシダーゼ欠損好中球のサイトカイン産生に及ぼすビタミンCの影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高取沙織、荒谷康昭
2. 発表標題 ミエロペルオキシダーゼ欠損好中球における貪食能の亢進に伴うMIP-2の過剰産生
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒谷康昭、藤本健太
2. 発表標題 MPO欠損に伴うマウス好中球のzymosan貪食能亢進機構の解析
3. 学会等名 第23回MPO研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Aratani Yasuaki, Fujimoto Kenta, Motowaki Takehiro, Tamura Naoya
2. 発表標題 Myeloperoxidase deficiency enhances zymosan phagocytosis in mouse neutrophils
3. 学会等名 10th International human Peroxidase Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kei Nagai, Yasuaki Aratani, Kunihiro Yamagata
2. 発表標題 A evidence for regulation by pentatraxin 3 in production of murine anti-myeloperoxidase antibody in vivo
3. 学会等名 第54回欧州腎臓学会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井恵、荒谷康昭、山縣邦弘
2. 発表標題 アルミニウムゲル投与によるマウスMPO-ANCA産生モデルの樹立
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横浜市立大学 理学部 理学科 生命環境カリキュラム
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~lifeenv/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----