

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08601

研究課題名(和文)獲得免疫成立における活性酸素種産生酵素NOX1の新しい役割の解明

研究課題名(英文)Role of NOX1/NADPH oxidase in acquired immunity

研究代表者

松本 みさき(Matsumoto, Misaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80533926

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)：NOX1はB細胞、T細胞、CD11b陽性単球/マクローファージいずれの免疫細胞にも発現していた。Nox1遺伝子ノックアウトマウス(Nox1-KO)は、野生型マウスと同程度の抗体産生およびオボアルブミン誘発性喘息応答を示した。一方、低用量LPSによって惹起されるコラーゲン誘発性関節炎モデルでは、Nox1-KOにおいてクリニカルスコアおよび関節炎発症率の有意な減少が認められた。NOX1はLPS刺激によって転写誘導され、関節炎発症に関わる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫応答におけるNOX2(gp91phox)の重要性はこれまでに詳細に研究されてきたが、免疫応答とNOX1アイソフォームの連関は不明である。本研究の成果は、これまで未知であったNOX1と免疫応答のクロストークを示唆するものであり、関節炎リウマチの発症機序の解明および新しい治療標的の開拓に資するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：NOX1 mRNA were expressed in splenic B cells, T cells and CD11b+ monocytes/macrophages. No significant differences were observed in antibody production or in ovalbumin (OVA)-induced asthma between wild-type mice (WT) and Nox1-KO. However, the severity and incidence of experimental collagen-induced arthritis (CIA) following the administration of a low dose of endotoxin (LPS) were significantly lower in Nox1-KO. These results indicate an as yet unidentified role for NOX1 in immune responses.

研究分野：病態分子薬理学

キーワード：活性酸素種 免疫 関節炎 喘息

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

活性酸素種産生酵素 NADPH oxidase は触媒サブユニット NOX と p22phox, Rac, activator タンパク, organizer タンパクの会合によって活性酸素種 (ROS) 産生活性を発揮する酵素複合体である。NOX には NOX1~NOX5 の 5 種のホモログが存在する。このうち、免疫細胞において高発現する NOX2 は、好中球などの貪食細胞における殺菌作用に関わり、自然免疫応答に重要である。一方で、その他の NOX ホモログについては非食細胞に高発現することから、NOX2 とは異なる作用に関わると考えられている。

一方、申請者は、活性酸素種産生酵素 NADPH oxidase 1 (NOX1) に対するモノクローナル抗体開発に取り組む過程で偶然に、*Nox1* 遺伝子欠損マウス (*Nox1*-KO) では抗原免疫後、血清中抗体価が十分上がらないという予備的知見を得た。これまでに NOX1 がマクロファージに発現することが知られているが、免疫応答における NOX1 の役割は解明されていない。そこで本研究は、*Nox1*-KO を用いて抗体産生を含む一連の免疫応答を解析することとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、「NOX1 由来の活性酸素種 (ROS) が獲得免疫の成立を促す」という仮説を立案し、保有する *Nox1*-KO を用いた検証とその作用機序解明、および免疫系の疾患治療への応用に繋げることを目的とする。特に、toll-like receptors (TLRs) 活性化が自然免疫のみならず獲得免疫成立に重要であること、また TLRs 活性化が NOX1 の強力な発現誘導作用を有することから、NOX1 が TLRs シグナル下流で獲得免疫を増強する可能性に注目する。

## 3. 研究の方法

### (1) IgG 産生実験におけるオボアルブミン(OVA)皮下免疫

C57BL6 系雄性 8-12 週齢の野生型(WT)および *Nox1*-KO を用いた。OVA 50  $\mu$ g/125  $\mu$ L および完全フロイントアジュバント 125  $\mu$ L を混和したエマルジョンを作製し、イソフルラン麻酔下に背側皮下投与を行なった。7 日後および 14 日後、非完全アジュバントを用いて等量の追加免疫を行なった。最終免疫より 7 日後に血清を回収し、ELISA 法により抗 OVA 抗体量を測定した。

### (2) OVA 誘発性喘息モデル

C57BL6 系雄性 8-12 週齢の WT および *Nox1*-KO を用いた。OVA 50  $\mu$ g および水酸化アルミニウム 2 mg を混和し、腹腔内投与を行なった。14 日後、同様の処置を行なった。初回免疫より 28, 29, 30, 33 日後、イソフルラン麻酔下に 1 % OVA を 50  $\mu$ L 鼻腔内投与した。24 時間後、気管支肺胞洗浄液 (BALF) および肺組織を回収し解析に用いた。

### (3) コラーゲン誘発性関節炎モデルと内毒素 Lipopolysaccharide (LPS) 処置

C57BL6 系雄性 13-20 週齢の WT および *Nox1*-KO を用いた。トリコラーゲン Type II (CII) 200  $\mu$ g/50  $\mu$ L および完全フロイントアジュバント 50  $\mu$ L を混和したエマルジョンを作製し、イソフルラン麻酔下に背側尾部へ皮下投与を行なった。3 週後、LPS 40  $\mu$ g を腹腔内投与した。初回免疫より 8 週後に血清を回収し、ELISA 法により抗 CII 抗体量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) リンパ系組織における NOX1 の遺伝子発現解析

リアルタイム PCR 解析により、NOX1 mRNA は正常マウスより採取した脾臓、胸腺、骨髄、鼠蹊リンパ節に発現することを見出した。さらに、脾臓から単離した T 細胞、B 細胞、CD11b 陽性単球/マクロファージの中では、NOX1 は B 細胞に比較的高く発現していた。

### (2) *Nox1*-KO における抗 OVA 抗体産生

WT および *Nox1*-KO において、同等の anti-OVA IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3 産生が認められた。免疫後のマウスより単離した脾細胞に、OVA 抗原を再暴露したところ IFN- $\gamma$  産生が増加したが、WT および *Nox1*-KO に差異は認められなかった。

### (3) *Nox1*-KO における OVA 誘発性喘息応答

OVA 鼻腔内投与によって、BALF 中における好酸球数は有意に増加し、また肺組織では Th2 サイトカインである IL-4, IL-13 遺伝子発現も著明に増加した。この応答は WT および *Nox1*-KO で同等であった。

#### (4) Nox1-KO におけるコラーゲン誘発性関節炎と LPS の影響

コラーゲン誘発性関節炎モデルにはマウス系統によって感受性に差異があることが知られており、特に C57BL6 系統マウスは抵抗性であることが知られている。本実験に用いた C57BL6 系統マウスにおいても、CII 免疫のみでは関節の腫脹は観察されなかった。そこで実験的関節炎を悪化させることが知られている低用量 LPS(40  $\mu$ g, i.p.)投与を行ったところ、WT において関節炎の発症が認められた。一方、Nox1-KO では発症率および症状スコアが有意に低下していた。

LPS 投与前のマウスより脾細胞を単離し CII 抗原を暴露すると IFN- $\gamma$ および IL-17 産生が著明に増加したが、この応答は WT および Nox1-KO で同等であった。一方、低用量 LPS(40  $\mu$ g, i.p.)は、投与 2 時間後という極めて早い時間において脾臓の NOX1 遺伝子発現を強力に誘導することが明らかとなった。以上のことから、Nox1 はプライミング相ではなく、LPS によって惹起される関節炎発症に関与することが示唆された。

#### (5) まとめ

(1)-(4)の結果より、NOX1 は LPS 誘発性の関節炎発症に重要な役割を担うこと、および低用量 LPS 処置は脾臓における NOX1 遺伝子発現を誘導することが示された。自己免疫疾患は細菌やウイルス感染を契機に発症する可能性があることから、今回用いた低用量 LPS は免疫応答を調節することによって発症促進に関わると考えられる。LPS による関節炎発症促進の機序は未解明な部分が多いが、今回新たに NOX1 が関与することが見出されたことから、免疫細胞における NOX1 の役割について更なる解明が必要である。当初期待した抗体産生における NOX1 欠損の影響は認められなかったが、NOX1 遺伝子発現は B 細胞に比較的多いことが示されたことから、抗体産生とは別の B 細胞機能に関わる可能性がある。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto M, Zhang J, Zhang X, Liu J, Jiang JX, Yamaguchi K, Taruno A, Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Cui W, Matsuno K, Marunaka Y, Itoh Y, Torok NJ, Yabe-Nishimura C.	4. 巻 115
2. 論文標題 The NOX1 isoform of NADPH oxidase is involved in dysfunction of liver sinusoids in nonalcoholic fatty liver disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med.	6. 最初と最後の頁 412-420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.019.	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 該当する

1. 著者名 Liu J, Iwata K, Zhu K, Matsumoto M, Matsumoto K, Asaoka N, Zhang X, Ibi M, Katsuyama M, Tsutsui M, Kato S, Yabe-Nishimura C.	4. 巻 147
2. 論文標題 NOX1/NADPH Oxidase in Bone Marrow-Derived Cells Modulates Intestinal Barrier Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med.	6. 最初と最後の頁 90-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.009.	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	岩田 和実  (Iwata Kazumi)  (60305571)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師   (24303)	
連携 研究者	奈邊 健  (Nabe Takeshi)  (40228078)	摂南大学・薬学部・教授   (34428)	