

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10006

研究課題名(和文)好中球NETの酸化ミトコンドリアDNAは慢性肉芽腫症の自己免疫性炎症を増悪するか

研究課題名(英文)NETs including oxidative mitochondria DNA might make worse the autoimmune-inflammation in CGD

研究代表者

竹内 恵美子 (Takeuchi, Emiko)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00406935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：好中球NETosisは抗核抗体陽性自己免疫疾患の増悪因子である。一般にNETosisにはNOX2を介した活性酸素種(ROS)産生が必要であるが、我々はU1 RNPがNOX2非依存的にミトコンドリアROS産生を亢進させ、小胞のCa²⁺分泌を促してNETosisを惹起することをNOX2^{-/-}好中球を用いて示した。RNP刺激はApoptosisも惹起するが、Caspaseを阻害するとNETosisが亢進し、ミトコンドリア由来の酸化DNAがNETと共に放出された。酸化DNAは1型IFN分泌のtriggerになるため、Apoptosis/NETosisのアンバランスが炎症を誘発することが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はマウス好中球を用いた新しいNETosis誘導系を構築した。これを用いた解析の結果、NETosisを阻害すると好中球のApoptosisが起こり、Apoptosisを阻害するとNETosisが亢進することが示唆された。生体内においてApoptosisは抗炎症的な細胞死であり、NETosisは炎症誘発的細胞死である。これらは個体が細菌に暴露した時に、さらに炎症細胞を動員するのか、炎症を収束させるのかを制御する一つの要因になっている可能性がある。これらの細胞死バランスへの治療的介入は、有効かもしれないが、長期的にそのインバランスがもたらす副反応を視野に入れて検討すべきであると我々は考える。

研究成果の概要(英文)：NETosis has been known as neutrophil unique cell death releasing extracellular chromatin structure considered to be implicated in several autoimmune diseases and inflammatory disorders. Activation of NETosis requires ROS production usually dependent on activation of NOX2. We found that U1 RNP, however, could induce NETosis independent on activation of NOX2, involved with mitochondrial ROS production. The addition of U1 RNP could induce Calcium influx in both wild type and NOX2^{-/-} neutrophils. Because the addition of U1 RNP could induce both apoptosis and NETosis. The inhibition of Apoptosis with several caspase inhibitors, accelerate releasing more NETs including mitochondrial-oxidative-DNA, which is known as proinflammatory factor secreting type1 IFN. Our results indicate that the imbalance between Apoptosis and NETosis might make worse the inflammatory disease.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性細胞死 好中球 慢性肉芽腫症 NETosis Apoptosis

1. 研究開始当初の背景

近年、成熟した好中球が自己の核成分を細胞外へ放出する NETosis という新たな細胞死の概念が提唱され、抗核抗体産生を中心とした自己免疫炎症との関連が注目されている。細胞外病原微生物の存在を感知した成熟好中球は、自身の顆粒タンパクを脱凝集したクロマチンと共に投網のように細胞外に放出し、周囲の病原微生物を絡め捕って病原体の拡散を防ぐ。この投網構造を NETs (Neutrophil Extracellular Traps : NETs) と呼びこのような好中球の細胞死を特に NETosis と呼ぶ。NETosis が自己免疫疾患において特に重要な点は、apoptosis では核成分は分解、凝縮され原則的に細胞外に放出されないのに対し、NETosis では炎症の中心で DNA や核タンパクが細胞外に露出するため、NETs が体内に滞留し続けることが抗核抗体を産生する直接原因になりうることである。実際に SLE 患者の末梢血好中球には NETosis を起こしやすい活性化低比重好中球が多く存在しており、in vitro で容易に NETosis 誘導できることが知られている。そのため、NETosis を抑制することで抗核抗体産生を阻止しようという研究が進められているが、NETosis がどのような分子メカニズムで誘導されるかについては未だ不明なことが多い。

一般に、活性化好中球は NADPH oxidase (別名 : NOX2) 依存的に活性酸素 (ROS) を産生放出し病原微生物を殺菌することが特徴であるが、NOX2 が活性化しないと NETosis も起こりにくいことが報告されており、NOX2 依存性 ROS 産生は NETosis の trigger になっていると予想されてきた。しかし一方で、NETosis をおこしにくいはずの NOX2 欠損 慢性肉芽腫症 (CGD) 患者はしばしば SLE 様の抗核抗体上昇を伴った自己免疫疾患を発症することも知られており、NOX2 欠損による ROS 産生低下は単純に NETs 放出抑制に繋がらないことも指摘されていた。実際に、我々はヒト CGD のモデルである gp^{91phox}/mouse (NOX2 の subunit である gp^{91phox} を欠損する CGD のモデルマウス、以下 CGD マウスと呼ぶ) の好中球を刺激し in vitro で NETs 放出を正常マウスの好中球と比較する実験を行ったが、好中球の活性化の条件によっては CGD の NETs 放出は、正常と同等かそれ以上であるというデータを得ていた。

ところで 2016 年 C Lood らによって、分離したヒト末梢血好中球を、リボ核酸タンパク免疫複合体 (RNP IC) で刺激したときに、ミトコンドリア (以下 Mito) の ROS 産生に強く依存した NETosis が起こり、酸化されたミトコンドリア DNA (以下 ox-mtDNA) が細胞外へ放出されるという報告がなされた (Nat. Med. vol. 22, 2016)。この NETosis はヒト慢性肉芽腫患者の好中球でも認められた。細胞外に放出された酸化 DNA は単球に貪食されると STING 依存的型 IFN 分泌を促して炎症を増悪させることが報告されており、ox-mtDNA も SLE の増悪因子になり得る。

我々は、以前からヒト CGD のモデルマウスの好中球の解析を行っていたが、ヒト好中球を用いた NETosis の実験の多くは、マウス好中球に転用しても NETosis を起こさない。しかし、自己免疫の病態生理と NETosis の関連を解析するにはマウスモデルで安定して高率に NETosis を誘導できるようにすることが必須であるため、RNP IC を用いた NETosis の誘導系を CGD マウスでも確立しようと考えた。

NETosis はバクテリアを殺菌するための効率的なシステムであると同時に、抗核抗体産生性自己免疫疾患を増悪させる可能性もある諸刃の剣である。行き過ぎた NETosis を抑制し、自己免疫疾患の増悪を回避しようとするのは、治療法として魅力的であるかもしれないが、NETosis そのもの、あるいは NETosis が個体に及ぼす影響についての知見が足りなければ予期せぬ副反応が出現する可能性がある。本システムはいずれ CGD マウスを用いた in vivo の疾患モデルに応用し、さらに安全な治療を探求する一助にしたいと考えている。

2. 研究の目的

ヒト SLE 患者由来の RNP-IC がミトコンドリアの ROS 産生を亢進させるという知見を手掛かりに、NOX2 活性を欠損した gp^{91phox}KO マウスの好中球を用いて、NOX2 非依存的 NETosis 誘導系を in vitro において構築し、その pathway を解析する。

このシステムを用いて、in vitro で好中球を刺激した場合でも、好中球の死に方は一様ではなく、NETosis と Apoptosis が混在していることを確認し、細胞死のバランスが個体における炎症の拡大縮小をコントロールしていることを示唆する。

3. 研究の方法

CGD マウスと WT マウスの骨髓細胞をとり、磁気ビーズで negative に好中球を分離し、下記の刺激で NETosis を誘導して以下の方法で検出した。

- ・ 0.3ug/mL PMA: (phorbol 12-myristate 13-acetate ; NOX2 を活性化する)
- ・ 25um A23187 (Ca ionophore)
- ・ 1ug/mL Ips (TLR4 ligand)
- ・ 1ug/ml R848 (TLR7 ligand)
- ・ 0.1mg/mL Zymosan (TLR1,2)
- ・ 10ug/ml RNP-aRNP Ab IC

- 0.25ug/mL snRNP (HeLa 細胞から精製したヒト U1 RNP)
 - 9.75ug/mL anti-RNP mouse Ab
- (1) 生体膜透過性がありミトコンドリア膜に結合し ROS によって蛍光を発する Mitosox を用いて、FACS によりミトコンドリア特異的 ROS 産生を経時的に測定した。
 - (2) 細胞上清中に放出された extracellular DNA の経時変化を、生体膜透過性がなく DNA に結合して蛍光を発する Sytox Green の強度で定量した。
 - (3) スライドガラスに好中球を固定し NETs の形態を蛍光免疫染色によって観察した。
 - (4) 細胞外 DNA が genomicDNA かミトコンドリア由来 oxDNA であるかを FACS または蛍光免疫染色を用いて識別した。
 - (5) 含 Sytox Green RPMI 中に好中球を浮遊させ、NETosis が起きる様子を time-lapse によって観察した。
 - (6) 上記の観察手法を用いたうえで、Caspase などの阻害剤を加え、好中球の fate を操作し、NOX2 非依存的 NETosis のマグニチュードを測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト U1 RNP は mouse 好中球のミトコンドリアの ROS 産生を促す

上記の方法に示した刺激を分離したマウス好中球に加え、ミトコンドリア ROS (mt-ROS) 産生の

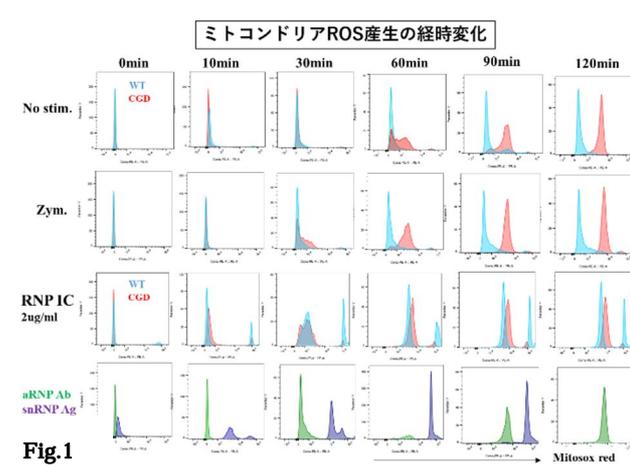


Fig.1

経時変化を FACS で解析した。その結果、TLR-ligand の単純な添加では、mt-ROS 産生の亢進は見られず、これらの定常状態では、CGD の mt-ROS 産生が必ず Wild type(WT)を上回ることが分かった。次に、既報に基づきヒト U1 RNP (以降 RNP) とマウス抗 RNP 抗体との複合体を作り、分離した好中球を刺激したところ、WT において mt-ROS 産生の著しい亢進が認められた。興味深いことに、RNP 単体のみを添加した場合でも mt-ROS 産生亢進が見られたが、抗 RNP 抗体のみでは mt-ROS 産生は起こらなかった (Fig.1)。従って、mtROS 産生を亢進するのに RNP は免疫複合体を形成する必要はなく、FcR による

endocytosis と関係ないことが示唆された。この時の細胞外 DNA 放出を Sytox 染色によって連続して検出すると、TLR-ligand 刺激や NOX2 依存的な PMA 刺激では CGD より WT の DNA 放出が優れているが、RNP-IC、RNP や、NOX2 非依存的 Ca ionophore 刺激では CGD と WT の DNA 放出に有意差はなかった。

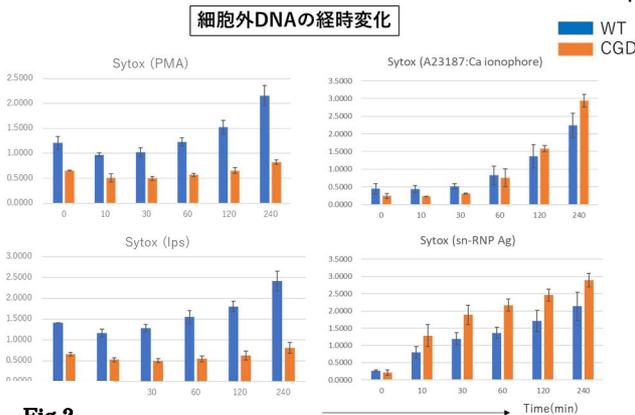


Fig.2

二つの結果より、RNP の刺激がミトコンドリアの ROS 産生を亢進させて NETs を放出させていることが示唆された (Fig.2)。ヒト RNP でマウス好中球の DNA 放出が誘導できた一方で、マウス recombinant U1 RNP をマウス好中球に加えた場合には DNA 放出は見られなかった。ヒト好中球にヒト RNP を加えた場合は、DNA 放出が見られ、さらに正常と SLE 患者由来の好中球を比較すると SLE 好中球の DNA 放出が顕著であることがわかった。(data not shown) これらの結果から、RNP がマウス好中球に NETosis を起こさせたのは、異種の

RNP を添加されたからではなく、この実験に用いたヒト U1RNP に NOX2 非依存的 NETosis を誘導する何らかの要因があったためと考えられた。実際に、細胞外の RNP が endocytosis によって取り込まれ、Virus 感染時などに細胞内外の RNA を伴って、Rab 依存的/非依存的にミトコンドリアへ輸送される例も報告されている (*Biologists* vol.3, 2014)。好中球に関しては、その生理学的意義は現在のところ不明であるものの、ヒト由来 U1 RNP が偶然 NETosis 誘導の Trigger になっていたと考えられる。しかし、NETosis の実験はいまだにヒト好中球で行われることが多く、マウス好中球に NETosis を誘導するのは困難であると考えられている現状を鑑みると、必ず NETosis 様の DNA release を誘導できる本手法は検討するに値すると思われた。

(2) snRNP 刺激は細胞内小胞からの Ca 放出を促進する

細胞内 Ca の上昇は NETosis を惹起する pathway の一過程であると考えられており、Ca ionophore を用いて強制的に細胞内のカルシウム濃度を上昇させると NOX2 非依存的に NETosis を起こすことができることが知られている。RNP 刺激が NOX2 非依存的に細胞内 Ca 濃度を上昇させることができるか、Calcium kit -iCellux を用いた kinetic assay で検証した (Fig.3)。その結果、RNP

は WT, CGD 両方の好中球の細胞内カルシウム濃度を上昇させており、RNP が NOX2 非依存的に NETosis の過程を進行させていることがわかった。細胞外液からカルシウムを除いても細胞内 Ca 濃度の上昇がみられることから、この Ca は細胞膜上のカルシウムイオンチャンネルには依存せず、細胞内小胞由来であることが示唆された。

(3) pan-Caspase 阻害が NETosis を亢進する

制御性細胞死には、Pyroptosis のように炎症を拡大する細胞死と Apoptosis のように炎症を収束させるように働く細胞死がある。NETosis は炎症拡大に働くと考えられる。In vitro で NETosis を誘導しようとした場合にも全ての細胞死が NETosis になることはなく、Apoptosis が混在する像しか得られない。

そこで、RNP によって NETosis を誘導した場合に、Caspase などの阻害によって Apoptosis が起こらないようにすると、NETosis が亢進するかを検証した。

WT と CGD の骨髓より分離した好中球をガラスチャンパー上に RNP などの刺激を加えて 4 時間培養した。細胞外に放出された DNA は生細胞膜に透過性のない Sytox で、総 DNA は DAPI で、酸化 DNA は抗 8-ox-dG 抗体で三重染色を行った。PMA や TLR-ligand などの NOX2 依存的な NETosis 誘導系では WT 好中球にはわずかに NETs が観察されたが、CGD の好中球は NETosis を起こさなかった。一方、RNP で刺激すると WT、CGD ともに細胞外に放出された DNA が網上に広がる NET 像が確認され、形態上も RNP で NETosis が誘導できることが明らかになった。また、ミトコンドリアの ROS 産生が亢進すると、ミトコンドリア DNA は酸化され、Guanin が 8-Hydroxy-Guanine となるため、損傷のない DNA と区別できるようになる。抗酸化 DNA 抗体染色像(ox-mtDNA)と Sytox 陽性細胞外 DNA(exDNA)とを Merge した結果、WT の好中球は RNP 刺激を加えてもほとんど ox-

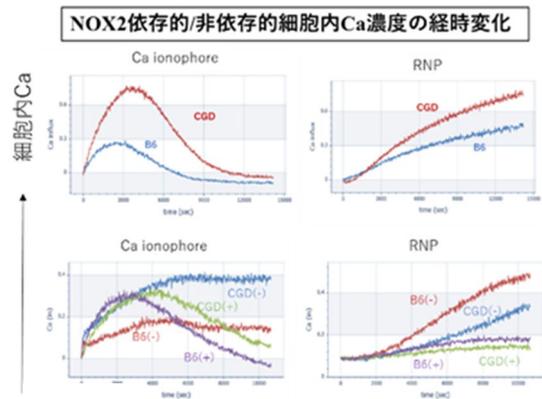


Fig.3 細胞外液のCa(+)またはCa(-)の比較

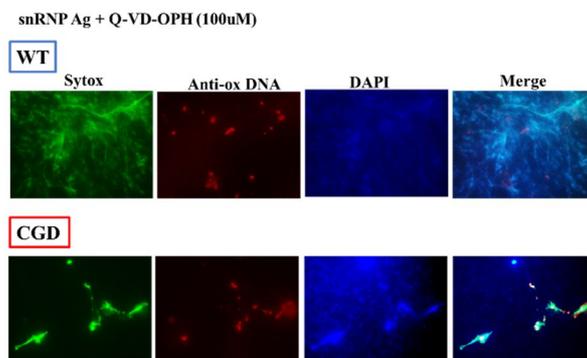
snRNP Ag + Q-VD-OPH (100uM)

WT

Sytox Anti-ox DNA DAPI Merge

CGD

Fig. 4



In vivo においては、酸化 DNA はマクロファージに貪食されて type I IFN の分泌を促し炎症を拡大することが知られている。従って、好中球は RNP 刺激を受けると一部は NOX2 非依存的 NETosis を起こすが、炎症誘発性 ox-mtDNA が過度に拡散しないよう、多くは Apoptosis で除去されているといえる。CGD は無刺激時の mtROS 産生レベルが正常よりも高いため、NETosis が起きると NET 中に ox-mtDNA が多く含まれているのかもしれない。

(4) RNP induced NETosis の可視化

蛍光免疫染色を用いた解析は、RNP による NETosis 誘導後の限られた time point でしか、解析を行えない。NETs の存在が認められるのは、NETs が放出されてから分解されるまでの間にサンプルを固定できた場合のみである、細胞が刺激されてから放出される前の変化や、NETs が放出されて拡散した後、さらに細胞の痕跡すらなくなった後では、何が起きたのかを検証できない。そこで、細胞培養液 RPMI に Gytox Green を加えて、細胞外に DNA が放出されると蛍光を発するようにして、time laps により RNP 添加後から 10 時間の連続した変化を取得することを試みた。WT でも CGD でも RNP の添加により早期に NETs が細胞外に放出される像が得られたが、一部の細胞は NETosis を免れ、培養後期に核が凝集し Sytox 陽性となる Apoptosis 像を呈した。Pan-Caspase 阻害剤投与により、Apoptosis を阻害すると、NETs の放出が早く激しく起こり、観察している視野のほぼすべての細胞が消失した。一方、Cl-amidin を加え、PAD4 によるクロマチン脱凝集を阻害すると反応の初期に NETosis を起こす細胞がいるものの、多くの好中球がこれを免れ、Apoptosis に特有の像を示すようになった。NETosis の pathway の PAD4 活性化よりさらに下流で p38 がリン酸化を受けるが、p38 の阻害は NETosis の阻害効果を示さなかった。PMA で NOX2 を活性化させた場合には、好中球が膨張し核が細胞質に押しやられたように細胞内で偏在する、pyroptosis 様の変化を示したが、細胞外への核の放出は起こらなかった。

また、培養液のカルシウム濃度を高くすると、細胞が膨潤するが、核を細胞外へ放出しなくなった。

Time lapse による観察から、RNP 刺激が加えられた場合、in vitro ではまず NETosis が起こり、これを免れた好中球は緩徐に Apoptosis を起こすことがわかった。また、近年の報告では NETosis が起こる場合でも、Gasdermin D による pore の形成があるといわれている。我々の観察でも細胞の膨潤はしばしば見られるが、核の細胞外への放出が起こりにくく、核を細胞外へ放出する条件が極めて限定的であることがわかった。好中球の細胞死は一部が pyroptosis の pathway と重なっているものの、全てが一致するわけではないことが示唆された。

(5) NETosis/Apoptosis の定量化

Time lapse の観察は時間と共に変化する好中球の形態を解析するのに優れているが、一度に複数の検体の情報を採取することができないため、定量的な比較に適していない。例えば、Annexin X はそれ自体に細胞死の進行を止めるような働きがあり、Sytox と AnnexinX, または Sytox と Mitosox 等の二重染色をした場合に、色素がなかった場合と条件が同じか否かをさらに検討しなければならなくなってしまふ。そこで、IncuCyte を用いて、96 検体の顕微鏡画像と蛍光強度の情報の同時採取を試みた。同一の well に複数の試薬を入れることはできないが、同じ条件の well を複数作り、蛍光試薬を変えて同時に測定することで、少なくとも蛍光試薬が反応系に与える影響を限定することができる。この system を用いてミトコンドリアと NETs 放出の前後関係および、NETosis と Apoptosis および Pyroptosis とのバランスを Caspase 3 と Caspase 1 の阻害剤を分けて使用することで解析した。現在までに得られた結果では、Caspase 3 を阻害して Apoptosis をおこらなくすると NETosis が亢進するが、Caspase 1 阻害剤による Pyroptosis の阻害は NETosis を亢進しないようである。

しかしながら、現段階ではこのシステムにより得られた結果には、さらなる検討が必要である。

我々はマウス好中球を用いた新しい NETosis 誘導系を構築した。これを用いた解析の結果、NETosis を阻害すると好中球の Apoptosis が起こり、Apoptosis を阻害すると NETosis が亢進することが示唆された。生体内において Apoptosis は抗炎症的な細胞死であり、NETosis は炎症誘発的細胞死であることを考え合わせると、これらは個体が細菌に暴露した時に、さらに炎症細胞を動員するのか、炎症を収束に向かわせるのかを制御する一つの要因になっている可能性がある。これらの細胞死バランスへの治療的介入は、有効かもしれないが、長期的にそのインバランスがもたらす副反応を視野に入れて検討すべきであると我々は考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内恵美子・竹内康雄・大津 真
2. 発表標題 X連鎖性慢性肉芽腫症モデルgp91phoxknock-out mouseへの肉芽腫形成誘導とNOX2依存的細胞死の関連について.
3. 学会等名 第48回臨床免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内恵美子
2. 発表標題 In vitroにおけるマウス好中球のNetosis誘導と細胞外カルシウム濃度の関係について
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Emiko Takeuchi
2. 発表標題 The association between calcium influx and NETosis induced through the NADPH oxidase independent pathway
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内恵美子 竹内康雄
2. 発表標題 NADPH oxidase (NOX2)非依存的的好中球NETosis誘導とミトコンドリアROS産生の関連について
3. 学会等名 第46回 臨床免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Emiko Takeuchi, Yasuo Takuchi, Kazuya Iwabuchi
2. 発表標題 The association NADPH oxidase independent NETosis with acceleration of mitochondrial ROS production
3. 学会等名 The 47th Annual meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内恵美子、森澤慎、竹内康雄
2. 発表標題 LupusモデルマウスBXSBを用いた好中球NETosisの新たな定量と定性解析.
3. 学会等名 第45回 臨床免疫学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shin Morisawa, Emiko Takeuchi, Yauso Takeuchi
2. 発表標題 Quantitative analysis of Neutrophil extracellular traps (NETs) in lupus prone mouse using novel methods .
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2017年

〔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	大津 真 (Otsu Makoto) (30361330)	北里大学・医学部・助教 (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	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	竹内 康雄 (Takeuchi Yasuo) (60286359)	北里大学・医学部・教授 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関