

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010 年度

課題番号：20591200

研究課題名（和文）ヒト好中球におけるオゾン産生の機序解析ならびに殺菌増強作用への応用

研究課題名（英文）Study of the mechanism of ozone production and application for enhancement of bactericidal activity in human neutrophils

研究代表者 山下 浩平 (Yamashita Kouhei)

京都大学・大学院医学研究科・助教 研究者番号：80402858

研究成果の概要（和文）：

好中球が産生する活性酸素は、病原微生物に対する生体防御に重要な役割を果たす一方、その強い反応性のため組織傷害を引き起こす。活性化した好中球は、NADPH オキシダーゼの活性化を介して、スーパーオキシド・過酸化水素・ヒドロキシラジカル・一重項酸素などの活性酸素を産生する。最近、免疫グロブリンの作用により、一重項酸素からオゾンが産生されることが報告されたが、その詳細な機序や生体防御における役割は明らかでなかった。本研究で我々は、4 種のアミノ酸（Trp, Met, Cys, His）が免疫グロブリンと同様に一重項酸素からオゾン産生を触媒する作用があること、そしてこれらアミノ酸の触媒作用により産生したオゾンがヒト好中球において殺菌に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Reactive oxygen species (ROS) by phagocytosing neutrophils are double-edged swords. They play a pivotal role in innate host defense, while they bring about tissue injury. Activated neutrophils produce ROS via NADPH oxidase activation, such as superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, and singlet oxygen. It has been recently reported that immunoglobulin has a catalytic activity to produce ozone from singlet oxygen. However, the precise mechanism and the role in host defense remain unclear. In this study, we discovered that 4 amino acids themselves were able to catalyze the production of an oxidant with chemical signature of ozone from singlet oxygen at comparable level of immunoglobulin. We also revealed that ozone production by amino acids contributed to killing of bacteria in human neutrophils.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、感染症内科学、感染症防御学

キーワード：好中球、オゾン、殺菌、免疫グロブリン、アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

抗菌化学療法の進歩により、多くの感染症が克服可能となってきているが、血液・腫瘍内科領域に起きて、感染症は未だ死因の上位を占めている。また、近年、多剤耐性の細菌感染症が問題となっており、抗菌薬の開発のみでは解決できない難問が山積している。本研究では、自然免疫の第一線を担っている好中球の生体防御能に焦点を当て、感染症の克服を目指す。好中球の殺菌機構において、活性酸素産生系が極めて重要であることが明らかとなったが、殺菌のメカニズムには未解明な点が数多く残されている。最近、免疫グロブリンが活性酸素の一つである一重項酸素からオゾンを生産する触媒作用をもつことが報告され、免疫グロブリンがオプソニン作用のみならず、殺菌に関わるエフェクターを直接産生するという、生体防御における新たな役割が認識されつつある。しかし、オゾン産生の詳細な機序は未解明であり、産生したオゾンの感染防御における役割についても明確に示されていない。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、本研究では下記の点を明らかにすることを目的とする。

- (1) 一重項酸素からのオゾン産生機構の解明
- (2) ヒト好中球におけるオゾン産生の検討
- (3) ヒト好中球の殺菌におけるオゾンの役割の解明

これら課題の解明は、造血細胞移植や悪性リンパ腫などに対するリツキシマブ治療の普及などにより、免疫グロブリンが低下した患者が増加し、このため肺炎、敗血症などの感染症が増加している血液・腫瘍内科領域において、大変有意義であると考えられる。また、オゾン産生機構やヒト好中球の殺菌におけるオゾンの役割が明らかになれば、抗菌薬非依存性に殺菌作用を増強しうる可能性が考えられ、現在問題となっている多剤耐性菌感染症に対する治療応用への貢献が期待できる。

3. 研究の方法

一重項酸素を特異的に産生すると考えられる
(1) 独自に開発した cell-free system

(6-formylpterin (6FP) やその誘導体 6FP-tBu-DMF+紫外線照射) と (2) 独自に発見した *gp91-phox variant-type* 慢性肉芽腫症 (CGD) 患者好中球を用いて実験を行う。
A) Cell-free system におけるオゾン産生の機序解析:

6FP 或いは 6FP-tBu-DMF を加えた水溶液に紫外線照射する一重項酸素産生系に、種々の免疫グロブリンフラグメント、アルブミンなどの蛋白、formyl-Met-Leu-Phe (FMLP) などのペプチド、または水溶性アミノ酸 (19 種) を加えてオゾン産生を検討する。この系に一重項酸素消去剤として知られる azide, edaravone などを添加してその抑制効果を検討する。オゾンの測定は吸光度計を用いたインジゴカルミンの脱色反応を利用する。またオゾン産生の確認として、HPLC や mass spectrometry を用いてインジゴカルミンやビニルベンゾイン酸の分解を検出する。

B) Cell-free system におけるオゾンの殺菌作用の検討:

6FP 或いは 6FP-tBu-DMF に紫外線を照射する一重項酸素産生系に、オゾン産生触媒作用を有する免疫グロブリン、ペプチド、アミノ酸を添加してオゾン産生を誘導する。その溶液中に大腸菌を加えて適当な時間反応させた後、コロニー形成法により生菌率を測定することにより、オゾン産生による殺菌作用を検討する。

C) CGD 患者好中球におけるオゾン産生の検討ならびにその殺菌増強作用の検討:

健常人好中球は phorbol myristate acetate (PMA) などで刺激すると一重項酸素の他スーパーオキシドなど種々の活性酸素を産生する。しかし、活性酸素産生酵素の subunit である 91kDa の glycoprotein (gp91) をコード

する遺伝子 *CYBB* のエクソン 3 に存在する 252 番目の G→A 変異によって、スプライシングに異常をきたす *gp91-phox variant-type* CGD 好中球は、PMA 刺激によりスーパーオキシドは有意に産生しないが、一重項酸素を健常人と比較してやや少ないものの有意に産生することが我々の検討で明らかとなった。この CGD 好中球にオゾン産生触媒作用を有する免疫グロブリン、ペプチド、アミノ酸を添加して PMA 刺激することにより、インジゴカルミンを用いた脱色反応やビニルベンゾイン酸を用いた HPLC 法などで患者好中球のオゾン産生を検討する。オゾン産生を検出する系はスーパーオキシドにも反応することが報告されたが、この特殊な患者好中球を利用することにより、その障壁を乗り越えることが出来る。さらに、このオゾン産生系に適当な割合で大腸菌を加えて適当な時間反応させた後、コロニー形成法により生菌率を測定することにより、患者好中球におけるオゾン産生による殺菌増強作用について調べる。また、同様の実験を健常人好中球を用いて行うことにより、オゾン産生による殺菌増強作用が我々の生体で広く行われている現象か否かを検討する。

4. 研究成果

6FP 或いは 6FP-tBu-DMF を加えた水溶液に紫外線照射する cell-free での一重項酸素産生系の実験において、完全型の免疫グロブリン (IgG) のみならず、免疫グロブリンフラグメントである F(ab)'₂、アルブミン、FMLP によっても、インジゴカルミン脱色反応にてオゾン産生することが分かった。この所見を発展させて、水溶性アミノ酸 (チロシンを除く 19 種) を調べたところ、Trp, Met, His, Cys

の4種アミノ酸がインジゴカルミンの脱色反応を引き起こし、オゾン産生を触媒する可能性が考えられた。この系に一重項酸素消去薬である azide や edaravone を加えたところ、インジゴカルミンの脱色反応は抑制された。また、このアミノ酸の触媒反応で産生する酸化物は、HPLCによるインジゴカルミン分解産物 vinylbenzoic acid の解析や O¹⁸を用いた mass spectrometry でオゾンであることが示され、4種アミノ酸が一重項酸素からオゾン産生を触媒する作用を有することが明らかとなった。

次に、cell-free 系で産生したオゾンによる殺菌作用を検討した。Trp や Met といったオゾン産生を触媒するアミノ酸を 6FP-tBu-DMF + 紫外線照射水溶液に加えたとき、大腸菌や腸球菌は反応開始後2時間でほぼ完全に死滅したが、Arg や Phe といったオゾン産生触媒作用を有さないアミノ酸を加えたときには菌は死滅しなかった。ヒト好中球における殺菌への関与については、PMA 刺激により一重項酸素を比較的特異的に産生する gp91-phox variant-type CGD 好中球を用いて解析した。CGD 好中球に Trp を加えて PMA 刺激を行ったとき、インジゴカルミンの脱色反応やビニルベンズイン酸の分解産物である 4-carboxybenzaldehyde の産生が認められ、またこの反応が edaravone の添加によって部分的にはあるが抑制されたことから、オゾン産生が明らかとなった。さらに CGD 好中球と大腸菌の混和による殺菌実験で、Trp の添加により大腸菌に対する殺菌能が有意に増強することが示された。同様の所見は、健常人好中球でも認められ、アミノ酸により産生したオゾンが殺菌に寄与する可能性が示された。

本研究の所見は、アミノ酸投与による好中球殺菌能の増強を介した生体防御能の向上に結びつく可能性があり、この点は今後の大きな研究課題になると考えられる。

本研究の成果は、米国科学アカデミー紀要 (*Proc Natl Acad Sci USA* 105, 16912-7, 2008) に発表し、京都新聞 (2008年10月21日夕刊) で紹介され、広く社会に発信した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計13件)

1. Miyoshi T, Yamashita K, Arai T, Yamamoto K, Mizugishi K, Uchiyama T. (2010) The role of endothelial Interleukin-8/NADPH oxidase1 axis in sepsis. *Immunology* 131, 331-9. (査読有)
2. Nishinaka Y, Mori H, Endo N, Miyoshi T, Yamashita K, Adachi S, Arai T (2010). Edaravone directly reacts with singlet oxygen and protects cells from attack. *Life Sci* 86, 808-13. (査読有)
3. Mori H, Nishinaka Y, Nonogawa M, Sommani P, Makino K, Yamashita K, Arai T (2010). Substituent effects of pterin derivatives on singlet oxygen scavenging activity. *Biol Pharm Bull* 33, 905-8. (査読有)
4. Miyoshi T, Arai T, Yamashita K, Sasada M, Uchiyama T. (2010) NB4 cells treated with all-trans retinoic acid generate toxic reactive oxygen species that cause endothelial hyperpermeability. *Leuk Res* 34, 373-8. (査読有)
5. Kawai A, Nishinaka Y, Arai T, Hirota K, Mori H, Endo N, Miyoshi T, Yamashita K, Sasada M. (2008) α -Phenyl-*N*-tert-butyl nitron has scavenging activity against singlet oxygen (¹O₂) and attenuates ¹O₂-induced neuronal cell death. *J Pharmacol Sci* 108, 545-9. (査読有)
6. Yamashita K, Miyoshi T, Arai T, Endo N, Itoh

H, Makino K, Mizugishi K, Uchiyama T, Sasada M. (2008) Ozone production by amino acids contributes to killing of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 16912-7. (査読有)

7. Senda C, Nishinaka Y, Arai T, Segawa H, Mori H, Nonogawa M, Endo N, Miyoshi T, Yamashita K, Sasada M. (2008) Effects of injectable propofol emulsion on singlet oxygen released from activated human neutrophils and that chemically generated. *J Pharmacol Sci* 107, 460-4. (査読有)

8. Miyoshi T, Arai T, Nonogawa M, Makino K, Mori H, Yamashita K, Sasada M. (2008) Anticancer photodynamic and non-photodynamic effects of pterin derivatives on a pancreatic cancer cell line. *J Pharmacol Sci* 107, 221-5. (査読有)

9. Arai T, Nonogawa M, Makino K, Endo N, Mori H, Miyoshi T, Yamashita K, Sasada M, Kakuyama M, Fukuda K. (2008) The radical scavenger edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) reacts with a pterin derivative and produces a cytotoxic substance that induces intracellular reactive oxygen species generation and cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 324, 529-38. (査読有)

10. 山下浩平, 三好隆史. 広範囲血液・尿化学検査 第7版, 免疫学的検査(3) —その数値をどう読むか—. 好中球機能検査(貪食能、殺菌能、遊走能、活性酸素産生能、接着分子発現能) 877-80. 日本臨床社. 2010. (査読無)

11. 山下浩平. 造血器疾患・続発性免疫不全症における低ガンマグロブリン血症. 血液フロンティア. 20. 1999-2006. 2010. (査読無)

12. 山下浩平. 学会印象記—第84回日本感染症学会総会—. 臨床と微生物. 37. 407. 2010.

(査読無)

13. 山下浩平, 三好隆史. 疾患と検査値の推移—家族性地中海熱—. 検査と技術. 36. 29-34. 2008. (査読無)

[学会発表] (計5件)

1. 山下浩平. 好中球の殺菌作用—活性酸素の役割. 第84回日本感染症学会総会教育講演. 2010年4月5-6日. 京都.
2. 三好隆史, 山下浩平, 荒井俊之, 笹田昌孝, 内山卓. ATRA 症候群における血管透過性亢進病態形成への活性酸素関与の可能性の検討. 第71回日本血液学会学術集会. 2009年10月23-25日. 京都.
3. 山下浩平. 難治性非腫瘍性造血器疾患の病態と新しい治療戦略—好中球機能異常症. 第89回近畿血液学地方会特別講演. 2008年6月21日. 枚方.
4. 三好隆史, 山下浩平, 伊藤洋志, 山本孝吉, 笹田昌孝. 敗血症におけるIL-8の血管内皮細胞に対する作用についての検討. 第82回日本感染症学会総会. 2008年4月17-18日. 松江.
5. 三好隆史, 山下浩平, 荒井俊之, 山本孝吉, 内山卓, 笹田昌孝. 敗血症病態におけるIL-8の血管内皮細胞に対する作用の検討. 第70回日本血液学会総会. 2008年10月10-12日. 京都.

[その他]

ホームページ等：京都大学大学院医学研究科
血液・腫瘍内科学 生体防御研究
<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~hemonc/research/biophylaxis.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者：山下 浩平 (Yamashita

Kouhei)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80402858

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし