

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06446

研究課題名(和文) 自然免疫異常が惹起する過剰炎症反応と獲得免疫異常の解析

研究課題名(英文) Mice deficient in NOX2 display severe thymic atrophy and lymphopenia in association with neutrophilic lung inflammation

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) 3,300,000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感染非依存的にも肺炎を発症するメカニズムを探った。その結果、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り、それらの過剰産生にはTLR2やTLR4受容体が関与し、NF- κ BやSTAT3転写因子の過剰活性化がサイトカイン過剰産生の一因であることを示す結果を得た。さらに、NOX2欠損という自然免疫異常は、獲得免疫能の低下も招くという重要な知見も得た。

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。ところが、病原体が検出されないにも関わらず劇的なサイトカインストームを伴う重篤な炎症が進行することもあり、NOX2を欠損したヒトにおいてもそのような病態を時折発症することが知られている。しかし、その発症機構は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)：Neutrophils and macrophages play a role in host defense against bacteria and fungi. Activated neutrophils generate superoxide anions and hypochlorous acid via phagocyte NADPH oxidase (NOX2) and myeloperoxidase (MPO), respectively. This study aimed to examine the role of these enzymes for the systemic inflammation. In a zymosan-induced inflammation model, NOX2-deficient (NOX2-KO) mice exhibited more severe thymic atrophy, lymphopenia, and more remarkable neutrophilic lung inflammation in association with accumulation of higher amounts of TNF- α and KC in NOX2-KO lungs. Strikingly, zymosan-stimulated NOX2-KO neutrophils produced a greater amount of TNF- α than wild-type neutrophils. NOX2-KO macrophages produced a greater amount of KC in response to zymosan. These results suggest that the greater TNF- α and KC production from the NOX2-KO phagocytes at least partly contributes to the accumulation of neutrophils observed in the lungs of these mutant mice.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫 好中球 活性酸素

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の一員であり、感染に対する初期防御を担っている。これらの食細胞が病原体を貪食して活性化すると、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、続いて過酸化水素(H_2O_2)へと代謝される。さらに、好中球においては、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、NOX2 のノックアウトマウス(NOX2-KO マウス, M. Dinayer 博士より分与)が、カンジダ菌を初めとする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発見し、感染初期の生体防御における好中球由来活性酸素の重要性をすでに証明済みであった。

(2) ところが、MPO-KO マウスも NOX2-KO マウスも、生菌だけでなく、カンジダの死菌や酵母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していた。この発見は、自然免疫担当細胞からの活性酸素産生の欠如は、殺菌能の低下とは無関係にも炎症重篤化を招く可能性を秘めている。しかし、そのメカニズムの全貌は不明であり、解析の途中にあった。

2. 研究の目的

背景(2)で記したような MPO-KO マウスや NOX2-KO マウスに観察される感染非依存的な炎症重篤化のメカニズムを解明することによって、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明確に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)を野生型、MPO-KO および NOX2-KO マウスに経鼻投与もしくは尾静脈投与し、肺やその他の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) 肺ホモジネート上清中に蓄積した TNF- α などの炎症性サイトカイン量は、市販の ELISA キットを用いて測定した。

(3) *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た。この細胞をザイモザン存在下で培養し、培養液中に分泌したサイトカイン量を ELISA 法で測定した。また、サイトカイン遺伝子の発現量は、培養後の細胞より RNA を調製し、リアルタイム PCR 法で解析した。

(4) 遺伝子が発現するためのシグナル伝達系の解析は、(3)の方法で単離した細胞を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、その細胞破碎液を 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。

(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) NOX2-KO 好中球およびマクロファージにおけるサイトカイン過剰産生機構の解析：NOX2-KO マウスにザイモザンを経鼻投与すると重篤な好中球性肺炎を誘発することや、NOX2-KO マウス肺中では TNF- α などの炎症性サイトカインや好中球走化因子である KC の産生量が野生型マウスよりも顕著に高値を示すことから、NOX2-KO マウス肺におけるこれらの炎症性メディエーターの過剰産生が肺炎重篤化の一因であるとの仮説を立案し、NOX2-KO マウスにおける TNF- α と KC の過剰産生の産生源とそのメカニズムを探った。その結果、TNF- α の過剰産生源は好中球であり、KC の過剰産生源はマクロファージであることを突き止め、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を明らかにした。さらに、好中球における TNF- α 遺伝子の過剰発現にも、マクロファージにおける KC 遺伝子の過剰発現にも、STAT 転写因子が機能していることを示唆する知見が新たに得られた。

(2) NOX2-KO マウスの獲得免疫異常の解析：野生型および NOX2-KO マウスにザイモザンを尾静脈投与しても、(1)と同様の重篤な肺炎が NOX2-KO マウスに観察された。さらに興味深いことに、NOX2-KO マウスでは肺炎の重篤化だけに留まらず、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、NOX2-KO 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。さらに、骨髄中の好中球数とリンパ球数の比率が好中球側に大きく傾くという非常に興味深い病態を発症することを発見した。これらの結果は、自然免疫の異常が獲得免疫の異常を誘発している可能性を強く示唆する重要な成果であるから、英文原著論文として速やかに成果発表した。

(3) MPO-KO 好中球におけるサイトカイン過剰産生機構の解析：骨髄から単離した好中球に、パターン認識受容体に対する遮断薬の存在下あるいは非存在下でザイモザンを添加し、培養後の炎症性サイトカインの遺伝子発現量と分泌量を、主に MIP-2 好中球ケモカインに注目して測定した。その結果、ザイモザンの受容体とされる TLR2、TLR4、dect in-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、NF- κ B と STAT3 の転写因子を阻害することによっても、遺伝子発現量が顕著に低下した。さらに、ザイモザン刺激による好中球からの MIP-2 産生はザイモザンの貪食依存的であることも明らかとなった。

(4) 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4件（うち査読付論文 4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 Sugimoto Yu, Endo Daiki, Aratani Yasuaki	4. 巻 44
2. 論文標題 Mice Deficient in NOX2 Display Severe Thymic Atrophy, Lymphopenia, and Reduced Lymphopoiesis in a Zymosan-Induced Model of Systemic Inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 371 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-020-01342-6	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 Tokuhiko Takuto, Ishikawa Akane, Sato Haruka, Takita Shunya, Yoshikawa Ayuri, Anzai Ryoko, Sato Shinichi, Aoyagi Ryohei, Arita Makoto, Shibuya Takumi, Aratani Yasuaki, Shimizu Shigeomi, Tanaka Masato, Yotsumoto Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Oxidized Phospholipids and Neutrophil Elastase Coordinately Play Critical Roles in NET Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 718586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.718586	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 Nunoi Hiroyuki, Xie Peiyu, Nakamura Hideaki, Aratani Yasuaki, Fang Jun, Nishimura Toyoki, Kataoka Hiroaki, Maeda Hiroshi, Matsukura Makoto	4. 巻 45
2. 論文標題 Treatment with Polyethylene Glycol-Conjugated Fungal d-Amino Acid Oxidase Reduces Lung Inflammation in a Mouse Model of Chronic Granulomatous Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 1668 ~ 1679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-022-01650-z	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 Kudo Takashi, Nakazawa Daigo, Watanabe Kusunoki Kanako, Kanda Masatoshi, Shiratori Aso Satoka, Abe Nobuya, Nishio Saori, Koga Jun ichiro, Iwasaki Sari, Tsuji Takahiro, Fukasawa Yuichiro, Yamasaki Miwako, Watanabe Masahiko, Masuda Sakiko, Tomaru Utano, Murakami Masaaki, Aratani Yasuaki, Ishizu Akihiro, Atsumi Tatsuya	4. 巻 75
2. 論文標題 Regulation of NETosis and Inflammation by Cyclophilin D in Myeloperoxidase Positive Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 71 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.42314	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本 遊、荒谷康昭
2. 発表標題 食細胞NADPHオキシダーゼ欠損マウスはザイモザンの全身投与によってリンパ球減少症を発症する。
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横浜市立大学理学部免疫生物学研究室 http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~lifeenv/index.php?id=8
--

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------