

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07543

研究課題名（和文）酸化ストレスが生体内のNK細胞に与える影響の解明

研究課題名（英文）The effects of oxidative stress on NK cells in vivo

研究代表者

大谷 真志（Ohtani, Masashi）

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：20383713

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）：野生型マウスと比べて酸化ストレス状態に陥りやすい xCT 欠損 (xCT KO) マウスでは、敗血症時に NK 細胞の IFN- γ 産生能が低下する。この IFN- γ 産生能の低下は、遺伝的な NK 細胞の機能不全や IFN- γ 産生を誘導するタンパク質の発現の違いによるものではなく、敗血症時に体内の酸化ストレス状態が野生型マウスよりも亢進することが原因で生じた可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に酸化ストレスは、炎症性疾患の増悪・慢性化やがんの発症につながると考えられている。しかし、本研究結果は、酸化ストレスが NK 細胞の働きを抑制することで敗血症のような全身性炎症反応が過剰に起こらないよう働いている可能性を示すものであり、炎症性疾患の治療において酸化ストレスを抑制することが悪化に繋がる可能性があることを提起するものである。

研究成果の概要（英文）：In xCT-deficient (xCT KO) mice, which are more prone to oxidative stress conditions than wild-type mice, the ability of NK cells to produce IFN- γ is reduced during sepsis. This decreased IFN- γ production is not due to genetic dysfunction of NK cells or differential expression of proteins that induce IFN- γ production, but may be caused by an increase in the oxidative stress state in the body during sepsis compared to wild-type mice.

研究分野：免疫学

キーワード：酸化ストレス NK細胞 敗血症

1. 研究開始当初の背景

生体では、呼吸の過程で恒常的に生じるスーパーオキシドや、感染時にマクロファージが病原体除去のために産生する一酸化窒素といった活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が生じる。通常 ROS は抗酸化酵素や抗酸化物質による抗酸化機構により除去されるが、それを上回る ROS が産生され蓄積すると酸化ストレスに陥る。酸化ストレスは、感染・炎症疾患の増悪・慢性化やがんの発症につながると考えられている。

シスチン/グルタミン酸トランスポーターは、xCT と他のアミノ酸トランスポーターに共通の 4F2hc からなる膜タンパク質で、細胞内の抗酸化物質 GSH の供給に関わる。xCT 欠損 (xCT KO) マウスは、野生型 (WT) と比べて体内環境が酸化方向に傾いており、パラコート投与により誘導した酸化ストレスに伴う肺損傷が悪化することや (Sato H et al., *Free Radic Biol Med*, 53:2197, 2012)、我々のこれまでの解析から、刺激性接触皮膚炎やアレルギー性皮膚炎が増悪することが知られている (未発表データ)。一方で、細菌由来の毒素 (リポ多糖: LPS) の投与により誘導される敗血症モデル実験においては、WT と比べ xCT KO マウスでは顕著な症状の軽減がみられ、WT マウスが全て死に至る 80 時間後も 9 割のマウスが生存した。敗血症は感染症に起因する全身性炎症反応で、重症化すると臓器不全により死に至る病気である。これらの症状は、サイトカインの大量産生に起因するもので、マウスを用いた解析から、特に NK 細胞が産生するインターフェロン (IFN)- γ が炎症誘導に重要であることが分かっている (Chiche L et al., *J Biomed Biotechnol*, 986491, 2011)。xCT KO マウスを用いた予備的解析の結果、WT と比べて xCT KO マウスでは、血清中の IFN- γ の量が少ないこと、敗血症に伴う脾臓 NK 細胞の IFN- γ 産生量が低いことが示された。

この結果は、酸化ストレスが亢進したマウスでは、NK 細胞の機能が抑制されることを示しており、一般的に生体にとって悪いとされている酸化ストレスが、敗血症のような死に至る激しい炎症反応においては、NK 細胞の機能抑制を介して過剰な炎症を防止し、生体を守る役割を持つことを示唆している。In vitro において、ROS が NK 細胞の機能を抑制するという報告はあるものの、その分子機構や生理的意義については明らかではない。

2. 研究の目的

酸化ストレス状態に傾いた xCT KO マウスが敗血症に対して抵抗性を示す理由として、NK 細胞における IFN- γ 産生量の減少が考えられた。そこで、本研究では、NK 細胞における IFN- γ 産生能が低下する分子機構を明らかにすることを目的とし、in vivo および in vitro の解析から、xCT KO マウスにおける IFN- γ 産生能低下が、環境依存的か NK 細胞依存的に生じているかを調べた。

3. 研究の方法

WT マウスおよび xCT KO マウス (新潟大学・佐藤英世博士より供与) は C57BL/6 系統を使用した。

マウス敗血症モデルは 50 mg/kg の LPS を腹腔内投与することで誘導した。LPS 投与後、経時的に脾臓や血液を採集し、in vivo における NK 細胞の動態やサイトカイン・ケモカインの発現、酸化ストレス状態を調べた。NK 細胞における IFN- γ 産生量や NK 細胞の分化段階は、フローサイトメトリー法により解析した。サイトカイン・ケモカインの遺伝子発現は real-time PCR を、タンパク質発現は ELISA やマルチプレックスアッセイにより解析した。酸化ストレス状態はサンプル中に含まれる還元型グルタチオン (GSH) の量から評価した。

In vitro における NK 細胞の機能解析は、脾臓細胞を単離した後、磁気ビーズもしくはセルソーターを用いて単離した NK 細胞を使用した。細胞の生存率は MTT アッセイ法やフローサイトメトリー法による死細胞の検出により解析し、IFN- γ タンパク質の産生量は ELISA もしくはフローサイトメトリー法により評価し、遺伝子発現解析は real-time PCR で行った。細胞内の ROS の量は蛍光検出試薬 (DCFH-DA) を用いて、フローサイトメトリー法により解析した。

4. 研究成果

LPS 投与後、4、12 時間後の脾臓における IFN- γ 産生細胞を解析したところ、いずれの時間においても大部分は NK 細胞で一部はマクロファージだった。また、マウスにアシアロ GM-1 抗体を投与して NK 細胞を枯渇させた場合、LPS 誘導敗血症に伴うショック死が軽減したことから、マウス敗血症モデルにおける NK 細胞由来の IFN- γ が、敗血症性ショックの誘導において重要な役割を担うことを確認した。

NK 細胞による IFN- γ の発現量はインターロイキン (IL)-12 や IL-18 によって増強されるため、WT と xCT KO マウスから脾臓 NK 細胞を単離し、濃度の異なる IL-12 と IL-18 を添加して IFN- γ 発現量の増加を解析した。その結果、WT と xCT KO マウスの両方で IFN- γ 発現量に違いは認められなかった (図 1)。一方、LPS 添加によっては WT、xCT KO 共に NK 細胞からの IFN- γ 産生はほとんど誘導されなかった。

次に、WT と xCTKO マウス由来の NK 細胞における、刺激に対する生存への影響を解析した。LPS や ROS の一種である過酸化水素で刺激した場合のいずれにおいても、生存率およびアポトーシスの割合は、WT と xCTKO で違いはみられなかった。また、LPS 刺激に伴う細胞内 ROS 産生量も両者で違いはみられなかった。

WT マウスに LPS を投与して 0、3、6 時間後に脾臓から NK 細胞を単離し、遺伝子発現を解析した。IFN- γ の発現は 0 時間において見られなかったが、3、6 時間後では時間依存的に発現の増加が認められた。一方、xCT の発現はいずれの時間においても見られなかった (図 2)。

以上より、定常状態および敗血症を起こしたマウスの脾臓における NK 細胞は、xCT を発現していないためシスチン/グルタミン酸トランスポーターによる抗酸化機構が働いていないことが示唆された。また、外部刺激に対する NK 細胞の IFN- γ 産生や生存への影響は、WT と xCTKO マウスで違いは認められなかったため、xCTKO マウスにおける NK 細胞の IFN- γ 産生能の低下は、NK 細胞自身の機能不全や外部刺激に伴う細胞死の亢進によって起こったのではなく、体内環境の違いが原因で生じた可能性が考えられた。

NK 細胞の IFN- γ 産生の誘導に関わる IL-12 および IL-18 の発現解析を行った。その結果、LPS 投与 4 時間後までは、脾臓中の mRNA 発現量や血液中タンパク質の量は、WT と xCTKO マウスで有意な差は見られず、IFN- γ についても同様だった。一方、LPS 投与 8 時間以降では、xCT KO マウスは脾臓中の NK 細胞由来 IFN- γ タンパク質、血液中の IFN- γ タンパク質の発現低下が認められたが、血液中の IL-12 と IL-18 タンパク質の量は WT マウスと同程度だった。したがって、xCTKO マウスで観察される LPS 投与に伴う NK 細胞の IFN- γ 産生能の低下は、LPS 投与 4 時間後から IL-12 と IL-18 の発現量とは無関係に生じた可能性が示唆された。

NK 細胞は ROS によってサイトカイン産生等の機能が抑制されることが知られているため (Asea A et al., *Clin Exp Immunol*, 105:376, 1996)、WT と比べて xCT KO マウスの体内では ROS の増加および酸化ストレスの亢進により、NK 細胞の機能低下が引き起こされていると予想した。そこで、LPS 投与後の WT と xCTKO マウスの脾臓における酸化ストレス状態を、抗酸化物質である GSH 量を指標にして経時的に解析した。その結果、LPS 投与後 12、18 時間では時間依存的に GSH 量の低下が見られ、12 時間における GSH 量は xCTKO マウスで有意に低かった (図 3)。したがって、LPS 投与により酸化ストレス状態が誘導され、12 時間後時点では xCT KO マウスの方が酸化ストレスが亢進していることが示唆された。今後は、12 時間以前の時間における解析を行ったり、NK 細胞における ROS の量や、炎症時の ROS 産生細胞として知られるマクロファージや好中球における ROS の量を、フローサイトメトリー法や組織学的手法により測定することで、WT と xCT KO マウスにおける酸化ストレス状態の比較が必要である。

以上の結果から、xCTKO マウスにおける NK 細胞の IFN- γ 産生能の低下は、NK 細胞自身の機能不全や外部刺激に伴う細胞死の亢進によるものではなく、体内の酸化ストレス状態の亢進が原因で生じた可能性が示唆された。本研究成果は、酸化ストレス状態が NK 細胞の働きを抑制することで敗血症のような全身性炎症反応が過剰に起こらないよう働いている可能性を示す一方で、NK 細胞が産生する IFN- γ はウイルス感染やがんにおける免疫反応の活性化に重要であるため、酸化ストレスがこれらの反応を減弱させる可能性を提起するものである。

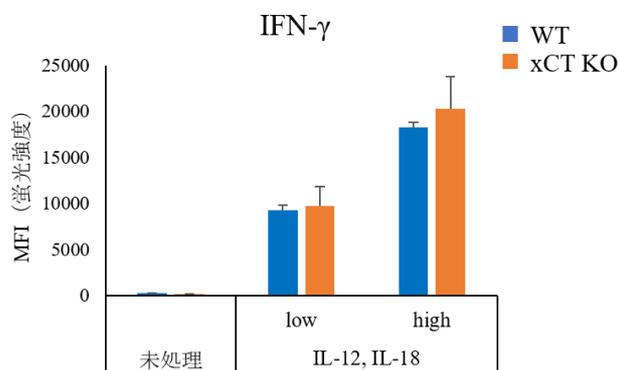


図 1 : WT および xCT KO マウスの脾臓 NK 細胞における、低濃度 (low) もしくは高濃度 (high) の IL-12 + IL-18 刺激に伴う IFN- γ 産生量 (n=3)

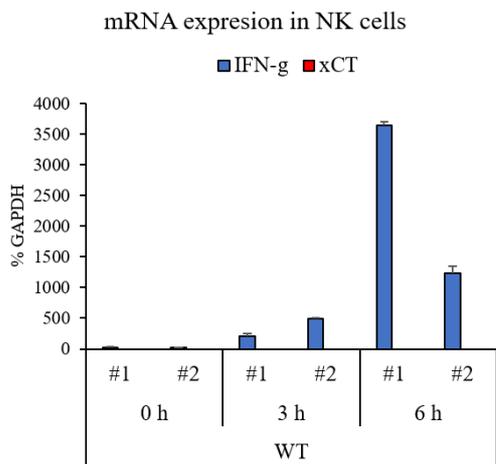


図2 : WT マウスに LPS を投与して 0、3、6 時間後の脾臓 NK 細胞における、IFN- γ および xCT 遺伝子の発現量 (n=2)

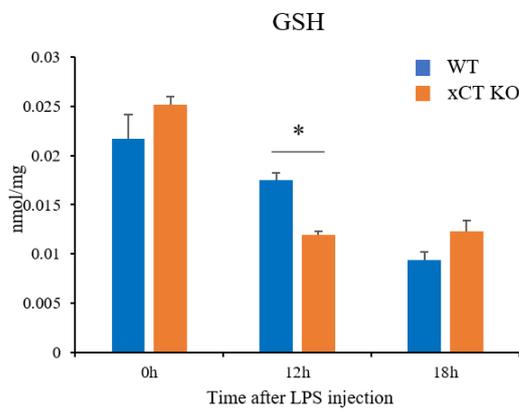


図3 : WT および xCT KO マウスに LPS を投与して 0、12、18 時間後の脾臓における GSH 量 Unpaired-t test *P<0.01 (n=3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ohtani, M., Watanabe, N.
2. 発表標題 Involvement of NK cells in sepsis resistance in cystine/glutamate transporter-deficient mice.
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本剛尚、友部光、小林一哉、佐藤英世、渡邊直子、大谷真志
2. 発表標題 シスチントランスポーターの欠損はマウスの慢性皮膚炎を悪化させる
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東邦大学 理学部生物分子科学科 大谷研究室 http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/biomol/ohtani/index.html
--

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