

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16361

研究課題名（和文）顆粒球の死を誘導する免疫ガイダンス分子の機能解明と免疫難病への治療応用

研究課題名（英文）Pathological roles of immune guidance molecules that induce granulocytic cell death

研究代表者

西出 真之（Nishide, Masayuki）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80812255

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）：本研究を通じて、免疫ガイダンス分子群が細胞外トラップ形成に様々な影響を与えることを見出し、好中球・好酸球が関連する疾患への寄与を見いだした。インテグリン分子を介した接着が血管炎における細胞外トラップ形成（Immunohorizons 2022）に寄与すること、ミトコンドリアDNAがベーチェット病における好中球の活性化に寄与すること（EMBO J 2023）を報告した。また、血管炎患者の末梢血単核球をシングルセル解析に与する事で、免疫学的プロファイルに基づいた予後予測を筆頭著者として提案した（Nat Commun 2023）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において厚生労働省指定難病に該当する顕微鏡的多発血管炎やベーチェット病について好中球活性化のメカニズムの一端を明らかにし、新たな治療戦略につながることを期待される。また、シングルセル解析を介して、好中球のみならず単球の遺伝子発現プロファイルに基づいた層別化に成功し、疾患予後予測へつながる成果を見いだした。

研究成果の概要（英文）：A group of immune guidance molecules have distinct effects on extracellular trap formation and contribute to neutrophil- and eosinophil-associated diseases. We reported that integrin-mediated adhesion contributes to extracellular trap formation in vasculitis (Immunohorizons 2022) and that mitochondrial DNA contributes to neutrophil activation in Behcet's disease (EMBO J 2023). We also proposed a prognostic prediction based on immunological profiles of peripheral blood mononuclear cells from patients with vasculitis by subjecting them to single-cell analysis (Nat Commun 2023).

研究分野：リウマチ・膠原病内科学

キーワード：好中球 好酸球 細胞外トラップ シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

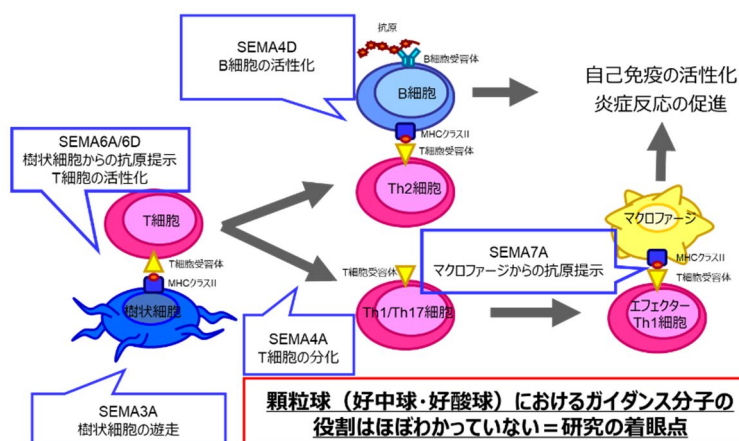
申請者が所属するグループはこれまで、神経の成長の方向を決めるガイダンス分子である「セマフォリン」に関連するタンパク質が、免疫機能の活性化や制御にも必須の役割を果たす「免疫ガイダンス分子群」の概念を明らかにしてきた (*Nature* 2002, 2007, 2010, 2012, *Nat Immunol.* 2008, 2010, 2018)。しかし、その多くはリンパ球が主役の獲得免疫に関する報告であり、自然免疫における機能はほとんど不明

である (右図)。

血管炎のような免疫難病や、一部のアレルギー疾患の病態では、顆粒球が細胞外に自らの核 DNA を放出する細胞外トラップを伴う細胞死を過剰に引き起こし、病態の中心的存在となる。しかし、顆粒球の過剰な細胞死が免疫疾患の成り立ちの過程でどのように誘導され、病態を引き起こすのかは、十分に理解されていない。申請者は、これまで詳細

な病態が解明されていない免疫、アレルギー疾患における顆粒球の異常な活性化に免疫ガイダンス分子群が重要な役割を果たしており、それを制御することが免疫難病の治療に繋がるのではないかとという「問い」を持って、本研究を立案した。

免疫系におけるガイダンス分子の役割



2. 研究の目的

本研究の目的を、顆粒球の過剰な活性化と細胞死に至るメカニズムを免疫ガイダンス因子群の観点から明らかにし、免疫難病の治療に繋げることと定めた。免疫細胞の活性化にブレーキをかけるタンパク質は「免疫チェックポイント分子」と呼ばれるが(例:Tリンパ球におけるPD-1分子)申請者は以前の研究で、ガイダンス分子の代表格であるセマフォリンが好中球の不適切な活性化を阻止する「免疫チェックポイント分子」として振る舞い、免疫難病の血管炎の発病に関与していることを見出した。すなわち、これまで短命かつ大雑把な機能しか持ち合わせていないと考えられていた顆粒球の活性化が、実はガイダンス分子によって精密に制御されているという独自の着眼点である。この成果を発展させ、顆粒球活性化の「ブレーキ」と「アクセル」のバランスが、生体内で免疫ガイダンス分子によって絶妙のバランスで制御されているという発想に至った。これを明らかにすることで、本研究は顆粒球の過剰な活性化を制御するという新しい切り口で免疫難病の病態理解、治療の基盤を築くという学術的な創造性を持つ。

3. 研究の方法

(1) 免疫ガイダンス分子群が顆粒球の細胞死を誘導するシグナルメカニズムの解明

大阪大学研究倫理委員会で承認された研究計画に基づき、健常人ボランティアより磁気ビーズを用いた細胞分離法で好中球、好酸球を単離し、以下の実験を行う。単離した好中球、好酸球をそれぞれ刺激(好中球に対しては患者検体やミエロペルオキシダーゼ(MPO)免疫マウスより

調製した抗好中球抗体（ANCA）好酸球に対しては IL-3.5 および Platelet Activating Factor（PAF）し、適切な時間培養した後に、生細胞に非透過性の色素である SYTOX® GREEN（Thermo Fisher Scientific, Inc., USA）を用いて核酸染色を行い、蛍光顕微鏡で観察、陽性細胞を細胞外トラップ形成死細胞としてカウントする。上述の計測方法を確立した後、免疫ガイダンス分子を用いた実験に移る。セマフォリン分子、インテグリン分子を通常のマルチウェルプレートまたは非接着性ハイドロゲルプレートのいずれかに加え、4 overnight でコーティングする。そこに好中球、好酸球を加え上述の刺激を与えることで、細胞外トラップ形成の割合変化、すなわち、ガイダンス分子群が細胞外トラップ形成の割合に影響を与えるかどうか（促進、抑制にかかわらず）を数値化し検討する。

細胞外トラップ形成に差がみられた分子について、その受容体（例えば SEMA3A であれば PlexinA1/A4/Nrp-1、SEMA7A であれば Integrin 1/Plexin-C1 など、受容体のプロファイルは既知である）に対する阻害薬を用いて、細胞外トラップ形成の阻害実験を行う。これにより、顆粒球の細胞死に影響を与えるガイダンス分子とその受容体を同定し、その下流シグナルの解析に移る。細胞外トラップ形成に必要とされる ERK、p38MAPK 経路、およびフォーカルアドヒージョンキナーゼ（FAK）経路を中心に、細胞内の各分子のリン酸化の状態をフローサイトメトリーまたはウェスタンブロット法で解析する。また、これらの Pathway の阻害剤を用いて同様の解析を行うことで、シグナルメカニズムの全容を解明する。

(2) 新規の血管炎モデルマウスの樹立と、ガイダンス因子を標的とした抗体治療

好中球性炎症モデルについては、新規のモデルマウスを立ち上げる予定である。手法としては、リコンビナント MPO タンパクをアジュバントと混合・乳化し、MPO 欠損マウスに投与する。Day45 に安楽死、採血、脾臓採材を行う。採取した脾臓から B 細胞を単離し、IgG 分画を精製する。この ANCA-IgG を野生型マウスに移入することにより、糸球体腎炎を含む ANCA 関連血管炎を発症させる。モデルマウスおよび病態評価基準を樹立後、計画 で得られた結果をもとに、各種ガイダンス分子の中和抗体や、接着因子の阻害剤を候補としてマウスを用いた前臨床試験（抗体投与実験）を行う。

(3) 患者検体におけるガイダンス分子群の発現と臨床マーカーとの相関解析

当研究室では大阪大学研究倫理委員会で承認された研究計画に基づき、実臨床における自己免疫疾患の患者検体を継続的に蓄積している。取得された患者血清中のセマフォリン濃度を ELISA 法で測定し、各検体に紐づいた臨床データとの相関について多変量解析で検討する。計画 で選定した免疫ガイダンス因子が顆粒球の細胞死に与える影響が、実際の患者検体でどのような発現プロファイルとなっているかを解析することで、治療標的としての信頼性を確固たるものにする狙いがある。

4. 研究成果

(1) 免疫ガイダンス分子群が顆粒球の細胞死を誘導するシグナルメカニズムの解明

健常人ボランティアより磁気ビーズを用いた細胞分離法で好中球、好酸球を単離し、抗 MPO 抗体（MPO-ANCA）好酸球に対しては IL-3.5 および Platelet Activating Factor（PAF）の刺激を加え、生細胞に非透過性の色素を用いて細胞外トラップ形成死細胞を検出した。種々のセマフォリン分子、インテグリン分子の存在下で細胞外トラップ形成の割合変化を算出することで特定の分子群が細胞外トラップ形成の割合に影響を与えることを見出した。セマフォリン分子と

細胞外トラップ形成の関連については論文作成中である。インテグリン分子を介した接着により MPO-ANCA による細胞外トラップ形成に寄与することについては共同筆頭著者として論文報告を行った (Immunohorizons 2022)。ミトコンドリア DNA、ガレクチン 10 といったファクターが細胞外トラップ形成に寄与することについては共著者として論文報告を行った (J Allergy Clin Immunol 2024) (EMBO J 2023)。また、ラマン顕微鏡を用いた細胞外トラップの可視化について、共著者として論文報告を行った (Sci Rep 2023)。

(2) 新規の血管炎モデルマウスの樹立と、ガイダンス因子を標的とした抗体治療

MPO に対するモノクローナル抗体を用いた MPO-ANCA 関連血管炎モデルマウスの作成に再現性をもって成功した。現在論文作成中である。

(3) 患者検体におけるガイダンス分子群の発現と臨床マーカーとの相関解析

血管炎患者の末梢血単核球をシングルセル解析に与する事で、免疫学的プロファイルに基づいた ANCA 関連血管炎の新たな疾患概念と個々の患者さんの予後予測を提案した (Nat Commun 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Lelliott Patrick M., Nishide Masayuki, Pavillon Nicolas, Okita Yasutaka, Shibahara Takayuki, Mizuno Yumiko, Yoshimura Hanako, Obata Sho, Kumanogoh Atsushi, Smith Nicholas I.	4. 巻 6
2. 論文標題 Cellular Adhesion Is a Controlling Factor in Neutrophil Extracellular Trap Formation Induced by Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 170 ~ 183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/immunohorizons.2200012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishide Masayuki, Yagita Mayu, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 Volume 16
2. 論文標題 Continuous Use of Etanercept During Pregnancy Does Not Affect TNF-Alpha Levels in Umbilical Cord Blood	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biologics: Targets and Therapy	6. 最初と最後の頁 17 ~ 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/BTT.S358449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Naito Maiko, Nakanishi Yoshimitsu, Motomura Yasutaka, Takamatsu Hyota, Koyama Shohei, Nishide Masayuki, Naito Yujiro, Izumi Mayuko, Mizuno Yumiko, Yamaguchi Yuta, Nojima Satoshi, Okuzaki Daisuke, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 5
2. 論文標題 Semaphorin 6D-expressing mesenchymal cells regulate IL-10 production by ILC2s in the lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202201486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202201486	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Naito Yujiro, Koyama Shohei, Masuhiro Kentaro, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Tumor-derived semaphorin 4A improves PD-1 blocking antibody efficacy by enhancing CD8 T cell cytotoxicity and proliferation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.ade0718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Lelliott Patrick Michael, Hobro Alison Jane, Pavillon Nicolas, Nishide Masayuki, Okita Yasutaka, Mizuno Yumiko, Obata Sho, Nameki Shinichiro, Yoshimura Hanako, Kumanogoh Atsushi, Smith Nicholas Isaac	4. 巻 13
2. 論文標題 Single-cell Raman microscopy with machine learning highlights distinct biochemical features of neutrophil extracellular traps and necrosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-36667-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishide Masayuki, Nishimura Kei, Matsushita Hiroaki, Eda Hiro Ryuya, Inukai Sachi, Shimagami Hiroshi, Kawada Shoji, Kato Yasuhiro, Kawasaki Takahiro, Tsujimoto Kohei, Kamon Hokuto, Omiya Ryusuke, Okada Yukinori, Hattori Kunihiro, Narazaki Masashi, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Single-cell multi-omics analysis identifies two distinct phenotypes of newly-onset microscopic polyangiitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-41328-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Konaka Hachiro, Kato Yasuhiro, Hirano Toru, et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 Secretion of mitochondrial DNA via exosomes promotes inflammation in Behcet's syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022112573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirai Takashi, Naito Yujiro, Koyama Shohei, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Sema6D forward signaling impairs T cell activation and proliferation in head and neck cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.166349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimura Hanako, Takeda Yoshito, Shirai Yuya, et al.	4. 巻 153
2. 論文標題 Galectin-10 in serum extracellular vesicles reflects asthma pathophysiology	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1268 ~ 1281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2023.12.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西出 真之
2. 発表標題 Semaphorin 7A plays a critical role in the growth of allergic nasal polyps by inducing eosinophil extracellular traps
3. 学会等名 日本リウマチ学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西出 真之
2. 発表標題 臨床医に知っておいてもらいたい基礎研究の楽しみ方
3. 学会等名 日本リウマチ学会近畿支部地方会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masayuki Nishide, Yumiko Mizuno, Atsushi Kumanogoh
2. 発表標題 Combination of monoclonal anti-MPO antibodies forms complexes to induce small-vessel vasculitis
3. 学会等名 第67回 日本リウマチ学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西出 真之、榎崎 雅司、熊ノ郷 淳
2. 発表標題 患者末梢血シングルセル解析によるANCA関連血管炎の層別化と実臨床への応用
3. 学会等名 第44回 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西出 真之、熊ノ郷 淳
2. 発表標題 患者検体シングルセル解析を基盤とした顕微鏡的多発血管炎に特徴的な細胞集団の同定
3. 学会等名 第51回 日本臨床免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masayuki Nishide, Atsushi Kumanogoh
2. 発表標題 Single-cell multi-omics analysis identifies two distinct phenotypes of newly-onset microscopic polyangiitis
3. 学会等名 第25回 アジア太平洋リウマチ学会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masayuki Nishide, Masashi Narazaki, Atsushi Kumanogoh
2. 発表標題 Single-cell multi-omics analysis identifies two distinct phenotypes of newly-onset ANCA associated vasculitis
3. 学会等名 第52回 日本免疫学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西出 真之、水野 裕美子、熊ノ郷 淳
2. 発表標題 抗MPO抗体を活用した新たなANCA関連血管炎マウスモデルの樹立と治療への応用
3. 学会等名 第5回血管炎病因病態研究会（招待講演）
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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