

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2012～2015
課題番号：24590277
研究課題名(和文) 貪食細胞機能における膜電位シグナルの役割の解明

研究課題名(英文) Role of membrane potential in phagocytes

研究代表者

大河内 善史 (Okochi, Yoshifumi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90435818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：電依存性プロトンチャネルは、貪食細胞において、pH、膜電位を制御する分子である。我々は、プロトンチャネルの役割を明らかにするために、生体防御において重要な細胞である好中球に着目して、研究を行った。その結果、プロトンチャネルが、強力な酸化剤である次亜塩素酸を作るミエロパーオキシダーゼやエラスターゼなどの分解酵素を含むアズール顆粒と呼ばれる小胞の分泌を負に制御していることを明らかにした。また、プロトンチャネルが欠失したマウスは野生型よりも真菌感染によって炎症が強く誘発されることが分かった。すなわち、プロトンチャネルは好中球の脱顆粒を抑制することで、炎症を抑制すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Voltage-gated proton channel regulates intracellular pH and membrane potential in phagocytes. We investigated the function of proton channel in neutrophils that are important immune cell in host defense. We found that proton channel negatively regulates the release of azurophil granules in neutrophils, which contain myeloperoxidase producing hypochlorous acid and degradative enzymes. We also found that proton channel deficient mice exhibit severer inflammation in lung than wild type mice upon fungal infection. These results suggest that proton channel suppresses inflammation through the inhibition of the granule release in neutrophils.

研究分野：細胞生理

キーワード：プロトンチャネル 炎症 好中球 脱顆粒

1. 研究開始当初の背景

電位依存性プロトンチャネル Hv1/VSOP は、貪食細胞において、活性酸素を作る酵素 NADPH オキシダーゼの活性を制御すると推定されていた。我々は、このチャネルのノックアウトマウスを作成し、好中球における活性酸素の産生能を制御するプロトンチャネルの機能を実証してきた (Okochi et al., BBRC 2009, Chemaly et al., JEM 2010)。

プロトンチャネルが欠損すると、活性酸素の低下が引き起こされることは分かったが、好中球が作り出す活性酸素は1種類ではなく、いろいろな活性酸素種が作られる。NADPH オキシダーゼが作る活性酸素はスーパーオキシドアニオンであり、その後の反応は、不均化反応により過酸化水素ができ、その後、ミエロパーオキシダーゼ (MPO) の働きにより、過酸化水素から次亜塩素酸が作られる。プロトンチャネルが欠損すると、スーパーオキシドアニオンと過酸化水素量が低下することは分かったが、その後の反応にも影響が出るかどうかは不明だった。そこで、次亜塩素酸の量を測定したところ、予想に反して、プロトンチャネル欠損好中球では、野生型よりも次亜塩素酸の産生量が増えていることが分かった (図1) (Okochi et al., JLB 2016)。この原因を解明することにより、プロトンチャネルの新たな機能を明らかにできるのではないかと考え、実験を行った。

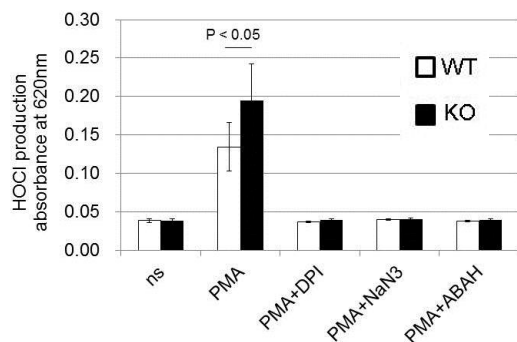


図1: 次亜塩素酸量の測定. PMA は、活性酸素の産生を誘導する薬剤. DPI は NADPH オキシダーゼ阻害剤、NaN3 および ABAH は MPO 阻害剤. Mean+/-SD. t 検定。

2. 研究の目的

本研究では、プロトンチャネルが欠損した好中球において次亜塩素酸の産生量が増える理由を調べることで、プロトンチャネルの新たな機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

プロトンチャネルが欠損したマウスの好中球を骨髄から分離し、各種実験を行った。次亜塩素酸の測定は、タウリンを用いて測定し、MPO の活性は、O-dianisidine hydrochloride を用いて測定した。MPO の量は、ELISA 法により測定した。エラスターゼ活性は、蛍光物質とエラスチンが結合したプ

ローブを用いて測定した。細胞内顆粒の数は DAB を用いて顆粒を染色した後、電子顕微鏡を用いて数えた。カンジダ真菌を用いた感染実験は、 4×10^6 個のカンジダを副鼻腔から投与し、5 日間の生存率を調べた。5 日後、肺を取り出し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した。

4. 研究成果

次亜塩素酸の産生量が、Hv1/VSOP 欠損好中球において増加している理由には、細胞外に分泌される MPO の量が増加している可能性が考えられた。そこで、活性酸素の産生を刺激する薬剤 PMA で好中球を 30 分間処理し、細胞外液を回収した後、ELISA 法により MPO の量を野生型と Hv1/VSOP 欠損好中球間で比較した。その結果、Hv1/VSOP 欠損好中球において、MPO の量が有意に増加していることが分かった (図 2) (Okochi et al.,

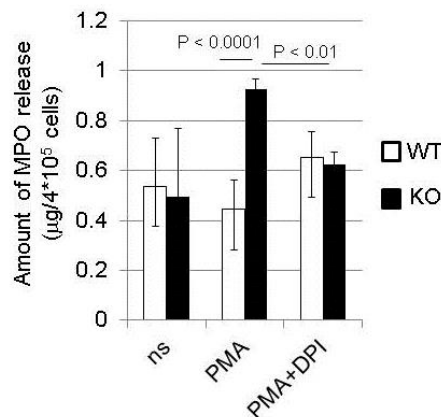


図2: MPO の量の測定. Mean+/-SD. Tukey-Kramer 検定。

JLB 2016)。MPO の分泌は、オキシダーゼの活性を阻害する DPI によって阻害された。すなわち、MPO の過剰な分泌は、オキシダーゼ活性によって誘発されていた。次に、MPO と同じ顆粒に存在する別の酵素エラスターゼについても、細胞外に過剰に分泌されているかどうか調べた。その結果、エラスターゼ活性も Hv1/VSOP 欠損好中球において有意に増加していた (図 3) (Okochi et al., JLB

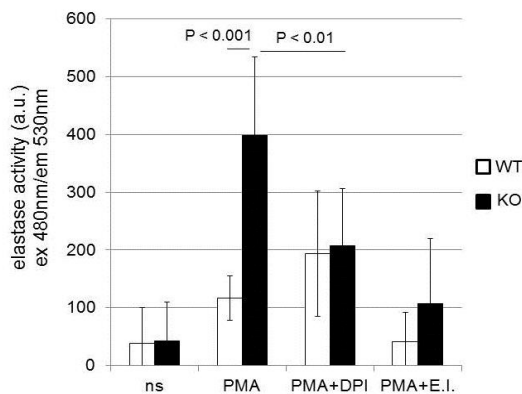


図3: エラスターゼ活性の測定. E.I.:エラスターゼ阻害剤. Mean+/-SD. Tukey-Kramer 検定。

2016)。すなわち、MPO、エラスターゼを蓄えるアズール顆粒と呼ばれる顆粒の脱顆粒

が促進していると考えられた。そこで、PMA 刺激後の細胞内に残っているアズール顆粒の数を測定した。MPO 活性を利用してアズール顆粒において DAB 色素を沈着させた後、電子顕微鏡を用いて顆粒の数を数えた結果、Hv1/VSOP 欠損好中球において、アズール顆粒の数が有意に低下していることが分かった (図 4) (Okochi et al., JLB 2016)。すなわ

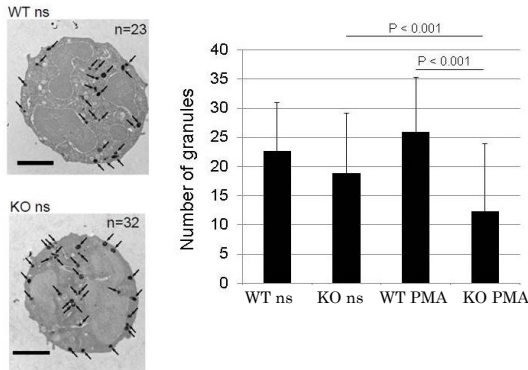


図 4: アズール顆粒の数の測定. 左図: 代表的な電子顕微鏡写真. 矢印は、DAB 陽性のアズール顆粒を示す。写真右上に、顆粒の数を示している。Mean±/SD. Tukey-Kramer 検定。

ち、Hv1/VSOP 欠損好中球では、PMA 刺激依存的に、つまり、オキシダーゼ活性依存的に、アズール顆粒の脱顆粒が促進しており、その結果として、次亜塩素酸の量が増えるという結論に達した。

生体内において同様な現象が見られるかどうか調べるために、好中球を刺激する IgG 抗体を用いて同様の実験を行った。その結果、IgG 刺激でも脱顆粒の亢進が確認された (図 5) (Okochi et al., JLB 2016)。プロトンチャ

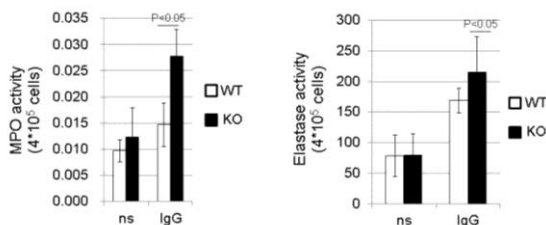


図 5: IgG 刺激後における MPO 活性とエラスターゼ活性の測定。Mean±/SD. t 検定。

ネルによる脱顆粒を制御する機構を調べるために、カリウムイオンフォアであるバリノマイシンで好中球を処理した。バリノマイシンは膜電位を抑制する効果を持つ。その結果、Hv1/VSOP 欠損好中球で見られた脱顆粒の亢進が部分的に抑制された (図 6: 次亜塩素酸の量 (上図)、エラスターゼ活性 (下図) が部分的に低下した) (Okochi et al., JLB 2016)。すなわち、Hv1/VSOP による脱顆粒の制御には、膜電位が関与すると考えられる。

個体レベルにおける影響を調べるために、カンジダ真菌を用いた肺感染症を誘導した。Hv1/VSOP 欠損マウスは、野生型と同程度の菌の除去能を示す一方で、炎症が野生型よりも強く現れた (図 7) (Okochi et al., JLB 2016)。この結果は、活性酸素の増加により、

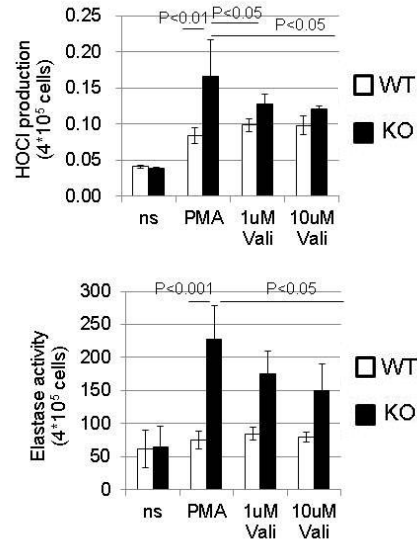


図 6: 脱顆粒の亢進におけるバリノマイシンの効果. Vali:バリノマイシン。PMA で刺激する前にバリノマイシンで 5 分処理した。Mean±/SD. Tukey-Kramer 検定。

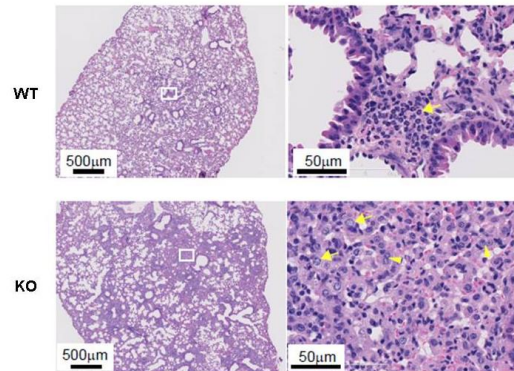


図 7: カンジダ感染肺の HE 染色像. 左図の白枠は、右図の拡大図の場所を示す。黄色矢印は、WT では好中球を、KO では多核・濾胞マクロファージを示す。

正常に菌を除去できたが、アズール顆粒内に存在する各種分解酵素が過剰に分泌されたために、炎症が強く現れたと考えられる。

以上を踏まえ、Hv1/VSOP による脱顆粒の制御機構を図 8 に示した。Hv1/VSOP は、従

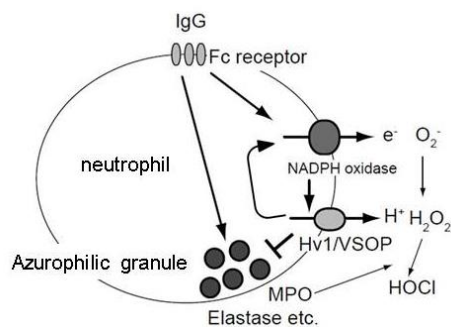


図 8: 脱顆粒を制御する Hv1/VSOP の機能
来言われていた活性酸素の産生を正に制御する機能 (NADPH オキシダーゼの活性をサポートする) に加えて、脱顆粒を抑制して

MPO の量を負に制御することが今回明らかになった。MPO 並びにエラスターゼなどの分解酵素の量を負に制御する機構は、過度な炎症を抑制する機構につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Okochi Y, Aratani Y, Adissu HA, Miyawaki N, Sasaki M, Suzuki K, Okamura Y. (2016) The voltage-gated proton channel Hv1/VSOP inhibits neutrophil granule release. *J. Leukoc. Biol.* 99(1):7-19. 査読有
2. Mutua J, Jinno Y, Sakata S, Okochi Y, Ueno S, Tsutsui H, Kawai T, Iwao Y, Okamura Y. (2014) Functional diversity of voltage-sensing phosphatases (VSPs) in two urodele amphibians. *Physiological Reports* 2 : no. e12061, DOI: 10.14814/phy2.12061 査読有
3. Takeshita K, Sakata S, Yamashita E, Fujiwara Y, Kawanabe A, Kurokawa T, Okochi Y, Matsuda M, Narita H, Okamura Y*, Nakagawa A* (2014) X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. *Nature Structural & Molecular Biology* Published online: 02 March 2014 | doi:10.1038/nsmb.2783, *equal to correspondence 査読有
4. Sasaki M, Tojo A, Okochi Y, Miyawaki N, Kamimura D, Yamaguchi A, Murakami M, Okamura Y. (2012) Autoimmune disorder phenotypes in HVCN1 gene deficient mice. *Biochem. J.*, 450(2):295-301. 査読有
5. Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Kobayashi M, Okochi Y, Nakagawa A & Okamura Y. (2012). The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H⁺ channel Hv1., *Nature Communications*, 3:816. doi: 10.1038/ncomms1823. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. Yoshifumi Okochi and Yasushi Okamura. The role of voltage-gated proton channel Hv1 in neutrophil chemotaxis. 第 93 回日本生理学会大会

2016.3.22 札幌

2. Yoshifumi Okochi, Yasuaki Aratani, Hibret A. Adissu, Nana Miyawaki, Mari Sasaki, Kazuo Suzuki, Yasushi Okamura. Multistep regulation of ROS production by voltage-gated proton channel Hv1/VSOP in neutrophils. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、第 91 回日本生理学会大会 合同大会 2015.3.21 神戸

3. Yoshifumi Okochi and Yasushi Okamura. Analysis of the role of voltage-gated proton channel Hv1/VSOP in neutrophil chemotaxis. 第 91 回日本生理学会大会 2014.3.16 鹿児島

[その他]

研究室のホームページ :

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/phys2/okamura/>

生理学会のホームページ内サイエンストピックに掲載した研究成果内容 :

<http://physiology.jp/science-topic/17882/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大河内善史 (Okochi Yoshifumi)

大阪大学大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 90435818

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

梅本英司 (Umemoto Eiji)

大阪大学大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 90452440

崎村健司 (Sakimura kenji)

新潟大学脳研究所・教授

研究者番号 : 40162325

岡村康司 (Okamura Yasushi)

大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 80201987

筒井秀和 (Tsutsui Hidekazu)

北陸先端科学技術大学院大学・准教授

研究者番号 : 30392038