

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 12 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670472

研究課題名(和文)新規好中球解析手法による病態解明と革新的好中球制御法の開発

研究課題名(英文) Study on pathogenesis of disorders caused by neutrophil dysfunction using novel analytical techniques and development of an innovative strategy to control neutrophils

研究代表者

森尾 友宏 (Morio, Tomohiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30239628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Fc受容体シグナルによりPI3Kが活性化されることが明らかになった。G-CSFで前培養して局所浸潤型好中球模倣モデルを作成し、LPS, SAA-1で刺激すると、前者ではIL-4産生が低下し、後者では亢進した。CPP結合野生型、膜移行シグナル保有、細胞質内滞在型MALを作成し、健常好中球に導入すると、膜移行型ではプライミングに動いた。

敗血症好中球では、day3に比しday0での活性酸素産生能は低かった。重症敗血症では健常人に比してCXCR2の発現が低く、PILRの発現は低下しており、また広範囲に亘りチロシンリン酸化タンパクが検出された。iPS細胞からの好中球分化誘導系については至適化された。

研究成果の概要(英文)：We observed activation of PI3K (class IA, IB) in neutrophils upon signal through Fcγ receptor. Stimulation with LPS or SAA-1 for neutrophils pre-cultured in the presence of G-CSF, which resembled locally infiltrating long-lived neutrophils, resulted in decrease of IL-4 production in LPS stimulation and increased IL-4 production in SAA-1 administration. We generated CPP-MAL, membrane-targeting type of CPP-MAL, and intracellular retention type of CPP-MAL, transduced them into human neutrophils, and found priming effect when transduced with the membrane-targeting type.

Neutrophils from patients with sepsis exhibited lower ROS production at day 3 compared to that at day 0; and neutrophils from severe sepsis showed lower CXCR2 and PILR alpha expression. Several cellular substrates were tyrosine-phosphorylated in the neutrophils. We also optimized the method to differentiate iPS cell into mature neutrophils in this study.

研究分野：小児科学、免疫学

キーワード：好中球 活性酸素産生 プライミング MAL 敗血症 膜透過性タンパク

1. 研究開始当初の背景

好中球は病原体共通認識構造や、オプソニン化病原体などに反応して、プライミングを受け、活性化し、さらに活性酸素(Reactive Oxygen Species: ROS)などの抗微生物因子を放出する。末梢での寿命は<24 時間であり、アポトーシスにより細胞死に至るが、Neutrophil extracellular traps (NETs)を放出してさらに殺菌に関与する。浸潤局所ではまた凝固や血栓形成にも深く関与する一方、炎症性あるいは抑制性サイトカインを分泌し、免疫応答を制御している。多彩な受容体と多種類の顆粒・生理活性物質を発現しているが、受容体シグナル伝達機構や生理活性物質の発現機序の詳細については長く不明なままである。それが故に決定的な好中球制御方法が開発されていない。

好中球研究は、その(1)著しい易被刺激性、(2)短寿命、(3)タンパク発現・改変の困難さ、(4)モデル細胞の欠如から困難であった。私たちは低刺激好中球分離法、好中球への組換えタンパク導入法を実現し、慢性肉芽腫症好中球への p67 導入、BTK 欠損好中球への野生型・変異型 BTK の導入による機能改変に成功した(*Biophys Biochem Res Comm*, 2012, *Nat Immunol*, 2012)。その結果、MAL の膜移行が好中球プライミングの鍵となると予想するに至った。PSTPIP1 異常症(無菌性膿皮症、関節炎など)、NEMO 異常症(外胚葉形成異常、易感染性・敗血症様症状など)などでも好中球のプライミング異常があり、局所での異常な免疫応答が認められる。これらの状態は難治性皮膚疾患、膠原病、敗血症などのモデルとなると考えた。

好中球のシグナル伝達や生理活性物質産生について検証を進めるグループは極めて少ない。オプソニン化病原体による刺激系を模倣する TLR/Fc γ R シグナルについては、好中球における検討がほとんどない。分子異常を基盤にした疾患で、好中球の生化学的検討を行った研究も稀である。敗血症での好中球解析結果も混迷を極めていいる。好中球各分化段階での機能の差異は検証されていない。

2. 研究の目的

好中球の過剰反応は組織障害や血管内皮損傷を惹起し、その低反応は細菌への脆弱性に帰結する。今までの研究から、好中球は刺激に対して最適な反応を起こすため、精密な分

子制御機構を有していることが明らかになった。その破綻は様々な病態に関与している。

研究期間には、好中球活性化において最も重要なオプソニン化刺激シグナル系を明らかにし、また単一シグナル異常を示す疾患の好中球を用いて、プライミングに関わる鍵分子を明らかにする。さらに敗血症における好中球の解析を加え、また iPS 細胞からの誘導系を用いた未熟好中球と成熟好中球の機能的差異の検討から、敗血症における好中球機能異常を浮き彫りにする。最終的にはタンパク導入などの手法により、異常な好中球活性化を制御する革新的方法を開発する。

3. 研究の方法

1) 好中球シグナル伝達経路の解明

TLR シグナル、Fc 受容体シグナルの大半は単球や樹状細胞を用いて行われてきた。ここでは最少刺激にて分離した健常者及び患者好中球を用いて、TLR (TLR1/2, 2/4), Fc γ R (CD16, CD32, CD64)シグナル伝達経路を明らかにする。特に *Src* family tyrosine kinases (SFKs)や *Tec* family kinases, PI3K および MAL(TIRAP)に着目して広範な検討を行う。また未刺激で priming 状態にある患者(PSTPIP1 異常症)好中球や、刺激後 NF- κ B を介した feedback のわからない患者(NEMO 異常症)の好中球を用いて、各ステップで鍵となる分子群を精力的に同定する。シグナル伝達の大半は Western blot により行うが、リン酸化 SFKなどは Luminex 法などにより high throughput にて検証を行う。PI3K については関与するクラス(クラス IA, IB, II α , β , γ)を明らかにし、MAL についてはリン酸化や細胞内局在についての解析も加える。

2) 局所浸潤型好中球からの生理活性物質産生の検討

局所浸潤型好中球を誘導し、至適 priming 刺激を加えた状態での炎症型・抑制性サイトカイン産生を、健常人、NEMO 異常患者、I κ B α 欠損患者、NADPH oxidase 異常患者などからの好中球を用いて比較検討する。生理活性物質は ELISA あるいは Luminex 法を用いて検証する。

3) 膜透過性ペプチドを用いた好中球プライミングや異常反応の制御

好中球のプライミングについては MAL が決定的な役割を果たしているとの仮説を立てている。ここではまず膜移行型 MAL のみでプライミングが惹起されること、細胞質内滞在型 MAL により

プライミングが抑制されることを検証する。さらに1, 2で明らかになった過剰反応に対して、機能喪失型あるいは抑制型 Kinase をタンパク導入することで、異常反応を終焉させられるかどうかを検証する。さらに、患者検体を用いて、過剰な好中球プライミングや異常反応についての制御の可否を検討する。過剰なサイトカイン産生あるいはサイトカイン産生不良についても、CPP組換えタンパク質の効果を検証する。

4) iPS 細胞からの好中球分化誘導と機能解析

iPS 細胞からの分化誘導は基本的には OP9 細胞との共培養系を用い、ここに VEGF などの生理活性物質を添加する。加えて各段階で C/EBP ファミリータンパクなど様々な転写因子をタンパク導入することで、分化段階に特徴的な顆粒の発現を促進する。このようにして得られた数種類の未熟・成熟好中球は、その活性酸素産生能、NETs 形成能、接着因子発現などについて機能解析を行う。幼弱な骨髓球系細胞・成熟好中球でのシグナル伝達に関わる分子発現や、シグナル伝達系にも焦点を当てて検討を行う。またその中でも特に幼弱な好中球の悪影響に注目する。

5) 敗血症における好中球機能・シグナル異常とその是正に関する検討

敗血症においていったい好中球がどのような状態にあるのかは、まだ混沌としている。プライミング状態にあるが、局所への遊走能が低下している、あるいは過剰に接着因子を表出し血管内皮と会合して傷害するなどの報告がある。ここではプライミング状態にあるかどうかを検証すると共に、シグナル伝達分子を解析することにより、特に MAL の細胞内局在を検討することにより、どの分子が異常な状態になっているのかを明らかにする。問題となる部分が明らかになれば、それを是正する CPP-組換えタンパク質を作成して、その効果を検証する。

4. 研究成果

1) 好中球シグナル伝達経路の解明

最小刺激にて分離した健常者及び患者好中球を用いて、FcγR(CD16,CD32,CD64)シグナル伝達経路について検証を行った。好中球は FcγR を発現し IgG はその Fc 部分で会合するために、それぞれに対する抗体は F(ab')₂ あるいは F(ab)として用意した。LPS との共刺激により微弱ではあるが活性酸素産生が認められること

が確認され、現在刺激後の細胞内チロシンリン酸化を検出している。

健常人好中球を用いた検討では、Fc 受容体や補体受容体シグナルにより、PI3K(クラス IA, IB)が活性化されることが明らかになった。一方、同シグナルにより活性化される src-type PTK については未同定にとどまった。

2) 局所浸潤型好中球からの生理活性物質産生の検討

健常人、NEMO 異常患者、NADPH oxidase 異常患者の好中球を G-CSF で培養し局所浸潤型好中球を誘導し、ELISA あるいは Luminex 法にてサイトカイン産生を解析した。健常人と患者において、IL-4, IL-8 などの産生に差を認めた。2014 年には、局所浸潤型好中球については、G-CSF で前培養することで、模倣モデルを作成した。その後 LPS, SAA-1 などで刺激したところ、SAA-1 刺激において IL-4 産生能が亢進し、一方 LPS 刺激では IL-4 産生が低下した。IL-10, ISG15 については有意な差が認められなかった。

3) 膜透過性ペプチド(CPP)を用いた好中球プライミングや異常反応の制御

細胞質内滞在型 MAL を精製し、健常者好中球に導入することにより、その ROS 産生抑制効果を検証した。膜透過性ペプチドでは CPP 結合野生型 MAL、膜移行シグナルを有する MAL、細胞質内滞在型 MAL を作成し、健常好中球に導入した。それぞれにつき局在が確認された。膜移行型ではプライミングに動く傾向が示唆された。

4) iPS 細胞からの好中球分化誘導と機能解析

東京大学医科学研究所大津真博士の協力のもと iPS 細胞から好中球への分化誘導法についてその手技を修得した。現時点ではまだ遺伝子導入などによる分化の微調節は行われていないが、活性酸素産生などの機能を発揮する好中球が得られた。iPS 細胞からの好中球誘導系では、好中球の誘導は十分に行えるものの、各段階で C/EBPalpha 及び Gf11, C/EBPbeta, C/EBPbeta/delta/zeta 及び PU.1 などの転写因子を導入するまでには至らず、細胞数の制約が問題になった。

5) 敗血症における好中球機能解析

2013 年から先取りする形で、敗血症における好中球機能解析を開始した。具体的には活性酸素産生、ST2, CXCR2, PILRα の発現、細

胞内基質のリン酸化、血清サイトカインなどである。その結果、敗血症患者好中球がプライミング状態にあり、また表面サイトカイン・ケモカイン受容体発現に異常を認めることなどが明らかになった。敗血症における好中球機能・シグナル異常については症例が蓄積し、解析が進んだ。経時的な解析では day3 に比して day0 での活性酸素産生能は低く、また Cytochrome b558 発現も低値であった。重症敗血症患者では健常人と比較して CXCR2 の発現が有意に低く、day0 においてもっとも顕著であった。PILR は好中球の adhesion を阻害するシグナルを伝えるが重症敗血症患者では健常人と比較して PILR の発現は有意に低下し好中球の非特異的接着が亢進していた(局所への有効な遊走が阻害されていた)。シグナル系では、広範囲の分子量に亘ってチロシンリン酸化タンパクが検出され、それを同定する段階に至った。敗血症においては、重症者、それ以外に分けて層別化しているが、そのほかの生化学的データにおいても差異が認められることが明らかになっている。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 7 件)

1. Yokota S, Itoh Y, **Morio T**, Sumitomo N, Daimaru K, Minota S. Macrophage Activation Syndrome in Patients with Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis under Treatment with Tocilizumab. *J. Rheumatol.* **42**:712-22, 2015. doi: 10.3899/jrheum.140288. 査読有
2. Marciano BE, Huang CY, Joshi G, Rezaei N, Carvalho BC, Allwood Z, Ikinciogullari A, Reda SM, Gennery A, Thon V, Espinosa-Rosales F, Al-Herz W, Porras O, Shcherbina A, Szaflarska A, Kiliç S, Franco JL, Gómez Raccio AC, Roxo P Jr, Esteves I, Galal N, Grumach AS, Al-Tamemi S, Yildiran A, Orellana JC, Yamada M, **Morio T**, Liberatore D, Ohtsuka Y, Lau YL, Nishikomori R, Torres-Lozano C, Mazzucchelli JT, Vilela MM, Tavares FS, Cunha L, Pinto JA, Espinosa-Padilla SE, Hernandez-Nieto L, Elfeky RA, Ariga T, Toshio H, Dogu F, Cipe F, Formankova R, Nuñez-Nuñez ME, Bezrodnik L, Marques JG, Pereira MI, Listello V, Slatter MA, Nademi Z, Kowalczyk D, Fleisher TA, Davies G, Neven B, Rosenzweig SD. BCG vaccination in patients with severe combined immunodeficiency: Complications, risks, and vaccination policies. *J Allergy Clin Immunol.* **133**:1134-41, 2014. doi: 10.1016/j.jaci. 査読有
3. Yamamoto A, **Morio T**, Kumaki E, Yamazaki H, Iwai H, Kubota T, Miyasaka N, Kohsaka H: A Case of Pyogenic Sterile Arthritis, Pyoderma Gangrenosum, and Acne (PAPA) Syndrome Accompanied by Nephrosclerosis, Splenomegaly and Intestinal Lesions. *J Genet Syndr Gene Ther.* **4**:9 (eJournal), 2013. 査読有
4. Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, **Morio T**, Yachie A. Rapid Detection of Intracellular p47phox and p67phox by Flow Cytometry; Useful Screening Tests for Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol.* **33**:857-864, 2013. doi: 10.1007/s10875-012-9859-9. 査読有
5. Fukuda S, Nanki T, **Morio T**, Hasegawa H, Koike R, Miyasaka N. Recurrent mitral valve regurgitation with neutrophil infiltration in a patient with multiple aseptic abscesses. *Mod Rheumatol.* **24**:537-9, 2013. doi: 10.3109/14397595.2013.852853. 査読有
6. Miyabe C, Miyabe Y, Miura NN, Takahashi K, Terashima Y, **Morio T**, Yamagata N, Ohno N, Shudo K, Suzuki J-I, Isobe M, Matsuhima K, Tsuboi R, Miyasaka N, and Nanki T. Am80, a retinoic acid receptor agonist, ameliorates murine vasculitis through the suppression of neutrophil migration and activation. *Arthritis Rheumatism.* **65**:503-512, 2013. doi: 10.1002/art.37784. 査読有

7. **(和文総説)森尾友宏**:好中球過剰活性化制御機構と炎症 **炎症と免疫** 21:345-351, 2013. 査読有

取得状況(計0件)

[学会発表](計5件)

1. **森尾友宏**:免疫不全症・異常症におけるリンパ球亜群解析、**ヒューマンイムノロジーフォーラム 2014(シンポジウム)**、京都、2014年12月13日
2. **森尾友宏**:重症感染症における好中球機能・シグナル異常とその制御、**第25回バイオメディカルフォーラム学術集会**、東京、2014年12月6日
3. **森尾友宏**:感染防御におけるサイトカインの働き、**第46回日本小児感染症学会総会・学術集会(教育講演)**、東京、2014年10月18日
4. 1. 熊木恵里、重野美湖、水谷修紀、**森尾友宏**:PAPA症候群・壊疽性膿皮における好中球の過剰反応、**第41回日本臨床免疫学会**、2013年11月29日、下関
5. 2. **森尾友宏**、熊木恵里、重野美湖、遠藤三千雄、大川哲平、今井耕輔、水谷修紀、尾崎富美子、市田久恵、川口鎮司、井田弘明:PAPA症候群責任遺伝子産物PSTPIP1の機能解析、平成25年度厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「自己炎症性疾患とその類縁疾患に対する新規診療基盤の確立」班 **平成25年度第1回班会議(平家班)**、東京、2014年1月31日

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

森尾 友宏(MORIO, Tomohiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号:30239628

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別: