

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670519

研究課題名(和文) NETs関連クロマチンDNA解析による自己抗体産生過程の同定

研究課題名(英文) Gene-based analysis of NETs-associated DNA in autoantibody-mediated diseases

研究代表者

松岡 悠美 (MATSUOKA, YUMI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10402067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：当初、ヒト好中球からNETsの単離を検討するステップを考えていたが、無刺激の好中球単離の条件検討が必要であることが研究推進中に明らかとなった。そこでまず、マウスの骨髄から好中球を単離し、刺激を行う系の習熟に着手した。マウス骨髄好中球を比重分離により単離し、好中球活性化を起こすことがすでに知られている皮膚病原真菌による刺激を行い、好中球の活性化を検討した。これまでの解析を通して実際にマウス骨髄好中球を用いて、NETsを可視化し、効率よくその産生を検出する系を確立した。今後これらの知見を活かし、実際のヒト検体を解析していく予定であり、萌芽研究として一定の成果を挙げられたと考えている。

研究成果の概要(英文)：First, we tried to collect neutrophils from normal human peripheral blood. However, there were some technical difficulties about collecting naive neutrophils from human blood. Therefore, we tried to obtain mouse naive neutrophils from bone marrow and analyzed ROS production, NETs release and antimicrobial peptide gene expressions under some stimulative conditions. We successfully isolated naive neutrophils from mouse bone marrow and visualized NETs release under *C.albicans* stimulation. We will establish the new method for visualizing NETs release and perform gene-based analysis of NETs-associated DNA in autoantibody-mediated diseases in our future project.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚科学 血管炎 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

近年、NETs による感染防御機構、NETosis が概念として提唱されて以降 (Brinkmann, *Science* 2004; Steinberg, *Science STKE* 2007)、様々な疾患への NETosis の関与が明らかとなってきた。古典的に好中球は貪食により感染症における生体防御に関与していることが知られていたが、NETosis とはより効率的に外来微生物を排除するために、ヒストンなどのついたクロマチン DNA を細胞外へ放出、「網で虫を捕らえる」様に外来微生物を捕獲するシステムのことである。面白いことに、NETosis により放出される NETs はクロマチン DNA の他に、PR3、MPO といった ANCA 関連血管炎で認められる抗原を含有し、ANCA 関連血管炎での NETosis 役割が明らかになりつつある (Kussenbrock, *Nat Med* 2009)。2012 年の Chapel Hill 血管炎分類によると、小血管を侵す血管炎は、アレルギー性紫斑病をはじめとする免疫複合体型と、Granulomatosis polyangiitis (以下 GPA、旧: Wegener 肉芽腫症) をはじめとする ANCA 関連の自己抗体型に分類することが出来る。好中球破碎型の血管炎という NETosis が関与すると思われる共通項を持ちながら、アレルギー性紫斑病では、先行する *Streptococcus* 感染を認識していると思われる ASO、ASK、抗カルジオリピン IgA の産生が見られる一方、同様に鼻腔の *Staphylococcus* や *E.coli* の関与がいられている ANCA 関連血管炎では好中球細胞質に対する自己抗体が認められる現象は非常に興味深い。

そこで申請者は、先行感染症に伴うクロマチン DNA の修飾に差が生じ、それが抗原性を規定しているのではないかという仮説を立てた。我々はこれまで自然免疫と感染に主眼を置き研究を行ってきた (Nakamura, *Immunity* 2012; Nakamura, *Nature* 2013)。このような背景を生かし、ANCA 自己抗体関連血管炎と、自己抗体陰性となるアレルギー性紫斑の NETs パターンを解析することで自己抗体産生機序を明らかに出来るのではないかと着想した。

2. 研究の目的

感染や組織壊死による炎症の場合の好中球の遊走と NETs の放出は、炎症性サイトカインの IL-1、微生物認識受容体の NLRP3、FPR1、TLR2、補体レセプター、C3 などにより制御されている (McDonald, *Science* 2010; Yipp, *Nat Med* 2012)。好中球破碎性血管炎がさまざまなレベルで起こる ANCA 関連血管炎、SLE など病態で、自己抗体が検出される機序が NETs という概念に基づき明らかになっていくのは非常に興味深い。しかしながら、似たような血管炎の組織像

をとるアレルギー性紫斑病をはじめとする免疫複合体型の血管炎でなぜ、自己抗体が検出されないのかこの理論では説明がつかない。そこで、自己抗体陰性のアレルギー性紫斑病と ANCA 関連疾患群の NETs パターンを比較解析する事で、自己抗体の産生機序に迫るという斬新なアイデアを着想した。臨床に再度携わる環境で、患者検体を用いた解析をスタートするまさに好機であると考えた。

また今回手法として採用したプロテオーム解析やエピジェネティクス解析により、最近、多くの生命現象への DNA 修飾の関与が明らかにされつつあり、斬新性とチャレンジ性を有した研究内容であると考えている。そこで我々は、自己抗体陽性と陰性の血管炎が存在することに着目し、両者の好中球の NETs パターンのエピジェネティクス解析により、そのパターンの違いが血管炎の自己抗体の産生に関与するのではないかと仮説を立て本研究で明らかにする。NETs パターンの違いと血管炎の関連が明らかになれば、将来的に血管炎の新たな診断・治療法につながるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 形態学的な観点から：エピジェネティクス解析を行うにあたり、放出された NETs そのものを用いればより効率的に解析を行えると考えため、まずは形態学的な観点より解析を行う。ANCA 関連血管炎、アレルギー性紫斑病、SLE 患者皮膚およびヒト末梢好中球を用いて、NETs の放出形態に差があるのかを形態学的に検討を行う。

千葉大学皮膚科にある、ANCA 関連血管炎、SLE、アレルギー性紫斑病のホルマリン固定皮膚組織および、凍結組織標本を用いて DNA 染色として DAPI、YOYO®-1 や DRAQ5®、好中球マーカーとして Gr-1 や CD66b の多重蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡下での NETs 分布と修飾について検討する。

浸潤好中球と NETs が同定された後、抗 DNA 抗体およびヒストン抗体や MPO 抗体を用いて既知のタンパク修飾について蛍光抗体多重染色法を用いてさらに確認を行う。

ANCA 関連血管炎、SLE、アレルギー性紫斑病の患者好中球を単離し、既知の NETosis 誘発物質 (PMA や IL-8) で健常者好中球を刺激し NET 比を比較する。

(2) ChIP-シーケンスおよびプロテオーム解析：形態学的な検討の後、健常者および患者末梢血より単離した好中球よりクロマチン DNA を抽出しプロテオーム解

析、ChIP-シーケンスを用いてエピジェネティクスな NETs パターンの解析を行う。

正常好中球を単離、で得られた条件を元に微生物由来物質や薬剤で刺激し上清中に NETosis によって放出された好中球クロマチン DNA 回収が ChIP により可能であるか検討する。このときクロマチンの状態の指標となる Histone H4Ac や H3Lys9me3 の抗体を用いて検討を行う。また、NETs そのものが本来バクテリアに付着し“網”の様な原理でバクテリアを捕獲していることから、バクテリア由来分子に対する抗体を用いて好中球クロマチン DNA の IP が可能であるかについて検討する。

次に ANCA 関連血管炎、SLE、アレルギー性血管炎およびコントロールの健常者好中球から得られたクロマチン DNA を実際に解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト組織における、好中球の染色を行った。DAPI、MPO の多重蛍光免疫染色により、好中球 DNA を組織中で確認する手技を確立し、アレルギー性紫斑病や SLE、その他の血管炎などの疾患で異差が認められるのか現在検討中である。今後さらに NETs 比などを検討するのに最適な条件を検討する予定である。

(2) 当初、ヒト好中球から NETs の単離を検討するステップを考えていたが、無刺激の好中球単離の条件検討が必要であることが研究推進中に明らかとなった。そこでまず、マウスの骨髄から好中球を単離し、刺激を行う系の習熟に着手した。マウス骨髄好中球を比重分離により単離し、好中球活性化を起こすことがすでに知られている皮膚病原真菌 *C. albicans* による刺激を行った。

刺激のありなしの条件における好中球の Reactive Oxygen Species(ROS)産生、NETs の産生を検討した。また、抗菌ペプチドの産生能について PCR 法、およびウエスタンブロッティング法を用いて検討を行った。マウス好中球は無刺激の状態では ROS および NETs の産生は起こさなかったが、*C. albicans* による刺激を行うと、ROS および NETs 産生が経時的に見られることを確認した。また、抗菌ペプチドである S100A9 タンパク質や NETs 産生に重要な因子として知られる c-type lectin 受容体である Dectin-1 の発現に関して PCR 法およびウエスタン法にて確認を行ったが、これらの発現は刺激のありなしで異差は認められず、恒常的に発現していることが明らかとなった。

我々はこれまで、皮膚の病原細菌および真

菌に対する免疫応答について研究プロジェクトを推進してきた。この中で、IL-17 の産生が好中球依存性に *C. albicans* の排除に関わっていることを明らかにした(未発表データ)。そこで次に、NETs の産生が、IL-17 サイトカイン産生依存性に起こっているのかについても更に検討を行った。最終的には蛋白発現や、NETs 特異的な蛋白修飾パターンをプロテオーム解析により検討する必要があるが、その前段階として、RNA sequencing 法を行うことで、IL-17 サイトカイン刺激により好中球内で変化する遺伝子がないか検討を行った。興味深いことに、RNA sequencing 法を用いた網羅的発現解析においては野生型マウスと IL-17 欠損マウスより単離した好中球では遺伝子発現に異差は認められなかった。今後、抽出した蛋白質のプロテオーム解析を行うなどして、IL-17 サイトカインの好中球活性化の役割に関しても検討を行っていく予定である。

現在までのところ、技術的な困難を克服できておらず、ヒト好中球を用いて実際に NETs 産生を検討する段階には至っていない。しかしながら、これまでの解析を通して実際にマウス骨髄好中球を用いて、NETs を可視化し、効率よくその産生を検出する系を確立した。今後これらの知見を活かし、実際のヒト検体を解析していく予定であり、萌芽研究として一定の成果を挙げられたと考えている。

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1件)

1. He Y, Varadarajan S, Muñoz-Planillo R, Burberry A, Nakamura Y, Núñez G. 3,4-methylenedioxy-β-nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome. *J Biol Chem.* (2014) 289: 1142-50. DOI: 10.1074/jbc.M113.515080 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

1. Iwasawa MT, Nakamura Y, Wakabayashi S, Saijo S and Matsue H. (2015) IL-17 produced by group 3 innate lymphoid cells and $\gamma\delta$ T cells is pivotal for host defense against epicutaneous candidiasis via neutrophil activation. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec. 11-13, (岡山県岡山市 岡山コンベンションセンター)
2. Iwasawa MT, Nakamura Y, Wakabayashi S, Saijo S and Matsue H. (2015) IL-17 produced by group 3 innate lymphoid cells

(ILC3) and $\gamma\delta$ T cells is pivotal for host defense against epicutaneous candidiasis via neutrophil activation. 45th Annual ESDR meeting, Sep 9-12, Rotterdam, (The Netherlands)

3. 松岡悠美 (2015) シンポジウム 2 「宿主-共生体感系と疾患」アトピー性皮膚炎における黄色ブドウ球菌の炎症惹起のメカニズム解析 第36回日本炎症・再生医学会、7月21-22日、(東京都港区、虎ノ門ヒルズフォーラム)

〔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：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

松岡 悠美 (MATSUOKA, Yumi)
千葉大学大学院医学研究院・助教
研究者番号：10402067

(2) 研究分担者

神戸 直智 (KAMBE, Naotomo)
千葉大学大学院医学研究院・准教授
研究者番号：50335254