

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580345

研究課題名 (和文) ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの炎症誘発機構の解析

研究課題名 (英文) Myeloperoxidase deficiency induces acute lung inflammation

研究代表者

荒谷 康昭 (ARATANI YASUAKI)

横浜市立大学・大学院国際総合科学研究科・教授

研究者番号：30192470

研究成果の概要：

ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス (MPO-KO マウス) の肺に酵母菌体成分を経鼻投与すると、MPO-KO マウスは野生型マウスよりも重篤な好中球性の肺炎を起こした。MPO-KO マウスは、菌体成分投与直後からある種のケモカイン産生量が異常に高値を示した。そのケモカインに対する抗体を投与したところ、炎症が軽減したことから、MPO の欠損によって異常産生されるこのケモカインが、MPO-KO マウスの肺炎重篤化の一因になっていることが証明された。また、MPO-KO マウス好中球の異常を知るために、単離好中球の貪食能、走化性、接着性を野生型マウスと比較し、両者の違いも検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・基礎獣医学基礎畜産学

キーワード：免疫、好中球、炎症、ミエロペルオキシダーゼ、応用動物

1. 研究開始当初の背景

免疫系は、好中球などによる自然免疫系とリンパ球などによる獲得免疫系（細胞性免疫、体液性免疫）に大別される。報告者は自然免疫に注目し、好中球由来の活性酸素が、感染防御と炎症性疾患にどのように寄与しているのかを個体レベルで知ることを研究課題としている。

好中球は全白血球の 6 割を占め、下に示す代謝系によって主に 3 種類の活性酸素を

産生している。



I の反応を NADPH オキシダーゼが、II をスーパーオキシドディスムターゼが、III を好中球のみに存在しているミエロペルオキシダーゼ (MPO) が触媒する。好中球由来の活性酸素は主に感染初期の殺菌を担う。報告者は、自らが作製した MPO ノックアウト (MPO-KO) マウスが種々の病原体に易感染性をし、好中球由来の HOCl が、感染初期

の生体防御を担う自然免疫系の一員として、重要な役割を担っていることを個体レベルで証明した。

一方、活性化した好中球は、炎症性疾患発症の一因として疑われている。好中球が長時間放出し続けた活性酸素が、生体内の正常組織に傷害を与えて炎症を起こす可能性が高いからである。この可能性が正しければ、仮に好中球が活性酸素を放出しなければ炎症性疾患は軽減されることになる。ところが、(1) MPO-KOマウスはゼイモザン誘発性肺炎がより重症になる、(2) MPO-KOマウスはゼイモザンによるリウマチ様関節炎がより重症になる、(3) MPO-KOマウスは紫外線を皮膚照射して誘発させた皮膚炎がより早期に発症するなど、解析した炎症モデルのすべてにおいて、MPO-KOマウスの方が野生型よりも重篤な炎症を起こした。これらは、MPOの欠損は炎症の重篤化に働くという、予想とは逆の結果であり興味深い。しかし、なぜMPO-KOマウスの方が重症になるのか、そのメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究は、好中球やマクロファージなどによる自然免疫に注目し、好中球由来の活性酸素が感染防御と炎症性疾患にどのように寄与しているのかを個体レベルで知ることが目的とし、MPO-KOマウスが炎症誘発剤による肺炎が野生型マウスよりも重篤化するメカニズムの解析に従事した。

3. 研究の方法

野生型マウス (C57BL/6 マウス) は日本 SLC から購入した。MPO-KO は、C57BL/6 マウスに戻し交配して、野生型マウスと遺伝的背景を等しくして使用した。いずれも、本学動物実験指針に準じて飼育管理した。

炎症誘発剤として使用したゼイモザンは、市販粉末をリン酸緩衝液にけん濁し、麻酔を施したマウスに経鼻投与した。投与後、1日目、3日目、および6日目の肺の解剖像を観察するとともに、その組織切片をヘマトキシリン/エオジン染色して、肺の炎症像を組織学的に解析するとともに、肺全体に対する炎症領域の割合を計測した。また、気管支および肺胞中に集積した炎症細胞を肺胞洗浄によって回収し、その細胞数を計測した。さらに、好中球、マクロファージ、樹状細胞、NK細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、およびB

細胞の各表面抗原の抗体を用いたフローサイトメトリーにより、回収した細胞の細胞種を同定するとともに、各々の細胞数を算出した。肺中サイトカインとケモカインの濃度測定には、ゼイモザン非投与のマウス、および投与後6時間後、1日目、3日目、および6日目のマウスの肺をプロテアーゼ阻害剤共存下で破碎し、破碎液の遠心上清を使用した。測定とデータ解析は、Bio-Plex (BIO-RAD) を用いてメーカーの推奨する方法に準じた。抗ケモカイン抗体は経鼻的に投与した。

(倫理面への配慮)

実験動物は動物の保護及び管理に関する法律に準じて扱い、必要最小限の動物を使用した。やむを得ず動物をす際には、頸椎脱臼法もしくはエーテル麻酔法で安楽死させた。

4. 研究成果

野生型マウスおよび MPO-KO マウスにゼイモザンを投与すると、野生型マウスは1日後にすでに全肺葉のおよそ1割程度に炎症が認められた。しかし、その後6日目までほぼ同程度の炎症が持続し、それ以上の炎症の進行は認められなかった。一方、MPO-KOマウスの炎症は、投与後1日目ですでに野生型マウスよりも有意に炎症領域が広がっており、その後も炎症の拡大が経時的に進行し、6日目には肺全体のおよそ6割以上を占める領域に炎症像が観察された。

投与後1日目の野生型マウス肺から肺胞洗浄によって回収された細胞数は、およそ300万個であったのに対し、MPO-KOマウス肺からは、その3倍量の細胞が回収された。また、6日目の MPO-KO マウス肺からは野生型マウスの5倍以上の細胞が回収された。

肺胞浸潤細胞種は、ゼイモザン非投与時ではほとんどがマクロファージであったが、ゼイモザンを投与すると、MPO-KOマウスは1日目ですでに好中球が急速に増加し、6日目では野生型マウスの約4倍も多く好中球が集積した。すなわち、MPOが欠損するとゼイモザンで誘発された好中球性の肺炎が野生型マウスよりも重篤化することがわかった。

肺組織内のサイトカイン・ケモカイン量を測定した結果、MPO-KOマウスではKCとMIP-2の産生量が投与後6時間で一過的に増加し、野生型マウスの約3倍量を示した。そこで、このように大量に産生されたKCやMIP-2がMPO-KOマウスにおける好中球の浸潤に関わっているかを知るために、ゼイモザンを投与後6時間の MPO-KO マウスに KC と MIP-2 の抗体

を経鼻投与し、各ケモカインを中和した。その結果、KC 抗体投与群では抗体非投与群と比較して、ザイモザン投与 1 日目の好中球の集積が約 4 割減少した。一方 MIP-2 抗体投与群では好中球の集積が約 6 割減少した。このことから KC と MIP-2 は共に、炎症の初期段階において好中球の集積に関与していることがわかった。このことから、ザイモザン投与後の MPO-KO マウスで、一過的に産生される KC 量と MIP-2 量が、MPO-KO マウスの肺への好中球の集積に少なくとも部分的に関与していることが示された。

本研究は、酵母菌体抽出成分であるザイモザンによって誘発される肺炎をモデルとして、その病態の発症機構を知ることで重症肺炎発症機構解明の一助とすることを目的とした。この肺炎モデルでは、MPO-KO マウスのほうが野生型マウスよりも重篤になる。興味深いことに、KC と MIP-2 の抗体を肺に経鼻投与して肺胞内の各ケモカインを中和すると、肺胞への好中球の集積が減少し、炎症が軽減した。このことから、ザイモザン投与後の MPO-KO マウス肺で KC や MIP-2 の産生量が一過的に多くなることが、このマウスの肺炎が重篤化する一因になっていると考えられる。これらのケモカインが肺組織内のどこで産生され、なぜ MPO-KO マウスの方が一過的に多く産生されるのかを知ることが、今後の重要研究課題となる。

我が国の死因の第四位に位置する肺炎の予防治療対策が急務の一課題として急浮上している。肺炎は、感染が治まれば治癒するものと思われがちであるが、たとえ病原体を排除できても必ずしも肺炎が治癒するとは限らない。たとえば、急性呼吸窮迫症候群などの重症肺炎では、病原体の消滅後も炎症が重篤化する過剰生体防御反応が起こる。そのため、抗生物質が効かないばかりか、抗炎症剤の薬効も乏しいため、治療法がなく致命的となる。一方、関節リウマチも、感染説、ストレス説、食物説、遺伝説などが提唱されているが、真の原因は不明であり、治療法も乏しい。本研究は、炎症性疾患の発症機構を解明するという基礎研究としての意義に加えて、好中球機能の制御による新たな炎症性疾患治療法を開発するための知見を提供するという重要な意義を持つ。

結論として、MPO-KO マウスで一過的に産生される KC 量と MIP-2 量が、MPO-KO マウスの肺への好中球の集積に深く関与していることが示された。

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 4 件)

1. Takahashi, A., Yamakawa, N., Mori, E., Ohnishi, K., Yokota, S., Sugo, N., Aratani, Y., Koyama, H., Ohnishi, T: Development of thermotolerance requires interaction between polymerase β and heat shock proteins. *Cancer Sci.* 99, 973-978 (2008) 査読有
2. Chen, Y., Aratani, Y., Osawa, T., Fukuyama, N., and Nakazawa, H: Activation of Inducible Nitric Oxide Synthase Increases MMP-2 and MMP-9 Levels in ApoE-knockout Mice. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 33, 28-34 (2008) 査読有
3. Matthijsen, R.A., Huugen, D., Hoebbers, N.T., Vries, B., Peutz-Kootstra, C. J., Aratani, Y., Daha, M.R., Tervaert, J. W. C., Buurman, W. A., and Heeringa, P: Myeloperoxidase is critically involved in the induction of organ damage following renal ischemia reperfusion. *Am. J. Pathol.* 171, 1743-1752 (2007) 査読有
4. Sugo, N., Niimi, N., Aratani, Y., Masutani, M., Suzuki, H., and Koyama, H: Decreased PARP-1 levels accelerate embryonic lethality but attenuate neuronal apoptosis in DNA polymerase β -deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 656-661 (2007). 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. 荒谷康昭, 梅木 佑, 西川なつき, 戸塚彩子, 吉田后那, 鈴木和男: ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのザイモザン誘発性肺炎の促進 日本農芸化学会 2008 年度大会, 2009 年 3 月, 福岡
2. Nagao T., Aratani Y., Nakayama T., Suzuki K.: Secretion of neutrophil chemotactic factors from glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. 第 38 回日本免疫学会学術集会, 2008 年 12 月, 京都
3. Nishikawa N., Umeki Y., Aratani Y.: Phagocyte NADPH-oxidase deficiency promotes zymosan-induced acute lung inflammation. 第 38 回日本免疫学会

- 学術集会、2008年12月、京都
4. Umeki Y., Nishikawa N., Suzuki K., Aratani Y.: Myeloperoxidase deficiency promotes zymosan-induced acute lung inflammation. 第38回日本免疫学会学術集会、2008年12月、京都
 5. 梅木 祐、瀬田玄樹、西川なつき、鈴木和男、荒谷康昭: Zymosan誘発性肺炎におけるMyeloperoxidaseの役割 第14回MPO研究会、2008年10月、東京
 6. 長尾朋和、松村実美子、荒谷康昭、中山俊憲、南谷晴之、鈴木和男: MPO-ANCAによる糸球体血管内皮細胞の好中球走化性因子の発現、第14回MPO研究会、2008年10月、東京
 7. 荒谷康昭、瀬田玄樹、梅木 祐、西川なつき、鈴木和男: ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのザイモザンによる肺炎の誘発 第13回MPO研究会、2007年10月、広島
 8. 長尾朋和、松村実美子、荒谷康昭、星野昭芳、山本健二、中山俊憲、南谷晴之、鈴木和男: MPO-ANCAによる糸球体内皮細胞の活性化、第13回MPO研究会、2007年10月、広島
 9. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Takano, Y., Okawara, A., Suzuki, K., Maeda, N., and Koyama, H: Contribution of myeloperoxidase to host defense against pulmonary and systemic infections with *Cryptococcus neoformans*. The 5th international Peroxidase Meeting, New Zealand (2007).

〔図書〕(計3件)

1. 荒谷康昭 (分担): 好中球機能異常による呼吸器不全-ミエロペルオキシダーゼ欠損を中心に。医学のあゆみ(医歯薬出版) 224, 861-862 (2008)
2. 荒谷康昭 (分担): ミエロペルオキシダーゼ(MPO)の抗菌活性。臨床検査(医学書院) 51, 1121-1125 (2007)
3. 荒谷康昭 (分担): 好中球 myeloperoxidaseの役割。生体防御医学事典(朝倉書店) 145-149 (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒谷 康昭(ARATANI YASUAKI)
横浜市立大学・大学院国際総合科学研究科・教授
研究者番号: 30192470

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

大学院生: 瀬田玄樹、梅木 祐、西川なつき
学部生: 戸塚彩子、吉田后那、車、軒