

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591474

研究課題名(和文)好中球細胞外トラップの分子機構並びにその感染・炎症病態における役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of a mechanism of neutrophil extracellular trap (NET) formation and a role of NETs in infectious and inflammatory diseases.

研究代表者

山下 浩平 (YAMASHITA, KOUHEI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80402858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：好中球細胞外トラップ(NETs)は好中球の新たな細胞外殺菌機構として生体防御に寄与するが、強い傷害因子を細胞外へ放出するため、血栓症や炎症性・自己免疫性疾患などの病態形成に関与することが報告されている。本研究では主に以下の3点、NETs形成機構に活性酸素の一種である一重項酸素が重要であること、同種造血細胞移植後の重篤な合併症の一つである血栓性微小血管障害(TMA)の病態形成にNETsが深く関与し、血清NETs高値がTMA発症の予測因子になりうること、高濃度の尿酸が活性酸素非依存性にNETs形成を誘導し、NETsが高尿酸血症による心血管障害に関連する可能性があること、を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Neutrophil extracellular traps (NETs), a newly recognized extracellular killing mechanism by activated neutrophils, contribute to host defense, however, it is reported to be relevant to the pathogenesis of immunothrombosis and inflammatory/ autoimmune diseases by releasing potent hazardous mediators, such as anti-microbial peptides. In this study, we revealed three major findings as below; 1) Singlet oxygen, one of the reactive oxygen species produced by activated neutrophils, is essential for NET formation, 2) Serum NET levels predict thrombotic microangiopathy after allogeneic stem cell transplantation (SCT), which is one of the critical complications of SCT. 3) Uric acid induces NADPH oxidase-independent NET formation, suggesting that NETs could be a missing link between serum uric acid elevation and cardiovascular diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 感染症内科学

キーワード：好中球細胞外トラップ NADPH oxidase 一重項酸素 血栓性微小血管障害 造血幹細胞移植 高尿酸血症 心血管障害 殺菌

1. 研究開始当初の背景

近年、好中球細胞外トラップ (Neutrophil Extracellular Traps; NETs) と呼ばれる好中球の新たな細胞外殺菌機構が注目され、その形成機序や種々の病原体に対する殺菌作用について精力的に研究が進められている。NETs は病原体や様々な因子によって活性化された好中球がクロマチンを細胞外へ放出して崩壊する現象で、NETs 周囲の病原体はクモの糸に絡まるように捕捉され、放出したクロマチンに含まれる顆粒抗菌蛋白により殺菌される。NETs 形成については、活性化好中球の活性酸素産生が重要であることが報告されているが、どの活性酸素種が最も重要であるのか、その後どのようなシグナル伝達系が活性化されるのかなど、詳細は明らかでない。また、NETs は生体防御に重要な役割を果たす一方、傷害活性の強い因子を細胞外へ放出するため、組織障害を引き起こし、種々の炎症性疾患の病態形成に関与すると考えられる。例えば、血管内で過剰な NETs 形成が誘導された場合、NETs が血管内皮細胞傷害を惹起し、その結果、血栓形成促進に関与すると考えられる。しかしながら、その詳細な病態生理や臨床症例における検討は十分になされていない。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、本研究では下記の点を明らかにすることを目的とする。

NETs 形成に関与する活性酸素種の同定を行う。

NETs 形成における活性酸素産生からのシグナル伝達系を解析する。

同種造血細胞移植後の重篤な合併症の一つであり、その成因が詳しく判っていない血栓性微小血管障害 (TA-TMA) 患者の検体を用いて、血栓形成における NETs の役割を明らかにする。

炎症性・自己免疫性疾患の病態における NETs の役割を解明するために、本邦から提唱された疾患概念である「IgG4 関連疾患」に着目し、その病態形成における NETs の役割を形質細胞様樹状細胞の活性化の観点から明らかにする。

これらの課題を解明することによって、NETs 形成の効率的な増強による感染症治療への可能性が広がるのみならず、NETs 形成の制御による炎症性・自己免疫性疾患の治療開発への道が開かれる可能性がある。

3. 研究の方法

NETs 形成に関与する活性酸素種の同定

活性化好中球はスーパーオキシド・過酸化水素・ヒドロキシラジカル・一重項酸素といった様々な活性酸素を産生することが知られている。我々は、最終に産生される活性酸素種である一重項酸素が NETs 形成に重要な役割を果たすと仮説を立て、実験計画を進めた。まず、PMA (phorbol myristate acetate) 刺激により誘導した NETs 産生に対して、一重項酸素の消去剤であるエダラボンや PBN (α -phenyl-N-tert-butyl nitron) が抑制効果を示すかどうか検討した。次に、光増感剤である Photofrin に 630 nm のレーザー光を照射することにより一重項酸素を特異的に産生する系を利用して、活性酸素産生が先天的に欠損している慢性肉芽腫症 (CGD) 患者好中球に Photofrin を取り込ませた後、レーザー照射して一重項酸素を産生した場合、NETs 形成が観察されるか否かを検討した。

NETs 形成におけるシグナル伝達系の解析

NETs 形成におけるシグナル伝達を解析するため、種々の刺激により NETs 誘導を行い、Raf-MEK-ERK リン酸化経路の活性化

やNF-κB活性化などを解析した。さらに、この系に対するNADPH oxidase阻害剤や種々の活性酸素消去剤による抑制効果を検討した。

同種移植後TMA(TA-TMA)の病態形成におけるNETsの役割の解明
当科で同種造血細胞移植を行った患者の血清検体を用いて、血清NETs値とTA-TMAの発症率との相関関係を後方視的に解析した。さらに、TA-TMAを発症した患者の腎臓組織などを用いて、組織中に存在するNETsの検出を試み、TA-TMAの病態形成におけるNETsの役割を臨床的に検討した。

IgG4関連疾患(IgG4-RD)の病態形成におけるNETsの役割の解明
全身性エリテマトーゼス(SLE)の病態にNETsが深く関与することが報告され、他の炎症性・自己免疫性疾患の病態形成にもNETsが関わっている可能性が示唆されている。我々は、本邦から提唱された疾患概念である難治性疾患「IgG4関連疾患」に注目し、特にNETsによる形質細胞様樹状細胞(pDC)の活性化の視点から、解析を進めた。患者血清や生検隣組織を用いて、IFN-α産生やNETs形成などを測定した。さらに、NETs刺激によるpDCの活性化とB細胞からのIgG4産生との関連を調べるために、患者および健常人の好中球、pDC、B細胞を分離して種々の条件下で共培養し、IgG4産生を測定するとともに、IFN-αやB cell activating factorなどIgG4産生に関与すると考えられるサイトカイン産生を検討した。

4. 研究成果

NETs形成に関与する活性酸素種の同定
末梢血から分離したCGD患者または健常人好中球に光増感剤であるPhotofrinを取り込ませ、630 nmのレーザー光を照射し

て一重項酸素を特異的に発生させたときに、NETsが形成されることを、DNAと好中球顆粒であるmyeloperoxidase(MPO)との二重染色を用いた蛍光顕微鏡および走査型電子顕微鏡による観察で明らかにした。また、この系にエダラボンやPBNを添加した場合、NETs形成が抑制されることを明らかにした。さらに、健常人好中球をPMAで刺激してNETs形成を誘導した時に、エダラボンやPBNがNETs形成を抑制することを確認した。以上の所見から、一重項酸素がNETs形成に必須であることを明らかにした。以上の実験結果を纏めて、論文発表を行った(文献8)。

NETs形成におけるシグナル伝達系の解析

ヒト生体内でのNETs形成における活性酸素産生の役割を確認するために、生体内における最多の抗酸化物質とされる尿酸を用いて、NETs形成の抑制作用を検討した。その結果、PMA誘導NETs形成に対して、5 mg/dl未満の尿酸は抑制効果を示したが、8 mg/dlの尿酸においては抑制効果が消失した。一方、濃度に関わらず、尿酸は好中球が産生する活性酸素(一重項酸素)に対する消去作用を示した。興味深いことに、8 mg/dlの尿酸はそれ自体単独で好中球に作用し、NETs形成を誘導した。この尿酸によるNETs形成は、NADPH oxidase阻害剤や一重項酸素消去剤であるPBNの添加で抑制されず、また先天的に活性酸素産生が欠損したCGD患者好中球でも認められることから、活性酸素非依存性であることが示された。さらに、尿酸誘導NETs形成はNF-κB p65のリン酸化を介し、NF-κB阻害剤であるBAY11-7082の投与により抑制されることから、NF-κBの活性化が重要であることが明らかとなった。一方、活性酸素依存性のPMA誘導NETs形成とは異なり、尿酸誘導NETs形成ではERKのR

ン酸化が認められなかった。以上の所見から、高濃度の尿酸は活性酸素産生非依存的に NETs 形成を誘導し、少なくともその一部は NF- κ B の活性化を介することを明らかにした。以上の実験結果を纏めて、論文発表を行った（文献 1）。

同種移植後 TMA (TA-TMA) の病態形成における NETs の役割の解明

当科で同種造血細胞移植を受けた患者の血清検体を用いて、血清 NETs 値と TA-TMA の発症率を検討した。その結果、移植前の血清 NETs 高値が TA-TMA 発症と正の相関にあること、感染症・急性 GVHD などの他の移植後合併症の発症とは相関関係がないことを明らかにした。さらに、TA-TMA 患者 2 症例における腎臓組織の病理学的検討により、腎糸球体の血栓形成部位に二重鎖 DNA と MPO がともに染色される NETs が存在することを示した。以上の所見から、血清 NETs 値が TA-TMA 発症の良いマーカーになること、そして NETs が TA-TMA の病態形成に関与する可能性を明らかにした。以上の実験結果を纏めて、論文発表を行った（文献 2）。

IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) の病態形成における NETs の役割の解明

IgG4 患者血清や生検臓組織を用いた検討から、健常人と比較して患者血清中の IFN- α が有意に高値であること、患者臓臓に IFN- α を産生する形質細胞や二重鎖 DNA と MPO がともに染色される NETs が存在することを明らかにした。この臓臓に存在する IFN- α 産生形質細胞は B cell activating factor (BAFF) の産生が認められた。健常人好中球に尿酸結晶を加えて NETs を誘導し、ここに pDC と B 細胞を加えて共培養した場合、IFN- α 、BAFF、IgG4 の有意な産生が認められた。健常人 pDC の代わりに患者 pDC を加えた場合 IFN- α 、BAFF、IgG4 の産生が著明に増

加したこと、健常人好中球の代わりに患者好中球を用いてもこれらの産生が同等であったことから、IgG4 産生の亢進には NETs に反応した患者 pDC が重要であると考えられた。さらに、IgG4 産生は NETs 消去剤である DNase I や抗 IFN- α 中和抗体により抑制されることから、NETs 刺激 pDC/IFN- α 産生系が IgG4-RD の病態形成に重要な役割を果たす可能性が示された。実際、IFN- α 産生に重要な転写因子 IRF-7 の核内移行が NETs 刺激を行った患者 pDC で有意に亢進していた。さらに、IgG4-RD 患者血清中に、NETs の構成因子であるラクトフェリンに対する自己抗体が高率に存在することを見出し、抗ラクトフェリン抗体を好中球に作用させた場合、NETs が有意に産生することを明らかにした。以上の所見から、IgG4-RD 患者では、抗ラクトフェリン自己抗体が存在し、NETs 産生を誘導すること、NETs に反応した pDC が IFN- α /BAFF 産生を介して B 細胞/形質細胞から IgG4 産生を促進することを見出し、NETs が IgG4-RD の病態形成に関与することを明らかにした。現在、以上の実験結果を纏めて、論文投稿中である。

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 9 件)

1. Arai Y, Nishinaka Y, Arai T, Morita M, Mizugishi K, Adachi S, Takaori-Kondo A, Watanabe T, Yamashita K. Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 443, 556-61, 2014. (査読有)
2. Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Watanabe T, Sakamoto S, Kitano T, Kondo T, Kawabata H, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. Serum neutrophil extracellular traps levels predict thrombotic

microangiopathy after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl*, 19, 1683-9, 2013. (査読有)

3. Yamashita K, Miyoshi T, Arai Y, Mizugishi K, Takaori-Kondo A, Ueyama T. Enhanced generation of reactive oxygen species by interferon- γ may have contributed to successful treatment of invasive pulmonary aspergillosis in a patient with chronic granulomatous disease. *Int J Hematol*, 97, 505-10, 2013. (査読有)

4. Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Takaori-Kondo A, Chiba T, Watanabe T. The implication of myelodysplastic syndrome-associated chromosomal abnormalities in the development of graft-versus-host disease. *Eur J Haematol*, 90, 525-30, 2013. (査読有)

5. Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Watanabe T, Kondo T, Kitano T, Kawabata H, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. Familial Mediterranean fever mutations in a patient with recurrent episodes of acute respiratory distress syndrome. *Clin Immunol*, 147, 58-60, 2013. (査読有)

6. Watanabe T, Yamashita K, Sakurai T, Kudo M, Shiokawa M, Uza N, Kodama Y, Uchida K, Okazaki K, Chiba T. Toll-like receptor activation in basophils contributes to the development of IgG4-related disease. *J Gastroenterol*, 48, 247-53, 2013. (査読有)

7. Watanabe T, Yamashita K, Fujikawa S, Sakurai T, Kudo M, Shiokawa M, Kodama Y, Uchida K, Okazaki K, Chiba T. Activation of toll-like receptors and NOD-like receptors is involved in enhanced IgG4 responses in autoimmune pancreatitis. *Arthritis Rheum* 64, 914-24, 2012. (査読有)

8. Nishinaka Y, Arai T, Adachi S, Takaori-Kondo A, Yamashita K. Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. *Biochem Biophys Res Commun* 413, 75-9, 2011.(査読有)

9. 新井康之, 山下浩平. 好中球の細胞外殺菌機構 (NETs) - 感染防御における役割と自己免疫・炎症病態への関与 - . 炎症と免疫 . 22. 122-34. 2014. (査読無)

[学会発表] (計 7 件)

1. Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Takaori-Kondo A. Plasmacytoid dendritic cells activated by neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of IgG4-related disease. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2013. 2013.6.13. Madrid, Spain.

2. Arai Y, Nishinaka Y, Arai T, Mizugishi K, Adachi S, Takaori-Kondo A, Yamashita K. Uric Acid Induces NADPH Oxidase-Independent Neutrophil Extracellular Trap Formation. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology. 2013.12.10. New Orleans, USA.

3. Arai Y, Sakamoto S, Yamashita K, Mizugishi K, Kitano T, Kondo T, Kawabata H, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. Serum Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Are a Potential Predictive Marker for Thrombotic Microangiopathy (TMA) After Allogeneic Stem Cell Transplantation. 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, USA. December 8, 2012.

4. Nishinaka Y, Arai T, Morita M, Arai Y, Mizugishi K, Adachi S, Takaori-Kondo A, Yamashita K. A novel role of uric acid in neutrophil extracellular trap formation. 第 74 回

日本血液学会学術集会, 京都. 2012年10月20日.

5. 西中瑤子, 森田真紀子, 荒井俊之, 山下浩平, 足立壯一. 高濃度尿酸による NADPH oxidase 非依存性 NETosis の誘導. 第 21 回日本 Cell Death 学会学術集会, 名古屋. 2012年7月28日.

6. Nishinaka Y, Morita M, Arai T, Adachi S, Takaori-Kondo A, Yamashita K. Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. The 53rd ASH Annual Meeting and Exposition. 2011. 10. 12.12. San Diego, USA.

7. Yamashita K, Nishinaka Y, Arai T, adachi S, Takaori-Kondo A. Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. 第 73 回日本血液学会総会 . 2011. 10. 14-16 . 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学 生体防御研究

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~hemonc/research/biophylaxis.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者：山下浩平 (Yamashita Kouhei)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：80402858

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし