

令和元年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08175

研究課題名(和文) 電位依存性プロトンチャネルによる好中球機能を抑制する機構と炎症抑制機構の解明

研究課題名(英文) inhibition of inflammation and neutrophil function by voltage-gated proton channel Hv1/VSOP

研究代表者

大河内 善史 (Yoshifumi, Okochi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90435818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性プロトンチャネルHv1/VSOPは、好中球機能の制御ならびに炎症抑制機能を持つチャネルである。このチャネル機能が欠失したマウスでは、真菌感染後の肺において過剰な炎症症状が観察された。本研究では、この過剰な炎症が起きる原因を明らかにするために、好中球の走化性応答に着目して種々の解析を行った。その結果、Hv1/VSOPが好中球において低濃度の走化性因子fMLF刺激に依存した活性酸素の産生を抑制し、ERKシグナルに依存した走化性応答の抑制に必須であることが明らかになった。以上の結果は、炎症抑制におけるHv1/VSOPの機能の一端を明らかにするものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好中球は、感染時にいち早く感染部位に到着して病原菌を除去する役割を担う一方で、過剰な好中球の遊走は炎症を拡大させる負の側面を併せ持つ。そのため、好中球の遊走は適切にコントロールされる必要がある。我々は、電位依存性プロトンチャネルHv1/VSOP1が活性酸素の産生量を抑えることで低濃度の走化性因子に対する走化性応答を抑制することを明らかにした。この結果は、Hv1/VSOPが炎症の早期解決において好中球の遊走能を抑制する可能性を示唆する。今後、このHv1/VSOPの機能に着目した炎症をコントロールする方法の確立につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Voltage-gated proton channel, Hv1/VSOP, has a role to regulate neutrophil function and inhibit an inflammation in pathogen infection. Hv1/VSOP-deficient mice exhibit excess inflammation in lung after *Candida* infection. In this study, we found that Hv1/VSOP negatively regulates ROS production in neutrophils stimulated with low concentrations of fMLF. And, we demonstrated that this inhibitory function by Hv1/VSOP in ROS production is necessary for inhibiting ERK-dependent chemotactic response to low fMLF concentrations. These results may suggest that Hv1/VSOP inhibits an inflammation by suppressing neutrophil migration to infection site upon pathogen infection.

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 走化性 ERKシグナル 活性酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、細胞内外の pH および膜電位を制御する分子である (Decoursey, *Physiol Rev* 2003, Sasaki et al., *Science* 2006, Okamura and Okochi, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2019)。このチャネルは、主に貪食細胞などの免疫細胞において活性酸素の産生を助ける働きを担っていることが我々を含めた研究により明らかにされてきた (Okochi et al., *BBRC* 2009, Chemaly et al., *J Expe Med* 2010, Sasaki et al., *Biochem J* 2013)。我々は、貪食細胞の 1 種である好中球における Hv1/VSOP の役割を解析する過程で、このチャネルが活性酸素や分解酵素を蓄えた小胞の脱顆粒 (エキソサイトーシス) を抑制する機能を担っていることを発見した (Okochi et al., *J Leukoc Biol* 2016)。Hv1/VSOP の機能が欠失した好中球では、過剰な脱顆粒が起きるため、細胞外に細胞傷害性のある活性酸素種 (ROS) や分解酵素が野生型よりも多く放出される。個体レベルでは、Hv1/VSOP が感染時における炎症抑制の役割を担っていることが明らかとなった (Okochi et al., *J Leukoc Biol* 2016)。Hv1/VSOP の機能が欠失したマウスでは、カンジダ真菌感染後の肺において、肺胞への過剰なマクロファージや好中球の浸潤を特徴とした炎症を呈する。以上の結果から、Hv1/VSOP は感染部位に集まる好中球の脱顆粒を適切に制御することで、炎症を早期に収束させる役割を担っていると考えられる。

2. 研究の目的

Hv1/VSOP の機能が欠失したマウスにおける過剰な貪食細胞の浸潤は、貪食細胞の遊走能が亢進している可能性を示唆していた。本研究では、Hv1/VSOP が好中球の移動能を制御する可能性を検討し、Hv1/VSOP による炎症抑制機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 走化性の解析: 好中球の走化性テストには、大腸菌由来の走化性因子 fMLF を用いた。走化性テストは Transwell チャンバー (96 ウェル) を用いて行った。具体的には、直径 3 μm の多孔フィルターを介して、上段に好中球を、下段に fMLF 溶液を加えて、37 $^{\circ}\text{C}$ 45 分間保温した。その後、フィルターを通して下段の fMLF 溶液を含むウェルに移動した好中球を回収した。その後、蛍光ビーズを細胞と混ぜ、フローサイトメーターで細胞とビーズをカウントし、走化性応答した細胞数を細胞/1 ビーズで表した。

(2) ERK のリン酸化: 好中球をチューブ内において一定時間 fMLF で刺激した後、可溶化し、SDS-PAGE によるタンパク質分画、ウェスタンブロット法による膜への転写後、特異的抗体を用いてリン酸化 ERK あるいはリン酸化 p38 をラベルした。二次抗体反応後、化学発光キットを用いて発光したバンドを CCD カメラで検出した。検出されたバンドは、ImageJ を用いて定量化された。膜は、その後、アクチン抗体を用いてリプローブされた。アクチン量は上記と同様の方法で定量化され、各リン酸化タンパクの量を補正するために使用された。

(3) ROS 産生量の測定: ROS は、ROS に感受性を持つ発光物質 (Diogenes) および発光検出用プレートリーダーを用いて検出された。

4. 研究成果

(1) Hv1/VSOP の機能が欠失した好中球 (Hv1/VSOP^{-/-}好中球) は低濃度の fMLF に対して亢進した走化性応答を示した

通常、野生型の好中球は 1 μM 以上の fMLF に対して明確な走化性応答を示すことから、野生型と Hv1/VSOP の機能が欠失した好中球において、1 ~ 50 μM の fMLF に対する走化性応答を調べた。その結果、Hv1/VSOP^{-/-}好中球は、1 μM の fMLF に対して強い走化性応答を示すことが分かった (図 1A)。一方、10 μM 以上の濃度に対しては野生型と同様の走化性応答を示すことが分かった。この結果は、低濃度の fMLF に対する Hv1/VSOP^{-/-}好中球の感受性が増大して

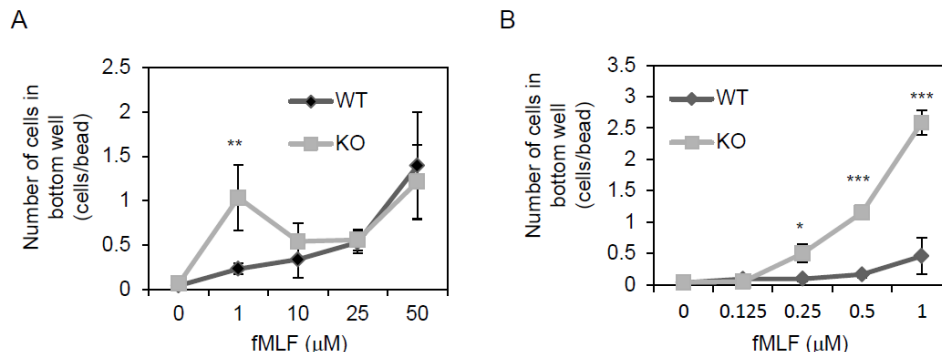


図 1. fMLF に対する走化性応答テスト

WT:野生型、KO:Hv1/VSOP の機能が欠失した好中球。縦軸は、ビーズで補正した細胞数を示している。使用した細胞数は、A: 1×10^5 、B: 2×10^5 。mean \pm SD, n=3、*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ (unpaired t-test)

いる可能性を示唆した。そこで、1 μM から 0.125 μM まで連続希釈した fMLF を用いて走化性テストを行ったところ、Hv1/VSOP^{-/-}好中球は低濃度の fMLF に対して強い走化性応答を示すことが分かった (図 1B)。さらに、Hv1/VSOP^{-/-}好中球は、野生型がほぼ走化性応答を示さない低い濃度に対しても走化性応答を示した (図 1B)。すなわち、Hv1/VSOP は fMLF に対する好中球の走化性応答を抑制する機能を持つことが分かった。

(2) 低濃度の fMLF で刺激された Hv1/VSOP^{-/-}好中球において、ERK シグナルが亢進していた

fMLF は G タンパク質共役型受容体を介して様々なシグナル分子を活性化する (Schiffmann et al., PNAS 1975, He et al., JBC 2014, Baruah et al., J Leukoc Biol 2019)。Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)、特に extracellular signal-regulated kinase (ERK) と p38 は、好中球の走化性を制御する主要な分子であり (Liu et al., Nat Immunol 2012, Zhang et al., Sci Signal 2016)、fMLF 刺激によって活性化することが知られていた (Southgate et al., J Immunol 2008)。そこで、これら 2 つの MAPKs のリン酸化レベルの経時変化を野生型と Hv1/VSOP^{-/-}好中球について調べ、比較することにした。その結果、Hv1/VSOP^{-/-}好中球において、ERK のリン酸化が亢進していることが分かった (図 2A)。野生型の好中球では、1 μM の fMLF で刺激されてから 30 秒後に ERK のリン酸化レベルが最大となり、その後、徐々に減衰し、5 分後には刺激前のレベルに戻った (図 2A)。一方で、Hv1/VSOP^{-/-}好中球では、ERK のリン酸化は刺激後 60 秒で最大となり、その後野生型と同じレベルまで減衰した (図 2A)。さらに、刺激後 60 秒での ERK のリン酸化の規模が野生型よりも有意に大きいことが分かった (図 2A)。以上の結果から、Hv1/VSOP が ERK の活性化の持続時間と規模を抑制することが明らかになった。10 μM の fMLF で刺激した場合には、野生型と Hv1/VSOP^{-/-}好中球の間で、ERK のリン酸化レベルに差は見られなかった (図 2B)。すなわち、Hv1/VSOP は低濃度の fMLF 刺激依存的に ERK の活性化を抑制する機能を持つことがわかった。

次に、時間依存的な p38 のリン酸化レベルを調べた。しかしながら、野生型と Hv1/VSOP^{-/-}好中球の間で、p38 のリン酸化レベルに違いは見られなかった (図 2C)。

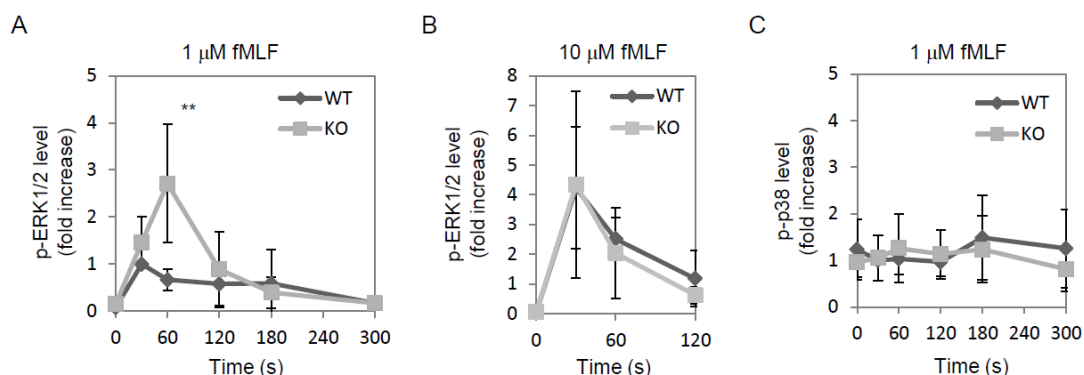


図 2. 時間依存的な ERK と p38 MAPKs の活性化

A と B: 1 μM (A) あるいは 10 μM (B) 刺激下でのリン酸化 ERK レベルを野生型と Hv1/VSOP の機能が欠失した好中球で比較したグラフ。C: 1 μM 刺激下でのリン酸化 p38 レベルを比較したグラフ。A あるいは B の各時間における p-ERK のレベルは、1 μM の fMLF で 30 秒間刺激した野生型の値で標準化した。p-p38 (C) のレベルも、p-ERK の場合と同様の方法で標準化した。ERK: mean \pm SD, n=6 (1 μM fMLF)、n=4 (120s) (n=3) (10 μM fMLF)、**: P < 0.01 (unpaired t-test)。p38: mean \pm SD, n=5 (180s) (n=2) (1 μM fMLF)。

(3) 低濃度の fMLF で刺激された Hv1/VSOP^{-/-}好中球では、活性酸素の産生量が増大していた

fMLF などの走化性因子は、好中球において活性酸素の産生を刺激することが知られていた (Southgate et al., J Immunol 2008,)。また、Hv1/VSOP は ROS の産生を制御する (Okochi et al., BBRC 2009, Chemaly et al., J Expe Med 2010, Sasaki et al., Biochem J 2013)。そこで、fMLF 刺激によって誘導される活性酸素量の測定を試みた。1 μM の fMLF 刺激下で 10 分間 ROS の産生量を測定した結果、野生型よりも Hv1/VSOP^{-/-}好中球において ROS 産生量が有意に増加していることが分かった (図 3A)。一方で、10 μM の fMLF で刺激された場合には、両者に差は見られなかった (図 3B)。すなわち、Hv1/VSOP は低濃度の fMLF 刺激依存的に活性酸素の産生を抑制する機能を持つことがわかった。

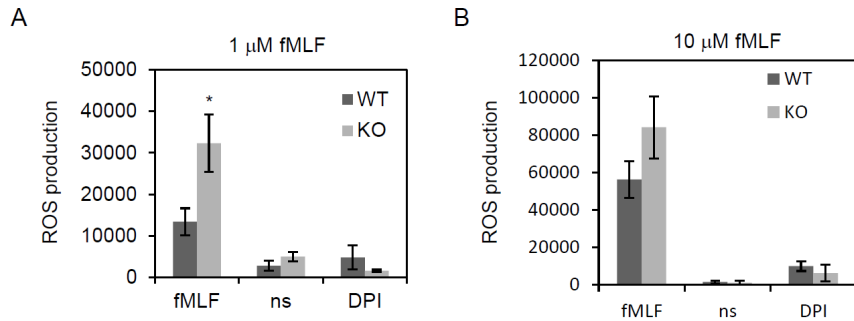


図3. 活性酸素の測定
 グラフは、fMLF刺激直後から10分間のROS産生量（積算）を示す。DPIは活性酸素の産生を阻害する薬剤。10 μ MのDPIで好中球を処理した後、fMLFで刺激した。ns (no stimulus)は、コントロール。mean \pm SEM、n=5、*: p <0.05 (unpaired t-test)

(4) Hv1/VSOP^{-/-}好中球における亢進した ERK の活性化と走化性応答は、活性酸素の産生を抑制することで、正常レベルに回復した

Hv1/VSOP^{-/-}好中球において観察された活性酸素の産生量の増大は、ERK の活性化および走化性を亢進させる主要因であると考えられた。この可能性を検証するために、活性酸素の産生を阻害する薬剤 DPI(ジフェニレンヨードニウムクロリド)を用いて活性酸素の産生を抑制した後、走化性応答と ERK の活性化を調べた。DPI 処理された Hv1/VSOP^{-/-}好中球における 1 μ M の fMLF 刺激に応答した走化性は、DPI 処理されていないものと比べて、有意に低下していた(図 4A)。また、ERK の活性化においても、DPI 処理された Hv1/VSOP^{-/-}好中球では、DPI 処理されていないものと比べて、その活性化レベルが有意に低下していた(図 4B)。すなわち、低濃度の fMLF で刺激された好中球において、Hv1/VSOP は、ROS の産生を抑制することで ERK の活性化を抑制する、ERK の活性化時間と規模を抑制することで走化性応答を抑制するが明らかになった。好中球において Hv1/VSOP が ERK シグナルの制御を介して走化性応答を抑制する機構は、おそらく、感染時に起こる炎症を早期に解決させる役割を担っていると考えられる。

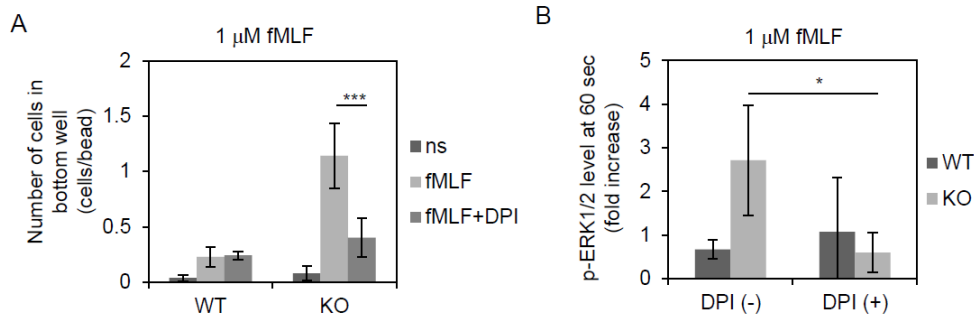


図4. 活性酸素の産生を阻害する薬剤存在下と非存在下における走化性応答(A)と ERKの活性化レベル(B)の評価
 10 μ MのDPIで好中球を処理した後、1 μ M fMLFで刺激した。A:走化性テスト mean \pm SD、n=4、***: p <0.001 (unpaired t-test)、B:60秒間刺激後のリン酸化ERKレベル mean \pm SD、n=4、*: p <0.05 (Tukey-Kramer test)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Okamura Y, Okochi Y. Molecular mechanisms of coupling to voltage sensors in voltage-evoked cellular signals. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 査読有 2019 95(3) 111-135. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.010>

Kawai T, Okochi Y, Ozaki T, Imura Y, Koizumi S, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Yamashita T, Okamura Y. Unconventional role of voltage-gated proton channels (VSOP/Hv1) in regulation of microglial ROS production. Journal of Neurochemistry. 査読有 2017 142(5):686-699. doi: 10.1111/jnc.14106

Okochi Y, Aratani Y, Adissu HA, Miyawaki N, Sasaki M, Suzuki K, Okamura Y. The voltage-gated proton channel Hv1/VSOP inhibits neutrophil granule release. J. Leukoc. Biol. 査読有 2016 99(1)7-19. doi: 10.1189/jlb.3HI0814-393R.

〔学会発表〕(計3件)

Yoshifumi Okochi and Yasushi Okamura. Hv1/VSOP voltage-gated proton channel inhibits migration in response to fMLF in neutrophils. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress. 201903.

Yoshifumi Okochi and Yasushi Okamura. Hv1/VSOP inhibits chemotaxis behavior toward fMLP in mouse neutrophils. 第94回日本生理学会大会. 201703.

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. 201603

〔図書〕(計1件)

大河内善史、川鍋陽、岡村康司 リポクオリティによる膜タンパク質の機能制御と炎症・免疫～炎症抑制にかかわる電位依存性プロトンチャンネル Hv1/VSOP の機能 先端医学社 2017 25(4) 17-22.

6. 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岡村 康司

ローマ字氏名：Yasushi Okamura

研究協力者氏名：梅本 英司

ローマ字氏名：Eiji Umemoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。