

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09499

研究課題名(和文) 免疫・炎症・血栓性疾患における好中球細胞外トラップの役割の解明

研究課題名(英文) The role of neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of immunological, inflammatory, or thrombotic diseases

研究代表者

山下 浩平 (Yamashita, Kouhei)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80402858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：好中球の新たな細胞外殺菌機構として知られる好中球細胞外トラップ(Neutrophil Extracellular Traps, NETs)は感染防御に寄与する一方、細胞外へ放出した組織傷害性の強いヒストンや抗菌蛋白により、種々の免疫・炎症・血栓性疾患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、病態生理が十分に明らかでないIgG4関連疾患の一種である自己免疫性膵炎や、スフィンゴ脂質代謝の異常により母児間の免疫寛容が破綻したため発症する習慣性流産を対象として研究をおこない、その病態形成においてNETsが極めて重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、稀少疾患である自己免疫性膵炎の病態にNETsが関与することを明らかにし、その治療としてNETs産生系制御の可能性を示した。また、母児間の免疫寛容の破綻による流産マウスモデルの解析から、NETsがエフェクターとなり流産を引き起こすことや、NETs産生を抑制するPAD4阻害剤の投与により流産の割合が劇的に低減することを示した。これらは、これまで主に獲得免疫系の異常と考えられた疾患の病態に自然免疫系、特に好中球の異常が深く関わることを示した、学術的に独自性の高い研究成果である。また、原因不明の不妊症の病態の一端を明らかにし、その新規治療の可能性を示したことは極めて社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Neutrophil extracellular traps (NETs), a novel extracellular killing mechanism of neutrophils, are profoundly involved in the pathogenesis of immunological, inflammatory, or thrombotic diseases, due to harmful histons and anti-microbial proteins extracellularly released, although NETs contribute to host defense against microbial pathogens. In this study, we reported that NETs play an important role in the pathogenesis of autoimmune pancreatitis, one of the phenotypes of IgG4 disease, and pregnancy loss due to the disrupt of fetomaternal tolerance by abnormal sphingolipid metabolisms, such as defect of sphingosine kinases.

研究分野：血液内科学

キーワード：好中球細胞外トラップ IgG4関連疾患 自己免疫性膵炎 不妊症 スフィンゴ脂質 スフィンゴシンキナーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

好中球の新たな細胞外殺菌機構として知られる好中球細胞外トラップ（Neutrophil Extracellular Traps, NETs）は、殺菌により感染防御に寄与する一方、細胞外へ放出した傷害活性の強いヒストンや顆粒抗菌蛋白などにより組織傷害や臓器不全を引き起こすことが近年数多く報告され、生体にとって「諸刃の剣」と考えられている。本研究では、感染防御機構の一翼を担う NETs が、種々の免疫・炎症・血栓性疾患の病態形成に深く関与するとの仮説に基づき、その病態形成の分子基盤を解明することを目的とする。

IgG4 関連疾患は本邦から提唱された疾患概念であるが、その病態生理はいまだ不明な点が多い。IgG4 関連疾患は、膵臓・胆管・唾液腺などに IgG4 を産生する形質細胞が浸潤し、高 IgG4 血症をきたす原因不明の免疫・炎症性疾患とされる。その病態に T リンパ球サブセットにおける Th2 シフトや制御性 T 細胞が関与する報告があり、獲得免疫系の破綻、即ち自己免疫疾患である可能性が示唆されている。しかしながら、マウスが IgG4 を有しないことなどから疾患動物モデルが限定しており、その詳細な病態は明らかでない。これまで我々は、病原微生物由来因子である Toll-like 受容体や NOD-like 受容体リガンドの刺激に対する単球や好塩基球の反応が IgG4 関連疾患患者において増強していることを明らかにした（Watanabe, Yamashita et al. *Arthritis Rheum* 2012. Watanabe, Yamashita et al. *J Gastroenterol* 2013.）。本研究では、IgG4 関連疾患における NETs の役割について研究を進めていく。

さまざまな細胞活性を有し生体の調節に重要な脂質として注目を浴びている sphingosine-1-phosphate (S1P) は、pro-inflammatory に作用して敗血症の病態に深く関与することが報告されているが、S1P 合成酵素である sphingosine kinase (SphK) 欠損マウスの解析から、リポ多糖類の刺激に対してマクロファージが pro-inflammatory に反応しないなど相反する報告も複数なされており、敗血症における S1P の役割は未だ確定していない。また、S1P は血管内で主に赤血球や血小板から産生されることから血栓形成に深く関与すると考えられるが、敗血症に伴う血栓形成における役割は明らかでない。我々のこれまでの研究から、*SphK1^{-/-}SphK2^{+/-}*マウスが母児間免疫寛容の破綻によると考えられる習慣性流産（不育症）を示し、その原因として、子宮脱落膜組織が産生するケモカイン CXCL1 および CXCL2 に反応して子宮組織へ浸潤して異常活性化をきたした好中球による組織や血管の傷害が主であることを見出した（Mizugishi, Yamashita et al. *J Biol Chem* 2015.）。この背景をもとに、本研究では、このスフィンゴ脂質代謝異常を有するマウスモデルの解析などから、血管などの組織傷害や血栓症における NETs の役割について研究をおこなっていく。

2. 研究の目的

「1. 研究の背景」でも述べたように、本研究では、生体において感染防御の一翼を担う NETs が、免疫・炎症・血栓性疾患の病態形成へどのように関わるのかについて、これまで十分にその病態が明らかとなっていない IgG4 関連疾患（自己免疫性膵炎）や習慣性流産（不育症）を対象として明らかにすることが目的である。この目的を達成するために、それぞれの疾患モデルマウスや患者検体などを利用して解析をおこなう。

3. 研究の方法

① IgG4 関連疾患における NETs の役割

健常人および IgG4 関連疾患（自己免疫性膵炎）の末梢血から好中球、B 細胞、形質細胞様樹状細胞（pDC）などを分離する。好中球については、danger signal の一つである尿酸結晶刺激に

よる NETs 産生を *in vitro* で測定したり、二重鎖 DNA やミエロペロキシダーゼに対する抗体などを用いて患者膵臓標本の NETs を検出したりする。B 細胞と pDC の *in vitro* 共培養系に NETs を添加し、上清の IgG4 産生や、その産生系に関与する因子 (IFN- α 、B cell activating factor (BAFF)、IL-33 など) の産生について ELISA などを用いて測定する。また患者膵臓標本の免疫染色でこれら因子の産生を確認する。さらに、IFN- α 産生系に関わる因子である IRF-7 や NF- κ B の活性化なども測定する。

また、MPL/Mp マウスに poly I:C 刺激を週 2 回、12 週間投与するという自己免疫性膵炎 (AIP) マウスモデルを利用して、血清中の NETs や、IFN- α 、BAFF、IL-33 などの IgG4 産生系に関わる因子を測定する。さらに、マウスの膵臓組織においてこれらの因子の発現を確認する。また、IFN- α 、BAFF、IL-33 などの中和抗体や制御因子を投与して膵炎が低減されるかどうかを調べることなどにより、AIP 発症のメカニズムについて検討する。

② スフィンゴ脂質代謝異常マウスモデルを用いた流産における NETs の役割

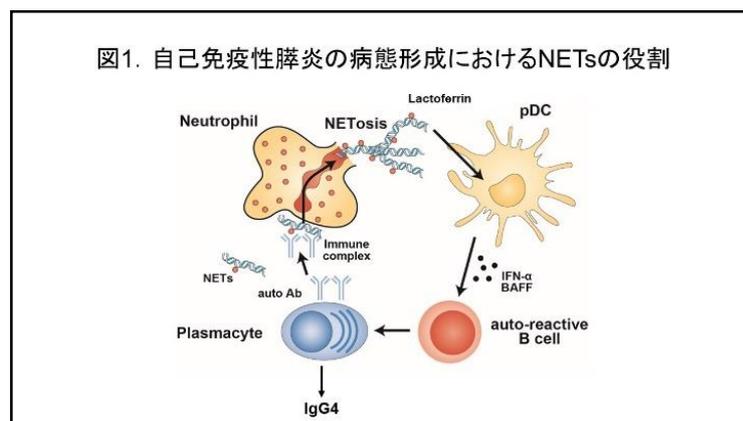
我々のこれまでの研究で、*SphK1*^{-/-}*SphK2*^{+/+}雌マウスは妊娠するものの E7.5 の段階で子宮脱落膜がケモカインである CXCL1,2 を極めて過剰に発現することによって子宮組織へ好中球を浸潤させ、子宮で活性化した好中球が血管内皮細胞などを傷害することにより流産をもたらすことが示されている (Mizugishi et al. *J Clin Invest* 2007., Mizugishi, Yamashita et al. *J Biol Chem* 2015.)。本研究では、NETs の組織傷害活性による可能性を考え、このマウスモデルにおいて、子宮組織における NETs をシトルリン化ヒストン H3 や好中球エラスターゼなどに対する抗体を用いて検出を試みる。また、NETs の制御因子である PAD4 阻害剤などを投与することにより、流産の低減がもたらされるか否かを組織染色などをおこない調べる。

4. 研究成果

① IgG4 関連疾患における NETs の役割

IgG4 関連疾患 (AIP) 患者検体 (膵臓組織、末梢血) や AIP モデルマウスである poly I:C 処理 MRL/Mp マウスを用いた解析の結果、①膵臓内の NETs が pDC に作用して pDC から IFN- α や BAFF の産生をもたらすこと、②これら液性因子の作用

によって B 細胞の活性化や成熟を経て形質細胞から IgG4 産生が促されること、③ AIP 患者ではこの系が異常に活性化していること、が明らかとなった。また NETs による pDC の活性化には、好中球の顆粒蛋白の一つであるラクトフェリンとそれに対する自己抗体とによる免疫複合体が関与する所見が得られ、AIP の病態の病態に自己免疫学的な機序が存在する可能性が示された (図 1)。



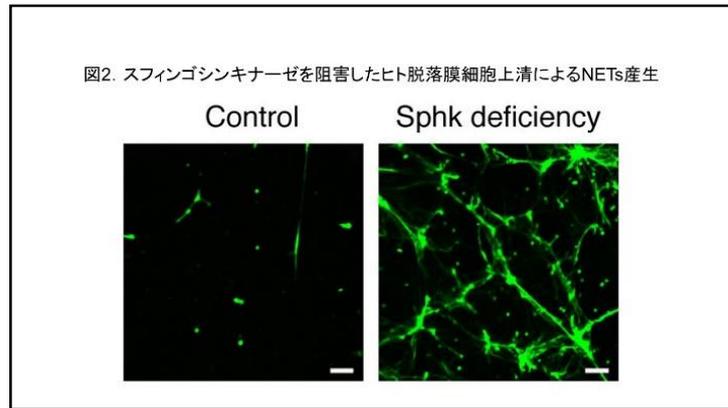
ラクトフェリンとそれに対する自己抗体とによる免疫複合体が関与する所見が得られ、AIP の病態の病態に自己免疫学的な機序が存在する可能性が示された (図 1)。

さらに、この AIP モデルマウスにおいて、①膵臓に浸潤した pDC が IFN- α や IL-33 を産生すること、②pDC や IFN- α の中和抗体を投与することにより、膵臓の炎症や線維化が劇的に改善すること、③抗 ST2 抗体で IL-33 のシグナル伝達を阻害することにより、膵臓の炎症や線維化が改善すること、を明らかにした。また AIP 患者の膵臓組織においても IL-33 を産生する pDC の

浸潤が認められたことから、AIP の病態形成には IFN- α や IL-33 を産生する pDC が重要な役割を果たすことが示唆された。

② スフィンゴ脂質代謝異常マウスモデルを用いた流産における NETs の役割

129Sv/C57BL/6 バックグラウンドの *SphK1^{-/-}SphK2^{+/+}* 雌マウスの流産モデルの検討から、好中球顆粒蛋白であるエラスターゼ、シトルリン化ヒストン H3、DNA に対する特異抗体を用いて免疫染色をおこなったところ、流産マウスの子宮組織ではこれらが陽性に染まる多量の好中球が検出され、NETs が大量に存在することが示された。また、NETs 産生を抑制することが知られる PAD4 阻害剤である Cl-amidine を妊娠 day 5 および 7 に投与したところ、流産するマウスの割合が 100% から約 30% にまで減少すること、そしてこれらの流産が回避できたマウスの子宮組織には NETs がほぼ検出できな



いレベルまで低減していること、が示された。さらに、ヒト脱落膜細胞に sphingosine kinase 阻害剤である DMS を加えて 48 時間培養して得られた上清で健常人好中球を刺激した場合、DMS 非添加群の上清で刺激した場合と比べ、有意に大量な NETs 産生が認められた (図 2)。

以上の結果から、この流産モデルマウスにおいて NETs がエフェクターとして作用することにより子宮組織傷害をもたらして流産を引き起こしていることが示唆され、同様の機序がヒトの流産にも起こっている可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Mizugishi K, Yamashita K. Neutrophil extracellular traps are critical for pregnancy loss in sphingosine kinase-deficient mice on 129Sv/C57BL/6 background. *FASEB J*, 31, 5577-91, 2017. 査読有. doi: 10.1096/fj.201700399RR.
- ② Watanabe T, Yamashita K, Arai Y, Minaga K, Kamata K, Nagai T, Komeda Y, Takenaka M, Hagiwara S, Ida H, Sakurai T, Nishida N, Strober W, Kudo M. Chronic fibro-inflammatory responses in autoimmune pancreatitis depend on IFN- α and IL-33 produced by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*, 198, 3886-96, 2017. 査読有. doi: 10.4049/jimmunol.1700060.
- ③ Watanabe T, Yamashita K, Kudo M. IgG4-related disease and innate immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*, 401, 115-28, 2017. 査読有. doi: 10.1007/82_2016_42.
- ④ Arai Y, Yamashita K, Kuriyama K, Shiokawa M, Kodama Y, Sakurai T, Mizugishi K, Uchida K, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Kudo M, Okazaki K, Strober W, Chiba T, Watanabe T. Plasmacytoid dendritic cell activation and IFN- α production are prominent features of murine autoimmune pancreatitis and human IgG4-related autoimmune pancreatitis. *J Immunol*, 195, 3033-44, 2015. 査読有. doi: 10.4049/jimmunol.1500971.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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：<https://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~hemonc/research/defense.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：水岸貴代美

ローマ字氏名：Mizugishi Kiyomi

※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。