

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06937

研究課題名(和文) 免疫系特異的オートファジー制御因子Rufy4による炎症応答制御

研究課題名(英文) Inflammatory response regulation by immune system specific autophagy regulator Rufy4

研究代表者

寺脇 正剛 (TERAWAKI, Seigo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60437217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では免疫系特異的オートファジー制御因子Rufy4の病理学的および生理学的機能の解明を目的とし、Rufy4を恒常的に発現する好中球の細胞死NETosisへの影響について調べた。野生型およびRufy4欠損マウスの腹腔洗浄液から単離した好中球をPMAにより刺激しNETosisを誘導したところ、野生型好中球ではクロマチンDNAを大きく放出する典型的なNETosisが認められたのに対し、Rufy4欠損マウス由来の好中球では細胞死は誘導されるものの、形成されるNETsは顕著に縮小していた。以上の結果はRufy4がNETosisの進行やNETsの形成において重要な機能を持っていることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好中球は感染初期における生体防御を担っており、感染の負荷が高い場合にはNETosisとよばれる細胞死を誘導し、分泌顆粒内の消化酵素とともに自らのクロマチンDNAを放出して細菌を物理的に捕捉殺菌していることが知られているが、その分子メカニズムはまだ不明な点が多い。本研究において免疫系特異的オートファジー制御因子であるRufy4がNETosisの進行に重要な機能を持っていることが示唆された。NETosisは自己免疫疾患や血管炎、さらにはCOPDやCOVID-19など炎症性肺疾患への関与も指摘されており、本研究はこれら難治性炎症疾患の病態解明や治療法開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathophysiological function of immune system-specific autophagy regulator Rufy4 which is constantly expressed in neutrophil, we investigated the involvement of Rufy4 in NETosis progression. Non-inflammatory neutrophils are isolated from wild type, or rufy4-deficient mice peritoneal wash by density-gradient centrifugation. Although NETosis was induced both in wild type and rufy4 deficient neutrophils, NETs expelled from rufy4 KO neutrophil was drastically reduced as compared to wild type. This result suggested that Rufy4 has a critical role in NETosis progression, but not in initiation.

研究分野：分子免疫学、分子細胞生物学、医化学

キーワード：オートファジー メンブレントラフィッキング NETosis 炎症性疾患 分子免疫制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、隔離膜と呼ばれる脂質二重膜によって細胞質内のタンパク質やオルガネラを取り込み、リソソームと融合することによってその内容物を消化する細胞内の分解機構のひとつであり、一般的には細胞の恒常性維持機構として機能していると捉えられている。一方、免疫応答を担う細胞群においても、オートファジーは重要な機能を持っている。細胞質内のタンパク抗原(内在性抗原)がオートファジーによって分解されると、分解によって生じた抗原ペプチドは抗原提示細胞上のMHCクラスII分子に提示され、CD4陽性T細胞を活性化させる。また自己抗原以外にも細胞内に寄生する細菌や原虫などの寄生体も内在性抗原としてオートファジーのメカニズムによって排除されるなど生体防御機構(ゼノファジー)の一環として機能しており、免疫系ではオートファジーは単なる分解システムではなく、免疫応答制御機構の1つとして機能していると考えられる。

われわれは免疫系でもっとも抗原提示機能の高い樹状細胞におけるオートファジー制御機構について研究を行ってきた。その過程において、抗体産生やアレルギー応答において主要な働きをもつサイトカインIL-4の存在下で分化誘導した樹状細胞ではオートファジーが亢進していることを見いだした。さらにこのIL-4刺激によって樹状細胞に発現誘導される遺伝子からオートファジーを促進する新規の分子Rufy4を同定した(*J Cell Biol.*, 2015)。Rufy4は非免疫系の培養細胞に強制発現させてもその細胞におけるオートファジーを亢進させるとともに、導入したRufy4を中心としてオートファゴソームが集積し、その周囲を多数のリソソームが取り囲むという極めてユニークな細胞内構造体が形成される。この構造体にはLC3やRab7、Stx17などオートファジー制御に関わるとされる分子群が共局在しており、構造体の形成がオートファジーの亢進に大きく寄与していると予想されたが、Rufy4とこれらの分子との間にどのような機能的相関があるのか、またRufy4がオルガネラのトラフィッキングをどのように制御しているのかについては十分に研究が進んでおらず、Rufy4によるオートファジー活性化の分子機序はまだ解明に到っていない。

またRufy4によるオートファジー活性化の分子機序に加え、免疫応答におけるRufy4の生理学的意義も不明であった。これまでの研究によりIL-4が樹状細胞にもたらすオートファジーの活性化により内在性抗原特異的なCD4陽性T細胞の活性化を惹起すること、Rufy4を発現する細胞では細胞内寄生細菌であるブルセラ菌の排除が促進されることなどから、少なくともRufy4は細胞内寄生体に対する自然免疫応答(貪食)および獲得免疫応答(液性免疫)の双方に寄与していると考えられる。さらにRufy4は樹状細胞以外にも好中球や肺胞マクロファージにおいて発現が認められることが明らかとなり、Rufy4はオートファジーをはじめとしたメンブレントラフィックの制御機能を介して、幅広い免疫応答や炎症応答に関与していることが強く示唆された。以上の経緯から、われわれは免疫系における広範なRufy4の生理学的機能を*ex vivo*および*in vivo*レベルで詳細に解明するため、CRISPR/Cas9システムによりノックアウトマウスを作製し、解析を行うこととした。

2. 研究の目的

アレルギー性疾患や自己免疫疾患、自己炎症性疾患は、免疫制御機構の異常によってもたらされる。その発症機序には未だ不明な点が多いが、免疫系の司令塔たる樹状細胞やマクロファージによるT細胞の分化制御、その下流におけるサイトカイン環境に遺伝因子・環境因子が与える影響などが病態形成に深く関与していると考えられており、その分子機序を逐一明らかにすることが疾患発症機構の解明と治療に向けた取り組みには不可欠である。

NETosisは好中球における細胞死の一形態で、細菌感染に対して防御的に機能する一方、その残骸がDAMPs(ダメージ関連分子パターン)として認識され自己免疫病など炎症性疾患の病態形成に関わっていることが指摘されている。NETosisそのものの詳細なメカニズムも明らかにはなっていないが、その進行過程にはオートファジー機構が必須であるという報告がある。実際NETosisの最終段階ではリソソームを含め好中球の全ての細胞内小器官が消滅することから、NETosisは究極のオートファジーの一形態であると考えられることもできる。免疫系特異的なオートファジー制御因子Rufy4は好中球においては恒常的に発現しており、オートファジーを制御するRufy4がNETosisの進行過程に関与している可能性は高い。そこでRufy4欠損マウス由来の好中球を用い*ex vivo*にてNETosisを誘導し、NETosisにおけるRufy4の寄与について評価を行なった。

3. 研究の方法

(1) Rufy4 遺伝子欠損好中球における NETosis の誘導

野生型および Rufy4 欠損マウスにカゼインを細胞回収の 24 時間前と 4 時間前の 2 回腹腔内投与し、非感染性の好中球を誘導した。カゼイン投与マウスの腹腔を 2% FCS 含有 PBS にて洗浄し、浮遊細胞を回収した。腹腔洗浄液から遠心にて回収した細胞を 63% Percoll に重層して密度勾配遠心にて分離したのち、混入した赤血球を溶血させて得られた細胞画分を好中球として単離した。好中球の純度はサイトスピンサンプルのメイギムザ染色により、常に 95%以上の純度であることを確認した。この初代培養好中球を無血清 RPMI 培地に懸濁し 100nM の PMA もしくは 25 μ M A23187 (カルシウムイオノフォア) で 4 時間刺激して NETosis を誘導した。4 時間後細胞を 4% PFA で固定し、DAPI のみ、もしくは膜透過処理を施した後に抗シトルリン化ヒストン抗体、抗好中球エラスターゼ抗体および DAPI にて染色し、スライドグラスに封入した。NETosis の誘導は蛍光顕微鏡によるイメージングにより解析した。

(2) NETs 付随エラスターゼ活性の測定による NETosis の定量

NETosis の誘導は不均一であることが知られており、また NETosis が誘導された好中球をイメージングから定量的に解析するのは難しい。今回われわれは NETosis によって放出される NETs に付随するエラスターゼ活性を生化学的に定量することにより Rufy4 の欠損が NETosis に与える影響について検討をおこなった。(1)と同様にマウスから好中球を単離し、PMA もしくは A23187 で NETosis を誘導した。4 時間の薬剤処理後上清を除去し、細胞を 2 回洗浄して、分泌もしくは通常の細胞死に起因する遊離エラスターゼを除去した。その後 S7 ヌクレアーゼを含む酵素液を加えて NETs のクロマチン DNA を 1 時間分解処理したものを NETs 付随エラスターゼのサンプルとして得た。このサンプルをエラスターゼの人工基質である (Z-Ala-Ala-Ala-Ala)2Rh110 に加えて反応させ、蛍光強度からエラスターゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) NETosis の誘導における Rufy4 欠損の影響

PMA により刺激された野生型マウス由来の好中球では、クロマチン DNA を大きく放出する NETosis が認められた。Rufy4 欠損マウス由来の好中球でも分葉核が消失し NETosis 様の細胞死は誘導されるものの、形成される NETs が顕著に縮小していた (図 1A)。一方、A23187 で誘導した NETosis では両者に顕著な差は認められなかった。

図 1

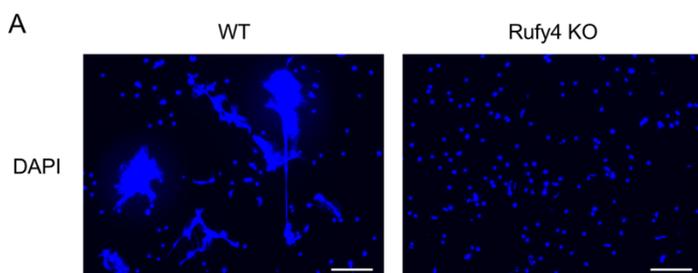


図 1A. Rufy4 欠損好中球における NETosis の誘導

野生型マウス由来 (左) および Rufy4 欠損マウス由来 (右) の好中球を 100nM PMA により刺激し NETosis を誘導した。NETosis に伴って放出された NETs (クロマチン DNA) を DAPI 染色により可視化した。(Scale bar: 100 μ m)

次に細胞染色により、野生型および Rufy4 欠損好中球における NETosis 関連因子の動態について検討をおこなった。その結果、Rufy4 欠損好中球ではヒストン H3 のシトルリン化が低下しており、大部分のエラスターゼが DNA とともに放出されず、細胞内に残存している様子が観察された (図 1B)。

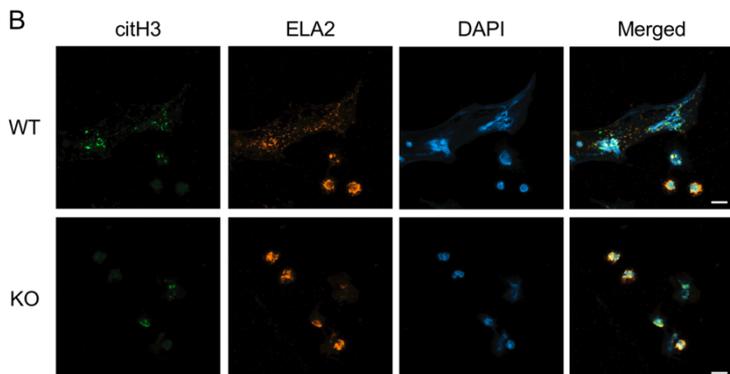


図 1B. Rufy4 欠損好中球における NETosis 関連分子の免疫蛍光染色

野生型 (上段) および Rufy4 欠損 (下段) 好中球を 100nM PMA により刺激し NETosis を誘導したのち固定し、各抗原に対する抗体で染色した。緑: シトルリン化ヒストン (CitH3)、赤: 好中球エラスターゼ (ELA2)、青: DAPI (Scale bar: 10 μ m)

(2) NETs 付随エラスターゼ活性の測定による NETosis の定量

イメージング解析より、Rufy4 欠損マウスでは NETosis は開始されるものの、放出される NETs の量が減少していることが示唆された。これを定量的に評価するため、NETs の構成成分であるクロマチン DNA に付随して放出される好中球エラスターゼの活性の測定をおこなった。その結果 S7 ヌクレアーゼ依存的に検出されるエラスターゼ活性、すなわち NETs 付随エラスターゼの活性は、Rufy4 欠損マウスでは有意に減少しており、イメージングのデータで認められた NETosis に伴って放出される NETs の減少が裏付けられた (図 2)。

図 2

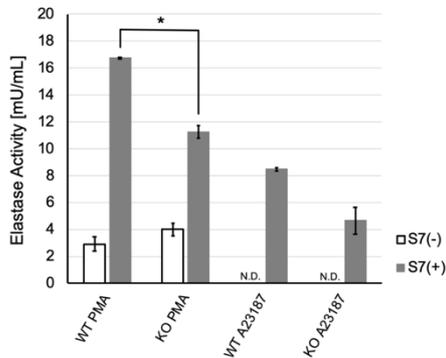


図 2. 好中球エラスターゼの活性測定による NETs の定量 NETosis を誘導した野生型 (WT) および Rufy4 欠損 (KO) 好中球を洗浄後に S7 ヌクレアーゼ処理を行い (S7+)、NETs に由来するエラスターゼの人工基質に対する活性を測定した。
(average±S.D., * < 0.05, Welch' s t test)

従前の研究においても NETosis の進行過程においてオートファジーにおける隔離膜と同様の脂質二重膜が出現することが報告されており、オートファジーの分子機構が NETosis の進行に寄与していることが強く示唆されていた。本研究では、免疫系において特異的に機能するオートファジー制御因子 Rufy4 が好中球においても発現していることから、Rufy4 が NETosis の進行過程において重要な役割を持っているという可能性について検討した。その結果、Rufy4 欠損好中球においても NETosis は開始されるものの、NETs の形成は顕著に抑制されていた。Rufy4 は NETosis の開始には必要ではないが、NETs の形成と放出の前段階として必須となる核や細胞内顆粒といった細胞内小器官の除去を介して NETosis の進行に寄与していると推察される。これまでも Rufy4 は抗原提示細胞におけるゼノファジーや内在性抗原提示によって細菌感染における生体防御に寄与していることが示唆されていたが、今回の研究において好中球を介した自然免疫応答においても、これまでと全く異なるメカニズムにより Rufy4 が病原体の排除機構に関わっていることが明らかとなった。NETosis は本来このように細菌感染などにおいて外来微生物の排除に寄与する一方で、放出された NETs が DAMPs として認識され、自己免疫疾患などにおいて重篤な炎症病態を形成することが知られている。また不完全な NETosis の結果生じた NETs が抗原となり MPO-ANCA 関連血管炎が誘導されることも指摘されており、NETosis の分子メカニズムを理解することは NETosis が関与する炎症性疾患の病態を明らかにする上でも重要であると考えられる。今後も引き続き Rufy4 を介した NETosis 分子機構の解明と *in vivo* における病態生理学的意義を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oikawa Daisuke, Sato Yusuke, Ohtake Fumiaki, Komakura Keidai, Hanada Kazuki, Sugawara Koji, Terawaki Seigo, Mizukami Yukari, Phuong Hoang T., Iio Kiyosei, Obika Shingo, Fukushi Masaya, Irie Takashi, Tsuruta Daisuke, Sakamoto Shinji, Tanaka Keiji, Saeki Yasushi, Fukai Shuya, Tokunaga Fuminori	4. 巻 3
2. 論文標題 Molecular bases for HOIPINs-mediated inhibition of LUBAC and innate immune responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0882-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Shuhei et al.	4. 巻 22
2. 論文標題 LC3 lipidation is essential for TFEB activation during the lysosomal damage response to kidney injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1252 ~ 1263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-020-00583-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Iwasaki Naruhito, Terawaki Seigo, Shimizu Kouhei, Oikawa Daisuke, Sakamoto Hirokazu, Sunami Kishiko, Tokunaga Fuminori	4. 巻 16
2. 論文標題 Th2 cells and macrophages cooperatively induce allergic inflammation through histamine signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0248158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyashita Hirohisa, Oikawa Daisuke, Terawaki Seigo, Kabata Daijiro, Shintani Ayumi, Tokunaga Fuminori	4. 巻 12
2. 論文標題 Crosstalk Between NDP52 and LUBAC in Innate Immune Responses, Cell Death, and Xenophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.635475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwasaki Naruhito, Terawaki Seigo, Shimizu Kouhei, Oikawa Daisuke, Sakamoto Hirokazu, Sunami Kishiko, Tokunaga Fuminori	4. 巻 70
2. 論文標題 Th2 cell-derived histamine is involved in nasal Th2 infiltration in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 539 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00011-021-01458-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Komakura K., Oikawa D., Terawaki S., Sakamoto S., Mizukami Y., Sugawara K., Tsuruta D., Tokunaga F.
2. 発表標題 HOIPIN-1, a novel LUBAC inhibitor, suppresses the imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice
3. 学会等名 Society for Investigative Dermatology 77th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://osaka-cu-1seika.umin.jp/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------