

令和 3 年 5 月 4 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07432

研究課題名(和文)好中球のNETsを起点とする血栓症の早期診断法の開発

研究課題名(英文)Development of early diagnosis of thrombosis induced by neutrophil extracellular traps

研究代表者

通山 由美 (Tohyama, Yumi)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：70362770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Neutrophil extracellular traps(NETs)は、好中球のクロマチンが網状に変化して病原微生物を捉える生体防御機構である。本研究では、NETsが血小板を刺激して血栓症を誘発することに注目し、NETs形成機構の解明と血小板を活性化するNETs成分の同定をめざした。ノックアウト型好中球モデルを活用して、NETs形成プロセスで生じる細胞内化学反応を解析し、好中球の細胞骨格の制御が、NETs形成に必須であることを見いだした。さらに、好中球に多く存在する2種類のタンパク質を、NETs由来の血小板活性化候補分子として検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Neutrophil extracellular traps(NETs)は、好中球のクロマチンが網状構造に変化して病原微生物を捉える生体防御機構であるが、近年、NETs成分が血小板を刺激して血栓症を誘発することが新たな病態として注目されている。そこで本研究では、NETs形成の分子メカニズムと、NETsが血小板の活性化を介して血栓症に至るプロセスの解明に取り組んだ。研究成果の学術的意義として、好中球の細胞骨格の制御が、NETs形成に必須であることを見いだした。さらに社会的意義として、NETs由来の2種類のタンパク質を血小板活性化候補として提案した。血栓症の早期診断法の開発に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Neutrophil extracellular traps (NETs) formation is a biological defense mechanism in which neutrophil chromatin changes into a meshwork to capture pathogenic microorganisms. In this study, we focused on the fact that NETs stimulate platelets to induce thrombosis, and aimed to elucidate the mechanism of NETs formation and to identify the NETs components that activate platelets. Using a knockout neutrophil model, we analyzed the intracellular chemical reactions that occur during NETs formation and found that regulation of the neutrophil cytoskeleton is essential for NETs formation. Furthermore, we are investigating two proteins that are abundant in neutrophils as candidate molecules for NETs-derived platelet activation.

研究分野：生化学、免疫学

キーワード：好中球 NETs

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Neutrophil extracellular traps (NETs) は、好中球のクロマチンが弛緩して網状構造に変化し、病原微生物を一挙に捕捉するしくみである。抗菌顆粒と共に働くことで効果的に感染の拡大を防御する。

(2) 近年、NETs 成分により血小板が活性化して血小板血栓を形成し、脳梗塞や心筋梗塞などの重篤な血栓症を誘発することが、新たな病態として注目されている。NETs を早期に検出してそれを制御する方法を見いだせば、血栓症の早期診断と治療に役立つが、NETs 形成から血小板の活性化に至る分子メカニズムは解明されていない。

## 2. 研究の目的

好中球の NETs を起点とする血栓症の早期診断法の開発を目的とする。その達成のために、以下の(1)(2)の具体的な目標を設定した。

(1) NETs 形成の分子メカニズムを明らかにするため、NETs 形成過程に必須の細胞内化学反応を見いだす。

(2) 血小板血栓を惹起する NETs 成分を明らかにして、血栓症の早期診断に有用な NETs 特異的成分を提案する。

## 3. 研究の方法

以下の(1)～(3)のプロセスで研究を進めた。

### (1) NETs 形成過程に特異的なタンパク質の翻訳後修飾の同定

NETs 形成過程に必須の細胞内化学反応を見いだすため、NETs 誘導試薬 PMA で、好中球を刺激して、網羅的質量分析をおこない、NETs 形成に特異的な翻訳後修飾を探索した。具体的には、好中球を刺激後、NETs 形成の進行に応じて以下の①～の段階にわけて、各段階のサンプルを回収した。好中球は刺激後の時間経過と共に、核の分葉構造が消失し、その後、核内クロマチンが徐々に弛緩して、ヒストンに巻きついた核酸 DNA が崩壊する。さらに、核膜が崩壊して核酸 DNA と細胞質成分が混ざりあう。最終的に、細胞膜も崩壊して網状のクロマチンが NETs として細胞外に放出される。進行段階の検出には、核酸に結合する細胞膜透過性、不透過性の2種類の蛍光色素を活用した。各サンプルについて網羅的質量分析、および修飾部位特異的な抗体によるウエスタンブロッティングをおこない、NETs 形成過程で有意に変動する翻訳後修飾を同定した。

### (2) 変異型好中球モデルの作成

(1)で見いだした翻訳後修飾に関与する5種類のタンパク質について、遺伝子編集技術を活用して、ノックアウト(KO)型好中球モデルを作成した。具体的には、好中球様に分化できるヒト白血病細胞株、HL60 に、各タンパク質に対する guide RNA と CRISPR/Cas9 をエレクトロポレーション法で導入した。ノックアウト細胞のスクリーニングは、標的分子の特異的抗体によるウエスタンブロッティング法でおこない、ダイレクトシーケンス法で最終的な配列を確認した。

### (3) 変異型好中球モデルの NETs 形成プロセスへの影響の解析

作成した KO 型 HL60 を好中球様に分化するため、ATRA(All-trans retinoic acid)存在下で4日間培養して好中球モデルとし、NETs 形成プロセスへの影響を解析した。NETs 放出までの形態学的解析には、細胞膜透過性(Hoechst 33342)、不透過性(SYTOX Green)の2種類の核酸結合蛍光色素を活用した。また、NETs 形成進行のマーカーとして、PAD4 によるヒストンのシトルリン

化を抗シトルリン化ヒストン抗体によるウエスタンブロットング法で検出した。

#### 4. 研究成果

(1) 質量分析法等を活用して、NETs 形成過程で特異的に変化する翻訳後修飾を網羅的に解析し、得られた結果から、有意に変動するタンパク質を選択して、修飾部位特異的な抗体によるウエスタンブロットング法でさらに解析し、NETs 形成過程で重要なタンパク質の候補を同定した。

(2) (1)の結果より、5種類のタンパク質を標的分子として、K0型好中球モデルを作成した。好中球様に分化できるヒト白血病細胞株,HL60に、遺伝子編集技術(CRISPR/Cas9)を応用し、ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)ファミリータンパク質,P4HB、プロテイン S100ファミリータンパク質のプロテイン S100A8,S100A9、チロシンキナーゼ,Syk、低分子量 G タンパク質,Rab27Aについて、K0型 HL60細胞を作成した。

(3) 野生型および各 K0型 HL60細胞を ATRA 存在下で4日間培養し、好中球様に分化・成熟させて NETs 形成への影響を解析した。その結果、①～③で示す通り、各細胞について、異なる段階での影響が認められた。

P4HB-K0型 HL60細胞では、好中球様分化で誘導される核の分葉の抑制が認められた。

プロテイン S100A8、S100A9は、ヒト好中球の NETs 形成過程において、特に多くのアミノ酸に翻訳後修飾の変化が認められたタンパク質である。S100A8とS100A9でヘテロダイマーを形成し、炎症時に血液中の濃度が高まることが知られている。両タンパク質は共に、未分化な HL60細胞では発現が認められないが、ATRA 存在下で好中球様に分化すると3日目以降に発現量が急増した。さらに、各 K0型 HL60細胞についてウエスタンブロットングで解析すると、S100A8-K0型 HL60細胞では、S100A9の発現抑制が、S100A9-K0型 HL60細胞では、S100A8の発現抑制が確認された。タンパク質の発現段階での相互関与のメカニズムについては、解析途中である。NETs 形成刺激後の経時的解析により、プロテイン S100A8、S100A9は、刺激4時間後には培養上清に放出されており、NETs 成分由来の血小板活性化分子の候補として検討を進めている。

Syk-K0型 HL60細胞では、好中球様に分化誘導後の補体依存性ファゴサイトーシスにおいて、活性酸素種の産生が有意に減少していた。活性酸素種は、NETs 形成と共に、好中球の殺菌機能の主要な成分であり、その抑制メカニズムについても検討中である。さらに Syk については、好中球同様に食細胞であるマクロファージの機能への影響について解析した。Syk が細胞骨格タンパク質、アクチンの制御を介して、リソソームと食胞の融合(ファゴリソソームの形成)その結果としての食胞酸性化を促進することを見いだした。細胞骨格の制御は、NETs 形成に必須であり、Syk による細胞骨格タンパク質、アクチンの制御を介した NETs 形成制御機構についての検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tabata H, Morita H, Kaji H, Tohyama K, Tohyama Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Syk facilitates phagosome-lysosome fusion by regulating actin-remodeling in complement-mediated phagocytosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22086
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79156-7	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 Morita Hiroyuki, Matsuoka Akihito, Kida Jun-ichiro, Tabata Hiroyuki, Tohyama Kaoru, Tohyama Yumi	4. 巻 108
2. 論文標題 KIF20A, highly expressed in immature hematopoietic cells, supports the growth of HL60 cell line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 607 ~ 614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-018-2527-y	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 -

1. 著者名 Kida Jun-ichiro, Tsujioka Takayuki, Suemori Shin-ichiro, Okamoto Shuichiro, Sakakibara Kanae, Takahata Takayuki, Yamauchi Takahiro, Kitanaka Akira, Tohyama Yumi, Tohyama Kaoru	4. 巻 32
2. 論文標題 An MDS-derived cell line and a series of its sublines serve as an in vitro model for the leukemic evolution of MDS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1846 ~ 1850
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-018-0189-7	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroyuki Tabata, Yumi Tohyama
2. 発表標題 Protein Tyrosine Kinase, Syk accelerates phagosome maturation by depolymerizing F Actin in complement mediated phagocytosis
3. 学会等名 ASBMB (American Society for Biochemistry and Molecular Biology) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田畑裕幸, 森田寛之, 通山由美
2. 発表標題 チロシンキナーゼSykによるファゴソーム成熟機構の調節
3. 学会等名 第66回日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田畑裕幸, 森田寛之, 通山由美
2. 発表標題 チロシンキナーゼSykはファゴソーム膜におけるF - アクチン形成を調節する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田知明, 田畑裕幸, 通山由美
2. 発表標題 CRISPR-Cas9を利用したシグナル分子ノックアウト細胞の構築とTNF- 産生への影響- ヒト白血病細胞株HL60を用いた検討
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yumi Tohyama, Hiroyuki Tabata, Kaoru Tohyama
2. 発表標題 Syk plays an essential role in phagosome-lysosome fusion by facilitating actin-remodeling in complement mediated phagocytosis.
3. 学会等名 61st ASH(American Society of Hematology) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田寛之, 田畑裕幸, 通山由美
2. 発表標題 好中球のNeutrophil Extracellular Traps (NETs)形成機構におけるProtein S100-A8の機能の解析
3. 学会等名 第65回日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川井真好, 通山由美
2. 発表標題 高温処理によるStaphylococcus aureusの生存能力への影響
3. 学会等名 第65回日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田畑裕幸, 森田寛之, 通山由美
2. 発表標題 チロシンキナーゼSykによるファゴソームの酸性化の調節
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田寛之, 田畑裕幸, 通山由美
2. 発表標題 食細胞 (好中球様・マクロファージ様細胞) におけるProtein S100-A8, Protein S100-A9の機能解析: 好中球様・マクロファージ様に分化したヒト白血病細胞株HL60による検討
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸信彦, 森田寛之, 田畑裕幸, 通山由美
2. 発表標題 食作用依存性のMPO活性化におけるチロシンキナーゼSykの機能解析:好中球様に分化したヒト白血病細胞株HL60による検討
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	田畑 裕幸  (Tabata Hiroyuki)		
研究協力者	森田 寛之  (Morita Hiroyuki)		

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
---------	---------