

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07807

研究課題名(和文)食細胞機能異常症における細胞動態に関する研究

研究課題名(英文)Pharmacokinetics of phagocytes in phagocyte disorders

研究代表者

河合 利尚(Kawai, Toshinao)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生体防御系内科部・医長

研究者番号：20328305

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)：食細胞は、遊走、貪食、殺菌、顆粒放出の機能を持ち生体を防御する。これらの細胞動態を連続的に測定することで、本来の細胞機能評価につながる。本研究では、ライブイメージング技術を応用し生体内の細胞環境やシグナルの時間的変化を再現し、患者好中球の速度、方向性、加速度、移動距離を測定し、遊走能を検討した。

細胞骨格の異常をきたすWiscott Aldrich症候群では、速度や移動距離が低下した。慢性肉芽腫症では、移動距離や速度は正常だったが、細胞の移動方向が直線的ではなかった。本研究では、好中球の遊走過程を画像解析することで、X連鎖慢性肉芽腫症の好中球では遊走能の部分的な機能異常が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、微小空間に化学物質の安定的な濃度勾配を形成し、化学物質に対する細胞の反応をリアルタイムに観察可能なライブイメージング技術を用いて、細胞動態を検討した。

慢性肉芽腫症は、食細胞の殺菌能が低下する原発性免疫不全症であるが、本疾患で見られる易感染性や過剰炎症などの機序について、不明な点が残されている。従来のボイデンチャンパー法では、遊走した細胞数を測定するだけの評価であった。しかし、本研究では、遊走の過程を画像的に解析することで、本疾患の好中球は様々に蛇行を繰り返して進むことが明らかになった。本解析は、他の食細胞機能異常症にも応用できる可能性があり、病態解明へ貢献し得ると考える。

研究成果の概要(英文)：Phagocytes play central role in innate immunity, which are characterized by various functions including phagocytosis, production of reactive oxygen species, release of granule component and migration. The observation and continuous recording of phagocytic function can lead to assess the pharmacokinetics of phagocytes. In this study, we demonstrated the migration of neutrophils in response to the chemotactic factors.

Wiscott-Aldrich syndrome (WAS) is immunodeficiency disorder, characterized by the dysfunction of the dynamic remodelling of the actin-based cytoskeleton in migration. The neutrophil of WAS demonstrated less ability of migration. Chronic granulomatous disease (CGD) is characterized by a functional disorder of phagocytes to produce reactive oxygen species. In CGD, the migration of neutrophils in response to the chemotactic factors demonstrated the speed and acceleration similar to that of healthy control, however, CGD neutrophils migrated with multi-direction.

研究分野：感染免疫

キーワード：好中球 食細胞 遊走能 食細胞機能異常症 慢性肉芽腫症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

生体内では、多彩な変化が継続的してみられるため、連続性に細胞や組織の動態を捉えることで、疾患の病態解明に繋がる可能性がある。近年、ライブイメージング技術の進歩によって標的細胞の動態を観察できるようになった。細胞の機能は、発生、分裂、遊走、接着、貪食、殺菌、顆粒放出、Ca<sup>2+</sup>流入出、アポトーシスなど多岐に渡り、高感度のライブイメージング技術によって正常と疾患の相違を比較できる。さらに、個々の細胞の機能を解析することの重要性が認識され、研究の焦点は細胞集団の解析から、個々の細胞の解析の重症性が認識されている。このような背景から、*in vitro* で生体内の環境変化を再現し、個々の細胞について連続的な変化を解析することで、細胞本来の機能の検討できると推測される。

これまで、食細胞の NADPH オキシダーゼ活性が先天的に障害される慢性肉芽腫症 (CGD) に注目し、NADPH オキシダーゼ由来の活性酸素が生体内で果たす役割を明らかにするとともに、CGD の病態解明に繋がる研究結果を報告してきた。しかし、CGD の感染症や過剰炎症に関連する病態として、全てが解明されてはいない。食細胞である好中球は、生体内で感染部位や炎症部位に対して、一次化学誘引物質などの遊走因子によって血液から動員される。遊走能は好中球の重要な機能であり、他の疾患で、遊走能障害が感染症発症に関連することが知られている。従来、細胞遊走能の解析は、一定時間に移動した細胞数をカウントするだけであり、遊走の速度や加速度、移動距離、方向性などの解析はできなかった。今回、新たなライブイメージング技術を用いて、細胞動態を連続性に解析し、遊走能の詳細な検討を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、微小な空間に化学物質の安定的な濃度勾配を形成し、それに対する細胞の反応を高解像度画像でリアルタイムに観察・記録する装置を用いて、これまで観察できなかった生体内の細胞動態を *in vitro* で再現するための実験系を構築する。そして、CGD など食細胞機能異常症患者の好中球を用いて、遺伝子変異に基づく食細胞機能異常の詳細を検討する。これまでの方法では、細胞機能のエンドポイントでの定量はできるが、細胞が移動する過程は確認できず、詳細な検討はできなかった。本装置では、化学物質の濃度勾配が形成されるため、記録した画像の解析によって細胞動態の定量化を行い、単一遺伝子の変異がもたらす細胞の機能異常について検討する。今回、単一遺伝子の異常による原発性食細胞機能異常症のみを対象とするが、将来的には遺伝子多型や染色体異常、医原性 (薬剤性) に伴う食細胞の機能的、形態的变化についても検討できるよう、解析方法の樹立を行う。

## 3. 研究の方法

本研究では、食細胞 (好中球) の遊走能について検討を行った。好中球は、遊走因子の刺激によって移動 (遊走) するが、遊走する方向や速度に関与するのが遊走因子の濃度勾配である。そこで、本研究では、微小な空間に遊走因子の濃度勾配を形成して、遊走因子に対する細胞の反応を顕微鏡カメラで撮影し、画像解析ソフトを用いて解析した。

測定用のチャンバーの微小空間に遊走因子を注入することで、遊走因子の安定した濃度勾配が形成される。末梢血から好中球を分離し、チャンバーの反対側から好中球を注入し、連続画像を 30 分間記録した。遊走因子は、Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)、Interleukin-8 (IL-8)、stromal cell-derived factor 1 (SDF1) を用いた。

なお、本研究は当センター倫理委員会で承認された研究実施計画 (研究課題名「先天性免疫不

全症の診断ならびに病態解析に関する研究」)を遵守し、インフォームドコンセントを得られた場合のみ本研究を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 好中球 viability

好中球は生体外での生存期間は短く、濃度勾配遠心分離や赤血球溶血、浸透圧変化などの処理で容易に活性化される。さらに、好中球機能を解析する上で、細胞の viability は測定結果に影響する大きな要因となる。今回、好中球分離の過程で、細胞の viability が 30-95%と大きく変動することが明らかとなった。そこで、EDTA-2Na 含末梢血を用いて、採血後 12 時間以内に機能解析を行ったところ、好中球の viability は 60-85%であった。なお、健常コントロールと患者の好中球の viability に有意差はなかった。

##### (2) 好中球遊走能解析

今回、遊走因子として fMLP、IL-8、SDF1 を使用し、個々の好中球が移動する連続性の画像データを収集した(図 1a)。その後、遊走開始地点からの移動方向、加速度、移動距離についてデータを解析した(図 1b)。

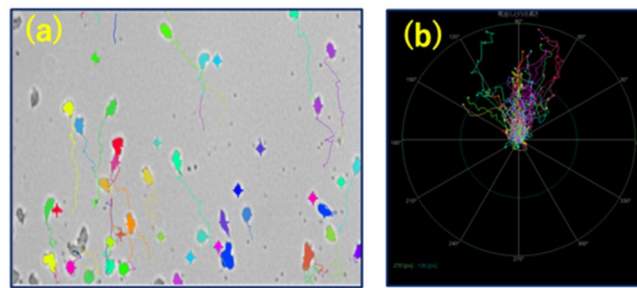


図 1. 好中球のプロット画像とトラッキング画像

(a)画面上の点が個々の好中球を現し、移動する様子をプロットした。(b)遊走因子の濃度勾配に従い、画面の上方へ遊走する様子をトラッキングした

##### (3) 食細胞機能異常症の好中球遊走障害

好中球や単球などの食細胞は自然免疫の免疫応答を担う細胞で、遊走、貪食、殺菌、顆粒放出などの機能が備わっている。これらの機能は、連続性にみられるため、継続的に変化する細胞環境を想定し、細胞や組織の動態を捉えることが、本来の細胞機能評価につながる。生体内では、炎症局所で IL-8 や fMLP などが産生され、拡散し濃度勾配が形成されることで、好中球は炎症が発生する地点を目指して遊走する。また、好中球や造血幹細胞など幅広い血球系では、CXCR4 が発現し、細胞のホーミングに関与することが知られている。今回、これらの好中球遊走因子を用いて、好中球が遊走する速度、方向、加速度、移動距離を測定した。その結果、fMLP と IL-8 と比較し、SDF1 では遊走の速度が著明に低下していた(図 2)。

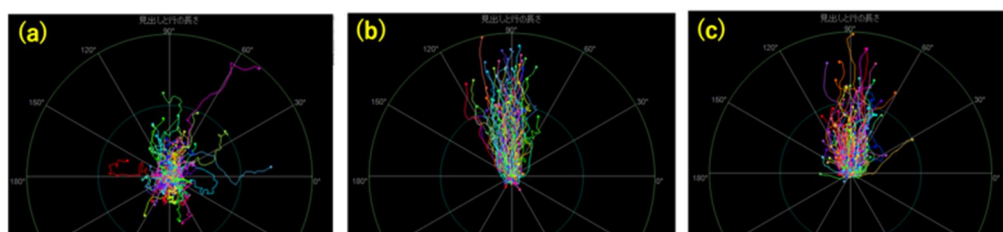


図 2. 好中球遊走因子に対する遊走

(a)SDF1、(b)fMLP、(c)IL-8 に対する健常コントロール好中球のトラッキング画像

さらに、CGD の好中球では、遊走因子(fMLP)に対する遊走はみられるが、健常コントロールと

比較し、遊走の方向性が直進的ではなかった(図3)。なお、CGDで易感染性がみられる細菌感染症やBCG感染症に罹患している時の好中球を用いて検討したところ、回復期と比較して明らかな変化はみられなかった。

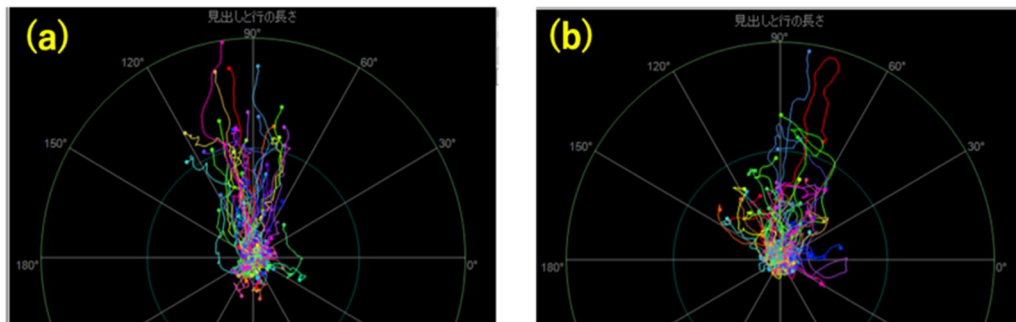


図3. fMLPに対する好中球遊走のトラッキング

(a)健常コントロールの好中球とX連鎖CGD患者の好中球のトラッキング画像

感染部位や炎症部位で産生されるfMLPやIL-8などの遊走因子(一次化学誘引物質)によって、好中球は血液から動員される。従来、このような細胞の遊走能を評価するために、ポイデンチャンパー法が用いられてきた。この方法は、一定時間で移動した細胞の数をカウントすることで、移動や浸潤を評価するため、実際に移動する過程を詳細に検討することはできなかった。今回、ライブイメージング技術を用いて、細胞動態を連続性に解析することで、CGDの好中球では、殺菌能だけでなく、遊走能の異常が示唆された。

今後、常染色体劣性遺伝CGDや他の変異を有するX連鎖CGDの好中球の解析データを蓄積することで、CGDの好中球で直進的な遊走が起こらない機序の解明に繋がると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osumi T, Tomizawa D, Kawai T, Sako M, Inoue E, Takimoto T, Tamura E, Uchiyama T, Imadome K, Taniguchi M, Shirai R, Yoshida M, Ando R, Tsumura Y, Fuji H, Matsumoto K, Shioda Y, Kiyotani C, Terashima K, Onodera M, Matsumoto K, Kato M	4. 巻 54
2. 論文標題 A prospective study of allogeneic transplantation from unrelated donors for chronic granulomatous disease with target busulfan-based reduced-intensity conditioning.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplant.	6. 最初と最後の頁 168-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-018-0271-9.	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 -

1. 著者名 Kanamori K, Tamura E, Onodera M, Ishiguro A, Kawai T.	4. 巻 61
2. 論文標題 Thymitis in chronic granulomatous disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 429-431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13810.	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 Shoji K, Kawai T, Onodera M, Tsutsumi Y, Nosaka S, Miyairi I	4. 巻 60
2. 論文標題 Multiple osteolytic lesions on the skull of a girl with MSMD.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 1043 - 1044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13691.	査読の有無 無
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 河合利尚	4. 巻 81
2. 論文標題 食細胞機能異常症	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 228-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 河合利尚	4. 巻 50
2. 論文標題 食細胞機能異常症	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 小児内科	6. 最初と最後の頁 262-263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 河合利尚
2. 発表標題 食細胞の減少・機能異常で知っておきたいこと
3. 学会等名 日本免疫不全・自己炎症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川尊士、田村英一郎、内山徹、小野寺雅史、和田靖之、河合利尚
2. 発表標題 小児期から重症感染症を繰り返すX連鎖性慢性肉芽腫症の成人女性例
3. 学会等名 小児感染症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawai T, Arai K, Ishikawa T, Tamura E, Uchiyama T, Onodera M
2. 発表標題 Coadministration of thalidomide ameliorates inflammatory bowel disease associated with chronic granulomatous disease.
3. 学会等名 European Society of Immunodeficiency diseases
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 河合利尚	4. 発行年 2020年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 2
3. 書名 小児臨床検査マニュアル 原発性免疫不全症	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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