

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08217

研究課題名(和文)腎間質線維化進行機序における炎症後細胞死異常と線維化促進性食細胞の関連性

研究課題名(英文)The unbalance between post-inflammatory apoptosis and NETosis possibly effects on the phagocyte which accelerate interstitial fibrosis in kidney

研究代表者

竹内 康雄 (Takeuchi, Yasuo)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：60286359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、好中球Apoptosis/NETosisなどの細胞死が炎症を起こした腎間質の機能特異的マクロファージにどのように作用するのかを明らかにすることを目的としている。我々は、異物を貪食した正常好中球がどのように細胞死を起こすのかを蛍光ラベルZymosanを用いて検証した。正常好中球は、Apoptosisを起こして細胞ごとマクロファージに貪食されるがApoptosisを阻害すると、好中球はNETosisを起こし、この時排菌が遅れることが経時的な細胞死の定量から明らかになった。つまり、NETosisは異物を補足する機能は有するが、分解するという点でApoptosisに劣ることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好中球は細胞外に自己のDNAやタンパクなどを放出し、NETosisと呼ばれる方法で細胞外寄生性菌の分解、除去を行うと考えられてきた。しかし、我々が構築したin vitroの定量系によりNETosisよりもApoptosisを起こした方が排菌が速やかであり、NETosisには異物を拡散させないため捕捉する機能はあるが、分解の効率はApoptosisに及ばないことが示された。一方で、NETosisは様々な抗核抗体陽性自己免疫疾患の増悪に関わっていることは知られており、今後はNETosisをApoptosisへ誘導する治療が重要になることが予想できる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we analyzed the interaction between function-specific macrophages (SatM) isolated from the site of inflammation in the kidney and neutrophils which underwent Apoptosis / NETosis. In order to analyze NOX2 sufficient/deficient cell death, several patterns of neutrophil cell death were quantified by measurement of the intensity of fluorescence of engulfed Zymosan or cleaved Caspase3 over 24 hours. As the results, NOX2 sufficient neutrophils, which engulfed Zymosan, die by apoptosis rather than NETosis. NETosis is thought to be strategy to kill extracellular pathogens, however, The inhibition of apoptosis made delay on clearance of fungal antigen. This is indicated that NETs may just trap pathogen but not kill them.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：制御性細胞死 好中球 慢性肉芽腫症 NETosis Apoptosis マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

様々な原因によって細胞死がおこり組織が破壊されると、その部位には炎症細胞が浸潤する。傷害された部位が完全にもとあった細胞で修復されれば組織は再生したといえるが、場合によっては傷害部位は膠原繊維で置き換えられ、組織が線維化し将来的な機能不全をもたらすことにもなる。従来、線維化の程度は炎症の激しさによって規定され、炎症の激しさは壊死した組織の大きさに依存すると考えられてきたが、近年の研究により **Necrotic cell** 由来の **DAMPs** は炎症を拡大するようにマクロファージに働きかけ、**Apoptotic cell** は炎症を抑制するように働くことが示唆されるようになった。つまり、一口に細胞死といっても、細胞の死後組織破壊が大きくなる場合もあれば、死細胞が修復を促進させることもあり、細胞死のパターンは細胞が個体に残した「遺言」のようなものともいえるかもしれない。

我々は、過去の研究において、慢性肉芽腫症のモデルである **NOX2** 欠損マウスを用いて様々な病態の誘導と治療を試みてきた。**NOX2** 欠損マウスは主に好中球やマクロファージなどで活性酸素種 (**ROS**) を産生する **NADPH oxidase** (別名: **NOX2**) の主要な component である **gp^{91phox}** が欠損したマウスで、好中球の殺菌能や貪食細胞の **Lysosome** の **pH** などに異常があることが知られている。我々はこの **NOX2** 欠損マウスに尿細管毒性のある薬物アリストロキア酸を投与し急性尿細管傷害 (**ATI**) を誘導すると、急性期の尿細管壊死が正常マウスと同程度であっても、約 1 ヶ月後の組織において **NOX2** 欠損マウスの方で著しい間質の線維化を残しているという結果を得たため、このモデルマウスの好中球細胞死と線維化の関連に着目した。

NOX2 は尿細管上皮細胞には発現しないので尿細管上皮自体の **turn-over** は **X-CGD** と正常で違いはないと考えられ、また、正常では線維化を残さずに尿細管が再生していることから、**NOX2** 欠損マウスでは線維化を亢進させる局所環境が形成されると考えられた。このマウスの好中球やマクロファージは **NOX2** 依存的な **ROSs** を産生できないため、①**NETosis** などの特種な細胞死が起こりにくく、②**Apoptosis** した炎症細胞が残存して肉芽腫を形成すると考えられてきた。このため慢性肉芽腫症では死細胞自体による炎症の拡大/抑制のバランスに支障をきたしていると考えた。また、好中球から放出される **ROSs** は周辺の細胞を障害すると同時に、それ自体が周囲の細胞に再生を促すシグナルともなるため、このバランスの異常によって結果的に尿細管の再生が遅れる可能性も考えられた。

ところで、この年に別の研究グループからブレオマイシン誘導性肺線維症のモデルにおいて炎症後期(線維形成期)に骨髄に非典型的な単球「**SatM**」が出現し、これを欠失させる (**Cebpb^{hi}**) と肺で炎症が起こるにも拘らず線維化のみが起こらなくなることが確認され、線維化を促すことに特化した単球が存在することが報告された (*Nature* 541:96-101.2017)。我々はアリストロキア酸誘導性 **ATI** でも **SatM** が出現するかを解析したところ、炎症早期にはほとんど出現しないが、投与終了後 3 週間以上経った線維化形成期に骨髄や脾臓で **SatM** と思われる表面マーカーを発現した細胞が現れ、**NOX2** 欠損マウスの方が有意にこの細胞数が多いことを確認した。また腎臓に浸潤した細胞の中に薬物投与終了後 3 週間を経てから新たに出現する **SatM** 様の細胞群が **NOX2** 欠損マウスでは有意に多く出現しているという結果を得た。これによって、炎症が起きている臓器が肺であるか腎臓であるかに関わらず、骨髄には同じ **SatM** という線維化に特化した単球が出現する可能性があることが示唆された。臓器によらず且つ炎症巣でのみ線維化が促進するよう正常組織との差別化をはかるには、**SatM** は臓器特異性が低く炎症後期に必ず存在する **Factor** を手掛かりに作用している必然性がある。

我々は、**NOX2** 欠損マウスの炎症細胞、特に好中球は **NETosis** を起こしにくいと一般的に考えられていること、炎症局所で **Apoptosis** を起こした「死骸」のクリアランスが遅れるという特徴と、炎症が収束するときにはいかなる臓器であれそこに必ずなんらかの視細胞が存在するという事実から類推し、細胞死そのものが炎症の **fate** を左右することを明らかにしようと検証を試みた。

2. 研究の目的

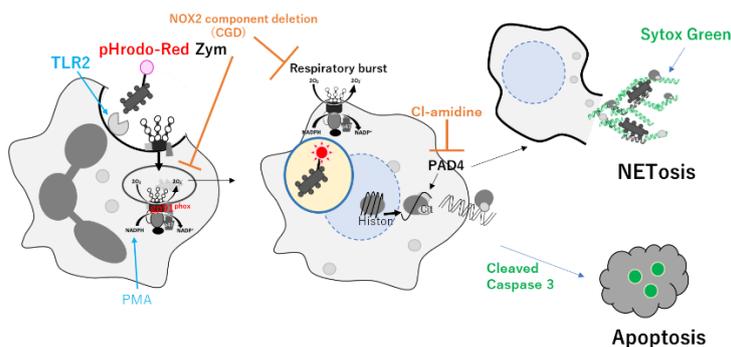
我々は本課題において **NOX2** 欠損マウスと正常 **C57BL/6** マウスの間で、**Necrosis/Apoptosis/Netosis** などの好中球細胞死の形式に違いがないかを検証し、さらにその違いが **SatM** の線維化促進効果に直接または間接に影響を及ぼすか否かを検証することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

NOX2 欠損マウスと正常 **C57BL/6** マウスの骨髄から磁気ビーズにより **negative** に好中球を分離し、下記の方法で細胞死を検出した。(次図)

- (1) **Zymosan pHrodo** は、**TLR1,2** の **Ligand** である **Zymosan** に酸性環境で蛍光を発する物質をラベルし、**lysosome** に貪食されたことを確認できるようにした **kit** である。分離した好中球をこの **Zymosan** で刺激し、貪食後の好中球の細胞死の形態を **time lapse** で 24 時間以上観察した。

- (2) Zymosan pHrodoに加え、cleaved Caspase3(cCas3)を検出する蛍光物質または細胞外DNAを検出できる蛍光物質を加え、TLR1,2の刺激によりどのような細胞死が起こるかをIncuCyte Live-cell analysis system(以下IncuCyte zoom)を用いて48時間以上定量した。
- (3) 上記(2)にCaspaseの阻害剤を添加しApoptosisまたはPyroptosisを阻害した場合のZymosanの排除の効率を定量的に比較した。



4. 研究成果

(1) NOX2欠損マウス好中球細胞死の観察

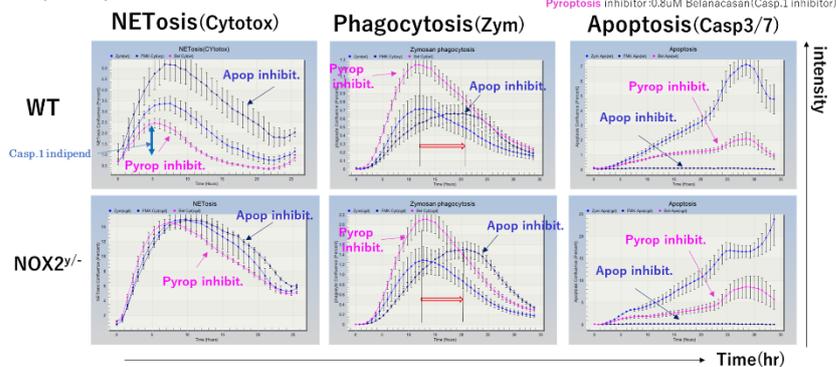
磁気ビーズで分離した好中球 (5.0×10^5 cells/100 μ L) を無血清 RPMI に浮遊させ、Zymosan pHrodo と Inncucyte Caspase3/7 Green または Cytotox Green を添加し、x40、x80 画像を15分ごとに24時間以上Bio-stationで撮影した。Caspase3/7 greenはCleaved Caspase3(以下cCas3)とのみ反応し、非活性Caspase3では蛍光を発しない。また、Cytotoxは生細胞膜非透過性のDNA親和性物質であり、Apoptosisをおこして膜の透過性が変化すると凝集したDNAが染色されるほか、細胞外に放出されたDNAを検出することにも使用できる。このため、Cytotoxのintensityは一般的にNETosisの定量に使われるが、特異性が無いことが問題である。Bio-stationにより撮像した経時的観察の結果、正常好中球はZymosanを貪食し赤色蛍光を発すると、同じ細胞で赤色蛍光が退色してからcCas3の緑色傾向が高くなることがわかった。Zymosan pHrodoとCytotox Greenの組み合わせでもZymosanの貪食を示す赤色蛍光が退色した後で、同じ細胞に凝集した緑色蛍光が観察された。これは、Zymosanを貪食した好中球がCaspase3を切断され、ゲノムDNAの分断凝集を起こし膜の透過性の変化するApoptosisの一連の経過を観察できたことを意味する。一方、NOX2欠損マウス好中球では正常とほぼ同じtimingで赤色蛍光を発するが、少なくとも24時間では正常でみられる蛍光の退色が見られず、cCas3による蛍光はほとんど観察されなかった。つまり、NOX2が欠損すると異物の貪食までは行われるが、Caspase3活性化以降の反応が起こらず、細胞はApoptosisに至らないことが示唆された。また、Cytotox greenの蛍光は初期に観察されたのち淡く拡散し、NETosis様の細胞の破裂とDNA releaseが起こったことを示唆していた。さらにこの画像に位相差像を重ねると、一度好中球に取り込まれたZymosan粒子が膜の破裂と共に再び細胞外に放出され、視野からZymosan粒子が排除できていないことがわかった。慢性肉芽腫症はApoptotic cellのクリアランスが遅いと予想されているが、In vitroでの観察ではNOX2欠損好中球はむしろApoptosisを起こしにくいことがわかった。

(2) 細胞死の経時的定量的比較

NOX2欠損好中球はApoptosisを起こしにくいことがtime lapse映像から推察できたが、NOX2活性を失っているからといってApoptosisが絶対に起こらない訳ではない。同一条件に置かれたはずの細胞群であっても一視野に複数種類の細胞死が同時に起きていることはしばしば観察される。我々は、様々な細胞死が混ざり合った状態を定量的に解析する必要があると考えた。

[Quantification of time depend changes of NETosis/Apoptosis]

The time laps Images were captured and analyzed using by incucyte zoom system.



Bio-stationは高倍率の撮像が可能であるが、一回の実験で1つのdishしか観察できないので、異なるconditionの正確な比較に向いていない。また、Cytotoxなどの蛍光強度を指標にしたとしてもApoptosisとNETosisは形態の違いによって見分けるよりほかない。NETosisとPyroptosis

に至ってはどちらもDNAを細胞外に放出するため形態もよくにており、time lapse画像だけでは識別できない。そこで、我々はIncuCyte Zoom systemを用いて96well plate上にCaspaseなどの阻害剤をあらかじめ添加した異なるconditionを作り、 1×10^4 cell/well好中球を無血清

RPMI で浮遊させ、45min 毎に全ての well の蛍光/位相差画像を capture し、蛍光強度、大きさ、細胞数などを識別して Apoptotic 細胞を NETosis から除外して定量する経時的比較を行った (前頁図)。その結果、正常好中球 (WT) に Zymosan を貪食させると、cCas3 で表される Apoptosis と Cytotox の蛍光強度の上昇で表現される NETosis がともに起きることがわかった。Caspase3 の阻害剤の添加により cCas3 は完全に抑制されるが (右パネル) この時、NETosis によって死ぬ細胞が増えることがわかった (左パネル)。しかし、Apoptosis を阻害すると Zymosan pHrodo の intensity のピークが後ろにずれているため (中央パネル⇒)、貪食した Zymosan を分解する効率が悪くなっているといえる。また、Caspase1 の活性化は Pyroptosis に必須であるが、Caspase1 を阻害しても細胞外に DNA の放出が起きていることから、Cytotox の intensity で表現される細胞死は Pyroptosis も含んでいるが、Caspase1 非依存的な NETosis だけが測定できたと考えられた (左パネル)。これに対して NOX2 欠損好中球の細胞は阻害剤に関係なく DNA release が起こり、NOX2 非依存的 NETosis がそんざいすることが示唆された。

(3) NOX2 非依存的 NETosis 誘導

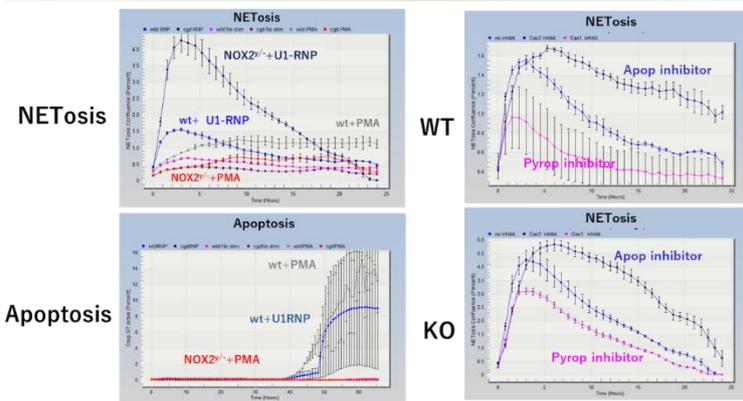
ところで、NETosis の研究はヒトの末梢血好中球を用いることが一般的で、マウスの好中球で NETosis を誘導している論文はほとんどない。マウスの好中球は NETosis を起こしにくいと考えられている。理由は明らかでないが、好中球の成熟度の違いや、IL-8 がマウスにはないため確実に NETosis を誘導できる手法が確立されていない等の理由が考えられる。しかし、我々は今までの研究の成果により、Hela 細胞から単離したヒト核タンパク U1 RNP がマウスの好中球に高率に NETosis を誘導するという結果を得ていた。そこで NOX2 欠損好中球にも U1RNP を用いて NETosis が誘導できるかを time lapse 映像で検証した。

その結果、NOX2 欠損好中球であっても U1RNP 刺激により細胞外への DNA release が起こることが確認された。U1RNP による NETosis 様細胞死は NOX2 非依存的経路で起こることが示唆された。

(4) NOX2 依存的/非依存的 NETosis の比較

我々はこの NOX2 非依存的 NETosis 様細胞死と NOX2 を活性化させる PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) 添加による NETosis とを NOX2 欠損マウス好中球と正常好中球で定量的に比較した。左図に示すように、NOX2 欠損好中球に PMA を添加しても NETosis (細胞外 DNA release) も Apoptosis (cCas3 上昇) も起こらず、PMA は NOX2 依存的に好中球に細胞死を誘導することが確認できた。U1RNP は正常好中球、NOX2 欠損好中球のいずれにも DNA release を誘導するが、細胞数が同じであるにもかかわらず、

[Quantification of time depend changes NETosis w/o U1-RNP]



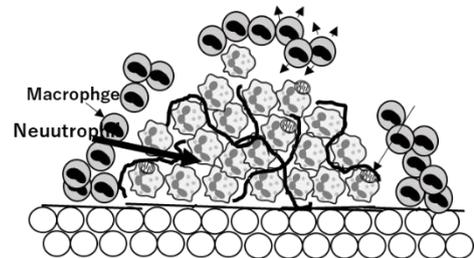
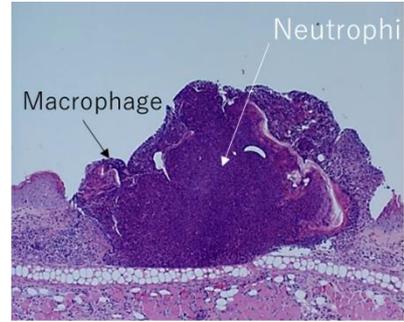
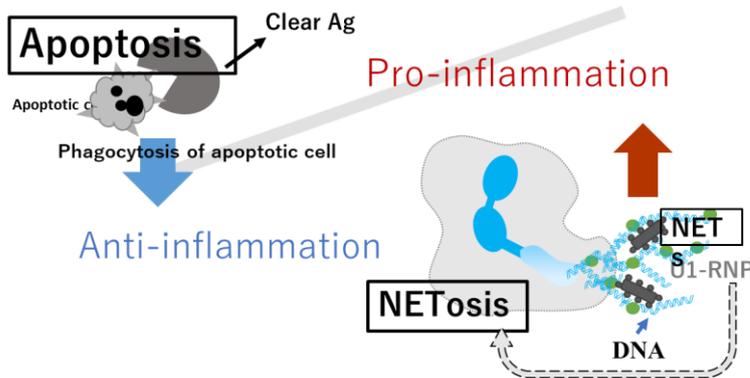
NOX2 欠損好中球の方が多量の DNA を放出していることが分かった。cCas を比較すると、正常では U1RNP 刺激でも一部の細胞が Apoptosis を起こしているが、時間軸を比較すると NETosis が Apoptosis に先行していることがわかった。この結果は、In vitro であるとは言え正常な細胞集団は NETosis と Apoptosis の間で何らかのバランスをとるということを示唆していると考えられた。これに対し NOX2 欠損好中球は大量の NETosis がすぐにおこり、Apoptotic cell はほとんど残らないという特徴があった。

(5) in vivo 実験への応用

NOX2 欠損マウスは本来ヒト慢性肉芽腫症 (CGD) のモデルとして作られたマウスである。このマウスに Zymosan を投与すると右図のような肉芽腫を形成する。一般的に肉芽腫は免疫機能上完全に排除できない異物をマクロファージが取り囲み、拡散することを防ぐようにしてできる。NOX2 欠損マウスの肉芽腫は免疫染色を行うと、中心に好中球の「死骸」が固まっているようにみえるので今まで Apoptosis を起こした好中球をマクロファージが貪食しきれないクリアランスの異常であると考えられてきた。さらに、NOX2 活性を欠損すると NETosis は起こらないとする報告もあったため、慢性肉芽腫症と NETosis の関係は明確ではなかった。確かに、ヒト末梢血の研究では NETosis の誘導に PMA がしばしば使われ、先に示したように NOX2 を欠

損すると PMA による活性化自体は全くおこらないため、CGD 好中球は NETosis を起こさないと誤解されることはありうる。しかしながら、我々の解析の結果では、CGD 好中球の問題はむしろ Apoptosis を起こしにくいことであることを示唆している。さらに、まだ不明な点が多いものの、NOX2 に依存せずに NETosis 様細胞死を誘導できる経路が存在し、この経路を刺激されると CGD では NETosis 様細胞死が起こり、異物は貪食されても分解されずにとどまり続けることが考えられる。

先にも述べたように、Apoptotic 細胞はマクロファージに取り込まれると抗炎症的、組織修復的にバランスを傾けることがすでに知られている。これらの知見をもとに我々が考える細胞死と炎症のバランスは左下図のようなものである。異物が体内に入ると好中球の一部はすぐに NETosis を起こし、この異物の動きを封じ、可能であればそのまま細胞外で分解する。NETosis の主要な目的は異物の捕捉であり、タンパク分解の効率は細胞内で行うより効率が悪くなる。しかし、この時に放出される自己核内成分は新たに集簇する好中球の活性化のきっかけとなる。集まった好中球は異物を貪食し、細胞内で分解、Apoptosis によって細胞ごとマクロファージに除去される。Apoptosis は好中球が効率的に異物を除去するために必須の細胞死であり、これを trigger として炎症は抑制され組織修復が開始される。



今後は in vivo の炎症誘導系モデルにおいて、実際に肉芽腫内で NETosis 様細胞死が起こっているのか、炎症は拡大するのか、Apoptosis を抑制すると炎症は拡大するのか、NETosis の抑制は可能か、臨床応用は可能なのか、などをさらに検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Emiko Takeuchi, Makoto Ostu, Yasuo Takeuchi
2. 発表標題 U1 RNP can induce NETosis to isolated mouse neutrophils through NOX2 independent pathway
3. 学会等名 The 50th Annual meeting of the Japanese Society for Immunology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内恵美子・竹内康雄・大津真
2. 発表標題 X連鎖性慢性肉芽腫症モデルgp91phoxknock-out mouseへの肉芽腫形成誘導とNOX2依存的細胞死の関連について
3. 学会等名 第48回臨床免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内恵美子、竹内康雄
2. 発表標題 In vitroにおけるマウス好中球のNETosis誘導と細胞外カルシウム濃度の関係について
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 EMIKO Takeuchi, YASUO Takeuchi, KAZUYA Iwabuchi
2. 発表標題 The association between calcium influx and NETosis induced through the NADPH oxidase independent pathway
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内恵美子 竹内康雄
2. 発表標題 NADPH oxidase(NOX2)非依存的好中球Netosis誘導とミトコンドリアROS産生の関連について
3. 学会等名 第46回 臨床免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Emiko Takeuchi, Yasuo Takeuchi, Kazuya Iwabuchi
2. 発表標題 The association NADPH oxidase independent NETosis with acceleration of mitochondrial ROS production
3. 学会等名 The 47th Annual meeting of the japanese Society for Immunology (国際学会)
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 分担者	竹内 恵美子 (Takeuchi Emiko) (00406935)	北里大学・医学部・講師 (32607)	
研究 分担者	川島 永子 (Kawashima Nagako) (90342774)	北里大学・医学部・助教 (32607)	

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