

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14909

研究課題名（和文）好中球細胞外トラップのDNAメチル化制御機構の解明

研究課題名（英文）DNA methylated-regulation in neutrophil extracellular traps

研究代表者

安田 浩之（YASUDA, HIROYUKI）

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40780284

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、好中球細胞死の一種であるNETosisの誘導機構の解明に向けて、エピジェネティクス、特にDNAメチル化制御の観点から解明を目指した。DNAメチル化転移酵素であるDNMT1を5-azacytidine（Aza）によって阻害することでNETosisの誘導が亢進した。このときアルギニンをシトルリンに変換する酵素であるPAD4の発現が亢進し、PAD4阻害剤やミトコンドリア活性酸素消去剤を前処理することで、Aza誘導性NETosisが抑制された。以上より、NETosis誘導はDNAメチル化状態の変化によって制御されると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NETosis誘導におけるPAD4の発現や活性酸素の関与は知られている。しかし、様々な疾患におけるエピジェネティック異常の観点からNETosisの誘導機構を指摘した報告は全くない。本研究では、好中球の分化過程におけるDNAメチル化制御の観点からNETosis誘導機構の一端を明らかにした。本研究における好中球のDNAメチル化状態とそれに起因するNETosisの誘導機構の知見は、NETosisが誘導される様々な疾患の病態悪化機構の解明に向けた重要な情報を提供できたと考える。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of epigenetics, especially DNA methylation to elucidate the mechanisms of NETosis, cell death of neutrophil. In this study, NETosis in the neutrophil-like cells was induced by the treatment with 5-azacytidine (Aza), DNMT1 inhibitor. Moreover, Aza increased PAD4 expression, and PAD4 inhibition and mitochondrial reactive oxygen species scavenger tended to decrease Aza-induced NETosis. Overall, our results suggested that NETosis induction was regulated by changes in DNA methylation status.

研究分野：薬理系薬学

キーワード：好中球細胞外トラップ NETs NETosis エピジェネティクス DNAメチル化 PAD4 ヒストンシトルリン化

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps; NETs) とは、網状の DNA など顆粒球タンパク質と共に細胞外に放出する現象であり、アポトーシスやネクローシスとは異なる細胞死 (NETosis) として知られている。NETosis は関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの自己免疫性疾患、糖尿病や癌といった様々な疾患でその誘導が亢進しており、過剰な NETs は血管壁の障害やさらなる免疫応答の惹起、血栓の生成などに関与し、病態の悪化につながると考えられている。しかし、NETosis の誘導メカニズムについては未だ不明な点が多い。つまり、NETosis の制御機構を明らかにすることは様々な疾患における病態の増悪メカニズムを新たな観点から解明することになり、治療ターゲットとしての有用な情報になりえると考えられる。

その NETosis の誘導機構の一つとして、ヒストンのアルギニン残基をシトルリン残基に変換する酵素である peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) が挙げられる。PAD4 は DNA メチル化制御を受けて発現が調節されているが、この遺伝子のエピジェネティクス制御は様々な疾患において異常となることが多く、好中球もその影響を受けていると考えられる。つまり、自己免疫性疾患などの疾患発症時、好中球の分化過程において PAD4 の発現がエピジェネティクス、特に DNA メチル化の制御を受けることで NETosis が制御される可能性がある。また、DNA メチル化制御はメチル化転移酵素である DNA methyltransferases (DNMTs) だけでなく、ten-eleven translocations (TETs) と呼ばれる DNA 脱メチル化酵素が注目されており、好中球の分化や PAD4 の発現に関与する可能性があるが、その影響を受けるかどうかは明らかになっていない。そこで本研究は、NETosis の根幹にある原因遺伝子の増減が好中球分化時にエピジェネティクスの影響を受けて変化するかどうかの基盤研究となることを目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NETosis 誘導の起点が好中球分化時の DNA メチル化制御の変化によるものかどうかを検証することである。そこで、好中球未分化細胞から好中球に分化する過程において、DNA メチル化に影響を与えて NETosis の変化と関連タンパクの発現への影響について検討した。

3. 研究の方法

1) 細胞培養

ヒト白血球細胞株 (HL-60 細胞) は、10% 非動化ウシ胎児血清 (FBS) とペニシリン/ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地を用いて、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。HL-60 細胞は 1.25% DMSO で 72 時間培養することで好中球様細胞へと分化させた。

2) NETosis 誘導の測定

各種試薬で処理した細胞を 1×10^6 cells/mL となるように 96 ウェルプレートに移し、5 μ M の SYTOX Green を加えて 4 時間後、蛍光波長を測定した。このとき、1% Triton X-100 を処理することで総 DNA 量の蛍光波長を 100% とし、総 DNA 量に対する NETosis 量の割合 (%) を算出した。

3) 細胞外 DNA の測定

各種試薬で処理した細胞を 1×10^6 cells/mL となるように 96 ウェルプレートに移し、4 時間後、20 U/mL の Micrococcal Nuclease (MNase) を 20 分間処理して細胞外に放出された DNA を切断した。この切断した細胞を 200 \times g、8 分間の遠心で分離し、5 μ M の SYTOX Green を加えて蛍光波長を測定した。

4) 免疫染色による NETosis の画像解析

各種試薬で処理した細胞をポリリジンでコートされたスライドガラスに移し、4% パラホルムアルデヒドを用いて固定した後、5% ウシ血清アルブミン (BSA) でブロッキングを行った。その後、シトルリン化ヒストン H3 抗体を反応させ、SYTOX Green で DNA を染色した。撮影は共焦点顕微鏡を用いて行った。

5) 活性酸素の測定

各種試薬で処理した細胞を 1×10^5 cells/mL となるように 96 ウェルプレートに移し、活性酸素測定試薬である L-012 を加え、経時的に化学発光量を測定した。

6) タンパク質発現量の測定

各種試薬で処理した細胞から、総タンパク質あるいは核タンパク質、ヒストン抽出を行い、ウェスタンブロット法によって PAD4 を含む各種タンパク質の発現量ならびにシトルリン化ヒス

トンの発現量を解析した。

7) DNA メチル化解析

各種試薬で処理した細胞からゲノム DNA を抽出し、ドットプロット法を用いて DNA メチル化を判断するメチル化シトシンの発現を解析した。また、抽出したゲノム DNA あるいは MNase を用いて細胞外 DNA を切断、回収した DNA は、ELISA 法によってメチル化シトシン量を測定した。

8) mRNA 発現量の測定

各種試薬で処理した細胞からトリゾール試薬を用いて総 RNA を抽出し、cDNA を作製した。調整された cDNA を用いて、PAD4 などの各種遺伝子の発現量を real time RT-PCR 法にて測定した。

4. 研究成果

1. DNMT1 阻害剤処理による NETosis 誘導と DNA メチル化の関与

HL-60 細胞は 1.25% DMSO で 72 時間培養することで好中球様細胞に分化させた。この DMSO を処理するのと同時に DNMT1 阻害薬 (5-azacytidine ; Aza) を処理し、分化過程での DNA メチル化への影響が NETosis 誘導に関与するかどうかを検討した。NETosis はカルシウムイオノフォアである A23187 を処理することで誘導させたが、1 μ M Aza の処理により NETosis 誘導が亢進した。また、A23187 未処理の好中球様細胞でも Aza の処理によって NETosis が誘導された。これらの結果から、Aza による DNMT1 阻害は基底状態の好中球様細胞の NETosis 誘導を亢進させることが示唆された (図 1)。

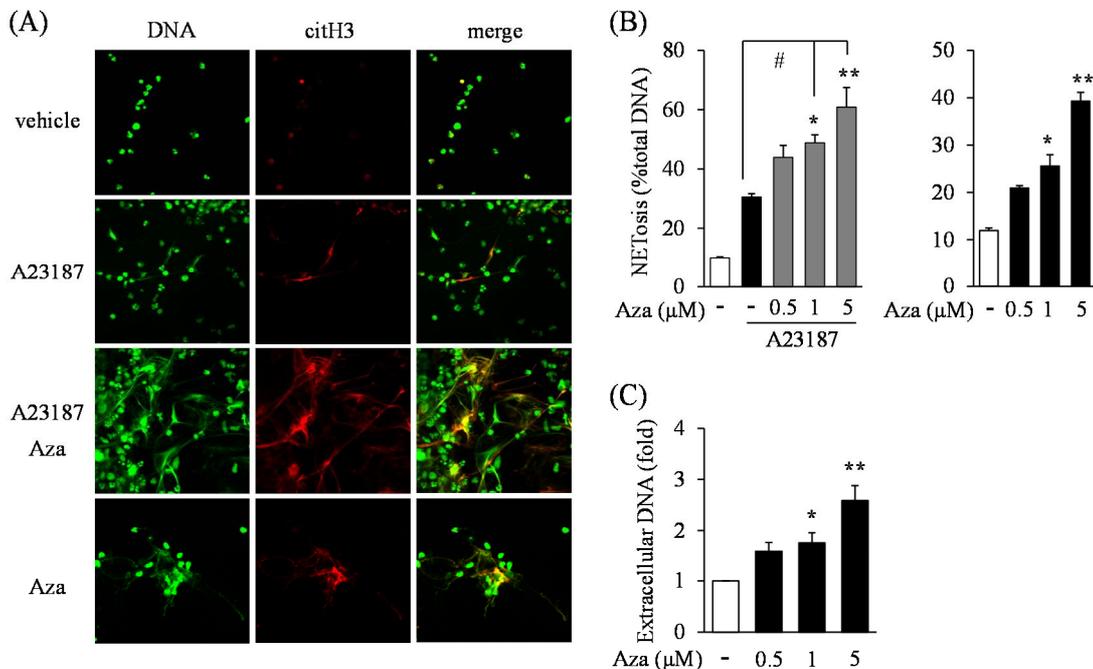


図1) DNMT1阻害によるNETosis誘導への影響

(A) 免疫染色によるNETosis誘導の評価 (B) NETosis誘導の定量的評価 (C) 細胞外DNA量解析
citH3; citrullinated histone H3, Aza; 5-azacytidine, A23187; NETosis誘導剤
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle, # $p < 0.05$ vs. A23187-treated cells.

次に、Aza の処理によって好中球様細胞の DNA メチル化状態を検討した。HL-60 細胞から好中球様細胞に分化する過程において、DNMT3A の発現に有意な変化はないが、DNMT1、DNMT3B の発現は有意に減少した。しかし、好中球様細胞分化により DNA メチル化が亢進し、Aza によって DNA メチル化亢進が抑制されたことから、少なくとも通常の好中球分化における DNA メチル化状態の変化に DNMT1 は関与しない可能性があることを見出した。また、好中球様細胞分化により TET2 の発現が亢進し、DNA 脱メチル化を判断するヒドロキシメチル化シトシン量も亢進する傾向にあったことから、好中球への分化には TET2 の関与が考えられる。さらに、好中球様細胞のゲノム DNA のメチル化は低度であり、細胞外に放出される DNA のほとんどがメチル化されていないという結果を得た。非メチル化 DNA の細胞外放出は TLR9 の活

性化などさらなる免疫応答に関与する可能性があり、好中球が NETosis を誘導する意義において、DNA メチル化状態との関連を今後深く検討する必要がある。

2. DNMT1 阻害剤処理による NETosis 誘導と活性酸素や PAD4 発現の関与

Aza を処理した好中球様細胞において、NADPH oxidase (NOX) 依存的な NETosis を誘導するホルボールエステル (PMA) と、NOX 非依存的な NETosis を誘導する A23187 をそれぞれ加え、活性酸素量を測定したところ、Aza 未処理に比べて若干増加するものの有意な変化はなかった。また、NOX 阻害剤である diphenyleneiodonium (DPI) を前処理ところ、NETosis 誘導に影響がなかった。しかし、ミトコンドリア由来活性酸素消去剤 (mito-TEMPO) を前処理したところ、NETosis 誘導を抑制したことから、Aza 誘導性 NETosis は NOX 由来ではなく、ミトコンドリア由来の活性酸素を介する可能性がある (図 2)。

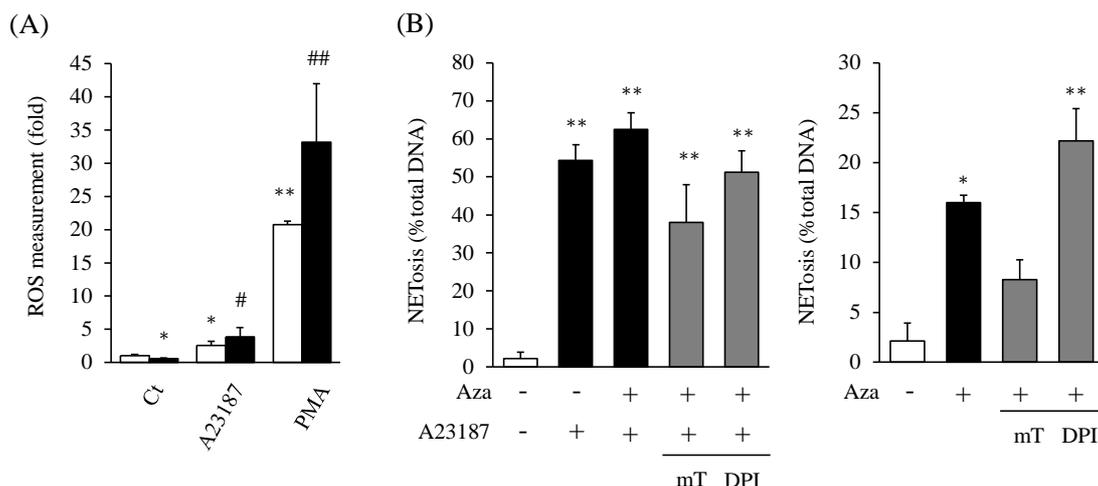


図2) Aza誘導性NETosisにおける活性酸素の関与

(A) 活性酸素量測定 (B) NETosis誘導の定量的評価

mito-TEMPO (mT); ミトコンドリア活性酸素消去剤、DPI; NADPH oxidase阻害剤

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control (white bar), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. control (Aza treatment, black bar).

次に、Aza の処理による PAD4 の発現とヒストンのシトルリン化レベルを解析した。その結果、Aza 処理により PAD4 の発現、ヒストン H3 のシトルリン化とともに亢進した。また、PAD4 を阻害する Cl-amidine を前処理したところ、Aza 誘導性 NETosis を抑制する傾向があった (図 3)。これら阻害剤での NETosis 抑制は部分的であったことから、Aza による NETosis 誘導の亢進はミトコンドリア由来活性酸素と PAD4 の発現の両方を介する可能性がある。

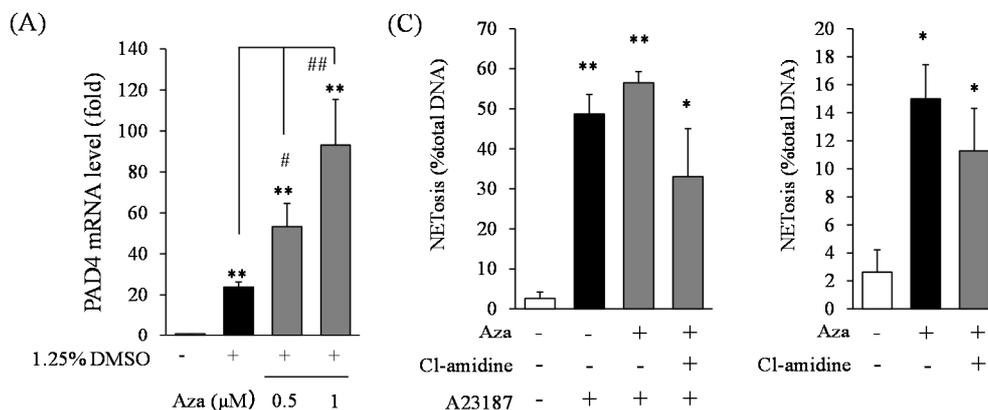


図3) Aza誘導性NETosisにおけるPAD4の関与

(A) PAD4 mRNA発現量測定 (B) PAD4発現のタンパク質レベルの解析 (C) NETosis誘導の定量的評価

Cl-amidine; PAD4阻害剤

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. A23187-treated cells.

3. DNA 脱メチル化の NETosis への関与

好中球様細胞の分化過程において TET2 の発現は亢進し、TET1 と TET3 の発現は減少した。分化により DNA 脱メチル化に関連するヒドロキシメチル化シトシン量がわずかに上昇したことから、好中球様細胞への分化には TET2 が関与する可能性があるが、NETosis に関与するかどうかは明らかになっていない。そこで、TET を阻害する ヒドロキシグルタル酸 (HG) を前処理し、NETosis の誘導や PAD4 の発現への影響を検討したところ、PAD4 の発現は抑制傾向ではあるものの有意な変化はなかった。また、NETosis の誘導においても影響はなかった。つまり、好中球の分化においては DNA 脱メチル化制御機構の関与は考えられるが、NETosis の誘導においては関与しないことが明らかとなった。

以上の結果から、NETosis の誘導は好中球分化過程における DNA メチル化の低下により増加し、PAD4 の発現やミトコンドリア由来活性酸素を介して制御されることが明らかとなった。好中球分化における DNA メチル化状態の変化が、その後の細胞死を運命づける可能性が示唆された。本研究における好中球の DNA メチル化状態の変化とそれによる NETosis 誘導への影響は、様々な疾患のエピジェネティクス異常によって誘引される病態の悪化につながる情報になりえると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Yasuda Hiroyuki, Takishita Yutaka, Morita Akihiro, Tsutsumi Tomonari, Tsuchiya Masahiko, Sato Eisuke F.	4. 巻 689
2. 論文標題 DNA demethylation increases NETosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108465 ~ 108465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2020.108465	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 Takishita Yutaka, Yasuda Hiroyuki, Shimizu Mio, Matsuo Akane, Morita Akihiro, Tsutsumi Tomonari, Tsuchiya Masahiko, Sato Eisuke F.	4. 巻 66
2. 論文標題 Formation of neutrophil extracellular traps in mitochondrial DNA-deficient cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 15 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.19-77	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 安田 浩之、瀧下 裕、森田 明広、堤 智斉、佐藤 英介
2. 発表標題 好中球のDNA脱メチル化はNETosis誘導を亢進させる
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田 浩之、瀧下 裕、森田 明広、堤 智斉、佐藤 英介
2. 発表標題 好中球のDNAメチル化とNETosisの関与
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安田 浩之、瀧下 裕、佐藤 英介
2. 発表標題 エピジェネティックな好中球分化制御に伴う好中球細胞外トラップ誘導変化
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田 浩之、瀧下 裕、佐藤 英介
2. 発表標題 好中球細胞外トラップのエピジェネティクス
3. 学会等名 日本生化学会中部支部代82回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田 浩之、瀧下 裕、佐藤 英介
2. 発表標題 好中球分化過程に伴うDNAメチル化制御とNETosis誘導変化
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 Hiroyuki Yasuda, Yutaka Takishita, Eisuke F Sato
2. 発表標題 Epigenetic regulation of neutrophil extracellular traps
3. 学会等名 19th the Society for Free Radical Research International Biennial Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田 浩之、瀧下 裕、佐藤 英介
2. 発表標題 DNA脱メチル化に伴う好中球細胞外トラップ誘導機構
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Yasuda, Yutaka Takishita, Eisuke F Sato
2. 発表標題 Neutrophil extracellular traps increase by DNA demethylation
3. 学会等名 The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田 浩之、松本健次郎、加藤伸一、佐藤英介
2. 発表標題 好中球DNA脱メチル化のNETosisにおける影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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

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