

令和 4 年 9 月 18 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08894

研究課題名（和文）好中球細胞外トラップ形成におけるリン脂質酸化制御の分子機構とその意義の解明

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms of lipid peroxidation-dependent NET formation

研究代表者

四元 聡志 (Yotsumoto, Satoshi)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30318191

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）：好中球細胞外トラップ（NET）は、ネトーシスと呼ばれる好中球特異的細胞死を伴って好中球自身から放出される。NET形成は、活性酸素種依存的に引き起こされることはよく知られているが、詳細は不明である。本研究では、リン脂質酸化がネトーシスとNET形成に重要であることを示した。このリン脂質酸化は、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）の酵素活性を介して起こることがわかった。一方、NET形成中にMPOによって顆粒から細胞質に放出される好中球エラスターゼ（NE）は、リン脂質酸化またはネトーシスの実行のいずれにも必要ではないが、クロマチンの脱凝縮および核の膨潤に寄与することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NET形成は、感染症以外の疾患でも形成され、様々な疾患の病理に深く関与していることが相次いで報告されている。例えば、糖尿病では、NET形成が創傷治癒の阻害要因となっていること、また、自己免疫疾患では、過剰なNETに含まれる核酸やタンパク質の免疫系への暴露が、自己抗体産生を促進することが報告されている。本研究で明らかになった機構を標的としたNET形成の制御は種々の疾患の新しい治療法の開発に繋がる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：Neutrophil extracellular traps (NETs) are released from neutrophils undergoing NETosis, a neutrophil-specific cell death mode. It is well known that production of reactive oxygen species (ROS) triggers NETosis and NET formation. However, details of intracellular signaling downstream of ROS production during NETosis and NET formation remains uncertain. Here, we demonstrated that the peroxidation of phospholipids (PLs) plays a critical role in NETosis and NET formation. PL peroxidation is mediated by the enzymatic activity of myeloperoxidase (MPO). On the other hand, neutrophil elastase (NE), which was previously reported to be released from granules to cytosol by MPO during NET formation, is not required for either the peroxidation of PLs or the execution of NETosis, but contributes to chromatin decondensation and nuclear swelling. These findings indicate the dual roles of MPO in NETosis and NET formation, and provide new insight into the molecular mechanism of these phenomena.

研究分野：免疫学

キーワード：好中球 好中球細胞外トラップ 脂質酸化 酸化リン脂質 ミエロペルオキシダーゼ 好中球エラスターゼ

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

### I) 種々の疾患病理における NET 形成の関与

感染が起ると、好中球は病原体を貪食し殺菌するとともに、自身のクロマチンを細胞外に放出して網状の構造物を形成する。この構造物は、好中球細胞外トラップ (NET) と呼ばれ、病原体を物理的に捕獲してこれを排除する機構と理解されている。最近になって、この NET 形成は、感染症以外の疾患でも形成され、これらの疾患の病理に深く関与していることが、相次いで報告されている。例えば、糖尿病では、NET 形成が創傷治癒の阻害要因となっていること、また、自己免疫疾患では、過剰な NET に含まれる核酸やタンパク質の免疫系への暴露が、自己抗体産生を促進することが報告されている。これらの知見は、NET 形成の制御が、種々の疾患の治療法に繋がる可能性を示唆するが、制御法開発の基盤となる NET 形成の分子機構の詳細は、未だ明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、好中球におけるリン脂質酸化制御に関わる分子を同定し、NET 形成の実行メカニズムの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### I) リン脂質酸化制御に関わる分子の同定とその NET 形成における役割の解明

#### a) ネトーシスおよび NET 形成の評価

NET 形成の評価は、ヒト/マウス好中球、HL-60 細胞 (好中球様に分化するヒト株化細胞) を用いた。細胞外に放出されたクロマチンを、核酸染色試薬 Sytox green で染色し NET 形成を評価した。さらに、NET 形成時に特異的に見られるヒストンのシトルリン化を免疫蛍光染色や western blot 法を用いて検出することで、NET 形成を評価した。

#### b) 同定した標的分子の NET 形成における役割の解明

同定した分子を欠損した細胞株や遺伝子欠損マウス由来好中球を用いて、同定した分子がネトーシスや NET 形成に関与するか *in vitro* で検討した。ヒト白血病細胞由来細胞株 HL-60 は、ジメチルスルホキシド存在下で培養すると好中球様に分化することが知られている。分化した HL-60 は、活性化すると NET が形成される。ゲノム編集法である CRISPR/CAS9 法 (レンチウイルス法) を用いて標的分子欠損 HL-60 を作製した。

### II) モデルマウスを用いた解析

マウスにグラム陰性菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖を経鼻投与すると肺に NET が形成されるとの報告がなされている。この方法を用いて、*in vivo* で肺に形成される NET を評価した。

## 4. 研究成果

### 1) 好中球におけるリン脂質酸化制御に関わる分子の同定

これまでに当研究室では、炎症性腸疾患の治療薬であるスルファサラジンや抗菌薬であるジアミノジフェニルスルフォン (DDS) を活性化マウス好中球に作用させるとネトーシスおよび NET 形成が促進されることを明らかにしていた。これらの化合物は、細胞内の脂質酸化を亢進することがわかった。さらに、リポドミクス解析により、これらの化合物が、細胞内のエーテル型酸化リン脂質を増加させることも見出した。これらの結果から、ネトーシスを起こした好中球ではリン脂質酸化の亢進が起こることがわかった。また、ネトーシスおよび NET 形成は、脂質酸化阻害剤であるビタミン E 誘導体トルロックスにより抑制されることから脂質酸化機構がネトーシス誘導・NET 形成が重要であることを明らかにしていた。

そこで、脂質酸化亢進に関与する分子の同定を試みた。ネトーシス誘導に好中球内顆粒に存在するミエロペルオキシダーゼ

(MPO) および好中球エラスターゼ (NE) が関与するとの報告がある。活性酸素により活性化した MPO は、NE を細胞質に放出する。放出された NE は、アクチンやヒストンを分解することによってネトーシスや NET を誘導すると報告されている。そこで、MPO および NE が脂質酸化依存的に起こるネトーシス誘導に関与するか検討した。ヒト末梢血好中球をトルロックス、NE 阻害剤である GW4869 または MPO 阻害剤である 4-ABH で前処理後、PMA でネトーシスを誘導した。Trolox と MPO 阻害剤は完全にネトーシス誘導を阻害した。一方で、NE 阻害剤はドナーにより効果が異なり、NE がネトーシス誘導に

かならずしも必要ではないことが示唆された (図 1)。これらの結

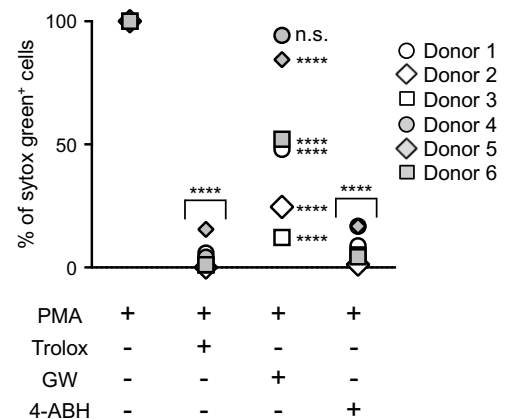


図 1. Differential contribution of MPO and NE in NETosis

果より、MPO がネトーシス誘導に重要であること、NE は常にネトーシス誘導に関与するわけではない可能性が示唆された。

ネトーシス誘導が、脂質酸化阻害剤および MPO 阻害剤で抑制されたことから、ネトーシス誘導において MPO と脂質酸化が密接に関係していると考えられた。そこで、次に MPO が脂質酸化依存的ネトーシス誘導に関与しているか MPO 欠損マウスを使用して検討を行った。PMA+DDS によって誘導されるネトーシスおよび NETs は MPO 欠損好中球では全く観察されなかった (図 2)。また、PMA+DDS による脂質酸化の亢進は MPO 欠損好中球では減少した (図 3)。網羅的酸化リン脂質解析を行ったところ、PMA+DDS により観察される酸化リン脂質の増加は、MPO 欠損好中球ではほとんど観察されなかった (図 4)。さらに、LPS 投与により肺で観察される NET 形成は MPO 欠損マウスでは減少することがわかった (図 5)。以上の結果から、MPO は脂質酸化依存的ネトーシス誘導に関与していることを明らかにした。

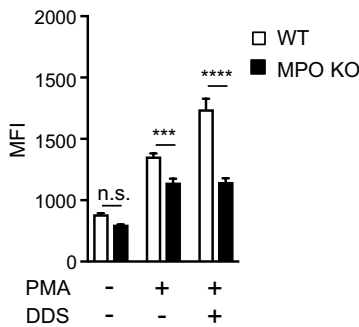


図 2. MPO plays a critical role in NET formation.

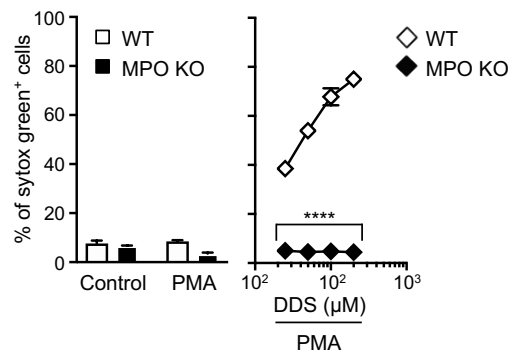


図 3. MPO plays a critical role in lipid peroxidation.

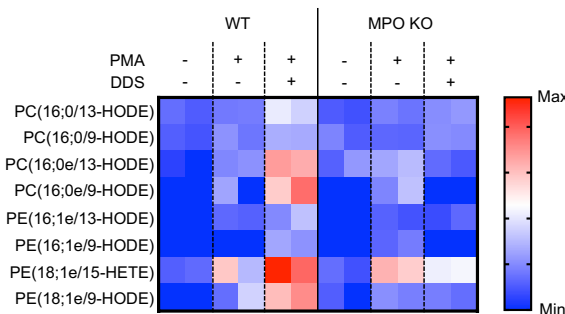


図 4. Wide-targeted lipidomics of oxidized phospholipids.

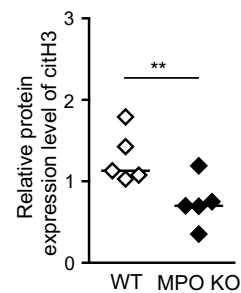


図 5. NET formation is suppressed in lung of MPO-deficient mice.

MPO は、過酸化水素と塩化物イオンを基質として次亜塩素酸を産生する酵素である。過酸化水素により活性化された MPO が細胞質に NE を放出することでネトーシスを誘導すると報告されている。この際、MPO の酵素活性は必要ないとの報告がある。そこで、MPO の酵素活性が脂質酸化依存的ネトーシス誘導に必要であるか検討した。ヒドラジン誘導体は、MPO の酵素活性を抑制することが知られている。そこで、15 種類のヒドラジン誘導体のネトーシス阻害活性と MPO 酵素活性阻害効果を検討した。その結果、MPO 酵素活性阻害能とネトーシス阻害能には正の相関があることがわかった (図 6)。また、MPO の酵素活性阻害能と脂質酸化阻害能も正の相関があることがわかりました (図 7)。これらの結果から、MPO の酵素活性が脂質酸化依存的ネトーシス誘導に重要であることが示唆された。

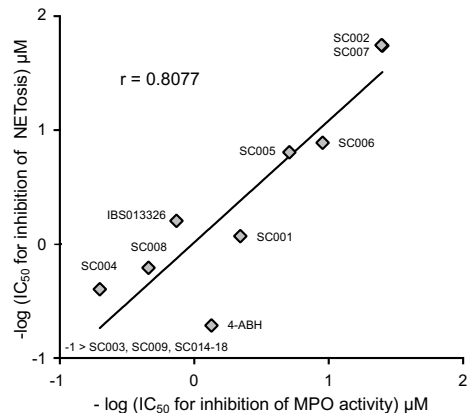


図 6. Correlation between MPO-inhibitory activity and NET-inhibitory activity of several hydrazine compounds.

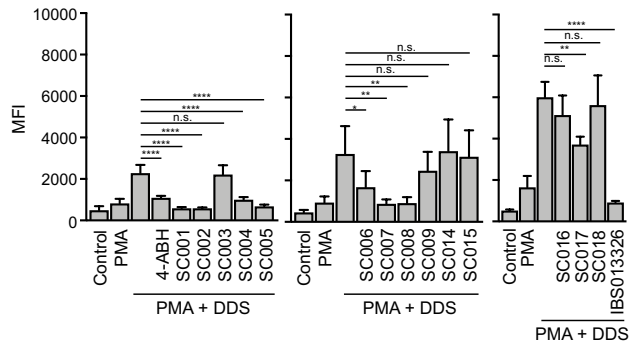


図 7. Lipid peroxidation and inhibitory effect of MPO enzymatic activity are strongly correlated.

MPO が不飽和リン脂質を直接酸化できるか検討した。組み換え MPO を過酸化水素および不飽和リン脂質と混合後、酸化リン脂質が産生されるか TBARS 法を用いて検討した。MPO の濃度に依存して脂質酸化の指標である MDA の増加が観察できた (図 8)。この結果より、MPO が直接的に脂質酸化を亢進できることが示唆された。この結果は、MPO が酵素活性を介して酸化リン脂質の産生に関与している可能性があることを示唆された。

MPO の酵素活性が重要であることを明確にするために次のような検討を行った。ヒト白血病細胞である HL-60 は DMSO 処理することにより好中球様細胞に分化することが知られている。CRISPR/CAS9 法を用いて MPO 欠損 HL-60 を作製した。さらに、この欠損細胞にレトロウイルスベクターを用いて MPO 再発現株および酵素活性のない変異 MPO 再発現株を作製した。MPO 再発現株ではネトーシスの誘導 (図 9 上段) および脂質の酸化 (図 9 下段) が認められましたが、変異 MPO 再発現株では認められなかった。これらの結果より MPO の酵素活性が脂質酸化依存的ネトーシス誘導に必須であることを明らかにした。

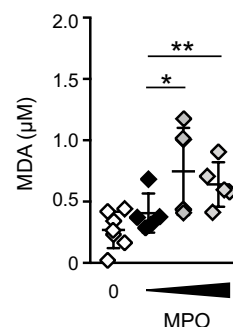


図 8. Lipid peroxidation ability of MPO.

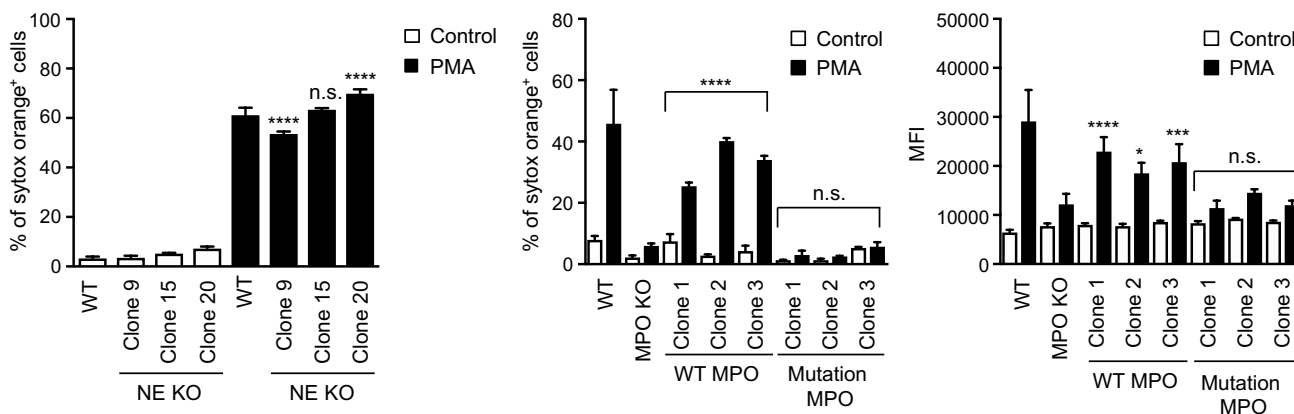


図 9. MPO contributes to the execution of NET formation through its enzymatic activity to oxidize phospholipids.

脂質過酸化依存的ネトーシス誘導における MPO-NE の役割をさらに明らかにするために、NE 欠損 HL-60 細胞を作製した。NE 欠損株は、PMA 刺激により WT 株と同定度ネトーシスが誘導された (図 10 上段)。さらに、PMA 刺激による脂質過酸化も NE 欠損によってほとんど影響を受けなかった (図 10 中段)。これらの結果より、NE が脂質過酸化依存的ネトーシス誘導に関与しないことが示唆された。さらに、NE 欠損株の NET 形成能を評価した。citH3 陽性細胞の数は NE 欠損 HL-60 細胞で有意に減少した (図 10 下段)。この結果は、

NE が脂質過酸化依存性ネトーシス誘導には関与しないが、NET 形成に重要であること示唆している。以上結果をまとめると、脂質酸化依存的ネトーシス誘導に関与する分子として MPO を同定した。MPO は過酸化水素を基質として次亜塩素酸を産生する。産生した次亜塩素酸がリン脂質を酸化して酸化リン脂質を生み出し、この酸化リン脂質が NE と強制的に働くことでクロマチンの脱凝集とヒストンの分解を引き起こしネトーシスが誘導されると考えられた。

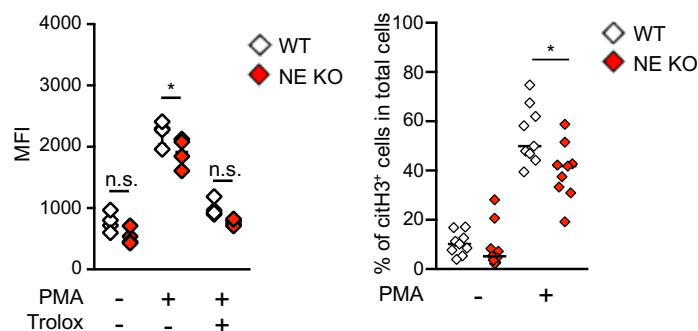


図 10. NE is dispensable for lipid peroxidation dependent NETosis but is involved in NET formation.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件) すべて査読あり

1. Oxidized Phospholipids and Neutrophil Elastase Coordinately Play Critical Roles in NET Formation. **S. Yotsumoto (16<sup>th</sup>/16 authors) (責任著者)**, et al., *Frontiers in cell and developmental biology* 9 718586-718586 (2021)
2. Garcinielliptone G from *Garcinia subelliptica* Induces Apoptosis in Acute Leukemia Cells. **S. Yotsumoto (4<sup>th</sup>/9 authors)**, et al., *Molecules* 26(9) 2422-2422 (2021)
3. Immunoregulatory Monocyte Subset Promotes Metastasis Associated With Therapeutic Intervention for Primary Tumor. **Yotsumoto (16<sup>th</sup>/16 authors) (責任著者)**, et al., *Frontiers in immunology* 12 663115-663115 (2021)
4. Frontline Science: Conversion of neutrophils into atypical Ly6G+ SiglecF+ immune cells with neurosupportive potential in olfactory neuroepithelium. **S. Yotsumoto (3<sup>rd</sup>/12 authors)**, et al., *Journal of leukocyte biology* 109(3) 481-496 (2020)
5. Development of a Water-Soluble Indolylmaleimide Derivative IM-93 Showing Dual Inhibition of Ferroptosis and NETosis. **Yotsumoto (8<sup>th</sup>/14 authors)**, et al., *ACS medicinal chemistry letters* 10(9) 1272-1278 (2019)

[書籍等出版物] (計 1 件)

1. 細胞死：その分子機構, 生理機能, 病態制御  
三浦, 正幸, 清水, 重臣 (担当: 分担執筆, 範囲: ネトーシスと疾患)  
化学同人 2019 年 8 月 (ISBN: 9784759817317)

[学会発表] (計 4 件)

1. 脂質酸化依存的ネトーシスの誘導機構  
**四元聡志**, 田中正人  
第 94 回日本生化学会大会 2021 年 11 月 5 日 (招待講演)
2. 新しい単球サブセットによる がん転移の促進とその機構  
**四元聡志**, 田中正人  
第 65 回日本薬学会関東支部大会 2021 年 9 月 11 日 (招待講演)
3. ネトーシスにおける脂質酸化制御の分子機構  
**四元聡志**, 田中正人  
日本薬学会第 140 年会 2020 年 3 月 27 日 (招待講演)
4. Hyperoxidation of ether-linked phospholipids accelerates neutrophil extracellular trap formation.  
**Satoshi Yotsumoto**, Tatsuya Chiba, Rio Ohmura, Ryohei Aoyagi, Makoto Arita, Masato Tanaka.  
60th International Conference on the Bioscience of Lipids 2019 年 6 月 19 日

[産業財産権] (計 1 件)

1. 特願 2021-126801 がん転移抑制のための医薬組成物  
田中正人 **四元聡志** 浅野謙一 澁谷拓未 池田直輝

[研究組織]

- (1) 研究代表者  
四元 聡志 (Yotsumoto Satoshi)  
東京薬科大学 生命科学部 助教
- (2) 研究分担者  
鬮 孝介 (Dodo Kosuke)  
理化学研究所 袖岡有機合成化学研究室 専任研究員

## 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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tokuhiko Takuto, Ishikawa Akane, Sato Haruka, Takita Shunya, Yoshikawa Ayuri, Anzai Ryoko, Sato Shinichi, Aoyagi Ryohei, Arita Makoto, Shibuya Takumi, Aratani Yasuaki, Shimizu Shigeomi, Tanaka Masato, Yotsumoto Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Oxidized Phospholipids and Neutrophil Elastase Coordinately Play Critical Roles in NET Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental 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） 10.3389/fcell.2021.718586	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 Shibuya Takumi, Kamiyama Asami, Sawada Hirotaka, Kikuchi Kenta, Maruyama Mayu, Sawado Rie, Ikeda Naoki, Asano Kenichi, Kurotaki Daisuke, Tamura Tomohiko, Yoneda Atsuko, Imada Keisuke, Satoh Takashi, Akira Shizuo, Tanaka Masato, Yotsumoto Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Immunoregulatory Monocyte Subset Promotes Metastasis Associated With Therapeutic Intervention for Primary Tumor	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.2021.663115	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 Yun YoungSook, Shioura Mariko, Hitotsuyanagi Yukio, Yotsumoto Satoshi, Takahashi Yuji, Aoyagi Yutaka, Kinoshita Takeshi, Takeya Koichi, Inoue Hideshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Garcinielliptone G from Garcinia subelliptica Induces Apoptosis in Acute Leukemia Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2422 ~ 2422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26092422	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 Ogawa Kei, Asano Kenichi, Yotsumoto Satoshi, Yamane Tsuyoshi, Arita Makoto, Hayashi Yoshihiro, Harada Hironori, Makino Okamura Chieko, Fukuyama Hidehiro, Kondo Kenji, Yamasoba Tatsuya, Tanaka Masato	4. 巻 109
2. 論文標題 Frontline Science: Conversion of neutrophils into atypical Ly6G+SiglecF+ immune cells with neurosupportive potential in olfactory neuroepithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Leukocyte Biology	6. 最初と最後の頁 481 ~ 496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JLB.1H10620-190RR	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 Dodo Kosuke, Kuboki Erika, Shimizu Tadashi, Imamura Ryu, Magarisawa Megumi, Takahashi Masahiro, Tokuhiko Takuto, Yotsumoto Satoshi, Asano Kenichi, Nakao Shuhei, Terayama Naoki, Suda Takashi, Tanaka Masato, Sodeoka Mikiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of a Water-Soluble Indolylmaleimide Derivative IM-93 Showing Dual Inhibition of Ferroptosis and NETosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1272 ~ 1278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.9b00142	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takuto Tokuhiko, Satoshi Yotsumoto, Haruka Sato, Sayuri Yoshikawa, Shunya Takita, Masato Tanaka,
2. 発表標題 Myeloperoxidase-dependent lipid peroxidation plays a critical role in neutrophil extracellular trap formation
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 四元聡志、田中 正人
2. 発表標題 ネトーススにおける脂質酸化制御の分子機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Satoshi Yotsumoto, Tatsuya Chiba, Rio Ohmura, Ryohei Aoyagi, Makoto Arita, Masato Tanaka
2. 発表標題 Hyperoxidation of ether-linked phospholipids accelerates neutrophil extracellular trap formation
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 四元聡志, 田中正人
2. 発表標題 新しい単球サブセットによる がん転移の促進とその機構
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 四元聡志, 田中正人
2. 発表標題 脂質酸化依存的ネトーシスの誘導機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 三浦 正幸、清水 重臣	4. 発行年 2019年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 216
3. 書名 細胞死	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 がん転移抑制のための医薬組成物	発明者 田中正人 四元聡志 浅野謙一 澁谷拓未 池田直輝	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-126801	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	どど 孝介  (Dodo Kosuke)  (20415243)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員    (82401)	

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