

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07294

研究課題名（和文）スーパーオキシド産生酵素と自己免疫疾患病態に関するパラドックスの解明

研究課題名（英文）Differential role of NADPH oxidase in autoimmune diseases

研究代表者

松本 みさき（Matsumoto, Misaki）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：80533926

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）：低用量LPSによって惹起されるコラーゲン誘発性関節炎は、Nox1遺伝子欠損マウス（Nox1-KO）で有意に抑制された。コラーゲン免疫2週後のpriming相における脾細胞のTh1/Th17応答は野生型およびNox1-KOで同等であった。一方、LPS投与2時間後に脾臓の単球・マクロファージ及び樹状細胞においてNox1遺伝子発現が顕著に増加した。これらの細胞は関節炎の発症に重要であることから、NOX1はeffector（inflammation）相において関節炎の発症に関わる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NOX2/NADPH oxidaseの遺伝的機能欠損は自己免疫疾患の発症リスクを増大させる。このため自己免疫疾患におけるNOX2の抑制的役割は注目されているが、発現量で劣るNOX1についてはあまり解析が進んでいなかった。本研究は、NOX1はNOX2と異なり自己免疫疾患の発症に寄与することを初めて報告したものであり、免疫系細胞におけるNOX1の新しい役割を提起するものである。

研究成果の概要（英文）：Nox1 deficiency significantly suppressed the onset and severity of the LPS-induced exacerbation of collagen-induced arthritis in mice. Splenocytes from both genotypes showed similar Th1/Th17 responses at 2 weeks after the collagen immunization. On the other hand, intraperitoneal injection of LPS increased NOX1 mRNA in CD11b+ monocytes/macrophages as well as CD11c+ dendritic cells of the spleen. These results suggest that NOX1 is involved in the effector（inflammation）phase of the experimental arthritis, but not in the priming phase.

研究分野：薬理学

キーワード：NADPH oxidase スーパーオキシド 関節炎 自己免疫疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

NADPH oxidase はスーパーオキシドおよび過酸化水素などの活性酸素種産生酵素である。NADPH oxidase には複数のアイソフォームがあるが、免疫細胞において最も注目されているアイソフォームは NOX2 (gp91<sup>phox</sup>) である。NOX2 は好中球に高発現し、ファゴソーム内で病原体を殺菌する役割を担っており、その重要性は *Nox2* の遺伝的機能欠損によって発症する慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous diseases: CGDs) から支持される。CGDs の患者は細菌に対する易感染症を示すだけでなく、高頻度に炎症性腸炎を合併し、また関節リウマチや全身性エリテマトーデスに似た自己免疫疾患症状を伴う。これらの事実は *Nox2* の遺伝子欠損マウスを用いた研究でも確認されている。

一方、申請者らは NOX1 アイソフォームの研究を行ってきた中で、低用量 LPS によって惹起されるコラーゲン誘発性関節炎は *Nox1* 遺伝子欠損マウス (*Nox1*-KO) で有意に抑制されることを見出した。この結果は前述した NOX2 欠損によって自己免疫疾患発症リスクが増大するという事実と相反している。特に NOX1 については免疫系細胞における役割の検討が進んでいないため、機序の解明が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では「異なる NOX アイソフォームによって自己免疫疾患の発症リスクが変わる」ことに着目し、スーパーオキシド産生酵素と自己免疫疾患病態に関するパラドックスを解明することを目的とした。特に、免疫系細胞では NOX2 に比べ発現量で劣る NOX1 の解析が進んでいないことから、NOX1 を中心に解析を進めた。

### 3. 研究の方法

#### (1) コラーゲン誘発性関節炎モデルと内毒素 Lipopolysaccharide (LPS) 処置

C57BL6 系雄性 13-20 週齢の WT および *Nox1*-KO を用いた。トリコラーゲン Type II (CII) 200 µg/50 µL および完全フロイントアジュバント 50 µL を混和したエマルジョンを作製し、イソフルラン麻酔下に背側尾部へ皮下投与を行なった (priming 相)。3 週後、LPS 40 µg を腹腔内投与した (effector 相)。初回免疫より 8 週後に血清を回収し、ELISA 法により抗 CII 抗体量を測定した。

#### (2) 脾細胞を用いた Th1/Th17 応答

脾細胞を  $2 \times 10^6$  細胞ずつ 48 ウェルプレートに播種し、95 °C で 10 分間熱変性させた CII (100 µg/mL) または陽性コントロールとしてコンカナバリン A (ConA, 5 µg/mL) を添加した。培養 3 日後、培養上清中における IFN- $\gamma$  および IL-17A 濃度を ELISA 法により測定した。

#### (3) 磁気ビーズを使用した細胞分離

野生型マウスに LPS 40 µg を腹腔内投与し、2 時間後に脾細胞を回収した。塩化アンモニウム溶液による溶血後、各種抗体を結合した磁気ビーズを用いた細胞分離を行い、各種免疫細胞を回収後 total RNA を抽出し遺伝子解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) Priming 相における Th1/Th17 応答解析

コラーゲン (CII) 免疫 2 週後に脾細胞を単離し、CII 抗原刺激 3 日後の IFN- $\gamma$  および Th17A を測定した。野生型および *Nox1*-KO いずれの細胞においても同等のサイトカイン上昇が認められ、有意差はなかった。

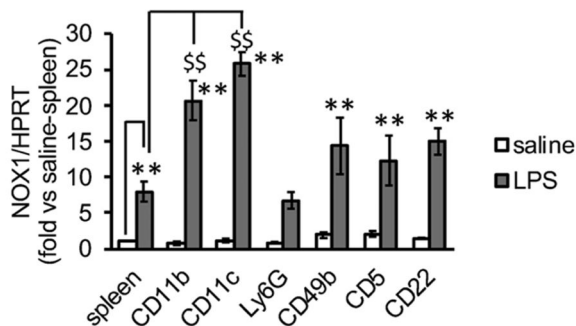
#### (2) Effector 相における遺伝子発現解析

野生型マウスに LPS 40 µg を腹腔内投与し 2 時間後に脾臓の各種免疫細胞を回収した。NOX1 は特に、CD11b 陽性単球・マクロファージ及び CD11c 陽性樹状細胞において *Nox1* 遺伝子発現が顕著に増加した (図)。これらの細胞は関節炎の発症に重要であることから、NOX1 は effector

(inflammation) 相において関節炎の発症に関わる可能性が示された。

### (3) 骨髄における遺伝子発現解析

(2)の解析において、骨髄でも同様に *Nox1* 遺伝子の発現増加が認められた。特に単球・マクロファージ細胞分画および Sca-1 陽性細胞分画においてその増加は顕著であった。野生型および *Nox1*-KO より骨髄 Sca-1 陽性細胞を抽出し RNA-seq 解析を行なったところ、複数の遺伝子が増動していた。今後詳細に解析する予定である。



図：脾臓の各種免疫細胞における *Nox1* 遺伝子発現

### (4) 増感剤を用いたスーパーオキシド測定系の開発

NOX1 活性（スーパーオキシド産生）を阻害する化合物のスクリーニングを進める中で偶然に、スーパーオキシド検出を増感させる性質をもつ化合物 X を見出した。本化合物はバックグラウンドシグナルには無影響であり、Signal/Noise 比を著しく改善させた。スーパーオキシドは高反応性かつ短寿命であり、特に少量のサンプルにおけるその検出は容易でないことから、化合物 X を増感剤とした検出系の改善が当該分野の発展に繋がると期待できる。

### (5) まとめ

実験的関節炎の発症における NOX1 の寄与は、*Nox2* やその関連因子 *Ncf1* (p47<sup>phox</sup>) の遺伝子欠損マウスで多数報告されているコラーゲン誘発性関節炎が悪化する結果と相反する表現型である。NOX2 については、抗原提示細胞の NOX2 由来スーパーオキシドが自己反応性 T 細胞シグナリングを抑制する可能性や、貪食細胞の NOX2 が死細胞クリアランスを促進することで、免疫を負に制御する可能性が指摘されている。この点で NOX1 は異なる機序で関節炎の発症に関わっており、関節炎の治療標的となり得る。機序について引き続き詳細に追究する必要があるが、NOX1 はマクロファージから破骨細胞への分化を促進することや、単球由来の活性酸素種が CXCL8 産生を介して好中球浸潤を促すことが報告されていることから、複合的に関与する可能性が考えられる。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumoto M, Liu J, Iwata K, Ibi M, Asaoka N, Zhang X, Katsuyama M, Matsuda M, Nabe T, Scroder K, Yabe-Nishimura C.	4. 巻 146 (2)
2. 論文標題 NOX1/NADPH oxidase is involved in the LPS-induced exacerbation of collagen-induced arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 88-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.01.009	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 該当する

1. 著者名 Matsumoto M, Sawada H, Iwata K, Ibi M, Asaoka N, Katsuyama M, Shintani-Ishida K, Ikegaya H, Takegami S, Umemura A, Yabe-Nishimura C.	4. 巻 9
2. 論文標題 Bortezomib is an effective enhancer for chemical probe-dependent superoxide detection.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Med	6. 最初と最後の頁 941180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.941180	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 該当する

〔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 松本みさき
2. 発表標題 スーパーオキシド産生酵素NOX1/NADPH oxidase欠損マウスにおけるLPS惹起性コラーゲン誘発性関節炎の抑制
3. 学会等名 第22回免疫サマースクール2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本みさき、矢部千尋
2. 発表標題 実験的関節炎の発症に関わる活性酸素産生酵素NOX1/NADPHオキシダーゼ
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本みさき、矢部千尋、榎村敦詩
2. 発表標題 ポルテゾミブ添加によるスーパーオキシドの高感度な検出法
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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	岩田 和実  (Iwata Kazumi)  (60305571)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師    (24303)	

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		
ドイツ	Goethe-University		