

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08487

研究課題名(和文) 感染時にみられる好中球のエネルギー産生の場の変更機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism that changes the energy production field of neutrophils during infection

研究代表者

真崎 雄一 (Mazaki, Yuichi)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：60311304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：好中球は、免疫細胞の一つであり、その主な役割は、体内へ侵入してきた病原体を排除することである。好中球は、通常、生体にダメージを与える活性酸素種の産生のない解糖系を使ってエネルギーであるATPを産生している。しかし、体内に病原体が侵入してくると、大量のエネルギーを必要とするため、活性酸素種の産生を伴うミトコンドリアも使ってATPを産生するようになる。今回、我々は、この過程にLRRK2というミトコンドリア関連タンパク質が重要な役割を果たしており、LRRK2を発現していない好中球や培養細胞を分化させた好中球様細胞では、ミトコンドリアの機能が低下し、病原体へ向かう能力も低下することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好中球は、体内へ侵入してきた病原体を体内から取り除くという重要な役割を持っている。しかし、過剰に働けば、我々の体にダメージを与え、死をもたらすことも免疫細胞である。この過剰な働きを抑える薬としては、現在、副腎皮質ステロイド薬が最も使用されているが、副腎皮質ステロイド薬は、副作用も多い薬である。今回の研究によって、好中球の活性化にLRRK2が重要な役割を果たしていることが明らかになった。この研究を足掛かりに、好中球に特異的に効く副作用の少ない薬が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils are immune cells that make up more than half of human white blood cells, and play a role in eliminating pathogens that invade the body. Normally, neutrophils use glycolysis to generate ATP, which is energy, in order to suppress the generation of active oxygen. On the other hand, when a pathogen invades the body, a large amount of energy is required, so ATP is generated using mitochondria. In this study, we found that LRRK2, mitochondrial fusion related proteins, are important for this transfer process. Furthermore, we showed that knockout or knockdown of LRRK2 reduced mitochondrial function in neutrophils and neutrophil-like cells and induced weakening of the defensive ability of neutrophils against pathogens.

研究分野：感染症内科学

キーワード：好中球 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

好中球は、通常、細胞質内の解糖系を用いて ATP を産生しているのに対し、病原体が体内に侵入すると、大量の ATP を得るためにミトコンドリア内の電子伝達系を使って ATP を産生することが知られている。電子伝達系を使った ATP 産生は、大量に ATP を得ることができる一方で、有毒な活性酸素種 (ROS) も産生され、周辺の正常な細胞にもダメージを与える。そのため、電子伝達系を使った ATP の産生は、厳密に制御されていると考えられている。しかし、病原体の感染によって、解糖系からミトコンドリアを使った産生へと、どのようなメカニズムでエネルギー産生の場が変更するようになるのかについては謎であった。

我々は、以前に、HL-60 細胞を好中球様細胞に分化させた細胞 (dHL-60 細胞) を細菌性ペプチド *N*-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) で刺激すると、5 分という極めて短時間にミトコンドリアが融合し、酸化的リン酸化の量が増加すること。この過程には、Mitofusin 2 (MFN2) が関わっており、MFN2 の発現を抑えると、ミトコンドリアの融合と酸化的リン酸化の量が減少すること。また、トランスウェルを使った解析によって fMLP の刺激による遊走能 (ケモタキシス) も減少することを明らかにしていた (Mazaki *et al.* 2019)。さらに MFN2 の活性化に関わる分子を探索した結果、dHL-60 細胞で MFN2 結合タンパク質の一つである Leucine Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) の発現を抑えると、fMLP 刺激によるミトコンドリアの融合抑えられること。トランスウェルを使った解析によってケモタキシスが抑えられることが明らかになった。以上のような結果から、『fMLP からのシグナルが LRRK2 から MFN2 へと伝わり、ミトコンドリアが融合することで、電子伝達系を使った ATP 産生ができるようになる』のではないかという作業仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

これまでに好中球のミトコンドリアの形態の異常が、易感染性になる原因の一つとして報告されている。さらに、我々は、dHL-60 細胞において MFN2 や LRRK2 がミトコンドリアの融合に関与していることを見出している。そこで、本研究では、LRRK2 と MFN2 を中心に、ミトコンドリア融合のメカニズムを調べることによって、感染に伴って起こる好中球のエネルギー産生の場の変更機構を明らかにすることを目的とし研究を行うこととした。

## 3. 研究の方法

研究では、これまで明らかにしてきたことが dHL-60 細胞特異的な現象でないことを調べるために、まず LRRK2 ノックアウトマウスから好中球を取り出し、その性質を調べた。その後、dHL-60 細胞を使って、MFN2 との関係を中心にメカニズムを調べた。具体的には以下に行った。

### (1) LRRK2 ノックアウトマウスにおけるケモタキシス解析

野生型のマウス、LRRK2 ノックアウトマウスから、それぞれ好中球を取り出し、トランスウェルを使って、膜の裏側に移動してくる好中球数をカウントした。

野生型のマウス、LRRK2 ノックアウトマウスから、それぞれ好中球を取り出し、Dunn チャンバーを移動する好中球の動画を撮影した。その後、ImageJ を使って、細胞の移動

速度、移動の方向性を解析した。

野生型のマウス、LRRK2 ノックアウトマウスの皮下に、空気を注射し、空気嚢を作製した。その後、空気嚢内に IL-8 を注射し、刺激によって集まってくる好中球数をカウントした。

(2) dHL-60 細胞を使ったケモタキシス解析

small hairpin RNA (shRNA) によって LRRK2 の発現を抑えた HL-60 細胞 (LRRK2 ノックダウン HL-60 細胞)、ネガティブコントロールの shRNA を発現させた HL-60 細胞 (ネガティブコントロール HL-60 細胞) を作製し、それぞれ dHL-60 細胞に分化させた。その後、Dunn チャンバーと動画撮影によって、細胞の移動速度、移動の方向性を解析した。

(3) 酸素消費速度解析

LRRK2 ノックダウン HL-60 細胞、ネガティブコントロール HL-60 細胞を、それぞれ dHL-60 細胞に分化させ、high resolution respirometry を使って解析した。

(4) ミトコンドリアの形態解析

LRRK2 ノックダウン HL-60 細胞、ネガティブコントロール HL-60 細胞を、それぞれ dHL-60 細胞に分化させ、超解像度顕微鏡を使って、fMLP の刺激前後のミトコンドリアの形態を観察し解析した。

(5) ミトコンドリア分画における MFN2 及び LRRK2 タンパク質量の解析

LRRK2 ノックダウン HL-60 細胞、ネガティブコントロール HL-60 細胞を、それぞれ dHL-60 細胞に分化させた。その後、fMLP で刺激し、細胞膜破壊後、ミトコンドリア分画を集めた。タンパク質量は、ウエスタンブロットティング法を用いて、fMLP 刺激前後の MFN2 と LRRK2 を解析した。

(6) MFN2 の GTP 結合活性の解析

LRRK2 ノックダウン HL-60 細胞、ネガティブコントロール HL-60 細胞を、それぞれ dHL-60 細胞に分化させた。その後、fMLP の刺激し、細胞を可溶性化後、刺激前後の細胞溶解液を GTP ビーズに結合させ、GTP に結合するタンパク質を集めた。GTP に結合活性を持つ MFN2 のタンパク質量は、ウエスタンブロットティング法を用いて解析した。

(7) LRRK2 キナーゼ阻害薬とケモタキシス解析

dHL-60 細胞を LRRK2 キナーゼ阻害薬 MLI-2 で処理した。その後、処理群、未処理群をトランスウェルと Dunn チャンバーを使って調べた。

#### 4. 研究成果

(1) LRRK2 ノックアウトマウスにおけるケモタキシス解析

これまでに我々は、dHL-60 細胞で LRRK2 の発現を抑えると、ケモタキシスが低下することを見出している。そこで、好中球でも同様の現象が見られるのか、マウスの骨髄から取り出した

好中球を、トランスウェルを使って調べた。その結果、LRRK2 ノックアウトマウスから取り出した好中球は、野生型マウスから取り出した好中球に比べ、ケモタキシスが低下することが明らかになった。さらに、ケモタキシスの低下を詳しく分析するために Dunn チャンバーを用いて動画撮影をし、その後、細胞の移動速度、移動の方向性を解析した。その結果、細胞の移動の方向性は変わらないものの、LRRK2 ノックアウトマウスから取り出した好中球では、移動の速度が低下していることが明らかになった。

このように骨髄から取り出した好中球では、ケモタキシスが低下したことから、次に、生体内での好中球のケモタキシスを調べた。皮下に作った空気嚢内に IL-8 を注射し、4 時間後に集まってくる好中球を調べた。その結果、LRRK2 ノックアウトマウスでは、集まってくる好中球数が減少することが明らかになった。

#### (2) dHL-60 細胞を使ったケモタキシス解析

マウスから取り出した好中球で、dHL-60 細胞と同様、ケモタキシスが低下したことから、dHL-60 細胞でも Dunn チャンバーを用いて細胞の移動速度、移動の方向性を解析した。その結果、dHL-60 細胞でも細胞の移動の方向性は変わらないものの、LRRK2 ノックダウン dHL-60 細胞では細胞の移動速度が低下していることが明らかになった。

#### (3) 酸素消費速度解析

MFN2 ノックダウン HL-60 細胞では、酸化的リン酸化の量が減少することから、LRRK2 ノックダウン dHL-60 細胞でも同様に解析した。その結果、MFN2 ノックダウン dHL-60 細胞と同様、LRRK2 ノックダウン dHL-60 細胞で酸化的リン酸化の量が減少することが明らかになった。

#### (4) ミトコンドリアの形態解析

MFN2 ノックダウン HL-60 細胞では、ミトコンドリアの融合が抑えることから、LRRK2 ノックダウン dHL-60 細胞でも同様に解析した。その結果、MFN2 ノックダウン dHL-60 細胞と同様、fMLP 刺激後のミトコンドリアの融合が抑えられた。

#### (5) ミトコンドリア分画における MFN2 及び LRRK2 タンパク質量の解析

MFN2 ノックダウン dHL-60 細胞と同様、LRRK2 ノックダウン dHL-60 細胞でも酸化的リン酸化の量が減少、ミトコンドリアの融合抑制が見られたことから、MFN2、LRRK2 とミトコンドリアの関係を調べることにした。その結果、LRRK2 は、fMLP 刺激によってミトコンドリア分画での量が増加することが明らかになった。一方、MFN2 は、fMLP 刺激しても変化が見られなかった。さらに、LRRK2 ノックダウン dHL-60 細胞でも MFN2 のミトコンドリア分画の量に変化は見られなかった。

#### (6) MFN2 の GTP 結合活性の解析

上記のようにミトコンドリア分画における MFN2 量に LRRK2 は影響を与えなかったことから、MFN2 の GTP 結合活性に影響を与えるか調べた。その結果、fMLP 刺激によって、GTP に結合活性を持つ MFN2 の割合が増加することが明らかになった。一方、LRRK2 ノックダウン dHL-60 細胞では、その増加が認められなかった。以上のことから、fMLP 刺激を受けると、LRRK2 は、MFN2 のミトコンドリアへの局在変化ではなく、MFN2 の GTP 結合活性を上げることによって、ミトコンドリアの形態変化を促し、さらに酸化的リン酸化を増加させることで、エネルギーである ATP の

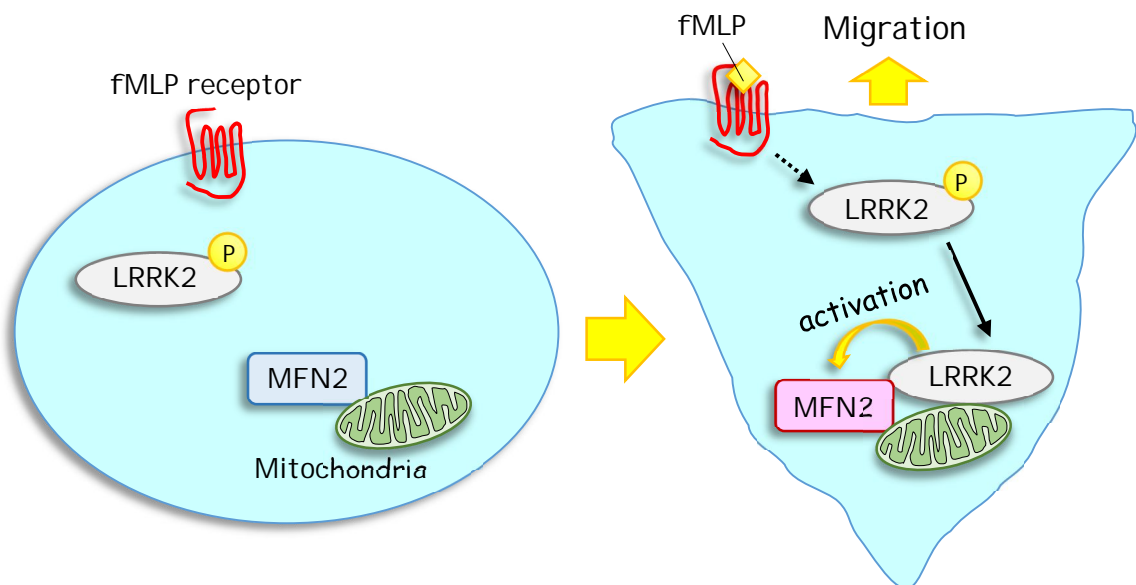
産生を増加させていることが考えられた。

#### (7) LRRK2 キナーゼ阻害薬とケモタキシス解析

LRRK2 はセリン・スレオニンキナーゼ活性を持っており、このキナーゼの活性化型変異体が、一部のパーキンソン病の原因であることが報告されている。そこで、LRRK2 のセリン・スレオニンキナーゼ活性が dHL-60 細胞のケモタキシスに影響を与えるか調べた。その結果、LRRK2 キナーゼ阻害薬では、未処理のもの比べ、dHL-60 細胞の移動速度が増加することが明らかになった。LRRK2 のキナーゼ機能不全タンパク質では、酸化的リン酸化活性が増加することが報告されていることから、LRRK2 キナーゼ阻害薬によって、酸化的リン酸化活性が増加し、dHL-60 細胞のケモタキシスが増加する可能性が考えられる。

LRRK2 は、キナーゼ活性化型変異体が、パーキンソン病の原因遺伝子として報告されており、主に神経細胞で研究が行われてきたが、本研究で、好中球における役割を調べた結果、LRRK2 が MFN2 を活性化することで ATP の産生を増加させ、感染後の好中球の活性化に寄与していることが初めて示唆された。LRRK2 のキナーゼ活性化型変異体を持つ患者は、炎症性腸疾患を罹患しやすいことも報告されている。LRRK2 は、他の免疫細胞に比べ、好中球で強く発現しており、またインターフェロンのシグナル伝達やファゴサイトーシスに関与していることから、LRRK2 のキナーゼ活性化型変異体が好中球の機能を破壊することで炎症性腸疾患を引き起こしているのかもしれない。

今回、好中球の活性化に LRRK2 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後、これを足掛かりに、好中球に特異的に効く副作用の少ない薬が開発されることが期待される。



fMLP、LRRK2、MFN2、ミトコンドリア、ケモタキシスの関係を示したモデル図

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 2件）

1. 著者名 Mazaki Yuichi, Handa Haruka, Fumoto Yoshizuki, Horinouchi Takahiro, Onodera Yasuhito	4. 巻 21
2. 論文標題 LRRK2 is involved in the chemotaxis of neutrophils and differentiated HL-60 cells, and the inhibition of LRRK2 kinase activity increases fMLP-induced chemotactic activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12964-023-01305-y	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 Horinouchi Takahiro, Mazaki Yuichi, Miwa Soichi	4. 巻 154
2. 論文標題 Mechanism of cytotoxicity induced by the cigarette smoke extract (CSE) of heated tobacco products in vascular smooth muscle cells: A comparative study of the cytotoxic effects of CSE and the ferroptosis inducer, erastin	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 86 ~ 96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2023.12.010	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 真崎雄一、東恒仁、堀之内孝広、三輪聡一
2. 発表標題 エンドセリン-1によるERKの活性化におけるAnnexin A2の役割
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真崎雄一、東恒仁、小野寺康仁
2. 発表標題 好中球様細胞に分化させたHL-60細胞のケモタキシスにおけるミトコンドリア関連タンパク質の役割
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真崎雄一、東恒仁、小林純子、小野寺康仁
2. 発表標題 好中球様細胞に分化させたHL-60細胞のケモタキシスにおけるMFN2及びMFN2結合タンパク質の役割
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真崎雄一、東恒仁、堀之内孝広、三輪聡一
2. 発表標題 メラノーマ細胞においてAnnexin A2のリン酸化はエンドセリン-1刺激によるAKTの活性化に関与する
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真崎雄一、半田悠、麓佳月
2. 発表標題 fMLP刺激による好中球のケモタキシスにおけるLRRK2の役割
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 真崎雄一、半田悠、麓佳月
2. 発表標題 LRRK2は好中球の走化性に関与しており、LRRK2のキナーゼ阻害剤MLi-2は走化性活性の増加を引き起こす
3. 学会等名 第97回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------