

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15276

研究課題名（和文）細胞外トラップの消化管炎症における役割解明

研究課題名（英文）Role of extracellular traps in gastrointestinal inflammation

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、IBDをはじめとする消化管炎症において、NETsやMETsの病態への関与とその誘導機構をPADI2とPADI4に着目して明らかにすることを目的とした。TNBS誘起大腸炎またはDSS誘起大腸炎ではNETsおよびMETsが誘導され、特にTNBS誘起大腸炎においてはPADI4を介したNETsがその病態形成に関与することが明らかとなった。対照的に、DSS誘起大腸炎ではPADI2およびPADI4KOマウスで病態が悪化した。以上の結果から、IBDにおいてPADI2およびPADI4KOは細胞外トラップ依存的に、または非依存的に病態形成に関与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前より、様々な疾患において細胞外トラップの関与が示唆されてきたが、IBDなどの消化管炎症に細胞外トラップが関与するか検討した研究は少なく、NETsとMETsの誘導比較という観点から検討した研究はない。本研究では、消化管炎症において細胞外トラップが免疫応答の一端に関与することを明らかにした。このとき、細胞外トラップ依存的な病態形成だけでなく、PADI2とPADI4を介した細胞外トラップ非依存的な経路によってIBDの病態が進行する可能性があるという結果も得られ、より詳細な病態形成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）：The purpose of this study was to clarify the involvement of NETs and METs in the pathology of gastrointestinal inflammation including IBD, focusing on PADI2 and PADI4, and the induction mechanism of NETs and METs. NETs and METs were induced in TNBS-induced colitis or DSS-induced colitis, and it was revealed that NETs mediated by PADI4 are involved in the pathogenesis of TNBS-induced colitis. In contrast, the pathology of DSS-induced colitis was aggravated in PADI2 and PADI4KO mice. These results suggest that PADI2 and PADI4KO are involved in the pathogenesis of IBD in an extracellular trap-dependent or -independent manner.

研究分野：薬理系薬学

キーワード：細胞外トラップ 消化管炎症 IBD PADI2 PADI4

1. 研究開始当初の背景

細胞外トラップとは、網状の DNA と顆粒球タンパク質などを細胞外に放出し、異物を捉えて殺菌する好中球やマクロファージなどにみられる細胞死の一種である。好中球における NETs (neutrophil extracellular traps) 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、敗血症、癌など様々な疾患でその誘導が亢進し、様々な炎症性疾患の増悪に関与することが報告された。しかし、消化管炎症における報告は少なく、マクロファージにおける METs (macrophage extracellular traps) に関しては全くない。これら細胞外トラップは本来、自然免疫などにおける重要な機序として誘導されると考えられているが、何らかの原因により誘導された過剰な細胞外トラップは、血管壁などを傷害し、血栓の生成に関与することが知られている。つまり、NETs や METs は疾患の発症よりも疾患の悪化につながると考えられ、消化管炎症における NETs や METs の病態への関与を明らかにすることは、詳細な増悪メカニズムを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 NETs 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 (PADI4) が挙げられる。このヒストンのシトルリン化はクロマチンの脱凝縮を誘引し、細胞外トラップにとって重要な誘導因子となる。しかし、METs の誘導因子は明らかになっておらず、マクロファージには PADI4 だけでなく PADI2 も発現していることから、両方の観点から誘導機序を解明する必要がある。消化管炎症、特に潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患 (IBD) において、マクロファージの関与が大きいと考えられているが、METs を対象とした研究はなく、さらには、NETs と METs を同時に検討した報告は全くない。このように以前までは、細胞外トラップと病態の関連において多角的なアプローチでの研究がなかった。本研究では、IBD の新しい病態理論の提案と PADI2 や PADI4 を対象とした創薬理論の提案に繋がる可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、PADI2 と PADI4 の遺伝子改変マウスを作製し、それら遺伝子改変マウスを用いた細胞外トラップの誘導メカニズムの解明と、IBD などの消化管炎症における病態への関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) PADI2 または PADI4 遺伝子欠損 (KO) マウスの作製

PADI2 および PADI4KO マウスは、図 1 のとおり、*exon2* 遺伝子付近の塩基配列の一部を欠損させ、CRISPR-CAS9 システムにより作製した。

2) トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘起マウス大腸炎の誘導と病態の評価

麻酔下におけるマウスの直腸内に 30%エタノールで溶解した TNBS を 80 mg/kg、0.1 mL で投与して大腸炎を誘導した。投与から 3 日間は体重を測定し、投与 3 日後に大腸を摘出して大腸の長さ、潰瘍の肉眼的な評価と組織学的な評価を行った。

3) デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘起マウス大腸炎の誘導と病態の評価

2.5% DSS 溶液を 5 日間、マウスに自由飲水させることで大腸炎を誘導した。投与から 5 日間 (0、1、3、5 日目) は体重の測定と便の状態 (下痢と血便) を 5 段階 (0~4) で評価し、投与 5 日後に大腸を摘出して大腸の長さや組織学的な評価を行った。

4) 潰瘍の肉眼的な評価と組織学的な評価

肉眼的な潰瘍の評価は、ImageJ によってその面積を測定した。組織学的な潰瘍の評価は、大腸組織を 10%ホルマリンで固定後、パラフィンで包埋し、4 μm の切片をヘマトキシリン&エオジン (H&E) によって染色した。解析は、蛍光顕微鏡 (BZ-X810、KEYENCE) で撮影して行った。

5) Myeloperoxidase (MPO) 活性の測定

大腸組織をリン酸緩衝液でホモジナイズして遠心した後、その上清をオルトジアニジンの存在下に過酸化水素の分解に由来する吸光度変化を測定することで MPO 活性を測定した。

6) mRNA 発現量の測定

大腸組織からセパ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、TNF α などの各種遺伝子の発現量を real time RT-PCR 法にて測定した。

7) 腹腔内好中球またはマクロファージの単離

2 mL の 3%チオグリコレート溶液をマウス腹腔内に投与し、好中球は 4 時間後、マクロファージは 72 時間後 PBS によって回収した。回収した好中球とマクロファージは、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 DMEM 培地を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。マクロファージは 24 時間培養した後、接着細胞のみ実験に使用した。

8) タンパク質発現量の測定

大腸組織や各細胞から、総タンパク質の抽出を行い、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を解析した。

9) 免疫染色による細胞外トラップの画像解析

大腸組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、凍結切片を作成し、20 μm の切片を 10%正常ロバ血清でブロッキングした。その後、各抗体を反応させ、hoechst33258 によって DNA を染色した。また、好中球やマクロファージは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で固定後、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、各抗体を反応させ、hoechst33258 によって DNA を染色した。これらの撮影は蛍光顕微鏡を用いて行った。

4. 研究成果

1. PADI2 および PADI4KO マウスの作製

図 1A のとおり、PADI2 と PADI4 の一部の塩基配列を CRISPR-CAS9 システムにより欠損させ、フレームシフトにより各 KO マウスを作製した。好中球には PADI4 が豊富に、マクロファージには PADI2 が存在することから、各 KO マウスの好中球における PADI4 とマクロファージにおける PADI2 の mRNA レベルを測定したところ、wild-type (WT) マウスより単離したそれぞれの細胞と比較して有意に減少した (図 1)。タンパク質レベルでも同様にこれら発現が減少した。これらの結果から、PADI2 および PADI4KO マウスが作製されたことがわかり、大腸炎モデル等の実験に使用した。

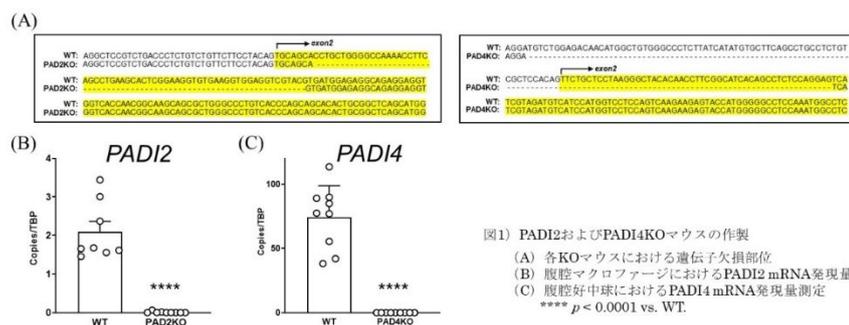


図1) PADI2およびPADI4KOマウスの作製
(A) 各KOマウスにおける遺伝子欠損部位
(B) 腹腔マクロファージにおけるPADI2 mRNA発現量測定
(C) 腹腔好中球におけるPADI4 mRNA発現量測定
**** $p < 0.0001$ vs. WT.

2. TNBS 誘起大腸炎または DSS 誘起大腸炎における細胞外トラップおよび PADI2、PADI4 の関与

細胞外トラップは DNase I によってその誘導が阻害され、PAD 活性を阻害する Cl-amidine によっても細胞外トラップの誘導が抑制されることが知られている。これら阻害剤をマウスに投与したところ、TNBS 誘起大腸炎モデルにおける病態が有意に抑制された (図 2)。

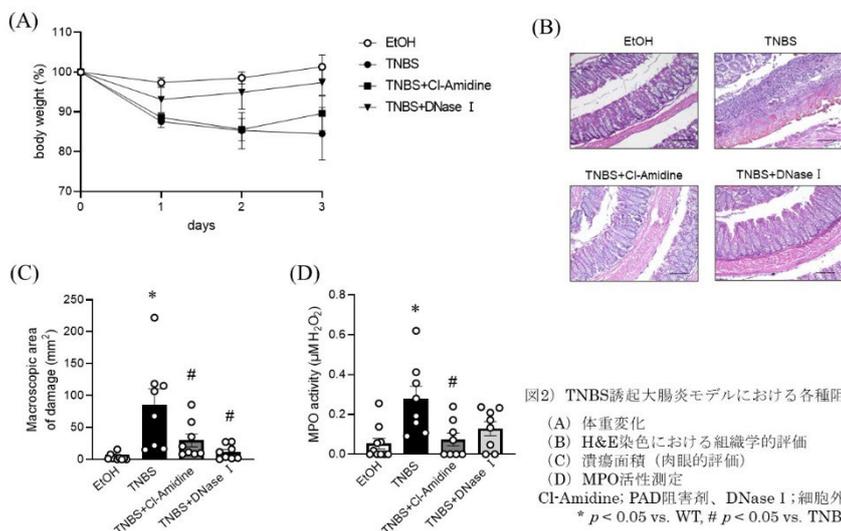


図2) TNBS誘起大腸炎モデルにおける各種阻害剤の効果
(A) 体重変化
(B) H&E染色における組織学的評価
(C) 潰瘍面積 (肉眼的評価)
(D) MPO活性測定
Cl-Amidine: PAD阻害剤、DNase I: 細胞外トラップ阻害剤
* $p < 0.05$ vs. WT, # $p < 0.05$ vs. TNBS

同様に、PADI2 および PADI4KO マウスでは WT マウスと比較して、TNBS 誘起大腸炎の病態が有意に抑制した (図 3)。これらの結果から、TNBS 誘起大腸炎において細胞外トラップおよび PADI2、PADI4 がその病態形成に関与することが示唆された。しかし、DSS 誘起大腸炎モデルにおける PADI2 および PADI4KO マウスの WT マウスとの比較は、より病態を悪化させる結果となった。過去の報告では、DSS 誘起大腸炎モデルにおいて PADI4KO マウスでは病態を改善するという報告と、病態を悪化させるという報告のどちらも存在し、今後より詳細に検討する必要がある。

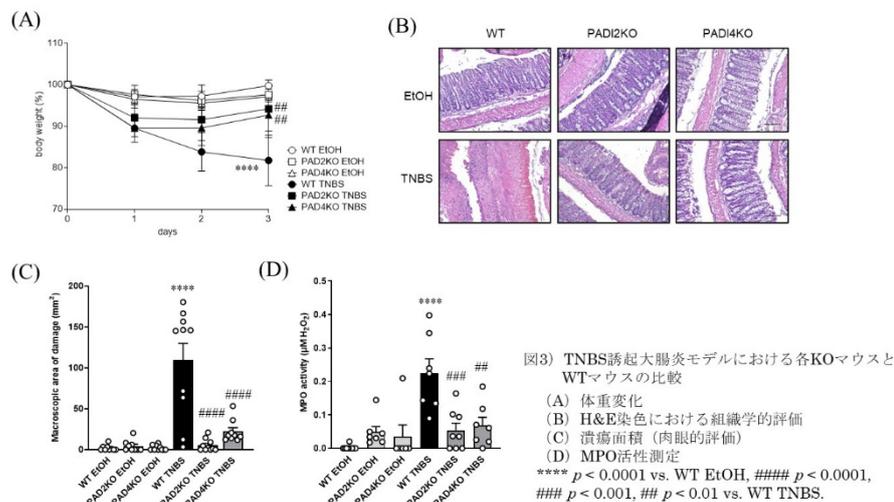


図3) TNBS誘起大腸炎モデルにおける各KOマウスとWTマウスの比較
(A) 体重変化
(B) H&E染色における組織学的評価
(C) 潰瘍面積 (肉眼的評価)
(D) MPO活性測定
**** $p < 0.0001$ vs. WT EtOH, ##### $p < 0.0001$,
$p < 0.001$, ## $p < 0.01$ vs. WT TNBS.

3. TNBS 誘起大腸炎または DSS 誘起大腸炎における NETs および METs の誘導

TNBS 誘起大腸炎または DSS 誘起大腸炎モデルにおける大腸組織において、細胞外トラップの誘導が確認された (図 4A)。細胞外トラップは MPO 抗体、シトルリン化ヒストン H3 抗体、DNA の共染色によって評価されるが、好中球に豊富に存在する MPO により、そのほとんどが NETs であると考えられている。しかし、MPO はマクロファージにも存在しており、METs との区別ができていなかった。本検討では、F4/80 抗体、シトルリン化ヒストン H3 抗体、DNA の共染色によって METs の評価を行った。その結果、TNBS 誘起大腸炎または DSS 誘起大腸炎モデルにおける大腸組織において、METs の誘導が確認された (図 4B)。また、TNBS 誘起大腸炎または DSS 誘起大腸炎モデルにおける細胞外トラップの誘導は、PADI2 および PADI4KO マウスで抑制されたことも確認している。さらに、F4/80 抗体染色されなかったシトルリン化ヒストン H3 抗体陽性細胞が NETs を誘導している好中球であると考えられるが、同時に NETs か METs かをより詳細に解析する方法を今後確立する必要があると考える。

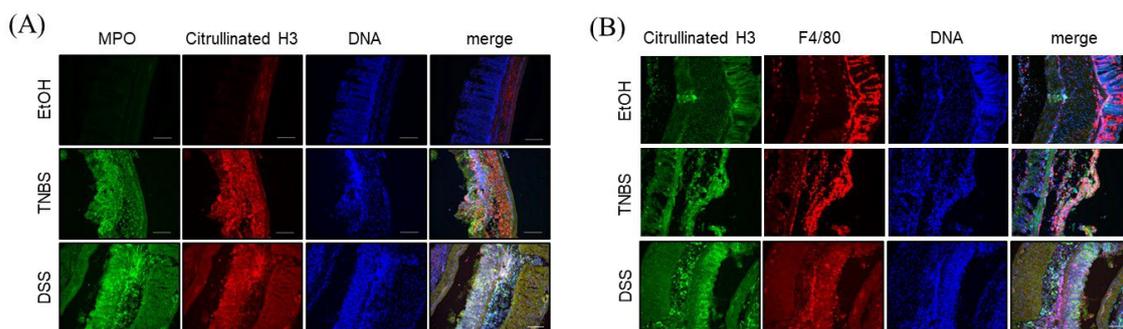


図4) 各大腸炎モデルにおける細胞外トラップの誘導
(A) 免疫染色における細胞外トラップの評価
(B) 免疫染色におけるMETsの評価

4. NETs および METs の誘導における PADI2 および PADI4 の関与

WT マウスの腹腔内好中球と腹腔マクロファージをそれぞれ単離し、細胞外トラップの誘導剤である A23187 とホルボールエステル (PMA) をそれぞれ加え、細胞外トラップを確認したところ、その誘導が確認できた。NETs の誘導は、PADI2KO マウスより単離した好中球においても確認できたが、PADI4KO マウスより単離した好中球においてはその誘導が有意に抑制された。また、METs の誘導は、PADI2KO マウスおよび PADI4KO マウスより単離した腹腔マクロファージにおいてもその誘導が確認できた (図 5)。これらの結果から、NETs は PADI4 を介し

て誘導され、METsはPADI2およびPADI4以外の因子を介して誘導されることが示唆された。細胞外トラップの誘導は活性酸素種（ROS）の産生も重要であると考えられていることから、METsの誘導にはROS産生が関与する可能性がある。

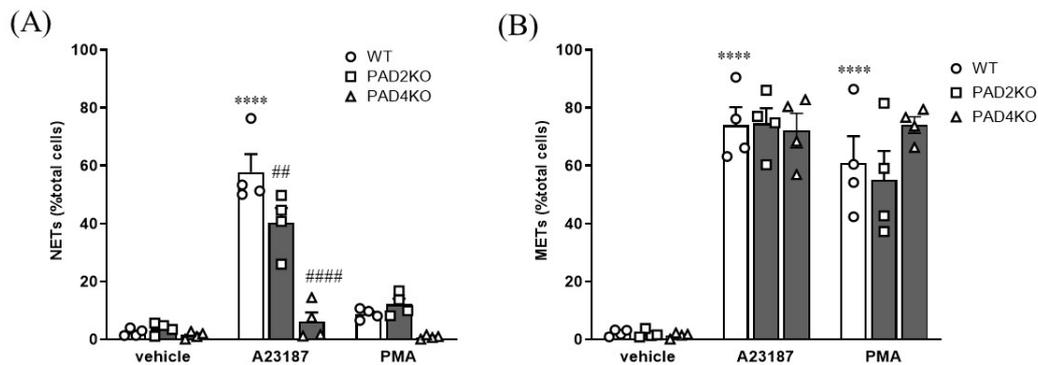


図5) 細胞外トラップ誘導PADI2およびPADI4の関与

(A) 免疫染色における細胞外トラップ誘導の定量的評価

(B) 免疫染色におけるMETs誘導の定量的評価

**** $p < 0.0001$ vs. vehicle (WT), ##### $p < 0.0001$, ### $p < 0.01$ vs. A23187-treated cells (WT).

以上の結果から、TNBS 誘起大腸炎または DSS 誘起大腸炎では NETs および METs が誘導され、特に TNBS 誘起大腸炎においては PADI4 を介した NETs がその病態形成に関与することが明らかとなった。DSS 誘起大腸炎モデルでは TNBS 誘起大腸炎モデルと異なる結果となったが、PADI2 や PADI4 が大腸炎の病態形成に深く関与し、細胞外トラップ非依存的なメカニズムによって病態に関与する可能性も示唆された。細胞外トラップの消化管炎症における本来の役割は自然免疫応答であり、過剰な誘導も誘導の抑制も病態の悪化につながると考えられる。今後 IB D への PADI2 および PADI4 の関与について、細胞外トラップ依存的または非依存的な経路も考慮して研究を継続する必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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, Uno Ayaka, Tanaka Yoshiya, Koda Saya, Saito Michiko, Sato Eisuke F., Matsumoto Kenjiro, Kato Shinichi	4. 巻 397
2. 論文標題 Neutrophil extracellular trap induction through peptidylarginine deiminase 4 activity is involved in 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 3127 ~ 3140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00210-023-02800-2	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 0件）

1. 発表者名 安田浩之、下村茉里乃、宇野綾花、甲田紗弥、田中義也、斉藤美知子、松本健次郎、加藤伸一
2. 発表標題 TNBS誘起マウス大腸炎モデルにおけるマクロファージ由来細胞外トラップ誘導の関与
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中義也、安田浩之、宇野綾花、甲田紗弥、斉藤美知子、松本健次郎、加藤伸一
2. 発表標題 TNBS誘起大腸炎の病態におけるpeptidylarginine deiminase 4を介した細胞外トラップの役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田 浩之、下村 茉里乃、宇野 綾花、甲田 紗弥、田中 義也、斉藤 美知子、松本 健次郎、加藤 伸一
2. 発表標題 Peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) contributes the pathogenesis of TNBS-induced murine colitis in relation to extracellular trap formation
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 下村 茉里乃、安田 浩之、宇野 綾花、甲田 紗弥、田中 義也、斉藤 美知子、松本 健次郎、加藤 伸一
2. 発表標題 TNBS誘起性大腸炎の病態におけるpeptidylarginine deiminase 2を介した細胞外トラップの関与
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅原彩羽、安田浩之、原礼子、藤原ゆう、斉藤美知子、松本健次郎、加藤伸一
2. 発表標題 TNBS誘起マウス大腸炎の病態におけるpeptidylarginine deiminase 2および4の関与
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北村菜月、安田浩之、田上瑛梨奈、多田佳鈴、斉藤美知子、松本健次郎、加藤伸一
2. 発表標題 DSS誘起マウス大腸炎の病態におけるpeptidylarginine deiminase 2および4の保護的役割
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田浩之、斉藤美知子、松本健次郎、加藤伸一
2. 発表標題 TNBS誘起マウス大腸炎の病態進展におけるpeptidylarginine deiminase 2および4の関与：細胞外トラップ依存のおよび非依存の経路
3. 学会等名 第51回日本潰瘍学会（GIweek）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 藤原ゆう、原礼子、北村菜月、斉藤美知子、安田浩之、松本健次郎、加藤伸一
2. 発表標題 TNBS誘起マウス大腸炎の病態におけるpeptidylarginine deiminase 2の役割
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 多田佳鈴、菅原彩羽、田上瑛梨奈、斉藤美知子、安田浩之、松本健次郎、加藤伸一
2. 発表標題 TNBS誘起大腸炎モデルにおけるPAD4を介した細胞外トラップの関与
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024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