

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580406

研究課題名(和文)好中球機能異常マウスの肺炎誘発機構の解析

研究課題名(英文) Mice deficient in myeloperoxidase and phagocyte NADPH oxidase exacerbates lung inflammation induced by zymosan and nonviable *Candida albicans*

研究代表者

荒谷 康昭 (ARATANI, YASUAKI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号：30192470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：好中球は自然免疫を担う白血球であり、食細胞NADPHオキシダーゼやミエロペルオキシダーゼ(MPO)の触媒によって、スーパーオキシドや次亜塩素酸などの活性酸素を産生し、病原体を殺菌する。本研究は、両酵素のノックアウトマウスが、生きた病原体に易感染性を示すだけでなく、死んだ病原体や菌体成分に曝されただけでも、生菌感染時と同様の重篤な肺炎を発症することを示した。また、そのような肺炎重篤化のメカニズムを個体レベルと単離細胞レベルで解析し、ノックアウトマウス好中球からの炎症性メディエーターの過剰産生が一因であることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：Neutrophil accumulation is a critical event in the pathogenesis of lung inflammation. Myeloperoxidase (MPO) and phagocyte NADPH oxidase, major constituents of neutrophils that generate reactive oxygen species (ROS), contribute to microbial killing. This study examined the role of these enzymes in neutrophil recruitment into the zymosan- or nonviable *Candida albicans* (nCA)-exposed lung of mice. Mice deficient in MPO and phagocyte NADPH oxidase that pulmonary received zymosan and nCA showed more severe pneumonia than wild-type mice. This was associated with higher levels of several inflammatory mediators in the lungs of these mutant mice. Enhanced production of chemokine by the mutant neutrophils, concomitant with up-regulation of Syk/ERK/NF- κ B pathway, may at least partly contribute to exacerbated inflammation in the mutant mice. Thus, loss of ROS production by neutrophils causes significant abnormalities in both host defense and inflammation.

研究分野：免疫生物学

キーワード：免疫 炎症 好中球 活性酸素 ミエロペルオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 好中球は自然免疫系の一員であり、活性化すると食細胞 NADPH オキシダーゼやミエロペルオキシダーゼ (MPO) の触媒によって、スーパーオキシド、過酸化水素 (H_2O_2)、次亜塩素酸 (HOCl) などの活性酸素を活発に産生する。申請者は、自身作製の MPO ノックアウトマウス (MPO-KO マウス) や、食細胞 NADPH オキシダーゼのノックアウトマウス (CGD マウス、インディアナ大学 M. Dinauer 博士より分与) が、カンジダ菌を初めとする種々の病原体に易感染性を示し、重篤な肺炎を発症することをすでに報告済みであった。これは、初期生体防御における好中球由来活性酸素の重要性を証明したものである。

(2) ところが、MPO-KO マウスは、生菌だけでなく、酵母の細胞膜成分であるザイモザンを肺投与しただけでも重篤な肺炎を発症するという興味深い現象を発見していたが、そのメカニズム解析は未着手であった。

2. 研究の目的

背景(2)で記した、MPO-KO マウスが「死菌」に曝されただけでも重篤な肺炎を発症するメカニズムを解析し、好中球からの活性酸素産生の欠損が、易感染性というリスクに加えて、感染非依存的炎症の誘発というリスクも負っている可能性を知ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 市販ザイモザンまたはカンジダ死菌 (東京薬科大学 大野尚仁教授より分与) の懸濁液をマウスに麻酔下で経鼻投与した。投与後の肺の炎症像を組織学的に解析するとともに、肺胞洗浄によって回収された細胞数を計測し、フローサイトメトリーでその細胞種を同定した。

(2) 肺中の MIP-2 および KC (いずれも好中球走化性因子、ケモカイン) 量は、市販の ELISA キットを用いて測定した。

(3) 好中球はマウス大腿骨髄より密度勾配遠心法により単離し、肺胞マクロファージは肺胞洗浄により回収した。これらの細胞をザイモザンもしくはカンジダ死菌存在下で培養し、培養液中に分泌した MIP-2 および KC 量を ELISA 法で測定した。

(4) ケモカインの遺伝子発現量は、(3)の方法で培養後の細胞より RNA を調製し、リアルタイム PCR 法で解析した。

(5) 遺伝子発現シグナル伝達系の解析は、(3)の方法で培養後の細胞破碎液を SDS 電気泳動に供し、ウェスタンブロッティング法で解析した。

(6) 動物実験にあたっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」等を遵守し、公立大学法人横浜市立大学動物実験指針に準じ、3R の原則を遵守した。ノックアウトマウスは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に準じて、組換え体として飼育した。

4. 研究成果

(1) ザイモザンによる MPO-KO マウスの肺炎重篤化の解析：野生型マウスにザイモザンを経鼻投与すると、6 日目までの観察期間中を通じて軽度の肺炎しか観察されなかった。一方、MPO-KO マウスの炎症は、1 日目ですでに野生型マウスよりも進行し、6 日目には重篤な炎症が発症した。投与後 6 日目の MPO-KO マウス肺からは野性型マウス肺の 5 倍量の炎症細胞が回収され、その 8 割以上が好中球であった。ザイモザン投与後 6 時間の肺組織中の MIP-2 量は、MPO-KO マウスの方が野生型マウスよりも 3 倍高値を示した。MIP-2 抗体を経鼻投与して中和すると好中球の集積が半減したことから、MIP-2 が炎症初期の好中球の集積に真に関与していることが明らかになった。野性型および MPO-KO マウスから単離した好中球に培養下でザイモザンを添加

して6時間培養した際に培地中に分泌されたMIP-2量は、MPO-KOマウス好中球が野生型よりもおよそ3倍高値を示した。以上から、MPO-KOマウスの方が野生型マウスより、ザイモザンで誘発される好中球性肺炎が早期に重篤になることが明らかとなり、MPOを欠損した好中球がMIP-2を過剰産生することがMPO-KOマウスの肺炎重篤化の一因であることが示された。

(2) MPO欠損による好中球のMIP-2過剰産生機構の解析：成果(1)の継続研究として、MPO-KOマウスの好中球がMIP-2を過剰産生するメカニズムを探った。単離したMPO-KO好中球のMIP-2 mRNA発現量は野生型好中球よりも4倍高値を示したことから、MIP-2の過剰産生は遺伝子発現レベルで制御されていることが示された。MIP-2遺伝子発現のシグナル伝達機構を探ったところ、MPO-KO好中球ではERK/IkB/NF- κ B経路が野生型よりも強く活性化することがMIP-2遺伝子の過剰発現の一因であると解釈できた。さらに、MPOの欠損に伴うH₂O₂の蓄積とHOClの枯渇がERKとIkBの活性化を誘発するというモデルを提唱し、好中球が産生する活性酸素の巧妙な制御メカニズムを唱えた。

(3) MPO-KOマウスのカンジダ死菌誘発性肺炎重篤化：成果(1)の延長研究として、MPO-KOマウスにカンジダ死菌を経鼻投与したところ、ザイモザン投与時と同様の重篤な好中球性肺炎を発症した。MPO-KOマウスの肺組織中では、MIP-2とKC量が共に一過的に高値を示し、MIP-2抗体とKC抗体の事前投与によって炎症が緩和されたことから、これらのケモカインの過剰産生が肺炎重篤化の一因であることが示された。単離したMPO-KO好中球をカンジダ死菌で刺激すると、Syk/ERK/NF- κ B経路の活性化度が野生型好中球よりも高く、それが一因となってMIP-2が過剰産生することが示された。

以上から、ザイモザンやカンジダ死菌とい

った菌体の違いを問わず、MPO-KO好中球におけるMIP-2遺伝子発現系の過剰な活性化がMPO-KOマウスにおける肺炎重篤化の一因であると考えられた。

(4) CGDマウスのカンジダ死菌誘発性肺炎重篤化の解析：CGDマウスにカンジダ死菌を経鼻投与すると、MPO-KOマウスと同様に、6日目には重度の炎症像が観察された。4日目CGDマウスの肺からは、野生型マウスの5倍量の細胞が回収され、その7割以上が好中球であった。ところが、予想に反して、MPO-KOマウスで観察された、肺組織中でのMIP-2やKCの一過的過剰産生がCGDマウスでは観察されなかった。このことは、MPO-KOマウスとCGDマウスでは肺炎の重篤化機構が必ずしも同一ではないことを示唆しており、それぞれの変異マウスの肺炎重篤化メカニズムの相違の解明が今後の継続課題として残された。

(5) まとめ：活性酸素は強い細胞傷害活性を持つので、好中球が活性酸素を産生できないMPO-KOマウスやCGDマウスの方が、野生型よりも炎症は軽度であろうと当初は予想した。しかし、その予想に反して、好中球からの活性酸素産生が欠如すると、単に殺菌能の低下に起因して炎症が誘発するだけでなく、感染非依存的な炎症も誘発されてしまうという、たいへん興味深い知見が、本研究期間中に蓄積できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Homme, M., Tateno, N., Miura, N., Ohno, N., and Aratani, Y.: Myeloperoxidase deficiency in mice exacerbates lung inflammation induced by nonviable *Candida albicans*. *Inflamm Res*, 62, 981-990 (2013) 査読有

doi: 10.1007/s00011-013-0656-6

- ② Tateno, N., Matsumoto, N., Motowaki, T., Suzuki, K., and Aratani, Y: Myeloperoxidase deficiency induces MIP-2 production via ERK activation in zymosan-stimulated mouse neutrophils. *Free Radic. Res.*, 47, 376-385 (2013) 査読有
doi: 10.1007/s00011-013-0656-6
- ③ Takeuchi, K., Umeki, Y., Matsumoto, N., Yamamoto, K., Yoshida, M., Suzuki, K., and Aratani, Y: Severe neutrophil-mediated lung inflammation in myeloperoxidase-deficient mice exposed to zymosan. *Inflamm. Res.*, 61, 197-205 (2012) 査読有
doi: 10.1007/s00011-011-0401-y

[学会発表] (計29件)

- ① 本目みずき、舘野奈央、三浦典子、大野尚仁、荒谷康昭: 好中球ミエロペルオキシダーゼ欠損によるカンジダ死菌誘発性肺炎重篤化。第36回 日本分子生物学会年会 2013年12月4日「神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)」
- ② 荒谷康昭、舘野奈央、松本典子、本脇献浩、鈴木和男: 好中球からのMIP-2産生におけるMPO欠損の影響。第19回MPO研究会、2013年10月26日「国立国際医療研究センター(東京都・新宿区)」
- ③ Aratani, Y., Tateno, N., Matsumoto, N., Motowaki, T., and Suzuki, K: Myeloperoxidase deficiency induces MIP-2 production via ERK activation in mouse neutrophils stimulated with zymosan. 8th International human Peroxidase Meeting 2013年9月10日「Sydney (Australia)」
- ④ 荒谷康昭、舘野奈央、松本典子、本脇献浩、鈴木和男: ミエロペルオキシダーゼ欠損好中球のMIP-2過剰産生機構の解析。第24回日本生体防御学会学術総会、2013年7月10日「くまもと森都心プラザ(熊本県・熊本市)」
- ⑤ 舘野奈央、松本典子、荒谷康昭: ミエロペルオキシダーゼ欠損好中球のMIP-2過剰産生の機序。第35回 日本分子生物学会年会 2012年12月11日「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」
- ⑥ 本目みずき、三浦典子、大野尚仁、荒谷康昭: ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのカンジダ死菌誘発性肺炎重篤化。第35回 日本分子生物学会年会 2012年12月11日「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」
- ⑦ 舘野奈央、松本典子、本脇献浩、荒谷康昭: 好中球からのMIP-2産生におけるミエロペルオキシダーゼ欠損の影響。第18回MPO研究会 2012年11月16日「京都大学(京都府・京都市)」
- ⑧ 舘野奈央、松本典子、荒谷康昭: 好中球のMIP-2産生におけるミエロペルオキシダーゼの役割。第23回 日本生体防御学会学術総会 2012年7月9日「きゅりあん(東京都・品川区)」
- ⑨ 本目みずき、舘野奈央、三浦典子、大野尚仁、荒谷康昭: ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスにおけるカンジダ死菌誘発性肺炎の解析。第23回 日本生体防御学会学術総会 2012年7月9日(東京)「きゅりあん(東京都・品川区)」
- ⑩ Takeuchi, K., Umeki, Y., Matsumoto, N., Yamamoto, K., Yoshida, M., Suzuki, K., and Aratani, Y: Myeloperoxidase deficiency enhances lung inflammation in mice exposed to zymosan. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012,

2012年3月28日「東京コンファレンス
センター品川(東京都・港区)」

- ⑪ Honme, M., Sugimura, M., Tateno, N., Miura, N., Ohno, N., and Aratani, Y: Severe lung inflammation in myeloperoxidase- and phagocyte NADPH-oxidase-deficient mice exposed to sterilized *Candida albicans*. 第34回 日本分子生物学会年会、2011年12月13日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」
- ⑫ Tateno, N., Nishikawa, N., Honme, M., and Aratani, Y: Phagocyte NADPH-oxidase regulates zymosan induced acute lung inflammation. 第34回 日本分子生物学会年会、2011年12月13日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」
- ⑬ Matsumoto, N., Yamamoto, K., and Aratani, Y: Myeloperoxidase deficiency enhances MIP-2 expression in mouse neutrophils exposed to zymosan. 第34回 日本分子生物学会年会、2011年12月13日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」
- ⑭ 荒谷康昭、本目みずき、三浦典子、大野尚仁: ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのカンジダ死菌による肺炎の重篤化。第17回 MPO 研究会 2011年10月28日「アークホテル熊本(熊本県・熊本市)」
- ⑮ 荒谷康昭、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男: 真菌感染防御における好中球由来の活性酸素の役割。第55回日本医真菌学会学術集会、2011年10月21日「椿山荘東京(東京都・文京区)」(招待シンポジスト)

[図書] (計3件)

- ① 荒谷康昭: 自然免疫異常による生体防御能の低下と炎症の誘発 ---好中球ミエロペルオキシダーゼ欠損を中心に---

横浜市立大学論叢 63:43-49 (2013)

- ② 荒谷康昭、鈴木和男: ミエロペルオキシダーゼ欠損と炎症誘発。日本臨床(日本臨床社)71増1, 258-262(2013)
- ③ 荒谷康昭、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男: 好中球機能異常による感染防御能の低下と炎症の誘発。Med. Myco. J.(日本医真菌学会雑誌) 53, 123-128 (2012)

[その他]

ホームページ等

荒谷研究室ホームページ

<http://yaratani.sci.yokohama-cu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名: 荒谷 康昭 (YASUAKI ARATANI)

所属: 横浜市立大学・

生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号: 30192470