

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 13日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659518

研究課題名（和文）顆粒球系細胞の活性酸素産生を負に制御する分子の研究

研究課題名（英文）Study on molecules that negatively regulate ROS production in human granulocytes

研究代表者

森尾 友宏 (MORIO TOMOHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：30239628

研究成果の概要（和文）：

顆粒球系細胞の活性酸素産生を負に制御する分子として Btk 及び Btk 会合分子に焦点を当てて検討を行った。ROS 産生は NADPH オキシダーゼ複合体によって遂行されるが、Btk が欠如すると、アダプター分子である Mal は PI(3)キナーゼや src タイプチロシンキナーゼ(PTK)と形質膜で会合していた。これらのキナーゼはまた過リン酸化し活性化していた。一方健康人の好中球では Btk は Mal と細胞質で会合し、細胞質にとどめる働きをしていた。この研究ではさらに、PTK が Btk 不在化で活性化される機序について主として PTK を負に制御するホスファターゼや Csk, Cbp/PAG に焦点を絞って検討を行った。また細胞膜透過性ペプチドをもつ組換え型 Mal (野生型、膜移行型、細胞内滞在型)を作成して、Mal の膜移行が好中球のプライミングに決定的な役割を果たしているかを検討した。

さらに Btk は好酸球においてもその過剰な ROS 産生を抑制していることを明らかにし、現在はさらにマスト細胞などにおいて検討を進めている。また Btk と同様に Tec family kinase である Itk についても T 細胞での ROS 産生制御について検討を開始できた。

本研究では Btk 及び Mal が顆粒球系における ROS 過剰産生を制御する分子であることを明らかにした。また今までの検討から Mal を細胞内にとどめておくことにより、プライミングを抑制できることが明らかになりつつある。この結果は、敗血症など過剰なプライミング刺激が入っている状態では、細胞内滞在型 Mal がその過剰反応抑制に作用する可能性があることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

We studied the roles of Btk and Btk-associated molecules in regulation of reactive oxygen species (ROS) production. The enzyme responsible for the respiratory burst is NADPH oxidase. In the absence of Btk, the adaptor Mal was associated with PI(3)K and PTKs at the plasma membrane, whereas in control resting neutrophils, Btk interacted with and confined Mal in the cytoplasm. These kinases were hyper-phosphorylated and were activated. We delved into the mechanism of PTK activation in the absence of Btk by looking into the negative regulator of PTKs (e.g. Csk/Cbp and phosphatases). We also generated wild type Mal and mutant Mal to check whether membrane translocation of Mal is critical for priming of neutrophils.

Btk was also involved in regulation of over-production of ROS in eosinophils. We are now working on mast cells derived from Btk deficient patients to examine the role of Btk in production of chymase and tryptase. The role of Itk, Tec family kinase expressed mainly in T cells, in the regulation of ROS production in T cells is currently under investigation.

Our data demonstrated the importance of Btk (and Mal) in negative regulation of ROS hyperproduction in granulocytes. Our data so far indicate that PH-domain defective Mal may inhibit priming of neutrophils, and thus the protein may be used for the prevention of hyper-activation of neutrophils in conditions such as sepsis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学 内科系臨床医学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：顆粒球、活性酸素(ROS)、シグナル伝達、リン酸化、Btk、Mal

1. 研究開始当初の背景

活性酸素(Reactive Oxygen Species:ROS)は免疫担当細胞において最も重要な抗微生物活性因子であり、また生体分子にとっては非特異的な化学損傷をもたらす毒性因子でもある。臨床的に好中球の過剰活性化が問題となる疾患は数多い。敗血症は代表例である。SLEは原因不明の全身的自己免疫疾患の代表であるが、ここでも好中球の関与(アポトーシスの亢進と、Neutrophil extracellular traps:NETs 形成の亢進、接着因子の高発現など)に注目が集まっている。Behcet 病、壊疽性膿皮症、Sweet 病などの皮膚疾患でも、またさらには動脈硬化や肥満などでも、その病態に過剰な ROS 産生が関与していると言われている。

ROS 産生は好中球ではNADPH オキシダーゼ(NOX2)によって遂行される。NOX2 は膜成分である gp91, p22phox と細胞内成分である p40, p47, p67 及びRAC2から構成されており、プライミング刺激と“活性化”刺激の両者によって膜に集合して活性を示す。TLR や TNFR などの刺激によってまず、PI(3)K が活性化し RAC2 を膜に targeting する。さらに菌体成分である fMLP や C5a などの刺激が入ると活性化シグナルとなり、PKC の活性化から p47, p67 のリン酸化がおき、これらの成分は膜に移行する。ヒトでは PI(3)K と p47, p67 が共にプライミングに働く(マウスでは p47, p67 のみ)。より近位のシグナルについてはLPS 刺激により Fgr, Hck が活性化するとされる(ヒト)。一方、fMLPR シグナルではFgr と Hck が関与するとの報告がある(マウスのみ)。ROS 産生制御に当たってシグナル伝達の詳細を知ることは重要であるが、現時点では情報は断片的であり、ヒトにおける研究成果は極めて少ない状況である。

B 細胞が欠損する Btk 欠損症では、約 1/3 で好中球減少が認められ、IgE 欠損にも関わらずアレルギー症状が著しい。私たちはその原因を、Btk が顆粒球系細胞で活性酸素(ROS)産生を負に制御しているためと予想した。検討の結果、Btk 欠損での ROS 産生亢進、PI3K, Lyn の活性化、スカベンジャーの不活化など、新しい知見が明らかになった。

2. 研究の目的

この研究では Btk を中心として顆粒球の活性化を負に抑える機構について詳しく検討する。具体的には(1) Btk の標的となり、ROS 産生シグナルに関わる分子を同定し、(2) Btk 欠損による ROS 産生増強を好酸球、マスト細胞で検証し、さらに(3)ROS 産生亢進の PreB 細胞でのアポトーシスへの関与を明らかにし、さらに抗酸化剤や Btk タンパク導入手法を用いて治療法の模索も行う。本研究は Btk 欠損における B 細胞欠損の根本的原因が明らかにする可能性があり、さらにアレルギーの制御や、敗血症における好中球減少制御の点でも重要な観点を提供する。

3. 研究の方法

1) XLA 患者からの細胞分離及び細胞分画の採取

好中球及び好酸球は常法を用いて、endotoxin free の condition で分離を行った。細胞分画採取は既報告に従って行った。分離した細胞はソニケーションバッファー(HEPES (10 mM), pH 7.2, sucrose (0.15 M), EGTA (1 mM), EDTA (1 mM), NaF (25 mM), leupeptin (10 µg/ml), pepstatin (10 µg/ml), aprotinin (1 µg/ml) and PMSF (1 mM))に浮かべ、ショ糖密度勾配法/超遠心法にて細胞質分画と膜分画を回収した。

2) 活性酸素測定

活性酸素は DHR123-Flow cytometry 法あるいは、Luminol 法を用いて測定を行った。

3) 組換えタンパクの作成

膜透過性タンパクの作成に当たっては、発現すべきタンパクをコードする cDNA を XmaI, SalI を両端にもつ primer で PCR 増幅し、pET28b vector (Merck)に組み入れた。作成した plasmid にはタンパク回収用に His x 6 サイトが、また膜透過性ペプチドとして Hph-1x2 サイトが含まれている。Plasmid は大腸菌に transform し、IPTG induction の後、Nickel カラムにて回収して用いた。

4) タンパクの発現解析

タンパクの発現解析は Flow cytometry 法、Western blot 法、蛍光免疫染色法にて行った。(倫理的配慮)

行った実験は患者からの検体を用いたものであり、患者への十分な説明を行い、同意

を取得した上で、各種倫理指針に従って研究を実施した。また組換え DNA 作成やタンパク作成については遺伝子組換え生物等実験計画書に則り、委員会の許可を得て実施した。いずれも医学部倫理審査委員会の承認を得て遂行した。

4. 研究成果

1) Btk による活性酸素制御機構の解析

Btk が好中球の基底状態における ROS 産生を負に制御する分子機構を明らかにした。特に好中球においては Btk と Mal の会合が重要であり、Btk が存在しないと Src プロテインチロシンキナーゼ(PTK)が Mal の活性化と膜移行を誘導することを明らかにした (Nature Immunology, 13: 369-378, 2012)。PTK の中では、Btk の欠損により、c-Src, Fgr, Hck がその活性増強と関係するチロシン残基でリン酸化を受け、一方 Lyn では活性を負に制御するチロシン残基でリン酸化を受けていることが明らかになった。Lyn は B 細胞や食食細胞系において、キナーゼ活性が細胞の機能を負に制御することのある分子であり、好中球における Lyn の機能抑制が、好中球機能にどのような影響を及ぼすかに興味を持たれる。

さらに、Btk がなくなるとなぜ PTK が活性化するかについて検討をすすめた。Csk/Cskbp については Btk の有無で発現・局在・リン酸化に差がなく、関連はない (図 1)。ホスファターゼ (PTP-PEST, PTEN, SHP1) は Btk の有無で発現量の差はないが、活性については不明である (図 2)。Btk と会合しないことで、Mal が PTK を活性化している可能性については検証中である。スカベンジャーであるパーオキシレドキシシン (prx1) については、そのリン酸化の程度が Btk の有無で異なっており、Redox システムとの関連の中でさらに検証を進めている。

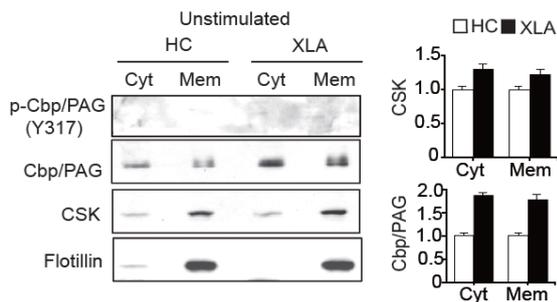


図1 Cbp/PAG の局在とリン酸化及び CSK の局在 (Nature Immunology, 13: 369-378, 2012 より)

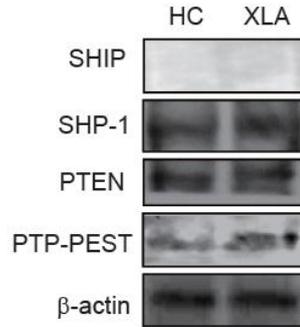


図 2 健常人と XLA 患者好中球における phosphatase の発現 (Nature Immunology, 13: 369-378, 2012 より)

Btk 欠損による ROS 産生亢進については、細菌菌体成分による刺激、オプソニン化細菌による刺激、FcγR 刺激などで検証を加えた。前二者ではいずれも明らかな ROS 産生の亢進を認めた。FcγR 刺激については 32.2, IV.3, 3G8 (それぞれ FcγRI, II, III に対する抗体) を産生するハイブリドーマから抗体を精製し、F(ab2)' 分画として、刺激実験を開始した。

加えて本年度は組換え型の野生型 Mal、膜移行型 Mal、細胞質滞在型 Mal のコンストラクトを作成し (図 3 および図 4)、タンパク発現の至適化実験から、100mg レベルのタンパク作成が可能になった。これを用いて Mal の局在による ROS 産生制御を検討し、また会合分子を探る実験を開始した。

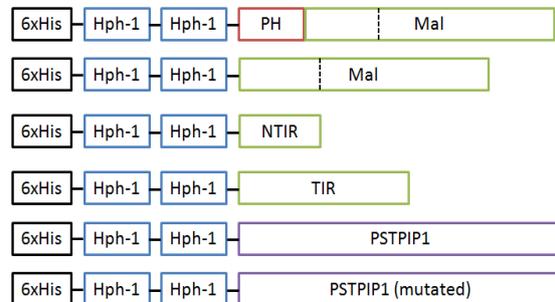


図 3 膜透過型組換えタンパクのコンストラクト

上から 4 つが MAL のコンストラクト
上から全長の MAL、
PH 領域を欠く MAL、
TIR 領域を欠く MAL
TIR 領域のみの MAL

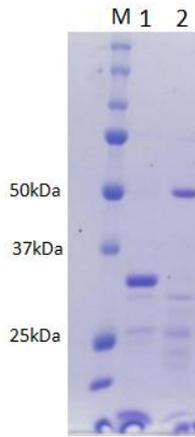


図4 Hph-1-MAL の作成

M: Maker

1: HH-MAL (濃度: 0.32mg/ml)

2: HH-PH-MAL (濃度: 0.12mg/ml)

2は膜移行型のMALである。

2) 非特異的アレルギー反応における Btk の関与

平成23年度はBtk欠損患者末梢血から分離した好酸球を用いて、ROSやケミカルメディエータの産生亢進について解析した。その結果患者ではROS産生が亢進していることが明らかになった(図5)。Eosinophil-derived neurotoxin (EDN)については一方大きな差が認められなかった。マスト細胞については、臍帯血より誘導し、Btk特異的阻害剤を用いて検討中であるが、ROS産生自体が弱く、まだ差を明らかにするには至っていない。今後、組換え型Btkタンパクを膜透過性ペプチドに結合させた形で用意して、好酸球に導入し、ROS産生の挙動について検討する準備を整えている。

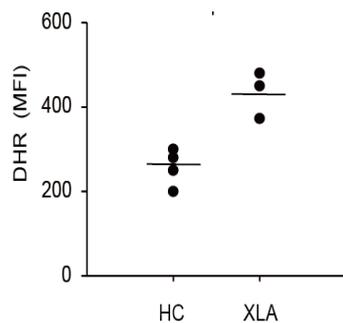


図5 好酸球からの活性酸素産生

好酸球を分離しPMA刺激後DHR123-FACS法にてROS産生を測定した。

MFI: mean fluorescence intensity

平成24年度にはBtk欠損患者末梢血あるいは骨髄からCD161陽性細胞を単離し、SCF, IL-6などでマスト細胞を分化させ、採取することに成功した。得られたマスト細胞に対してはFceR刺激による脱顆粒やキマーゼ、ト

リプターゼ産生系を立ち上げた。

3) B細胞分化におけるBtkのアポトーシスの役割に関する解析

PreB細胞段階におけるBtk欠損による細胞のアポトーシスを検証するために、iPS細胞からのB細胞分化の予備実験を共同研究の形で開始した。本システムが動けば、より直接的に仮説を検証可能と考えている。

4) T細胞におけるカウンターパートの検討

T細胞におけるROS産生を感度良く検出する系を立ち上げた。さらにT細胞死におけるItkの役割を検討した。健常者活性化T細胞を用いて、まずITKのknock downを試みた。現時点では十分は発現低下には至っていない。またT細胞からのROS産生についてはluminol法で解析可能であることを明らかにし、またApoptosisもcleaved Caspase3の測定やAnnexin V検出で可能であることを検証した。今後Itkの(T細胞での)NADPHオキシダーゼ活性への関与、アポトーシスへの関与については、Itk発現を低下する方法が確立すればすぐに解析可能な状態にまで至った。

5) Btk欠損症の新規治療確立に向けた検討

細胞質滞在型MalをBtk欠損好中球に導入することにより、好中球からの過剰なROS産生を制御可能との実験結果が得られている。NOG-SCIDマウスへのBtk欠損骨髄生着実験に着手することができなかったが、Lycopene, NACなどの抗酸化薬の投与やMalの制御による今後の展開が期待できる。

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5件)

1. Fukuda S, Nanki T, Morio T, Hasegawa H, Koike R, Miyasaka N. Recurrent mitral valve regurgitation with neutrophil infiltration in a patient with multiple aseptic abscesses. *Mod Rheumatol*. 2012 Nov 8. [Epub ahead of print]
2. Miyabe C, Miyabe Y, Miura NN, Takahashi K, Terashima Y, Morio T, Yamagata N, Ohno N, Shudo K, Suzuki J-I, Isobe M, Matsuhima K, Tsuboi R, Miyasaka N, and Nanki T. Am80, a retinoic acid receptor agonist, ameliorates murine vasculitis through the suppression of neutrophil migration and activation. *Arthritis Rheumatism*. 65 : 503-512, 2013.
3. Park TY, Kim SH, Shin YC, Lee NH, Lee RK, Shim JH, Glimcher LH, Mook-Jung I, Cheong E, Kim WK, Honda F, Morio T, Lim

JS, Lee SK. Amelioration of neurodegenerative diseases by cell death-induced cytoplasmic delivery of humanin. *J Control Release*. **166**:307-315, 2013.

4. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, **Morio T**. Btk negatively regulates ROS production and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nature Immunol*. **13**: 369-378, 2012.
5. Sato R, Iiizumi S, Kim E-S, Honda F, Lee S-K, Adachi N, Koyama H, Mizutani S, **Morio T**. Impaired cell adhesion, apoptosis, and signaling in WASP-gene disrupted Nalm-6 pre-B cells and recovery of cell adhesion using a transducible form of WASp. *Int. J. Hematol*. **95**:299-310, 2012.

[学会発表] (計 5 件)

1. **Morio T**. Primary Immunodeficiencies due the Defect in Signaling Molecules. **2012 KSMCB Annual Meeting**. Seoul, Korea. October 2012.
2. **Morio T**. An old and new regulator of ROS production in neutrophils. **Seminar of Brain Korea 21 Project for Functional Foods and Nutrigenomics**. Seoul, Korea. March 2012.
3. **Morio T**: Btk is a critical gatekeeper of neutrophil responses. **Medical Immunology World Initiative (MIWI) projects**, 横浜、2012年5月22日
4. 尾崎富美子、狩野博嗣、金兼弘和、野々山恵章、Sang-Kyou Lee、高木正稔、水谷修紀、**森尾友宏**：先天性免疫不全症の病態解析，およびタンパク導入法を用いた治療法の探索。第40回日本臨床免疫学会総会、東京、2012年9月27日～29日
5. **森尾友宏**：分類不能型免疫不全症の病態解明へのアプローチ、第39回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、2011年9月17日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森尾 友宏 (MORIO TOMOHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：30239628

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：