

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450446

研究課題名(和文) ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのサイトカイン過剰発現機構と肺炎重篤化の解析

研究課題名(英文) Myeloperoxidase negatively regulates the expression of proinflammatory cytokines and chemokines by mouse neutrophils

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(八景キャンパス)・教授

研究者番号：30192470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：好中球やマクロファージが活性化すると、食細胞NADPHオキシダーゼやミエロペルオキシダーゼ(MPO)の触媒によって各種活性酸素を産生する。本研究は、これらの酵素を欠損したマウスが感染非依存的に重篤な肺炎を発症するという興味深い現象の発症メカニズムを探った。ザイモザンやカンジダ死菌の刺激を受けたMPO欠損好中球や食細胞NADPHオキシダーゼ欠損好中球は、ERK/NF- κ B経路の過剰活性化によって種々の炎症性サイトカイン類を過剰産生した。さらに、MPO欠損好中球はMac1/FAK/ERK経路の過剰活性化によって貪食能も亢進することも判明し、この様な過剰活性化が肺炎重篤化の一因である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Myeloperoxidase (MPO) and NOX2, major constituents of neutrophils that generate reactive oxygen species (ROS), contribute to microbial killing. This study aimed to evaluate the effect of MPO deficiency and NOX2 deficiency on lung inflammation induced by zymosan and nonviable *Candida*. Mice deficient in these enzymes showed more severe neutrophilic pneumonia than wild-type mice, which exhibited higher lung concentrations of proinflammatory cytokines and chemokines. In vitro, production of these inflammatory mediators from neutrophils was enhanced in the mutant neutrophils, concomitant with upregulation of ERK/NF- κ B pathway. We also found that upregulation of the CD11b/FAK/ERK pathway due to absence of MPO enhances the phagocytic activity of neutrophils. These results suggest that lack of ROS production results in the production of higher levels of proinflammatory mediators. 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 好中球 ミエロペルオキシダーゼ 活性酸素 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 好中球やマクロファージは自然免疫系の一員であり、感染に対する初期防御を担っている。これらの食細胞が病原体を貪食して活性化すると、食細胞 NADPH オキシダーゼの触媒によって、酸素からスーパーオキシド (O_2^-) を産生し、続いて過酸化水素 (H_2O_2) へと代謝される。さらに、好中球においては、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) の触媒によって、 H_2O_2 から次亜塩素酸 (HOCl) という好中球特有の活性酸素が生成する。このように、好中球もマクロファージも活性酸素を活発に産生するが、HOCl を産生できるか否かの点において、両者が産生する活性酸素種は異なる。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り、感染防御における好中球由来活性酸素の重要性を証明した。

(2) ところが、MPO-KO マウスは、生菌だけでなく、カンジダの死菌や酵母菌体成分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も発見していた。しかし、そのメカニズムは解析途中にあった。

2. 研究の目的

背景(2)で記したような、MPO-KO マウスに見られる感染非依存的な炎症重篤化のメカニズムを解析するとともに、CGD マウスでも同様の解析を行うことによって、好中球からの活性酸素産生の欠如が、感染非依存的な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が目的とした。

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) を野

生型、MPO-KO および CGD マウスに経鼻投与し、肺胞洗浄によって回収された細胞数を計測するとともに、肺胞に集積した細胞種をフローサイトメトリーで同定した。

(2) 肺ホモジネート上清中の MIP-2, KC, TNF- α , IL-1 β , MIP-1 α の量は市販の ELISA キットを用いて測定した。

(3) *In vitro* の解析のための好中球は、マウス大腿骨髄より密度勾配遠心法により単離するか、もしくはチオグリコレートを腹腔投与し 4 時間後に腹腔に浸出した好中球を回収して使用した。マクロファージは、チオグリコレートを腹腔投与し 72 時間後に腹腔に浸出したマクロファージを使用した。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, KC, IL-1 β , TNF- α の量を ELISA 法で測定した。

(4) MIP-2, KC, IL-1 β , TNF- α 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砕液を 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) 好中球のザイモザン貪食能は、蛍光ザイモザン存在下で培養後の好中球をフローサイトメーターに供して解析した。

(7) 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) ミエロペルオキシダーゼ欠損好中球におけるサイトカイン過剰産生機構の解析：野生

型および MPO-KO マウスの腹腔から単離した好中球にザイモザンを添加して3時間培養した後、培養上清中への MIP-1 β 、MIP-1 α 、IL-1 β 、IL-1 α 、および TNF- α の分泌量を ELISA で測定すると、いずれも MPO-KO 好中球の方が野生型好中球よりも有意に高値を示した。MPO-KO 好中球におけるこれらのサイトカイン類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リアルタイム PCR 法で示された。NF- κ B、p38 MAPK、および ERK1/2 のいずれを阻害しても、すべての発現が顕著に低下したことから、p38MAPK/ERK/NF- κ B のシグナル伝達経路が関わっていることが示された。ザイモザン添加時の p38MAPK は MPO-KO 好中球も野生型好中球も同程度に活性化したが、興味深いことに、ERK1/2 は MPO-KO 好中球の方が野生型好中球よりも強く活性化することが明らかになった。

(2) ミエロペルオキシダーゼ欠損好中球における貪食活性促進機構の解析：野生型と MPO-KO マウスの大腿骨髄から単離した好中球に培養下で蛍光ザイモザンを添加し、0.5~2 時間培養後の好中球を FACS 解析に供し、平均蛍光強度を指標として貪食能を比較した。その結果、2 時間培養後の MPO-KO 好中球は野生型好中球のおよそ 4 倍の貪食能を示した。ザイモザンの受容体を特定するために、TLR2、CD11b の抗体、または Dectin-1 の阻害剤を添加したところ、CD11b 抗体でのみ貪食能が抑制された。また、FAK と ERK1/2 を阻害しても貪食能が抑制されたことから、両キナーゼともに貪食に関与することも示された。さらに、FAK の阻害によって ERK1/2 の活性化が抑制されることがウエスタンブロット解析により示された。興味深いことに、ザイモザンを添加した際の細胞表面への CD11b の発現量と ERK1/2 の活性化は、MPO-KO 好中球の方が野生型好中球よりも顕著に高いことが判明した。以上より、MPO-KO 好中球における貪食能の亢進は、CD11b/FAK/ERK 経路の過剰活性化が一

因である可能性が考えられた。

(3) 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重篤な好中球性肺炎を誘発すること、CGD マウス肺中では MIP-2、KC、TNF- α 、IL-1 β 等の炎症性サイトカイン類の産生量が野生型マウスよりも顕著に高値を示すこと、IL-1 β の中和抗体投与により好中球の集積が顕著に抑制されること、を明らかにし、CGD マウス肺における IL-1 β の過剰産生がこのマウスの肺炎重篤化の一因であることが示唆された。さらに、CGD マウスにおける IL-1 β 過剰産生のメカニズムを探った。野生型および CGD マウスの骨髄から単離した好中球に培養下でカンジダ死菌を添加し、6 時間後の IL-1 β 産生量を測定した結果、CGD 好中球からの IL-1 β 産生量は野生型好中球からの産生量よりも顕著に高値を示した。また、培養後の好中球から調製した RNA のリアルタイム RT-PCR 解析によって、IL-1 β 遺伝子の発現量も CGD マウスの方が高値を示した。このことから、CGD マウスからの IL-1 β 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明らかになった。NF- κ B、p38MAPK、および ERK1/2 のいずれを阻害しても、IL-1 β の産生が顕著に低下したことから、これらシグナル伝達系の関与が示された。興味深いことに、CGD 好中球では野生型よりも ERK1/2 の活性化が長時間継続することがウエスタンブロット解析から明らかになった。したがって、CGD 好中球における ERK1/2 の長期活性化が、IL-1 β 遺伝子の過剰発現を促している可能性が示された。

(4) まとめ：食細胞 NADPH オキシダーゼや MPO が欠損して O $_2^{\cdot -}$ や HOCl を産生できない好中球やマクロファージは、炎症性サイトカイン類を過剰産生して炎症重篤化を導く可能性を示唆する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5件)

Endo, D., Fujimoto, K., Hirose, R., Yamanaka, H., Homme, M., Ishibashi, K., Miura, N., Ohno, N., and Aratani, Y: Genetic phagocyte NADPH-oxidase deficiency enhances nonviable *Candida albicans*-induced inflammation in mouse lungs. *Inflammation*, 40, 123-135 (2017) 査読有 doi:10.1007/s10753-016-0461-9

Fujimoto, K., Motowaki, T., Tamura, N., and Aratani, Y: Myeloperoxidase deficiency enhances zymosan phagocytosis associated with up-regulation of surface expression of CD11b in mouse neutrophils. *Free Radic. Res.*, 50, 1340-1349 (2016) 査読有 doi: 10.1080/10715762.2016.1244821

Endo, D., Saito, T., Suzuki, K., and Aratani, Y: Myeloperoxidase negatively regulates the expression of proinflammatory cytokines and chemokines by zymosan-induced mouse neutrophils. *Inflamm. Res.*, 65, 151-159 (2016) 査読有 doi:10.1007/s00011-015-0899-5

[学会発表](計21件)

Fujimoto K. and Aratani Y: Myeloperoxidase deficiency enhances phagocytosis associated with up-regulation of surface expression of CD11b. 18th International Vasculitis & ANCA Workshop, 2017年3月27日「Univ. of Tokyo (Tokyo, Japan)」.

遠藤大樹、藤本健太、石橋健一、三浦典子、大野尚仁、荒谷康昭:食細胞 NADPH オキシ

ダーゼ欠損によるカンジダ死菌誘発性肺炎の重篤化。第18回MPO研究会、2016年12月3日「京都大学(京都府・京都市)」
藤本健太、荒谷康昭:ミエロペルオキシダーゼ欠損好中球における貪食活性促進機構の解析。第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

高取沙織、荒谷康昭:野生型およびミエロペルオキシダーゼ欠損好中球からのMIP-2産生に及ぼすビタミンCの影響。第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

遠藤大樹、山中寛子、廣瀬理華、藤本健太、高取沙織、荒谷康昭:食細胞 NADPH オキシダーゼ欠損好中球における IL-1 過剰産生機構の解析。第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

遠藤大樹、荒谷康昭:好中球からのサイトカイン産生におけるミエロペルオキシダーゼの役割。日本農芸化学会2016年度大会、2016年3月28日「札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)」

藤本健太、荒谷康昭:好中球のザイモザン貪食能におけるミエロペルオキシダーゼの役割。日本農芸化学会2016年度大会、2016年3月28日「札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)」

荒谷康昭、遠藤大樹、鈴木和男:MPO欠損マウス好中球からの炎症性サイトカイン過剰産生による肺炎の誘発。第20回MPO研究会、2015年10月31日「慶應義塾大学(東京都・新宿区)」

Endo, D., Fujimoto, K., Saito, T., Motowaki, T., and Aratani, Y: Aberrant production of inflammatory mediators in myeloperoxidase-deficient neutrophils stimulated with zymosan. 9th

International human Peroxidase Meeting,
2015年9月16日「Cologne (Germany)」
遠藤大樹、齊藤誉幸、荒谷康昭：ミエロペ
ルオキシダーゼ欠損好中球によるサイト
カイン過剰産生機構の解析。第26回日本
生体防御学会学術総会、2015年7月10日
「台東区生涯学習センター(東京都・台東
区)」

藤本健太、本脇献浩、荒谷康昭：ミエロペ
ルオキシダーゼ欠損好中球における貪食
能の解析。第26回日本生体防御学会学術
総会、2015年7月10日「台東区生涯学習
センター(東京都・台東区)」

廣瀬理華、山中寛子、本目みずき、石橋健
一、三浦典子、大野尚仁、荒谷康昭：食細
胞 NADPH 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26
回日本生体防御学会学術総会、2015年7
月10日「台東区生涯学習センター(東京
都・台東区)」

齊藤誉幸、遠藤大樹、荒谷康昭：ミエロペ
ルオキシダーゼ欠損好中球におけるサイ
トカイン発現量の促進。第37回日本分子
生物学会年会、2014年11月27日「パシ
フィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

本脇献浩、藤本健太、荒谷康昭：ミエロペ
ルオキシダーゼ欠損好中球におけるザイ
モザン貪食能の促進。第37回日本分子生
物学会年会、2014年11月25日~27日(横
浜) 2014年11月27日「パシフィコ横浜
(神奈川県・横浜市)」

齊藤誉幸、遠藤大樹、荒谷康昭：ミエロペ
ルオキシダーゼ欠損による好中球からの
サイトカイン過剰産生。第20回 MPO 研究
会、2015年10月31日「KKR ホテル熱海(静
岡県・熱海市)」

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
カンジダ死菌肺炎重篤化機構。第25回日

本生体防御学会学術総会、2014年7月10
日「東北大学(宮城県・仙台市)」

〔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