

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460405

研究課題名(和文)好中球による究極の殺菌術, NETs形成機構の解明：自己免疫疾患の治療戦略に向けて

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of neutrophil extracellular traps (NETs) formation

研究代表者

通山 由美 (Tohyama, Yumi)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：70362770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は好中球による殺菌システム、neutrophil extracellular traps (NETs)形成の分子機構の解明である。まずヒト好中球を用いてin vitroにNETsを誘導し、1)分葉核の喪失、2)クロマチンの弛緩、3)細胞膜の崩壊、の3段階で進行することを見出した。次に各段階のサンプルを用いてiTRAQ法による網羅的質量分析をおこない、クロマチンの弛緩に伴い急激な増加(20倍以上)が認められた約80種類のペプチド(翻訳後修飾を含み、15種類のタンパク質の断片)を見出した。特に顕著に増加した2種のタンパク質について、遺伝子欠失好中球モデルを作成して検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms of neutrophil extracellular traps (NETs) formation, human neutrophils were treated with PMA and induced to form NETs in vitro. As a result of live cell imaging, the process was classified into 3 stages: stage 1: most of the cells lost lobulated nuclei; stage 2: chromatin decondensation occurred like a spherical form; stage 3: decondensed chromatin became diffuse and spread like a cloud showing NET-like structures. Next, comprehensive mass spectrometric protein analysis using iTRAQ-labeling was performed using the lysates from each stage and we found about 80 peptides (fragments of 15 proteins) containing post translational modification, which were markedly increased according to NETs formation. Among them, we focus on two proteins and are studying the effects of gene defect of these proteins in NETs formation.

研究分野：生化学 免疫学

キーワード：好中球

### 1. 研究開始当初の背景

(1)好中球は生体防御の最前線ではたらく白血球である。病原微生物が侵入すると、迅速に移動して、食作用(ファゴサイトーシス)と抗菌顆粒で対抗し、自然免疫において中心的な役割を担う。近年、好中球のさらなる殺菌戦略として、好中球自身が投網のごとく変形して微生物を包み込む、Neutrophil extracellular traps (NETs)の形成が報告された。NETsの網本体は核酸DNAであり、好中球自らが抗菌網と化して死ぬこと(NETosis)で感染の拡大を防止する。すなわち、核の中でコンパクトに折りたたまれていたクロマチン(DNA-ヒストン複合体)が繊維状にほどけて核膜が消失し、抗菌顆粒が繋ぎ止められる。最後に細胞膜が崩壊して、放出されたNETsは効率的に微生物をトラップするが、その形成機構は未解明である。

(2)通常、NETsは生体内で速やかに分解されるが、何らかの異常でNETsの分解が不十分な時、NETs成分に対する抗体(自己抗体)の産生が誘導されて全身性エリテマトーデス(SLE)など重篤な自己免疫疾患を招く。このように、NETsは好中球の殺菌システムであるとともに、自己免疫疾患の原因となる。

### 2. 研究の目的

NETs形成の分子機構の解明をめざす。具体的には、1)NETs形成開始シグナル、2)クロマチンの脱凝縮プロセス、3)NETs分解機構に焦点を絞って検討する。通常、NETsは生体内で速やかに分解されるが、何らかの異常で遷延する時、NETs成分に対する抗体が産生されて重篤な自己免疫疾患の原因となる。本研究の成果は、感染症の治療法に加えて自己免疫疾患の分子標的治療法の確立に貢献する。

### 3. 研究の方法

ヒト末梢血由来の好中球(密度勾配遠心法で分離、精製)およびヒト白血病細胞株を分化させて好中球のモデルとし、*in vitro*にNETs形成を再構築した。NETs誘導刺激として、1)補体受容体を介した食作用、2)炎症を惹起する生体リガンドとしてATP、および3)NETs誘導試薬であるPMAを用いた。刺激後の変化を、核酸結合蛍光試薬(Hoechst33342およびSytox Green)共存下、バイオイメーキングシステムで追跡し、1)核内クロマチンおよび細胞内小器官の動態、2)各種活性酸素種インジケーターやpHセンサーを利用した細胞内における酸化還元反応、3)クロマチン脱凝縮(弛緩)の進行に伴うヒストンのシトルリン化、アセチル化、メチル化、リン酸化など細胞内タンパク質の翻訳後修飾、4)病原菌の生存率への影響を解析した。翻訳後修飾の解析については、PMA刺激後の各段階のサンプルについて、iTRAQ®法による網羅的質量分析を行った。これらの検討を通して、NETsの誘導から形成に至る各段階に重要な標的分

子を探索した。選択した標的分子については、shRNAの導入によるRNAi、およびCRISPR/Cas9を利用した遺伝子編集技術により、遺伝子変異型や遺伝子欠失型の好中球モデルを作成してその効果を解析した。

### 4. 研究成果

(1)ヒト好中球による、NETs形成プロセスの解析法の確立:ヒト末梢血由来の好中球を利用して、*in vitro*に、PMA(Phorbol 12-Myristate 13-acetate)およびカンジダ菌(真菌)を用いてNETsを誘導する方法を確立した。とりわけ、補体受容体を介したカンジダ菌の食作用では、食作用後の殺菌プロセスがNETs誘導シグナルに変換され、NADPHオキシダーゼ依存性の活性酸素種の生成を介してNETsを誘導することを見出した。次に、NETs形成過程を段階に分けて解析するため、核酸結合蛍光試薬(Hoechst33342およびSytox Green)共存下、蛍光顕微鏡を利用したバイオイメーキングシステムでクロマチン脱凝縮(弛緩)の進行過程を追跡した。NETs形成プロセスは、以下の1)~3)で示すように段階的に進行した。まず、1)核の形態が変化して分葉核を喪失し(30分~1時間)、その後、2)クロマチンが弛緩して核が膨潤し(1~2時間)、最終的には、3)核膜と細胞膜が崩壊して、NETsを放出した(3~4時間)。

(2)網羅的質量分析によるNETs形成過程における翻訳後修飾の探索:(1)で示した、各段階での生体内化学反応を見出すため、ヒト好中球を精製して、未刺激時およびPMA刺激後1,2,3時間のサンプルについて、iTRAQ法による網羅的質量分析をおこない、その結果を相対定量解析して、NETs形成過程で有意に変動する翻訳後修飾を含むタンパク質を探索した。蛍光顕微鏡を利用したバイオイメーキングシステムの結果より、刺激2時間後には、クロマチンの基本構造である核酸DNAとヒストンタンパク質の結合が緩んでいると判断し、2時間後に未刺激時と比して20倍以上の増加が認められるペプチド(アミノ酸の翻訳後修飾を含む)を検索した。その結果、15種類のタンパク質の断片として81種類のペプチドを見出した。現在、これらの翻訳後修飾を含むタンパク質についてさらに解析を進めている。以下に概略を示す。1)15種類のうち、4種類が細胞骨格タンパク質であるアクチンおよびアクチン結合タンパク質であった。NETs形成時の急速な形態変化に関与すると考えている。2)残りの11種類のうち、4種類が、EFハンド型カルシウム結合ドメインを持つタンパク質群であった。その中でも、特に顕著な増加が認められた2種類のタンパク質については、遺伝子欠失型好中球モデルを作成し、NETs形成過程における機能について解析中である。さらに、クロマチンの弛緩に直接的に関わる化学反応を見出すため、核内に存在する塩基性タンパク質であるヒ

ストンに注目した解析も行った。その結果、コアヒストンの H2A, H2B, H3、およびリンカーヒストンであるヒストン H1 において、これまで報告されていないアミノ酸の翻訳後修飾を見出した。特異性および NETs 形成における意義について、今後さらに解析を深める。

#### 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)

Okamoto S, Tsujioka T, Suemori SI, Kida JI, Kondo T, Tohyama Y, Tohyama K.: Withaferin A suppresses the growth of myelodysplasia and leukemia cell lines by inhibiting cell cycle progression. *Cancer Sci* 107(9):1302-14, 2016 (doi: 10.1111/cas.12988.) 査読有

Tsujioka T, Yokoi A, Itano Y, Takahashi K, Ouchida M, Okamoto S, Kondo T, Suemori S, Tohyama Y, Tohyama K: Five-aza-2'-deoxycytidine-induced hypomethylation of cholesterol 25-hydroxylase gene is responsible for cell death of myelodysplasia/leukemia cells. *Sci Rep* 5:16709. 2015 (doi: 10.1038/srep16709.) 査読有

Kuroda Y, Kato-Kogoe N, Tasaki E, Yuasa-Sunagawa M, Yamanegi K, Nakasyo K, Nakase I, Futaki S, Tohyama Y, Hirose M: Suppressive effect of membrane-permeable peptides derived from autophosphorylation sites of the IGF-1 receptor on breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 765: 24-33, 2015 査読有

Harahap NI, Nurputra DK, Ar Rochmah M, Shima A, Morisada N, Takarada T, Takeuchi A, Tohyama Y, Yanagisawa S, Nishio H: Salbutamol inhibits ubiquitin-mediated survival motor neuron protein degradation in spinal muscular atrophy cells. *Biochem Biophys Rep* 4 : 351-356, 2015 査読有

##### [学会発表](計 19 件)

森田寛之 (代表)、有馬太陽、佐々木彪曜、松本隆太郎、田畑裕幸、通山由美 細胞分化および増殖における Kinesin family member 20A (KIF20A) の機能の検討、第 89 回日本生化学会大会、2016

年 9 月 25-27 日、仙台国際センター(宮城県 仙台市)

島亜衣 (代表)、森田寛之、西尾久英、通山由美 脊髄性筋萎縮症 (SMA) のヒト神経細胞モデル作製と表現型の解析、第 63 回日本生化学会近畿支部例会、2016 年 5 月 21 日、神戸薬科大学(兵庫県・神戸市)

川井真好 (代表)、通山由美 *Staphylococcus aureus* の温度刺激による抵抗性の変化、第 63 回日本生化学会近畿支部例会、2016 年 5 月 21 日、神戸薬科大学(兵庫県・神戸市)

森田寛之 (代表)、福井彩乃、小山可奈子、有馬太陽、田畑裕幸、通山由美 Kinesin family member 20A(KIF20A)の細胞増殖と細胞分化における機能の検討、第 88 回日本生化学会大会、2015 年 12 月 1 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Tohyama Yumi (代表)、Tohyama Kaoru Role of Rab27a in highly-reactive oxygen species-related neutrophil extracellular traps (NETs) formation 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 11 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

Tohyama Yumi (代表)、Kawakami Tatsumi, Morita Hiroyuki Suemori Shin-ichiro Tohyama Kaoru Essential role of Rab27a in the formation of neutrophil extracellular traps (NETs), 第 76 回日本血液学会学術集会、2014 年 10 月 31 日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

森田寛之 (代表)、山口博文、岡本秀一郎、通山由美 補体依存性食作用における中間径フィラメント、ビメンチンの機能の解析(好中球様に分化したヒト白血病細胞株、HL60 による検討)、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

Dian Kesumapramudya Nurputra (代表), Hiroyuki Morita, Hisahide Nishio, Yumi Tohyama SMN is essential for the HDAC6 mediated tubulin-deacetylation in fibroblasts 第 61 回日本生化学会近畿支部例会、2014 年 5 月 17 日、京都産業大学(京都府・京都市)

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

該当なし

取得状況（計0件）

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.himeji-du.ac.jp/faculty/dp\\_pharm/pharm/pt2/](http://www.himeji-du.ac.jp/faculty/dp_pharm/pharm/pt2/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

通山 由美 (TOHYAMA, Yumi)  
姫路獨協大学・薬学部・教授  
研究者番号：70362770

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

田畑 裕幸 (TABATA, Hiroyuki)  
姫路獨協大学・薬学部・講師  
研究者番号：70378785

森田 寛之 (MORITA, Hiroyuki)  
姫路獨協大学・薬学部・助手  
研究者番号：90648594

### (4) 研究協力者

該当なし