

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：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461458

研究課題名(和文) Myotubularin分子群の顕微鏡的多発血管炎の発症機構に関する解析

研究課題名(英文) The role of myotubularins in pathogenesis of microscopic polyangiitis.

研究代表者

木村 洋貴 (Kimura, Hirotaka)

秋田大学・生体情報研究センター・特任助教

研究者番号：30382899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：顕微鏡的多発血管炎(MPA)は小型血管の壊死性血管炎で、自己抗体のAnti-neutrophilic cytoplasmic antibody (ANCA)が産生される。新たにCandida抽出物を用いてヒトMPAを病理学的、血清学的に再現するマウスモデルを確立した。Myotubularinファミリーの好中球特異的遺伝子欠損マウスにこの独自の方法でMPAを誘発し、いくつかの遺伝子型では生体内のNETsの頻度、ANCA価、病理学的重症度が上昇した。この遺伝子欠損好中球では、活性酸素種産生の亢進、ホスファチジルイノシトール3-リン酸の上昇、形成されるNETsのDNase耐性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Microscopic polyangiitis (MPA) is a necrotizing vasculitis affecting small vessels, resulting in alveolar hemorrhage and glomerulonephritis. An autoantibody, anti-neutrophilic cytoplasmic antibody (ANCA) is characteristically identified in MPA. In this study, we established a novel mouse model of MPA by administration of an extract from Candida yeast, histopathologically and serologically mimicking human disease. By utilizing this method, MPA was induced in neutrophil-specific myotubularins (MTMRs) deficient mice. Several genotypes among the MTMRs deficient mice exhibited increase of the levels of in vivo NETs and ANCA titers and exacerbation of histological damage. In the neutrophils, elevation of the levels of phosphatidylinositol 3-phosphate, ROS generation and tolerance of NETs to DNase was observed. These results suggested that MTMRs might participate in pathogenesis of MPA through regulating neutrophil functions including NETs formation via phosphoinositide metabolism.

研究分野：医歯薬学

キーワード：顕微鏡的多発血管炎 Myotubularin イノシトールリン脂質

1. 研究開始当初の背景

顕微鏡的多発血管炎(MPA)は毛細血管や細動脈などの小型血管に病変の首座を置く壊死性血管炎で、肺胞出血、半月体形成性糸球体腎炎や多発性単神経炎などを合併する自己免疫疾患であり病因は不明な点が多い。自己抗体である Anti-neutrophilic cytoplasmic antibody (ANCA) が産生されることが MPA の特徴的であり、ANCA は MPA の病態に深く関与する。

病態の解明や新たな治療法の開発には動物モデルを用いた解析が有用であると考えられる。従来の報告では、*Candida albicans* (CA) アルカリ性抽出物がマウスに ANCA 上昇と中血管炎を来すと言われている。しかし、血管病変の分布において、ヒトの MPA を模倣した血管炎動物モデルがほとんどないことから、われわれはヒト MPA を再現できる動物モデルの確立を試みた。

最近、活性酸素種(ROS)を産生する HADPH oxidase (NOX) の活性依存的に好中球が Extracellular traps (NETs) という細胞外構造物を形成し微生物との結合し殺菌に寄与する新たな生体防御機構が発見された。最近緒研究では、異常な NETs 形成は、ANCA 産生へと繋がり MPA を発症することが示唆されている。しかし、この異常な NETs がどのような機構の破綻を介して惹起されるかは未解明である。NOX の活性制御にはイノシトールリン脂質(PIs)が関与することから、研究者は、ホスホイノシタイド (PIs)代謝酵素である Myotubularin ファミリー (MTMRs) 分子群に着目した。

2. 研究の目的

従来、マウスに MPA を誘発する方法に関する報告は存在するが、病理学的あるいは病態学的には十分とは言えない。CA 抽出物がマウスに ANCA 産生を引き起こすという報告があることから、今回、新たな CA 抽出物を調製、検討し、これを用いてヒト MPA をマウスに再現できる誘発方法を確立する。好中球特異的 MTMRs 分子の遺伝子欠損マウスにこの方法で MPA を誘発し、どの遺伝子の欠損が MPA 発症に関与するか明らかにする。この分子群の遺伝子欠損マウス由来の好中球の NOX 活性、NOX 構成分子の局在、NETs 形成に MTMRs 遺伝子欠損および Phosphatidylinositol (3,4) bisphosphate [PI(3,4)P₂], PI(3)P の変化がどのように影響するかを解析する。MTMRs 分子群がいかにか NOX 活性と NETs 形成とに関与

しているかを明らかにする。以上から MTMRs のいかなる機能の破綻が MPA を引き起こすか解明する。これらの結果から得られる知見を基に、ヒト好中球での MTMRs 分子群の遺伝子発現の解析やヒトの NETs 形成を抑制する方法を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、はじめに種々の CA 抽出物の好中球に及ぼす ROS 産生、細胞形態学的変化などの生物学的活性を検討し、この新たな CA 抽出物を用いてヒト MPA をマウスに再現できる誘発方法を開発する。NOX 活性減少マウスに MPA を誘発し好中球が関与する血管炎であることを確認し、MPA モデルを確立する。MTMRs は、Mtmr1, 2, 3, 4, 6, 7, 14 を含むが、1 と 2, 3 と 4, 6 と 7 はそれぞれ分子構造上の相同性が非常に高い。ゆえに MTMRs のうち、4 つの遺伝型の MTMRs 遺伝子欠損マウスを用意した。MTMRs 酵素活性中心をコードするエクソンを挟んで loxP 配列を挿入した *Mtmrs^{lox/lox}* マウスと好中球特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *CD11b-Cre* マウスと交配することにより、遺伝子の欠損を導く。個体での解析では、4 つの遺伝型の MTMRs 遺伝子欠損マウスに、研究者の独自の方法で MPA を誘発し、血管炎の重症度を組織学的に解析し、血清中の ANCA 力価を測定する。これらの遺伝子欠損条件下の好中球を用いて、NOX 活性、NOX 構成分子の局在、NETs 形成、遊走能の解析を行う。さらに生体内および試験管内で形成される NETs について、量的および質的に検討する。これらの実験系から MTMRs 分子群のいかなる機能の破綻が MPA 発症の病因や病態となるのかを明らかにする。

4. 研究成果

研究者は、種々の条件での CA 抽出物を調製、好中球に及ぼす ROS 産生、細胞形態学的変化などの生物学的活性を検討した。結果、中性抽出物が *in vitro* での活性が最も高かった。この CA 由来抽出物を反復投与することによりヒト型 MPA をマウスに再現できるか検討した。この新たな方法ではマウスに、検尿異常、total ANCA 値上昇、Myeloperoxidase (MPO)-ANCA 上昇、肺の壊死性小血管炎、肺胞出血、半月体形成性糸球体腎炎および腎間質への白血球浸潤を認め、ヒトの MPA を病理学的、血清学的に高度に再現した。さらに、この新しい CA 由来抽出物は好中球の ROS 産生を引き起こし、*in vitro* および *in vivo* で NETs 形成を誘導した。この誘発法を好中球

ROS 産生機能が障害されている PI3K-gamma 欠損マウスに適用したところ, in vivo NETs 形成, 検尿異常, total ANCA 値上昇, Myeloperoxidase (MPO)-ANCA 上昇, 肺の毛細血管炎や糸球体腎炎を含む MPA 特異的な病理学的異常は緩和された. このことから, われわれの新しい MPA 誘発法は, 生体内での NETs 形成を過剰に誘導することにより, ANCA 産生さらに組織学的な異常へと続く病態を引き起こすと考えられた. 以上から, ヒト型 MPA をマウスに再現できる誘発方法を開発した.

好中球特異的 MTMRs 遺伝子欠損マウスに今回開発した独自の方法で MPA を誘発し, 疾患発症促進的な遺伝子型を検討した. 「Phosphatase ドメイン」を有する MTMRs の好中球特異的欠損マウスでは, 検尿 ANCA 値, 肺の毛細血管炎や糸球体腎炎を含む組織学的重症度値が増悪する傾向があった. 最も病変が著明であった遺伝型の MTMRs 欠損好中球の PIs 定量では, PI(3)P レベルの増加が認められた. この MTMRs 欠損好中球では, NOX 構成タンパク質の p47 phox, p40 phox の細胞膜やオルガネラ膜へ局在する分子が増加し, ROS 産生能も上昇した. これらの所見と一致するように, in vitro および in vivo での NETs 形成する好中球の頻度も亢進していた. さらに, この NETs は DNase I 耐性であった. これらの知見から, MTMR 阻害により好中球内の PI(3)P が増加する結果, NETs 形成は亢進し(量的異常), 質的にも NETs の分解が損なわれるため, 自己抗原になる機会が増加し ANCA 産生が亢進すると考えられた. NETs の DNase 耐性の詳細な機序については今後の検討課題である. 好中球内の PI(3)P が NETs 形成に関与すると考えられることから, 細胞内 PI(3)P を相対的に減少させる目的のため, Class III PI3K 阻害薬を好中球に添加したところ, ROS 産生や NETs 形成は抑制された. マウスでは, 好中球内の PI(3)P 増加が ROS 産生や NETs 形成を促進させることから, ヒトの好中球でもこのことが再現するか検討した. 健常人から末梢血を採取し, 好中球を分離した. Class III PI3K 阻害薬で処理されたヒト好中球では, ROS 産生や NETs 形成は抑制された. このことから, MTMRs の PIs 制御における機能が NETs 形成に関わるという有意義な結果を得た. さらに, この機構の破綻が異常な NETs 形成とその後の MPA 病態に関与することが示唆された.

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1件)

Hiroataka Kimura, Satoshi Eguchi, Junko Sasaki, et al. Vacuolar protein sorting 34 regulates myofibril proteostasis to prevent hypertrophic cardiomyopathy. JCI Insight. 2017 Jan 12;2(1):e89462.

〔学会発表〕(計2件)

木村洋貴. Phosphatidylinositol 3-phosphate による NETs 形成制御機構と顕微鏡的多発血管炎の発症病態の検討. 群馬大学・秋田大学 第5回生体情報研究シンポジウム. 2017年2月17日. 秋田大学大学院医学研究科・医学部本道会館2階研究室.

木村洋貴, 佐々木雄彦. 顕微鏡多発血管炎の発症に関与するリン脂質代謝酵素異常. 平成29年度東北乳酸菌研究会総会. 2017年7月14日. ホテルメトロポリタン仙台(発表決定).

〔図書〕(計1件)

木村洋貴, 佐々木雄彦. イノシトールリン脂質と炎症・免疫の制御. 炎症と免疫 vol.25, No.4, 先端医学社, 東京 (頁未定), 2017. (総説)(掲載決定).

〔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

木村 洋貴 (Kimura Hirotaka)
秋田大学 生体情報研究センター 特任
助教
研究者番号：30382899

(2)研究分担者

(3)連携研究者

小藤智史 (Kofuji Satoshi)
広島大学 薬学部 助教
研究者番号：00508153

佐々木純子 (Sasaki Junko)
秋田大学 医学系研究科 准教授
研究者番号：30333371

(4)研究協力者