

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461490

研究課題名(和文) p40phox siRNAによる好中球NET放出抑制がSLEに与える治療効果

研究課題名(英文) The possibility that suppression of NETosis contributes to improvement of SLE

研究代表者

竹内 康雄 (Takeuchi, Yasuo)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：60286359

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)：好中球はNETosisという独自の細胞死システムを持つことが知られるが、近年NETosisと抗核抗体陽性SLEの増悪に関連があることが注目されている。NETosisは、NOX2依存的活性酸素(ROS)産生が誘因になっていると考えられたため、本課題ではNOX2活性を制御することでSLEにおけるNETosisを抑制することを試みた。しかしながら、NOX2を抑制するとミトコンドリアでのROS産生が亢進することがあること、ミトコンドリアDNAが酸化傷害を受けてNETとして放出されること、酸化DNAに対する自己抗体はNETosisを亢進させることが分かり、応用にはさらなる解析が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils contribute to antimicrobial defense by releasing nuclear chromatin together with granule proteins to form an extra cellular mesh which binds and kills bacteria. This formation, called neutrophil extracellular traps (NETs), considered to be implicated in anti-nucleotide antibody (ANA) positive Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Activated neutrophils has been shown to involve the NADPH oxidase (NOX2) mediated production of reactive oxygen species (ROS), leading to disintegration of the nuclear envelope and result in induction of NETosis. In this study, we investigated the causal relation between NOX2 dependent/independent ROS production and extracellular DNA releasing. It was observed that the deletion of NOX2 in neutrophils accelerated mitochondrial ROS production with lps stimulation and released oxidative damaged DNA. Addition of anti-oxDNA antibodies induced more NETosis in vitro assay. Therefore, further analysis of the pathogenesis of anti-oxDNA Ab is needed.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：全身性エリテマトーデス 好中球 NETosis

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) の研究は長らく T 細胞や B 細胞の自己・非自己の認識の誤りがどのように生じるかという点に注目が集まっており、好中球などの自然免疫との関連は詳しく検証されてこなかった。しかし、2004 年、V Brinkmann らによって好中球が自身の DNA を投網のように細胞外へ放出し (Neutrophil Extracellular Trap: NET)、病原体の拡散を防いで殺傷する NETosis という新たな細胞死の形態が報告され (SCIENCE vol303,2004) SLE の進展と好中球との関連に焦点があてられるようになった。Apoptosis では死細胞の核成分は分解、凝縮され細胞外に放出されることはなくその clearance は immunological silent であると考えられている。一方 NETosis では、好中球のゲノム DNA は脱凝集し linearize されて放出され、シトルリン化ヒストンなどの様々な核タンパクが放出されるため、NET 成分が体内に存在し続けることが抗核抗体陽性自己免疫疾患の増悪に直接作用する可能性が出てきたためである。実際に SLE 患者では血清の DNase の異常等により NETs の分解に遅滞のあるケースが全 SLE の 36.1% 存在しているという報告もある (Proc.Natl.Acad.Sci.107,2010)。SLE 患者のもつ自己抗体、特に抗 RNP-IgG はそれ自体が誘因となって好中球に NETosis をおこさせることも知られている。つまり、SLE 患者は正常と比べ、本来細胞外に現れることのない自己の核成分にさらされる機会が相対的に多く、疾患の増悪に好中球が関与する悪循環が関係している可能性があるといえる。

2. 研究の目的

SLE の増悪には複数の要素が複雑に関係していることは明らかであるが、我々は新しい治療標的として、好中球の NETosis を起こしにくいように制御することで SLE 増悪の悪循環を断ち切ることを考えた。好中球に NETosis をおこさせる細胞外 trigger は様々であり、TLR の Ligand であるバクテリアや真菌は当然のことながら、SLE ではある種の抗核抗体やサイトカインが NETs を誘発することも知られている。しかし、これらの血清中の因子の作用は複雑な相互作用がありどこか一点を阻害しても大きな効果が得られるとは考えにくかった。一方、NETosis を起こす好中球自体の細胞内シグナルがどのようになっているのかは不明な点が多かったが、NADPH oxidase (NOX2) による活性酸素の発生を阻害すると NETosis が起こりにくくなることが示唆されていた。しかし、NETosis 抑制のために NOX2 の機能が完全に欠損してしまえば慢性肉芽腫症を発症することは自明の理である。そこで我々は NOX2 complex の中で酵素活性を持たない subunit である p40^{phox}

に着目し、siRNA を用いることで p40^{phox} の機能である膜移行のみを阻害し NOX2 活性を保ったまま NETosis を起こりにくくすることで SLE の増悪を防ぐことができないかを検討しようとした。

3. 研究の方法

複数サンプルの迅速で NETosis 特異性の高い解析方法を確立するため、シトルリン化ヒストンに対する抗体を用い、DAPI との二重蛍光抗体染色画像 (×100) を 16 視野以上取り込み Hybrid cell count ソフト (KEYENCE) を用いて全細胞数に対するシトルリン化ヒストン陽性細胞数の割合を計算しさらに形態学的に NETosis を起こしているかを確認して NETosis 頻度とした。疾患モデルマウスでの検討を可能にするため、マウスの骨髄を採取し磁気ビーズによる negative selection で好中球を分離し 90% 以上の分離度を確保したうえで in vitro において PMA、Ips、R848 で刺激した。

SLE の疾患モデルとして BXS/B^{Yaa} を用い、正常対照群には同週齢の C57BL/6 (B6) をもちいた。陰性対照群には C57BL/6 background の gp91^{phox} knock-out (NOX2 活性を完全に持たない。以下 NOX2KO) を使用した。また必要に応じて T 細胞 B 細胞を欠いた RAG2 knock-out マウス及び RAG2/NOX2 double knock-out マウスを使用した。

また、上記のマウスの NETosis 頻度及び好中球 NOX2 活性を FACS または plate reader で解析し活性酸素 (ROS) 産生と NETosis との経時的な関連について検討した。

NOX2 による ROS 産生は、細胞内に取り込ませた APF が ROS によって発する蛍光を FACS で検出する方法を主に用いたが、特に endosome 内に ROS が放出される場合と、細胞外に放出される場合を区別する必要がある時には Fc Oxy Burst または Oxy Burst H₂HFF Green BSA (ともに Molecular Probe) を用いて plate reader で検出した。

4. 研究成果

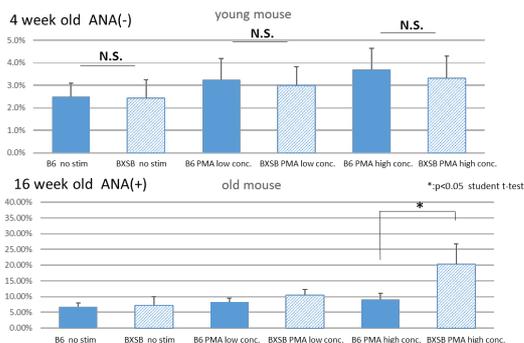
NETosis の定量法の確立

本研究は NOX2 活性を保ったまま NETosis の頻度を負に制御し SLE の増悪を抑制することを目的としていたため、NETosis の定量を正確に行う必要があった。NETosis の頻度を in vitro で比較する場合、生細胞の膜を透過しない核酸親和性蛍光物質 (ex: Sytox など) で細胞外 DNA を染色してその intensity を測定するのが従来の方法であるが、好中球は分離から活性化の過程で Apoptosis や Necrosis をおこすことがあり、Sytox では細胞内 DNA も染色されるためこの検出法は特異度が低い。ところで、NETosis でゲノム DNA を細胞外に放出するには、ゲノム DNA の condensation を解く必要があり、それには PAD4 による Histone のシトルリン化が必要である。シトルリン

化ヒストン (cit-H3) はゲノム DNA とともに細胞外に放出されるが、NETosis を起こしていない好中球の核には存在しないはずであるので Sytox よりも NET 特異性が高いと考えられた。我々は cit-H3 抗体と Sytox を用いて同一サンプルの DAPI 陽性細胞中のそれぞれの色素陽性細胞の割合 (%NET) を比較した。その結果、染色直後には両者の %NET に違いはないが、同じ条件でサンプルを固定しているにもかかわらず時間が経過すると Sytox は細胞内の DNA に非特異的に結合し蛍光を発するようになるということが分かり、複数のサンプルを順番に測定するような場合には Sytox 染色では正確な定量結果が出せないことがわかった。一方 cit-H3 で染色した場合は時間による不安定性はみられなかったため、以降正確な定量には citH3 をもちい、経時変化を追跡する場合には Sytox を併用することにした。

SLE 疾患モデルマウスにおける NETosis の亢進

上記の方法を用いて SLE のモデルである BXSB マウスの好中球の %NET を測定し同週齢の B6 と比較した。BXSB は 12 週齢ごろより抗核抗体を産生し始めるため、抗核抗体陰性の 4 週齢と陽性の 16 週齢で比較したところ 4 週齢の %NET は B6 と差がないが、16 週齢で BXSB の %NET が有意に上昇することがわかった(下図)。さらに、B6 と RAG2KO での %NET を比較したところ RAG2KO の %NET は B6 より有意に低値であった。

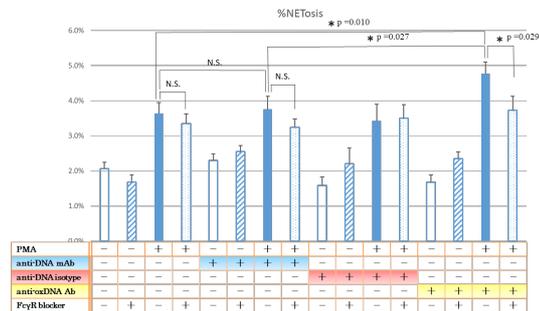


つまり、BXSB で NETosis が亢進する理由は好中球そのものの性質の違いによるわけではなく何らかの体内環境の変化、とりわけ自己抗体の産生と関連がある可能性が示唆された。

抗 DNA 抗体が NETosis に及ぼす影響

そこで、好中球から放出された NET DNA に対する抗体が体内に存在している場合に NETosis が亢進しうるのかを検討するため、RAG2KO の好中球に抗 DNA 抗体を加えて PMA 刺激による NETosis を誘導すると抗体がない場合より %NET が上がるか否かを in vitro で検討した。その結果、一般的な抗 DNA 抗体は %NET を上げなかったが、8-H-dG を認識する抗体、つまり酸化による Damage を受けた DNA に対する抗 oxDNA 抗体を添加

した場合は %NET が亢進することが分かった(下図)。またこの効果は FcγR を阻害するとキャンセルされた。



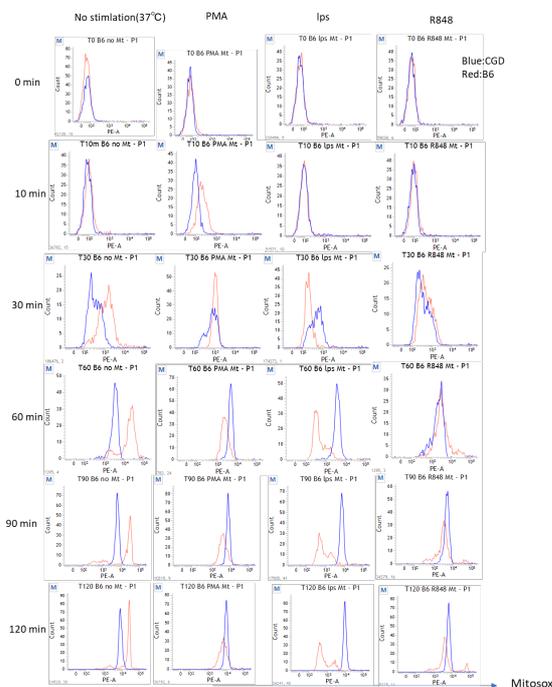
この結果は、NETosis 亢進が SLE 増悪と関連するとすれば、病原性があるのは抗 DNA 抗体ではなく抗 oxDNA 抗体であり、好中球の産生する ROS により酸化 Damage を受けた DNA と抗 oxDNA 抗体が結合し FcγR を介して次の NETosis を誘発し炎症を拡大している可能性を示唆している。

SLE 患者の抗 DNA 抗体はしばしば測定されるが、一般的な抗 DNA 抗体は正常人でも検出されることもあり、抗 DNA 抗体が直接の病原性を持っているか否かについては不明なことも多い。我々が ELISA で確認したところ抗 DNA 抗体陽性 BXSB マウスの血清には抗 oxDNA 抗体も含まれており、今後、抗 oxDNA 抗体の病原性についてさらなる解析が必要であると考えられた。

NOX2 欠損と oxDNA の関連について

BXSB マウスの NETosis の定量と並行して、NETosis を起こさないと考えられていた NOX2KO を用いて同様の NETosis の解析を行い、p40^{phox} を阻害することの有効性について検討した。既報では NOX2 依存的な ROS 産生は好中球の核膜を消失させ核成分を release させるのに必要であるため NOX2 活性を失った好中球は NETosis を起こさないと考えられていた。実際に我々が NOX2KO の好中球を刺激したところ、正常な好中球では核成分が細胞質内で混ざり合っているような像 (suicidal NETosis) が見られる刺激時間で、citH3 が顆粒状に細胞質にみられる (vital NETosis) 像が検出されることがあり、DNA 放出に至るまでの過程に違いがあるか、反応の遅れが生じていることが想定されたが、PMA 刺激の量や時間を変えると定量で差がつかなくなることもあることから NOX2KO で NETosis が起こらないとは断定できなかった。ところで 2016 年になり分離したヒト末梢血好中球をリボ核酸タンパク免疫複合体 (RNP IC) で刺激した場合について、ミトコンドリア(以下 Mito) の ROS 産生に強く依存した NETosis がおこり、酸化されたミトコンドリア DNA (以下 ox-mtDNA) が細胞外へ放出されるという報告がなされた (Nat.Med.vol.22,2016)。そこで、NOX2KO 好中球を PMA おをび TLR Ligand である lps(TLR4 ligand), R848(TRL7 ligand)で刺激した場合にミトコンドリアで

の ROS 産生がどのように変化するかを B6 好中球と FACS で比較した (下図)。



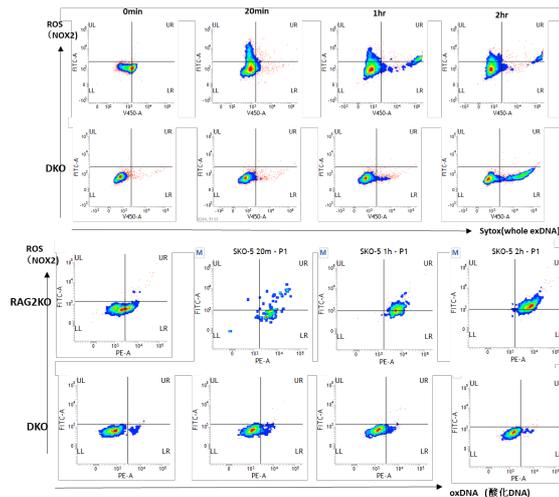
興味深いことに、正常マウスの好中球を *lps* で刺激すると何も刺激しない場合よりミトコンドリアにおける ROS の産生が抑制されるが、NOX2KO ではこの抑制がかからないということがわかった。*lps* はグラム陰性菌の細胞壁成分であり、*lps* 刺激は細胞外感染の状況を模倣している。一方細胞内感染を想定した R848 刺激では B6, NOX2 とともに活発なミトコンドリアでの ROS 産生がキャンセルされた。あるといえる。ミトコンドリアは本来細胞内寄生性細菌に由来する細胞内器官であるため mtDNA が細胞質内に放出されると DAMPs として作用し cGAS-STING 系を活性化して type IFN を分泌することが知られているが、今回の結果は、好中球が病原体の性質に合わせてミトコンドリアの ROS 産生を制御していることを示唆している。NOX2KO ではこのミトコンドリアでの ROS 産生の抑制が働かないことがあるようである。

近年、ミトコンドリアは細胞内で活発に分裂融合を繰り返しており、細胞質内に放出された mtDNA はウイルス感染が存在するかのように見せかけるための細胞の隠し玉のように働く重要な factor であることが分かってきている。好中球は長らく炎症初期に一度だけ脱顆粒して死んでしまう単純で短命な細胞と考えられてきたが、実際はその短い時間に複雑な制御が行われ状況に合わせて細胞死のシステムを使い分けているように思われる。

NOX2KO の好中球から oxDNA が release される

前述したように BXSB には抗 oxDNA 抗体が存在しこの抗体が Netosis を亢進している可能性があるため、NOX2 活性の有無のみの違

いで好中球が oxDNA を放出するの否かを はっきりと検証するために、NOX2/RAG2 double knock-out(DKO)を作製し RAG2KO 好中球と比較した。NOX2 活性と DNA の放出の時系列を明らかにするため APF を好中球にとりこませ、NOX2 が活性化し ROS が産生されると蛍光を発するようにして FACS で解析した (下図)。



その結果、ROS 産生は確かに DNA の release に先行しているが、NOX2 を欠損させても放出される DNA が存在し、その一部は oxDNA (下段)であることが明らかとなった。これらの結果をみると、NOX2 の膜移行を阻害することで NETosis により放出されるゲノム DNA の絶対量は減らすことができるかもしれないが、代償的に ox-mtDNA の放出が起こり、炎症自体は拡大すると考えられる。これまで、NOX2 を抑制することの副作用は慢性肉芽腫のような易感染性を呈することであると想定してきたが、むしろ oxDNA が DAMPs として機能し炎症を拡大する弊害の方が大きい可能性がある。治療手段として NETosis を抑制するにはさらなるメカニズムの解明が必要であると考えられる。

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 7 件)

- Multiple allogeneic progenitors in combination function as a unit to support early transient hematopoiesis in transplantation. Ishida T, Takahashi S, Lai CY, Nojima M, Yamamoto R, Takeuchi E, Takeuchi Y, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. *J Exp Med*. 2016;**213**:1865-80.

10.1084/jem.20151493 (査読有)

2. Inhibitory function of NKT cells during early induction phase of nickel allergy. Okuno H, Satoh M, Takeuchi E, Eshima K, Terashima M, Komotori J, Habu S, Tamauchi H, Iwabuchi K. *Immunobiology* 2016; DOI 10.1016/j.imbio.2016.01.012 (査読有)
3. Pre-transplantation blockade of TNF- α -mediated oxygen species accumulation protects hematopoietic stem cells. Ishida T, Suzuki S, Lai CY, Yamazaki S, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Takeuchi Y, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. *Stem Cells* 2017 Apr;35(4):989-1002. (査読有)
4. A possible clue for the production of anti-glomerular basement membrane antibody associated with ureteral obstruction and hydronephritis. Takeuchi Y, Takeuchi E, Kamata K. *Case Reports in Nephrology and Dialysis* 2015;5:87-95 (査読有)
5. 主要組織適合抗原不一致ドナーからの臍帯血移植による慢性肉芽腫症モデルマウスの治療. 田村昌也、竹内恵美子. *北里医学* 2015; 45(1):53-56 (査読有)
6. Curative haploidentical BMT in a murine model of X-linked chronic granulomatous disease. Takeuchi Y, Takeuchi E, Ishida T, Onodera M, Nakauchi H, Ohtsu M. *Int J Hematol* 2015;102(1):111-120 (査読有)
7. Convenient Evaluation of Magnitude of Glomerulonephritis in BXSB/Mp Lupus Mice. Takeuchi E, Iizuka M, Tamura M, Takeuchi Y. *J Clin Cell Immunol* 2014; 5:209 Doi:10.4172/2155-9899.100020

9 ISSN:2155-9899 (査読有)

[学会発表](計 8 件)

1. Quantitative analysis of Neutrophil extracellular traps (NETs) in lupus prone mouse using novel methods . The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017 Dec.12-14 Sendai, Japan. Morisawa S, Takeuchi E, Iwabuchi K, Takeuchi Y.
2. Lupus モデルマウス BXSB を用いた好中球 NETosis の新たな定量と定性解析. 第 45 回 臨床免疫学会. Shinjyuku, Tokyo, Japan. Sep.28-29,2017. 竹内恵美子, 森澤慎, 竹内康雄
3. NADPH oxidase defect leads to aristolochic acid induced acute tubule-interstitial nephritis resulting from imbalance of M1/M2 macrophages. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec 5-7, 2016, Naha, Japan. TAKEUCHI E, MORISAWA S, IIZUKA M, TAKEUCHI Y and IWABUCHI K
4. 慢性肉芽腫症モデルマウスにおいてアリストロキア酸誘導性尿細管壊死性腎炎が増悪するメカニズムの解析. 第 43 回 臨床免疫学会. Koube, Hyogo, Japan. Oct.22-24,2015 竹内恵美子、竹内康雄.
5. 活性酸素はアリストロキアサンによる急性腎障害進行を抑制する. 第58回 日本腎臓学会. Nagoya, Aichi, Japan. June 5-7, 2015 竹内康雄、竹内恵美子、鎌田貢壽、河原克雅.
6. MHC不一致ドナーからの臍帯血移植による慢性肉芽腫症モデルマウスの治療 第16回 神奈川血液・免疫フォーラム Yokohama, Japan Nov.21.2014 竹内恵美子、岩淵和也、東原正明、竹内康雄.
7. Stable supply of functional reconstituted neutrophils achieved by transplantation

of allogeneic umbilical cord blood induced remission of inflammatory state in X-CGD mice. (p184) 18th European society of gene and cell therapy. Hague, Netherland. Oct 23-26, 2014_ TAKEUCHI E and TAKEUCHI Y.

8. MHC不一致ドナーからの臍帯血移植による慢性肉芽腫症モデルマウスの治療. 第42回 日本臨床免疫学会. Sinjuku, Tokyo, Japan. Sep. 25-27, 2014 竹内恵美子、田村昌也、竹内康雄.

〔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

<http://www.khp.kitasato-u.ac.jp/SKA/nephrology/index.html>にて公開

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内 康雄 (TAKEUCHI, Yasuo)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：60286359

(2)研究分担者

竹内 恵美子 (TAKEUCHI, Emiko)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：00406935

大津 真 (OHTSU, Makoto)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：30361330

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()