

博士論文(2020年3月)内容の要旨および審査結果の要旨

鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科

氏名 ^{たきした ゆたか} 瀧下 裕

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博(薬)甲第7号

学位授与の日付 令和2年3月13日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目「NETosis 誘導機構の解析 NADPH oxidase 非依存性NETosis における
ミトコンドリアの関与と女性ホルモンの影響」

論文審査委員(主査)教授 里見 佳子 博士(医学)

(副査)教授 鈴木 宏治 薬学博士、医学博士

教授 定金 豊 博士(理学)

准教授 西田 圭吾 博士(医学)

准教授 米田 誠治 Ph.D.in Chemistry (オランダ)

論文要旨

氏名	瀧下 裕
----	------

論文の題名

NETosis 誘導機構の解析 NADPH oxidase 非依存性 NETosis におけるミトコンドリアの関与と女性ホルモンの影響

論文の要旨

序章

好中球は、自然免疫において重要な役割をはたす。通常は血液中を循環しているが、炎症など惹起されると、その局所に集積して生体防御反応をしめす。好中球の生体防御反応には、活性酸素種 (ROS) 産生や貪食があるが、それらの役割を果たすと好中球は細胞死を起こしてしまうことが知られている。一般に細胞死としてアポトーシスやネクローシスがよく知られているが、好中球はそれ以外の細胞死として好中球細胞外トラップ (NETs) を伴う細胞死を起こすことが明らかとなった。これは、DNA を網のように細胞外に放出して細菌などの異物を捕獲・殺菌する細胞死である。この NETs を形成することによって誘導された好中球細胞死は NETosis と呼ばれている。NETosis は自然免疫において重要な役割を持ち、細胞外に遊出した DNA やタンパク質がその後の炎症病態に大きく影響を与えることが知られている。例えば、NETosis は、関節リウマチや全身性エリトマトーゼスなどの炎症性疾患や自己免疫疾患などの増悪、血小板結合によるアテローム性硬化症、血管損傷に関与していることが報告されている。NETosis 誘導には、ROS の産生酵素である NADPH oxidase (NOX) が重要であると報告されているが、細胞にはその他にも ROS を産生する経路が存在し、特にミトコンドリアはエネルギー産生を担うだけでなく、細胞内で ROS 産生を通してシグナル伝達などに影響を与える。しかしながら、ミトコンドリアが NETosis 誘導にどのように関与するかについては明らかにされていない。本研究では、NETosis 誘導におけるミトコンドリアの関与を明らかにすることを主な目的とする。また、関節リウマチや全身性エリトマトーゼスなどの女性に好発する自己免疫疾患において NETosis 誘導が亢進していることが報告されているが、その理由は明らかになっていない。そこで、女性に多い疾患の病態メカニズムの一端を明らかにするため、女性ホルモン添加時の NETosis 誘導メカニズムを解析することを目的とした。

第一章 NADPH オキシダーゼ非依存性 NETosis の刺激物質の同定

NOX は好中球における ROS の主な産生酵素である。NETosis 誘導には NOX 由来の ROS が重要であり、NOX 依存性に誘導される NETosis を NOX 依存性 NETosis と定義している。しかしながら、最近、NETosis 誘導に NOX の活性化に関与しない機構も明らかになり、NOX 非依存性 NETosis と定義された。本研究では、NETosis 誘導機構における NOX 依存性と NOX 非依存性 NETosis の違いを明らかにするために、NOX 欠損マウスとミトコンドリア欠損細胞を用いて詳細に解析した。NOX のノックアウトマウスである *gp91^{phox}* ノックアウトマウスから腹腔に浸潤した好中球を回収して実験を行った結果、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 刺激では NETosis は誘導されなかったが、

カルシウムイオノフォアである A23187 刺激においては誘導された。PMA は PKC を介して NOX を活性化する刺激物質であるため、*gp91^{phox}* ノックアウトマウスでは、ROS が産生されず NETosis 誘導がおこらなかったと考えられた。また、A23187 刺激では NOX の活性化を介さずに NETosis を誘導することが判明した。したがって、PMA を NOX 依存性 NETosis 誘導剤、A23187 を NOX 非依存性 NETosis 誘導剤として以後の研究に用いた。

第二章 NETosis におけるミトコンドリアの役割

ミトコンドリアは、NOX とは異なる ROS 産生酵素をもつ。そのため、ミトコンドリアから産生される ROS の影響について検討した。ミトコンドリアの ROS 産生を抑制する mito TEMPO を用いて、PMA、A23187 両刺激の影響を調べた結果、どちらの刺激剤も部分的に NETosis 誘導を抑制した。したがって、ミトコンドリアは、NOX 依存性、NOX 非依存性 NETosis の両者に関与することが明らかになった。そこで、さらにミトコンドリアの関与を明らかにするため、ミトコンドリア欠損細胞 (ρ^0 細胞) を作成した。本研究ではより早期にミトコンドリア遺伝子を欠損させる新たな方法として、HL-60 細胞に 2', 3'-dideoxycytidine を加え、7 日間培養する方法を確立した。本細胞を用いた解析の結果、好中球に分化させた ρ^0 細胞では、A23187 刺激において NETosis は誘導されなかったが、PMA 刺激においては誘導された。この際、NETosis 誘導において鍵となる分子である peptidyl argininedeiminase 4 (PAD4) の発現、ヒストンのシトルリン化についてはミトコンドリア欠損の影響はなかった。したがって、ミトコンドリアは NOX 非依存性の NETosis 誘導に大きく関与し、それは、細胞内での PAD4 の活性化やヒストンのシトルリン化には影響せず、細胞膜崩壊に影響していると考えられた。

第三章 NETosis における細胞膜崩壊機構の解析

ミトコンドリア欠損細胞での実験から、NOX 依存性、NOX 非依存性 NETosis では細胞膜の崩壊機構が異なることが考えられたため、細胞膜崩壊に関わる因子について詳細に解析した。NETosis の細胞膜崩壊には、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) の活性化あるいは Necroptosis の細胞膜崩壊作用に関与している MLKL が関与することが考えられた。そこで、それぞれの阻害剤を用いて解析した。解析の結果、MPO 阻害剤処理により、PMA 刺激では NETosis 誘導は著明に抑制されたが、A23187 刺激では抑制されなかった。従って、NOX 依存性 NETosis は、MPO から産生される C10⁻ が細胞膜崩壊に関与し、NOX 非依存性 NETosis においては関与しないことが明らかとなった。Necroptosis 細胞膜崩壊作用に関与している MLKL の阻害剤を用いて解析した結果、NOX 依存性、非依存性 NETosis どちらも部分的に抑制された。以上のことから NOX 依存性 NETosis は MPO と一部 Necroptosis 様細胞膜破壊が関与していること、NOX 非依存性 NETosis においては、MPO は関与せず、一部 Necroptosis 様細胞膜破壊が関与していることが考えられた。

第四章 NETosis におけるエストロゲンの影響

女性に多い疾患の病態メカニズムの一端を明らかにするため、女性ホルモン添加時の NETosis の誘導メカニズムについて検討した。本研究では、女性ホルモンとして 17- β -estradiol (E2) を用いた。E2 を添加することで A23187 刺激による NETosis 誘導は著明に亢進した。本機構を解

析した結果、E2 添加により NETosis 誘導マーカーのヒストンシトルリン化が亢進し、同時にヒストンシトルリン化酵素である PAD4 の発現も亢進していた。NETosis 誘導には ROS が関与していることから L-012 を用いた ROS 産生量を測定したところ、E2 添加により ROS は減少した。さらに、エストロゲンの膜受容体である GPR30 のアゴニストを添加することにより E2 と同様の効果が得られた。そのため、E2 の効果は膜受容体を介している可能性が示唆された。これらの結果より、エストロゲンは膜受容体である GPR30 を介し、PAD4 の発現を亢進させ、ヒストンシトルリン化を誘導させることで、ROS 非依存的に A23187 誘導性 NETosis を亢進させていることが示唆された。

結論

本研究では、NETosis の誘導機構を詳細に検討した。解析の結果、NOX 非依存性 NETosis には Ca^{2+} が関与していること、NETosis の誘導機構にミトコンドリアが関与し、その欠損細胞の実験から特に NOX 非依存性の NETosis 誘導機構にミトコンドリアが関与すること、さらには NOX 依存性と非依存性では細胞膜崩壊機構が異なることが明らかとなった。また、NETosis は、様々な炎症病態に関与し、とくに 17- β -estradiol が関与する病態悪化には NETosis の亢進が関与する可能性があることが判明した。これらの発見は自己免疫疾患や炎症病態を治療するうえで NETosis の制御が重要な鍵を握ること、その制御にミトコンドリアがターゲットとなる可能性を示唆している。

引用文献

Yutaka Takishita, Hiroyuki Yasuda, Mio Shimizu, Akane Matsuo, Akihiro Morita, Tomonari Tsutsumi, Masahiko Tsuchiya, and Eisuke F. Sato “Formation of neutrophil extracellular traps in mitochondrial DNA-deficient cells” *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 1: 15-23 (2020)

Hiroyuki Yasuda, Maki Yamamoto, Yuna Kawashima, Yutaka Takishita, Akihiro Morita, Masahiko Tsuchiya, Eisuke F Sato “17- β -estradiol (E2) enhances neutrophil extracellular trap formation by increasing peptidyl arginine deiminase 4 expression via interaction with estrogen membrane receptor” *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 663:64-70 (2019)

※和文で作成すること。用紙サイズ A4、2500 字以内 (MS 明朝 10.5 ポイント)。

論文審査結果の要旨

【判定結果】

当委員会は、瀧下裕氏による学位申請論文の審査および口述による諮問を行った結果、博士（薬学）の学位を授与されるに相応しいと判定した。

【判定理由】

本論文で申請者は、生命の維持進展に不可欠なプログラム細胞死の一様式であり、好中球に特異的に見られる好中球細胞外トラップ（NETs）を伴う細胞死である NETosis について、その誘導機構を詳細に解析した。NETosis の誘導機構としては、すでに NADPH オキシダーゼ（NOX）依存性の機構があること、また NOX によって産生される活性酸素（ROS）が重要な役割を持つことが知られていたが、近年 NOX 非依存性誘導機構の存在が示唆されたことから、本論文では主に NOX 非依存性 NETosis の誘導機構について解析し、その一端を明らかにした。

申請者は、まず NOX 欠損マウスを使用し、好中球を単離して実験を行った。その結果、NOX 欠損マウス由来好中球において、NOX 依存性 NETosis の誘導物質であるフォルボールエステル（PMA）では NETosis は誘導されなかったが、カルシウムイオノフォアである A23187 では NETosis が誘導されたことから、A23187 が NOX 非依存性 NETosis の誘導物質であることを新たに示した。

次に申請者は、ミトコンドリアが NETosis に影響を及ぼし、またミトコンドリアで ROS が産生されるとの報告に基づき、ミトコンドリアの関与について解析するため、ヒト前骨髄球性白血病細胞株である HL-60 から、新規の方法によりミトコンドリア遺伝子欠損細胞（ ρ^0 細胞）を作成し実験を行った。HL-60 と ρ^0 細胞を好中球様細胞に分化させて、PMA と A23187 で処理した結果、PMA はどちらの細胞でも NETosis を誘導した。一方、A23187 は HL-60 では NETosis を誘導するが、 ρ^0 細胞では誘導しないことを認め、ミトコンドリアは NOX 非依存性 NETosis に関与することを示した。

続いて申請者は、 ρ^0 細胞で A23187 処理により NETosis が誘導されなかった理由を探るため、NETosis が起きる上で重要な現象である核脱凝縮に関わるヒストンのシトルリン化について解析した。その結果、ヒストンシトルリン化及びシトルリン化酵素である peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) の発現は、ミトコンドリアの有無に関わらず増加していた。このことから、申請者は ρ^0 細胞で NETosis が誘導されないのは、細胞内で核の脱凝縮自体は起こるものの、DNA が細胞外へ放出されないためであると推定し、細胞膜の崩壊機構について解析を行った。NETosis における細胞膜崩壊には、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）により産生される次亜塩素酸イオン（ClO⁻）が関与すると考えられているため、MPO 阻害物質を用いて解析したところ、PMA による NETosis の誘導は抑制されたが、A23187 による NETosis の誘導には影響が認められなかった。この結果から、MPO により産生される ClO⁻ は NOX 依存性 NETosis における細胞膜崩

壊には関与するが、NOX 非依存性 NETosis には関与しないことが示された。さらに申請者は、NOX 非依存性 NETosis における細胞膜崩壊機構を解析するため、Necroptosis において細胞膜崩壊に関与することが知られている mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL) の関与について解析した。MLKL 阻害物質で前処理すると、PMA と A23187 により誘導される NETosis はどちらも弱く抑制された。この結果から、MLKL は NOX 依存性及び NOX 非依存性 NETosis のどちらの細胞膜崩壊にも部分的に関与することを示した。

最後に申請者は、NETosis は女性に多い全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患の増悪に関与し、エストロゲンが核内受容体を介して NETosis を増加させるとの報告に基づき、エストロゲンの NETosis への影響について、その細胞膜受容体である GPR30 に注目して解析を行った。HL-60 では、 17β -エストラジオール及び GPR30 のアゴニストは A23187 により誘導される NETosis を亢進させ、これらの亢進作用は GPR30 のアンタゴニストにより抑制されることを認めた。また、PAD4 の発現とヒストンシトルリン化に対しても同様の結果であった。これらの結果から、エストロゲンは核内受容体だけでなく細胞膜受容体を介しても NETosis を亢進させることが示された。

以上のように、本論文は感染時等でみられる好中球の細胞死である NOX 非依存性 NETosis の誘導機構の一端を明らかにするとともに、女性ホルモンは細胞膜受容体を介する NETosis を亢進させることで、病態に影響を及ぼす可能性があることを示したものであり、薬学において価値のある研究と認めた。