

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

2020

瀧下 裕

Analysis of Induction Mechanism on NETosis

Mitochondria and Estrogen Mediate NADPH oxidase independent NETosis

2020

Yotaka Takishita

3

目次

はじめに	5
第1章 NADPH オキシダーゼ非依存性 NETosis の刺激物質の同定	
第1節 緒言	8
第2節 実験方法	9
第3節 結果	11
第4節 考察	11
第2章 NETosis におけるミトコンドリアの役割	
第1節 緒言	14
第2節 実験方法	15
第3節 結果	18
第4節 考察	19
第3章 NETosis における細胞膜崩壊機構の解析	
第1節 緒言	27
第2節 実験方法	28
第3節 結果	29
第4節 考察	29
第4章 NETosis におけるエストロゲンの影響の解析	
第1節 緒言	33
第2節 実験方法	34
第3節 結果	37
第4節 考察	37
結語	43
引用文献	44
謝辞	48
英文要旨	49

はじめに

好中球について

好中球は、人の循環血液中の最も多い白血球であり、病原体感染時に最初に反応する免疫担当細胞である。好中球は細菌・真菌類に対して遊走性を示し、貪食・殺菌を行うことで生体を防御している。また、好中球は IL-1 などの炎症性サイトカインを産生することで炎症反応を引き起こす。さらに、好中球は貪食した細菌を殺すため、NADPH オキシダーゼ(NOX)によってスーパーオキシドや過酸化水素を産生すると同時にアズール顆粒に含まれるミエロペルオキシダーゼ(MPO)は次亜塩素酸イオンを産生する(1)。好中球は、骨髓内で常時産生されており、約 2 週間で分化成熟して循環血液中に放出される。循環血液中の好中球は、生体内で感染や炎症がなければ 1 日で細胞死に至ることが知られており、好中球感染防御のために活性酸素を放出し、細菌や異物を貪食した後はアポトーシスあるいはネクロシスという細胞死を起こすと考えられてきた。しかし、2004 年に、Brinkmann V らによって好中球細胞外トラップと呼ばれる新たな細胞死が報告され注目されるようになってきた(2)。

細胞死について

従来細胞死は、大きく 2 つに分類され、何かしらの分子によって制御されるアポトーシス(プログラム細胞死)とそれ以外はネクロシス(壊死)と呼ばれていた。近年、アポトーシスとは異なる分子によって制御される細胞死が複数報告されるようになってきた。

Necroptosis、Pyroptosis、Ferroptosis、オートファジー細胞死や NETosis(2)などである。アポトーシスの分子機構については、ここ 30 年間で多くのことが明らかにされ、クロマチンの凝集と細胞質の断片化を特徴とし、カスパーゼ 3,6,7 などが実行因子として報告されている(3)。Necroptosis は、アポトーシスの分子経路が明らかになる過程でみつかった細胞死であり、Necroptosis を阻害する化合物として Nec-1 が報告され、Receptor interacting protein kinase (RIPK) 1/3 や Mixed lineage kinase domain-like (MLKL)といったタンパク質分子がシグナル伝達や細胞死実行に関与し、細胞の膨潤破裂と核の正常性を特徴としている(4)。

Pyroptosis はサルモネラの細胞内感染によって誘導されるカスパーゼ 1 依存性のネクロシス様の細胞死として報告され(5)、このカスパーゼ 1 の活性化にはインフラソームが関与しており、細胞死の直後にインターロイキン(IL)-1 β の放出がみられる。IL-1 β は炎症性

サイトカインであり、炎症を積極的に惹起することを特徴としている。Ferroptosis は、過剰な過酸化脂質がその誘導に重要であると想定されているが、その実行分子はほとんどわかっていない(6)。オートファジー細胞死は、飢餓や DNA 損傷時に活性化され、細胞や個体の生を維持するための機構と考えられている(7)。オートファジーの阻害がこの細胞死を抑制することからオートファジー細胞死とよばれている。

NETosis とは

好中球の新たな細胞死として NETosis が発見された。NETosis とは好中球が核内の DNA を放出し、クロマチンなどからなる好中球細胞外トラップ(neutrophil extracellular traps :NETs)で細菌などの異物を捕獲し、捕獲された細菌は放出された DNA に付着した MPO や好中球エラスターゼ(NE)などの酵素や抗菌ペプチドによって殺菌すると共に細胞死を起こす現象である(8)。

NETs の DNA はコンパクトに折りたたまれていないので、NETs を形成する DNA とヒストンが偏った荷電を有することになり高い粘着力を発揮して細菌や異物をとらえると推定されている。NETosis は、サルモネラや赤痢菌などの細菌やカンジダやアスペルギスなどの真菌をとらえることがまず報告された(2)。続いて NETs が HIV-1 や Myxoma virus などのウイルスなども捕捉することが報告されている(9)。生体内では NETs は好中球が豊富に存在する臓器である肝臓、肺、腸管などで病原体を捕らえているところが認められている。捉えられた細菌は好中球やマクロファージに貪食されやすくなるだけでなく、NETs には好中球の酵素である NE、MPO、ディフェンシンなどの抗病原体活性のあるタンパク質が機能を保持したまま放出されるので、細菌などを捕らえるだけでなく、失活させることも報告されている(10)。

NETosis の誘導機構

NETosis は様々な刺激物質によって誘導される。これらの刺激物質は、NOX を活性化させることによって、NETosis を誘導することが当初より報告されてきた(11)。好中球における NOX の活性化は非常に強力であるためスーパーオキシドを初期物質とする活性酸素種(ROS)が大量に産生される。これらの ROS は細胞内小器官であるアズール顆粒を脂質過酸化反応により損傷し、その顆粒内に局在していた NE が細胞質内に流出して、さまざまなタンパク質を非特異的に分解する。この NE は非常に強力な非特異的な分解作用を持っており、かつ ROS によって活性化される。したがって、NETosis が誘導された際には細胞内での脂質過酸化とエラスターゼによるタンパク分解が同時におこり核膜や細胞膜が破壊さ

れると推定されているが、その詳細な機構はわかっていない(12)。また、NETosis が誘導された際にエラスターゼは核内にも移動してヒストンタンパク質を分解して巻き付いていた DNA を解き放つことが報告されている(13)。このような事象が起こることによって細胞外へと DNA とヒストンが流出すると考えられているが、それに関わる分子や詳細な機構はまだ明らかになっていない。核脱凝縮については、NETs 誘導に重要な酵素と報告されているペプチジルアルギニンデアミナーゼ 4 (PAD4)によるヒストンアルギニン残基のシトルリン化も重要であることが判明している(14)。さらに、DNA 放出時の細胞膜崩壊機構は活性酸素が関連することは推定されているが、その分子機構は完全には分かってはいない。

NETosis の病態への関与

NETosis は DNA を放出することによって菌を捕獲・殺菌することで自然免疫に関与するが、DNA の過剰な放出は過度な炎症を引き起こす原因ともなり様々な炎症病態に関連している。NETosis によって放出された DNA は血小板に結合し、アテローム硬化症や血栓症を誘発する(15)。がん転移に重要な役割を果たすことも知られている(16)。また、全身性エリトマトーゼス(SLE)や関節リウマチなどの炎症性自己免疫疾患の増悪に NETosis が関与していることが報告されている(17,18)。また、細菌感染が関係している呼吸器系の炎症病態にも関与しており、肺や鼻汁中に NE や DNA が検出され、それらの病態悪化は DNase や NETosis を阻害する薬剤によって改善することが報告されている(13)。敗血症においても循環血液中に NETs が検出され、これらの病態でも DNase や NETosis を阻害する薬剤によって改善することが報告されている(19)。したがって、NETosis の誘導機構を解明することは多くの炎症病態を軽減することにつながり、治療ターゲットの 1 つとして注目されている。

本研究では、第 1 章において NOX のノックアウト(KO)マウスを用いて、NOX 非依存性の NETosis の刺激物質を同定した。また、第 2 章では、ヒト白血病細胞の培養細胞である HL-60 細胞を用いて NOX 依存性と非依存性の NETosis におけるミトコンドリアの関与について、新たな方法でミトコンドリア DNA 欠失細胞を作成し検討した。また、第 3 章では、培養細胞である HL-60 細胞を用いて NETosis における膜崩壊機構について検討した。さらに第 4 章では、病態への関与について、エストロゲンが NETosis を増強することを明らかにし、その機構について検討した。

第一章

NADPH オキシダーゼ非依存性 NETosis の刺激物質の同定

緒言

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。PMA、コンカナバリン A、微生物、コレステロールなどは NOX 依存性 NETosis を誘導することが報告されている(20)。これらの刺激物質は、PKC などを含むシグナル伝達経路を介して NOX を活性化している。NOX の阻害剤や ROS の消去剤がこれらの刺激物質で誘起される NETosis を阻害することが報告されている(21)。さらに、NOX の活性不全を特徴とする慢性肉芽腫症(CGD)患者では、PMA、コンカナバリン A、微生物による ROS の産生はなく、同時に NETosis も誘起されないことが報告された(22)。また、好中球では NOX によりスーパーオキシドが産生され、その後、好中球のアズール顆粒から放出される MPO によって ClO^- に代謝される。NOX 依存性の NETosis を誘導する刺激物質処理で、スーパーオキシドが MPO によって ClO^- に代謝されるが、この酵素の欠失患者や酵素を薬理的に阻害した際にも NOX 依存性の NETosis が阻害されることが報告された(1,23)。このように NOX 依存性の NETosis については、その刺激物質、シグナル伝達経路や関連する活性酸素が詳細に研究されている。ところが、最近になって、CGD 患者でも特定の刺激物質を使用すると NETosis が誘導されることが報告され(24)、それらの刺激物質で誘導される NETosis を NOX 非依存性の NETosis と定義するようになってきた。しかしながら、その詳細な機構については現在までのところ不明な点が多い。そこで本章では、NETosis 誘導機構における NOX 依存性 NETosis および NOX 非依存性 NETosis の違いを明らかにするために、NOX 欠損マウスを用いて解析した。

実験方法

1-1 実験動物

10 週齢の野生型(WT) C57BL/6 雄マウス(SLC、日本)と gp91^{phox} KO マウス (Jackson Laboratories、Bar Harbor, U.S.A.) を用いて検討を行った。マウスは、通常食 (Lab Diet[®]、U.S.A.) を給餌した。マウスの飼育は、温度 23°C、明暗周期 12 時間で行い、水・餌は自由に摂取させた。また、本研究の動物実験は、「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」および「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守し、鈴鹿医療科学大学動物実験委員会の承認を得て、動物擁護の配慮の下で行った。

1-2 マウス好中球の単離

マウス腹腔に 2.98% thioglycollate (Becton, Dickinson and Company、Franklin Lakes, NJ, USA) を 2 mL 投与した 4 時間後、腹腔内浸潤した好中球は PBS を用いて回収した。単離した好中球を PBS で 3 回洗浄し、細胞数を測定した後、各実験に用いた。

1-3 細胞外 DNA の定量

マウス由来好中球を 96 well-plate に 1×10^6 /mL の濃度で播種し、10 μ M A23187 または 1 μ M PMA で 3 時間処理した。次に、20 U/mL のマイクロコッカスヌクレアーゼ (New England Biolabs Japan、日本) で 20 分間、37°C で処理した。5 mM EDTA (pH 8.0) で反応を止めた後、切断した DNA を遠心分離 (200 \times g、8 分、4°C) によって回収した。回収した DNA を 5 μ M SYTOX green で染色した後、96 well-black plate に移し、SpectraMax[®] (励起波長：485 nm、蛍光波長：525 nm) を使用して蛍光量を測定した。回収した DNA の蛍光量は、無刺激(コントロール)に対する変化倍率として表した。

1-4 NETosis の定量

マウス由来好中球を 96 well-plate に 5×10^5 /mL の濃度で播種し、5 μ M SYTOX green で染色した後、10 μ M A23187 または 25 nM PMA を処理した。SpectraMax[®] (励起波長：485 nm、蛍光波長：525 nm) を使用して 1 時間ごとに DNA 蛍光量を測定した。NETosis の割合を計算するために、1% (v/v) Tritone X-100 処理した細胞の蛍光量を 100% DNA とみなし、各時点での NETosis 量を % で示した。

1-5 NETosis の形態観察

スライドグラス上に flexiPERM[®]チャンバーインサート（孔サイズ、1.8 cm²）を固定し、マウス由来好中球を 2×10^4 /well で播種し、10 μ M A23187 または 10 nM PMA で 3 時間処理した。次に、5 μ M SYTOX green で染色し、共焦点顕微鏡を使用して、観察した。

1-6 統計解析

データは、平均値 \pm SD として示した。統計解析は、Student's の t 検定で行なった。

結果

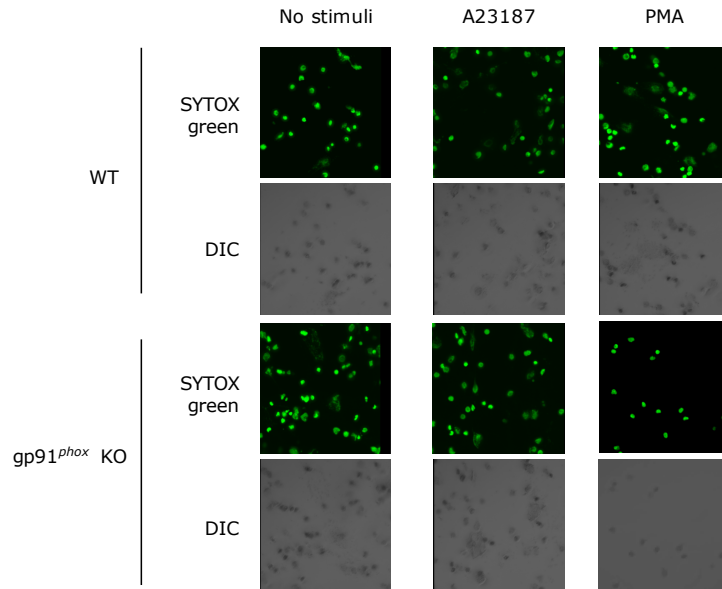
gp91^{phox} KO マウスの好中球における NETosis 形成

NOX サブユニット欠損マウスである gp91^{phox} KO マウスを使用して、PMA および A23187 によって誘導される NETosis がそれぞれ NOX 依存および NOX 非依存 NETosis かどうかを分析した。WT マウス由来好中球と比較して、gp91^{phox} KO マウス由来好中球は、PMA 刺激で細胞外 DNA の放出をしなかった (図 1A および C)。対照的に、A23187 刺激による細胞外への DNA 放出は、gp91^{phox} KO マウス由来好中球と WT マウス由来好中球の間に差はなかった (図 1A および B)。これらの結果は、gp91^{phox} KO マウスにおいて、A23187 が NOX 非依存的に NETosis を誘導させたことを示している。

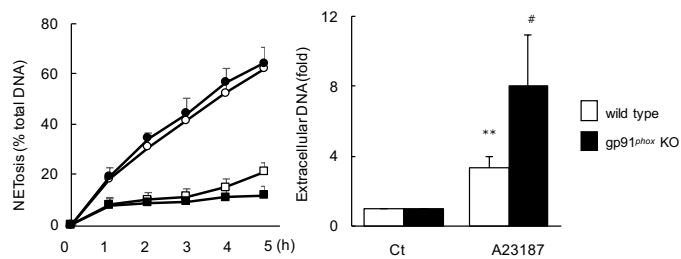
考察

gp91^{phox} KO マウスを用いた実験において、PMA は NOX 依存的であることが確認され、A23187 は NOX 非依存的な刺激誘導剤であることが明らかとなった。PMA 刺激では、正常マウスでは ROS が大量に産生される (date not shown) とともに NETosis も誘導されたが、gp91^{phox} KO マウスでは ROS は産生されず NETosis も誘導されなかった。しかしながら、A23187 刺激では、正常マウスでも gp91^{phox} KO マウスでも、ROS は産生されず (date not shown) NETosis が誘導された。このことは NOX の活性不全を特徴とする慢性肉芽腫症 (CGD) 患者での結果と一致した。したがって、PMA は NOX 依存性の刺激物質、A23187 は NOX 非依存性の刺激物質として、以降の実験に用いた。

A



B



C

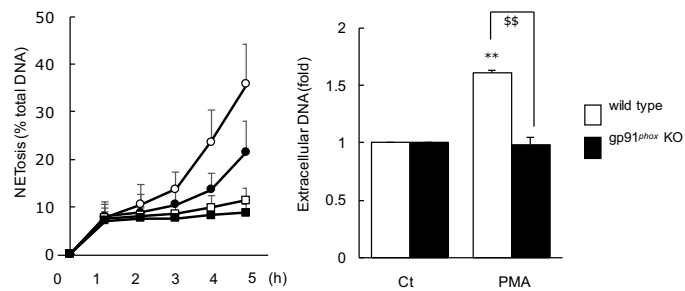


Fig. 1. Neutrophil extracellular trap (NET) formation in neutrophils from *gp91^{phox}* knockout (KO) mice and wild-type (WT) mice. The *gp91^{phox}* KO and WT mouse neutrophil were stimulated with 10 μ M A23187 (calcium ionophore) or 25 nM phorbol myristate acetate (PMA) for 3 h, and stained with SYTOX green (5 μ M), the cell-impermeable nucleic acid dye. (A) Representative confocal microscopy images showing NET formation; top panels: SYTOX green (DNA); bottom panels: differential interference contrast (DIC) images. (B) NETosis and extracellular DNA levels for

A23187-stimulated neutrophils. (C) NETosis and extracellular DNA levels for PMA-stimulated neutrophil. (○): stimulated WT mice, (□): unstimulated WT mice, (●): stimulated gp91^{phox} KO mice, (■): unstimulated gp91^{phox} KO mice were not stimulated. Student's *t* test analysis was performed. Data represent mean ± SD (n = 3). ***p* < 0.01 vs. WT mice (no stimuli), #*p* < 0.05 vs. gp91^{phox} KO mice (no stimuli), \$\$*p* < 0.01 vs. WT mice (PMA stimuli).

第二章

NETosis におけるミトコンドリアの役割

緒言

ミトコンドリアは、エネルギー産生やヘム代謝、尿素回路などの物質代謝およびシグナル伝達などを担う重要な細胞内器官である。NETosis はエネルギーに依存して誘導されることが報告されている(24)。好中球でのエネルギー産生は、解糖系に依存するところが大きい。ミトコンドリアにおいても ATP 産生は行われているためミトコンドリアが NETosis 誘導に影響を与える可能性が考えられる(25)。また、ミトコンドリアから産生される ROS は NOX から産生される ROS ほどの大量ではないが、電子伝達系からの ROS 産生が認められる。したがって、ミトコンドリアから産生される ROS が NETosis 誘導に関与している可能性も考えられる。さらに、ミトコンドリアからのシグナル伝達が NETosis 誘導に関与している可能性も考えられるが、その詳細な機構はわかっていない。同時に、NOX 依存性と NOX 非依存性の NETosis におけるミトコンドリアの役割もよくわかっていない。そこで本章では、ミトコンドリアの ROS を抑制することで NOX 依存性と NOX 非依存性の NETosis 誘導に影響されるかどうかを検討した。その後、ミトコンドリア遺伝子欠損細胞 (ρ^0) を作成して、ミトコンドリアそのものを欠失させて NOX 依存性と NOX 非依存性の NETosis にどのように影響するかを解析した。これまで多くの実験でエチジウムブロマイド (EtBr) によって ρ^0 細胞が作成されていたが(26)、この方法は 1 から 2 ヶ月の長期間培養が必要であること、核 DNA に影響がある可能性があるため本実験では代替方法を確立した。

実験方法

2-1 細胞培養

ヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 (RCB3683、RIKEN BioResource Center、日本) は、Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640 培地に 10% (v/v) 非動化 Fetal calf serum (FCS) および 100 IU/mL Penicillin-100 mg/mL Streptomycin Solution を加えて調製した培養液を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。2~3 日ごとに培地を換え、維持した。好中球様細胞への分化は、1.25% dimethyl sulfoxide (DMSO) または 1 μM all-trans retinoic acid (ATRA) で 3 日間処理することで行った。

2-2 ミトコンドリア DNA 欠損細胞 (ρ^0 細胞) の作製

ρ^0 細胞作製培養液として、RPMI1640 培地に 10% (v/v) 非動化 FCS、100 IU/mL Penicillin-100 mg/mL Streptomycin Solution、200 μM ウリジン、1 mM ピルビン酸および 1 μM dideoxycytidine (ddC) を加え、調製した。King MP *et al.* らの方法 (27) を参照し、 ρ^0 細胞を作製した。HL-60 細胞を調製した培養液で 37°C、5% CO₂ 条件下で 7 日間培養することで ρ^0 細胞を作製した。

2-3 細胞外 DNA の定量

第 1 章 実験方法 1-3 細胞外 DNA の定量に準じた。ただし、PMA は 10 nM または、25 nM の濃度で使用し、ミトコンドリア ROS スカベンジャーである MitoTEMPO は、200 μM の濃度で、A23187 または PMA で処理する 30 分前に添加した。

2-4 NETosis の定量

第 1 章 実験方法 1-4 NETosis の定量に準じた。ただし、PMA は 10 nM の濃度で使用し、ミトコンドリア ROS スカベンジャーである MitoTEMPO は、200 μM の濃度で、A23187 または PMA を処理する 30 分前に添加した。

2-5 NETosis の形態観察

第 1 章 実験方法 1-5 NETosis 形態観察に準じた。

2-6 ヒストン抽出

細胞を抽出バッファー (0.15 M NaCl、1.5 mM MgCl₂、0.65% NP-40、およびプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む 0.1 M Tris-HCl、pH 7.5) で溶解した。13,200 ×g で 10 秒間遠心分離した後、ペレットを 0.2 M H₂SO₄ と混合し、続いて 13,200 ×g で 20 分間遠心分離した。次に、上清を 100% トリクロロ酢酸と混合し、13,200 ×g でさらに 20 分間遠心分離した。ペレットをアセトンで洗浄し、13,200 ×g で 5 分間再度遠心分離し、2% SDS、6% 2-メルカプトエタノール、0.01% ブロモフェノールブルーを含む 0.45 M Tris-HCl、pH 8.8 に溶解した。

2-7 ウェスタンブロット

細胞は PBS で洗浄した後、RIPA buffer で溶解し、蛋白質サンプルを調製した。蛋白質サンプルは、12.5-15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) ゲルを用いて電気泳動をした後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜またはニトロセルロース膜にセミドライ転写により転写した。5% スキムミルクで 1 時間ブロッキングを行った後、抗シトクロム C (6H2.B4 556432; BD Bioscience USA)、抗ミトコンドリア複合体 I-V (Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail ab110413; Abcam UK)、抗ペプチジルアルギニンデアミナーゼタイプ 4 (PAD4) (ab214810; Abcam UK)、抗-TFAM (18G102B2E11; Novus biologicals, Centennial, CO USA)、抗シトルリン化ヒストン H3 (ab5103; Abcam UK)、および抗 MPO 抗体 (ab9535; Abcam UK) を 1 次抗体としてそれぞれ 1000 倍希釈で用い、4°C で一晩反応させた。Peroxidase 標識した抗ウサギ IgG 抗体または抗マウス IgG 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD USA) を 2 次抗体としてそれぞれ 2000 倍希釈で用い、室温で 1 時間反応させた後、ImmunoStar[®] Zeta (FUJIFILM、日本) で検出を行った。

2-8 ゲノム PCR、RT-PCR

1 × 10⁶ 個の HL-60 細胞および ρ⁰ 細胞を用いて、NucleoSpin[®] Tissue kit (TaKaRa Bio、日本) を使用し、ゲノム DNA およびミトコンドリア DNA を単離した。また、ISOGEN II (NIPPON GENE、日本) を使用し、total RNA を抽出した後、ReverTraAce[®] kit (TOYOBO、日本) を使用して cDNA を調製した。Table 1 のプライマーを用いてゲノム PCR または RT-PCR を行った。

Table 1

<i>Atp-6</i>	5'-atacacaacactaaaggacgaact-3', 5'-gaggcttactagaagtgaaaacg-3'
--------------	---

<i>p47^{phox}</i>	5'-agtagcctgtgacgtcgtct-3', 5'-accagccagcactatgtgt-3'
<i>gp91^{phox}</i>	5'-tctcctcatcatggtgcaca-3', 5'-gctgttcaatgcttggct-3'
<i>p22^{phox}</i>	5'-gtttgtttgtgcctgctggagt-3', 5'-tgggcggctgctgatgg-3'
<i>p67^{phox}</i>	5'-cgaggggaaccagctgataga-3', 5'-catggaacactgacctca-3'
<i>cytochrome C oxidase 1</i>	5'-tccttattcgagccgagctg-3', 5'-gggctgtgacgataacgttg-3'
<i>actin</i>	5'-agagctacgagctgcctgac-3', 5'-agcactgtgttggcgtacag-3'
<i>gapdh</i>	5'-gagtcctccacgataccaaag-3', 5'-ccccttcattgacctcaactac-3'

2-9FACS 分析によるタンパク解析

1×10⁶個のHL-60細胞およびp⁰細胞を、抗CD11b抗体（BD Biosciences USA）を一次抗体として100倍希釈した溶液と30分間、0°Cの条件下で反応させた。PBSで洗浄後、FITC標識抗マウスIgG抗体（BD Biosciences USA）を二次抗体として30分間、0°Cの条件下で反応させた。2% formaldehydeで懸濁した後、BD FACSCaliber（BD Biosciences. USA）を用いてFACS分析を行った。

結果

NETosis におけるミトコンドリア ROS の影響

ROS は NOX だけでなく、ミトコンドリアによっても生成される。したがって、NETosis の調節におけるミトコンドリア ROS の役割を評価するために、ミトコンドリア ROS のスカベンジャー作用をもつ mitoTEMPO を用いて好中球様 HL-60 細胞の NETosis への影響を解析した。MitoTEMPO 処理により、A23187 および PMA による細胞外 DNA 量や NETosis がわずかに減少した (図 2)。しかしながら、MitoTEMPO はそれらを完全に抑制しなかった。したがって、ミトコンドリアの ROS だけでなく、ミトコンドリアのシグナル伝達も含めた別の経路が NETosis に関与している可能性があると考えられた。

ρ^0 細胞作製方法の確立

次に、ミトコンドリアのシグナル伝達等が NETosis に関与するかどうかを調査するためにミトコンドリア DNA を欠損させた ρ^0 細胞を作製した。それまで、 ρ^0 細胞を作製するためには、EtBr (45 ng/mL) の存在下での細胞の長期培養 (1~2 か月) が必要であった(26)。本研究では、ミトコンドリア DNA 複製を阻害する ddC を使用し、短期間 (1 週間) での ρ^0 細胞作製を試みた。HL-60 細胞を 1 μ M ddC 存在下で 7 日間培養することで、ミトコンドリア DNA にコードされているシトクロム C オキシダーゼ遺伝子やシトクロム C の発現が減少した (図 3A および B)。また、ミトコンドリア複合体 I-V のタンパク質発現も著しく減少した (図 3C)。これらの結果から、HL-60 細胞を 1 μ M ddC 存在下で 7 日間培養することで、 ρ^0 細胞が得られることがわかった。

ρ^0 細胞の好中球様への分化の確認

上記の方法で作製した ρ^0 細胞が HL-60 細胞と同様に好中球様細胞に分化するかどうかを確認するために、分化マーカーなどの発現を調べた。フローサイトメーターを使用して、好中球表面抗原である CD11b の発現を評価した。CD11b は、HL-60 細胞および ρ^0 細胞でどちらも 1.25% DMSO 添加 3 日後に発現していた (図 4A)。また、好中球に発現している NOX 複合体 (gp91^{phox}、p22^{phox}、p47^{phox}、および p67^{phox}) の mRNA レベルを検討したところ、どちらの細胞においても 1.25% DMSO 添加 3 日後で発現が確認できた (図 4B)。これらの結果から、 ρ^0 細胞は HL-60 細胞と同様の方法で好中球様細胞に分化することがわかった。次に、この ρ^0 細胞が好中球様細胞に分化したとき、ミトコンドリア DNA が欠失した状態を維持しているかを確認した。その結果、ミトコンドリア DNA にコードされている *atp6* の発現やミトコンドリアの転写因子である TFAM の発現ともに、分化した ρ^0 細

胞においても低下していた（図 4C および D）。以上の結果から、 ρ^0 細胞と HL-60 細胞の間で DMSO による好中球様細胞への分化には差がないことがわかった。

ρ^0 細胞における NETosis の評価

続いて、作製した ρ^0 細胞を用いて NETosis が誘導されるか検討した。A23187 刺激において、好中球様 HL-60 細胞は NETosis が誘導されたが、好中球様 ρ^0 細胞では誘導されなかった（図 5A）。また、PMA 刺激において、NETosis はどちらの細胞においても誘導された（図 5B）。これらの結果から、ミトコンドリアは NOX 非依存性 NETosis に関与すると考えられた。

ρ^0 細胞におけるヒストンシトルリン化

ヒストンシトルリン化は、NETosis において重要な役割を果たす。したがって、好中球様細胞に分化した ρ^0 細胞で HL-60 細胞と同様、ヒストンのシトルリン化が誘導されるかどうかを確認するために、ヒストン H3 のシトルリン化レベルとシトルリン化酵素である PAD4 の発現を検討した。HL-60 細胞と ρ^0 細胞において PAD4 は、1.25% DMSO で処理した 3 日後にその発現が亢進した（図 6A）。また、A23187 刺激によるシトルリン化ヒストン H3 の発現は、どちらの細胞においても増加した（図 6B）。さらに、PAD4 発現とシトルリン化ヒストン H3 発現ともに、HL-60 細胞と ρ^0 細胞との間では差がなかった。これらの結果から、A23187 刺激は ρ^0 細胞における NETosis を誘導しなかったが、この時、PAD4 の発現とヒストンのシトルリン化は抑制されなかった。つまり、ミトコンドリア DNA 欠損における NOX 非依存性 NETosis の阻害には、PAD4 とヒストンシトルリン化は関係ないと考えられた。

考察

本章では、ミトコンドリア ROS の阻害と ρ^0 細胞を用いて、NOX 依存性および非依存性の NETosis へのミトコンドリアの関与を解析した。ミトコンドリア ROS の阻害により、NOX 依存性および非依存性の両方の NETosis が部分的に阻害されることが判明した。さらに 7 日間の培養で ρ^0 細胞を作成する方法を開発し、その ρ^0 細胞を用いた結果より、 ρ^0 細胞では NOX 依存性 NETosis は誘導されたが、NOX 非依存性 NETosis が抑制されたことから、NOX 非依存性 NETosis においてミトコンドリアが重要な役割を果たすことが示唆された。

以前の Douda DM らの研究では、ミトコンドリアの ROS をミトコンドリアの脱共役剤である dinitrophenol(DNP)を用いて抑制することで、NOX 非依存性の NETosis を抑制することが示された(28)。しかしながら、ミトコンドリアの脱共役剤は電子伝達系を阻害するためミトコンドリアの ROS 産生だけでなく ATP 産生も抑制する。本実験で用いた mitoTEMPO は ATP 産生を抑制せず、ミトコンドリア ROS のみを抑制するため、ミトコンドリアからの ROS の影響のみを検出することができる。したがって、本研究の結果は、ミトコンドリア ROS の影響をより明確にしたものとなる。それゆえミトコンドリアからの ROS は NOX 非依存性 NETosis だけに影響することは考えにくい。

これまで、 ρ^0 細胞は、EtBr を用いてミトコンドリア DNA の欠損を行っていた(26)。EtBr は、DNA のインターカレーターであるためミトコンドリア DNA だけでなく、核の DNA にも影響を与えることが判明している。また、処理期間も 1 から 2 ヶ月間と長いため、ミトコンドリア DNA 以外への影響が大きすぎる。そこで本研究では、ddC を用いた新しい方法により HL-60 細胞から ρ^0 細胞を作成した。ddC は、DNA ポリメラーゼ γ を抑制することがされており、核の DNA への影響は低濃度では低いことが明らかとなっている(29)。また、短期間の処理でミトコンドリア DNA が欠損するため、細胞ダメージを減らし、効率的にミトコンドリア DNA を欠失できる。ddC 添加により作成した ρ^0 細胞は、HL-60 細胞と同様に分化誘導剤で好中球様細胞に分化したが、分化マーカーである CD11b の発現は、HL-60 細胞よりも ρ^0 細胞で若干はやく発生することから、 ρ^0 細胞は HL-60 細胞よりも分化しやすい可能性が考えられた。これは、通常の分化でも好中球様細胞に分化するとミトコンドリアは少なくなることが報告されているが(30)、ddC によりミトコンドリア DNA を欠損させておくと、よりはやく好中球に分化することが出来ることを示唆している。

ρ^0 細胞では NOX 依存性 NETosis には影響が見られなかったが、NOX 非依存性 NETosis が有意に抑制されたことから、NOX 非依存性 NETosis においてミトコンドリアが関与することが示唆された。Douda DM らは NOX 非依存性 NETosis が、DNP 処理で阻害されることから、NOX 非依存性 NETosis にはミトコンドリアの ROS が関与すると述べているが、彼らの実験で用いた DNP は脱共役剤であるので、前述のようにミトコンドリアの ROS だけでなく、電子伝達系からの ATP 産生をも阻害されている(28)。したがって、ミトコンドリアの影響を正確にみるためには、本実験のようにミトコンドリア欠損細胞を利用したほうがよいと考えられる。

ミトコンドリアからの ROS やシグナル伝達が消失して NOX 非依存性 NETosis が抑制された際、核脱凝縮に関わる PAD4、ヒストンシトルリン化も抑制されている可能性が考えられた。しかしながら図 6 に示すように、HL-60 細胞と ρ^0 細胞において PAD4 の発現とヒ

ストンシトルリン化は抑制されていなかった。この結果は、NETosis が誘導されなかった ρ^0 細胞では、核脱凝縮が誘導され、細胞質へとクロマチンの放出がされていることが示唆される。従って、 ρ^0 細胞において NETosis が誘導されなかったのは、細胞膜の崩壊が引き起こされないため、細胞外に DNA が放出されなかったのではないかと考えられた。

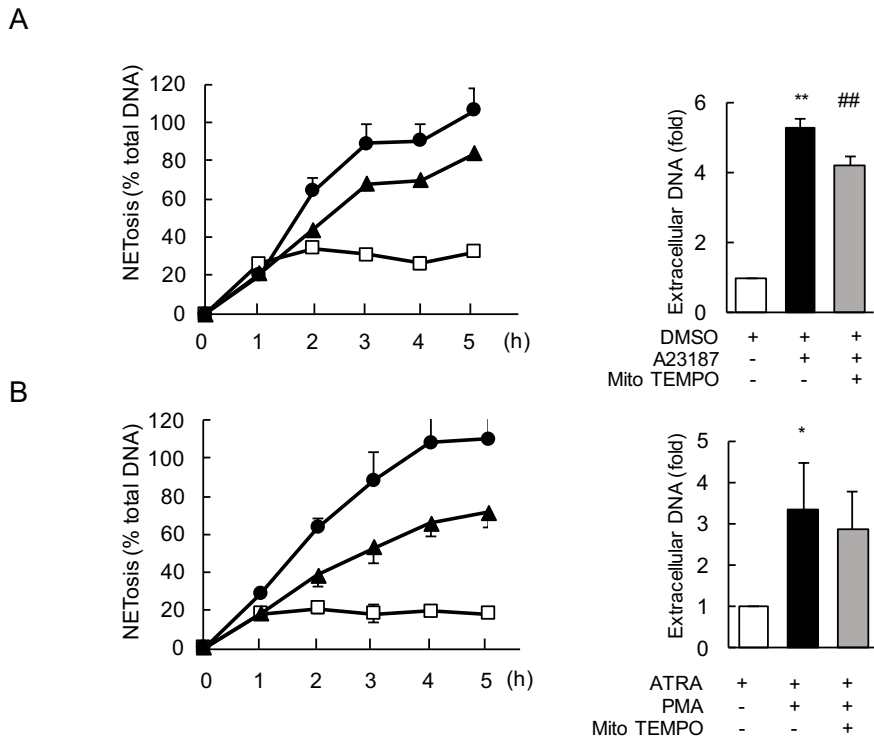


Fig. 2. Effect of MitoTEMPO on NET formation in neutrophil-like HL-60 cells. (A) NETosis and extracellular DNA levels for A23187-treated cells. HL-60 cells were treated with 1.25% DMSO for 72 h for neutrophil differentiation. The resulting neutrophil-like cells were pretreated with 200 μ M MitoTEMPO for 30 min and then treated with 10 μ M A23187. (B) NETosis and extracellular DNA levels for phorbol myristate acetate (PMA)-treated cells. HL-60 cells were treated with 1 μ M ATRA for 72 h for neutrophil differentiation. The resulting neutrophil-like cells were pretreated with 200 μ M MitoTEMPO for 30 min and then treated with 25 nM PMA. (●): stimulated cells, (▲): stimulated and MitoTEMPO-treated cells, (□): unstimulated and untreated (control). Student's *t* test analysis was performed. Data represent mean \pm SD (*n* = 3). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. control (-), ##*p* < 0.01 vs. A23187-stimulated cells.

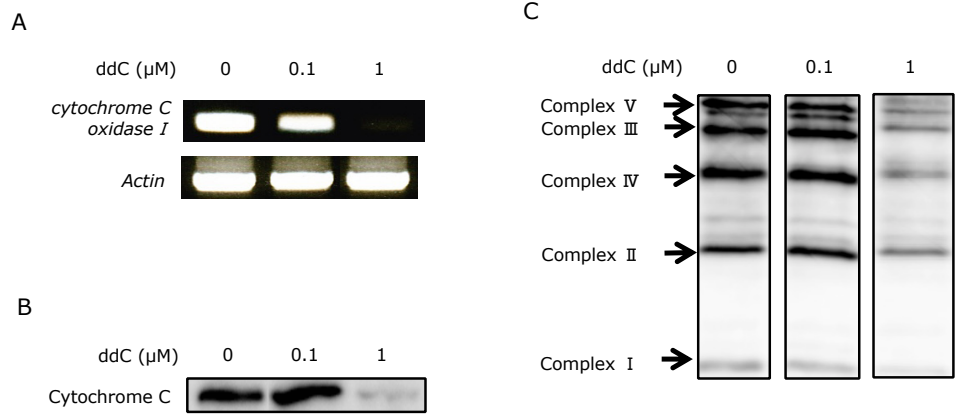


Fig. 3. Establishment of mitochondrial DNA deficient cells (ρ^0 cells) from HL-60 cells. HL-60 cells were treated with or without 0.1 or 1 μM ddC for 7 days. (A) Genomic PCR analysis showing the gene expression of *cytochrome c oxidase I* and *actin*. (B) Western blot showing the protein expression of Cytochrome C. (C) Western blots showing the protein expression of mitochondrial complexes.

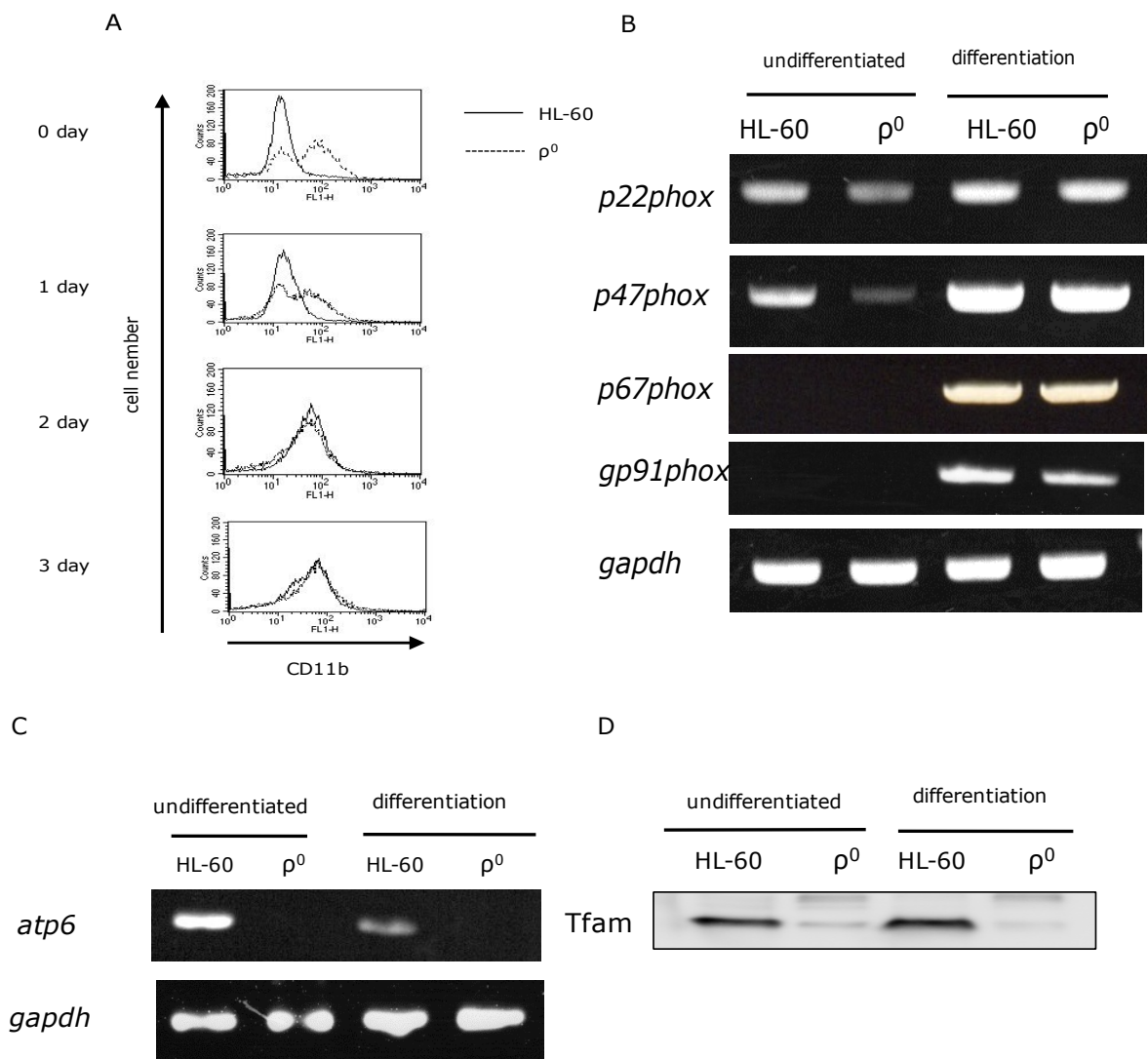


Figure 4. Characterization of neutrophil-like ρ^0 cells. HL-60 and ρ^0 cells were treated with 1.25% DMSO for 3 days. (A) Flow cytometry results showing CD11b expression from 0 day to 3 days after DMSO treatment. (B) RT-PCR results showing the expression of NADPH oxidase complex components (*p22^{phox}*, *p47^{phox}*, *p67^{phox}*, *gp91^{phox}*) before (0 day) and after (3 day) DMSO treatment. (C) Genomic PCR analysis showing *Atp6* expression (0 day) and after (3 day) DMSO treatment. (D) Western blot showing TFAM expression before (0 day) and after (3 day) DMSO treatment.

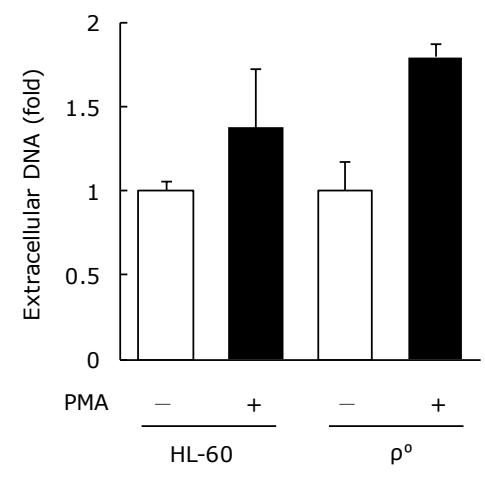
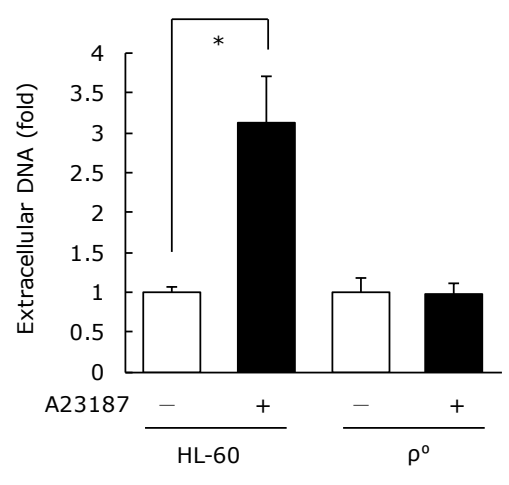
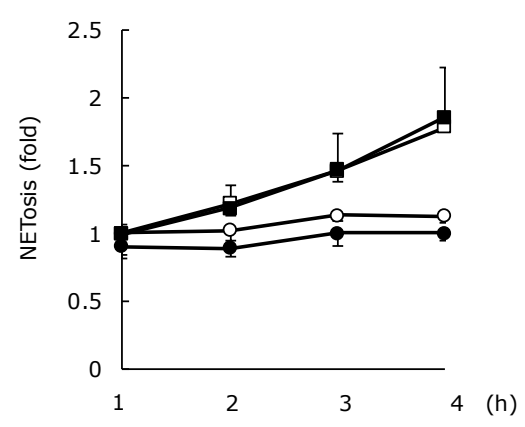
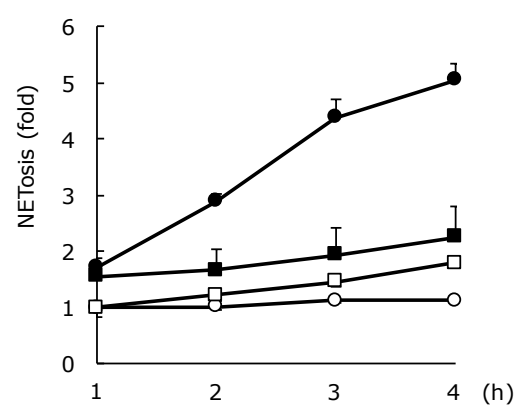
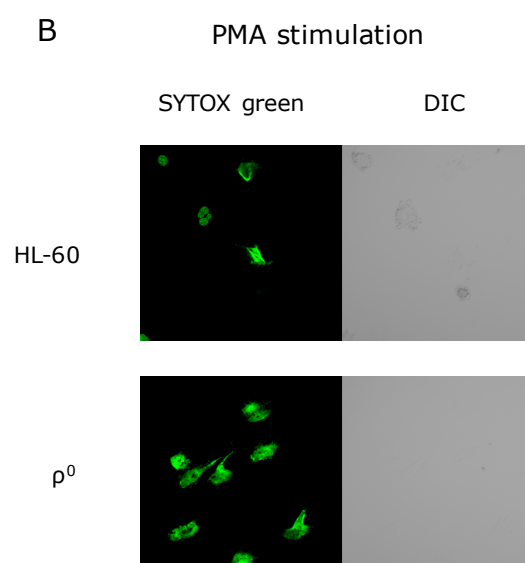
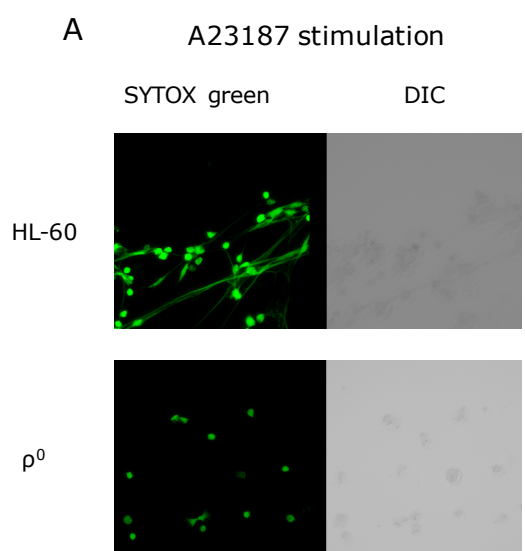


Figure 5. Analysis of NETosis of ρ^0 cells in neutrophil-like HL-60 and ρ^0 cells. HL-60 and ρ^0 cells were treated with 1.25% DMSO for 72 h, and then treated with (A) 10 μ M A23187 or (B) 10 nM PMA for 4 h. Representative confocal microscopy images showing NETosis have been provided; top left panels: SYTOX green (DNA); top right panels: differential interference contrast (DIC) images. The middle and bottom panels show NETosis and extracellular DNA levels. Student's *t* test analysis was performed. Data represent mean \pm SD (n = 3). **p* < 0.05 vs. control (-).

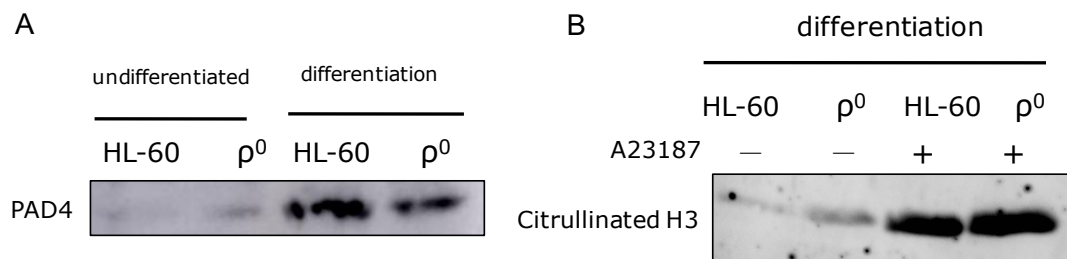


Figure 6. Peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) expression and histone H3 citrullinated in neutrophil-like HL-60 and ρ^0 cells. Neutrophil-like HL-60 and ρ^0 cells were treated with 10 μ M A23187 nuclear protein extraction was performed. Western blotting was performed to analyze the expression of (A) PAD4 and (B) citrullinated H3.

第三章

NETosis における細胞膜崩壊機構の解析

緒言

ミトコンドリア欠損細胞での実験から、NETosis 誘導に重要とされる核脱凝縮にミトコンドリアは関与しないことが明らかとなった。また、ミトコンドリア欠損細胞で NOX 非依存性 NETosis が抑制されるのは細胞膜崩壊が抑制されていることが予想された。したがって、NOX 依存性と NOX 非依存性 NETosis の誘導では細胞膜の崩壊機構が異なる可能性が考えられた。NOX 依存性 NETosis の誘導が、MPO 欠損患者や MPO KO マウスにおいて抑制されることから(23)、細胞膜破壊作用がある ClO₂⁻が関与している可能性が考えられる。そこで、本章では、まず MPO の特異的阻害剤を用いて実験を行なった。また、細胞死に伴う細胞膜崩壊には、Necroptosis では、MLKL が細胞膜に孔を形成することによって膨潤破裂をおこして細胞膜構造を破壊することが知られているので(31)、本章では NOX 依存性と NOX 非依存性 NETosis において Necroptosis 様の細胞崩壊が起きるかについても検討した。

実験方法

3-1 細胞培養

第 2 章 実験方法 2-1 細胞培養に準じた。

3-2 細胞外 DNA の定量

第 1 章 実験方法 1-3 細胞外 DNA の定量に準じた。ただし、PMA は 25 nM の濃度で使用し、MPO 阻害剤である 4-aminobenzoic acid hydrazide (ABAH) は、500 μ M の濃度で、A23187 または PMA で処理する 3 時間前に添加した。また、mixed-lineage kinase domain-like pseudokinase (MLKL) 阻害剤である necrosulfonamide (NSA) は、50 μ M の濃度で使用し、A23187 または PMA で処理する 30 分前に添加した。

3-3 NETosis の定量

第 1 章 実験方法 1-4 NETosis の定量に準じた。ただし、ABAH は、500 μ M の濃度で、A23187 または PMA で処理する 3 時間前に添加した。また、NSA は、50 μ M の濃度で使用し、A23187 または PMA で処理する 30 分前に添加した。

3-4 NETosis 画像の形態観察

第 1 章 実験方法 1-5 NETosis の形態観察に準じた。ただし、PMA は 25 nM の濃度で使用し、ABAH は、500 μ M の濃度で、A23187 または PMA で処理する 3 時間前に添加した。また、NSA は、50 μ M の濃度で使用し、A23187 または PMA を処理する 30 分前に添加した。

3-5 Aminophenyl fluorescein (APF) による ClO^- の検出

1×10^6 個の HL-60 細胞および ρ^0 細胞は、PBS で洗浄後、10 μ M APF で処理した。その後、10 μ M A23187 または 10 nM PMA で処理し、フローサイトメーター（励起波長：488 nm、蛍光波長：575 nm）を使用して、APF 染色細胞を分析した。

結果

NETosis に関与する細胞膜崩壊機構の探索

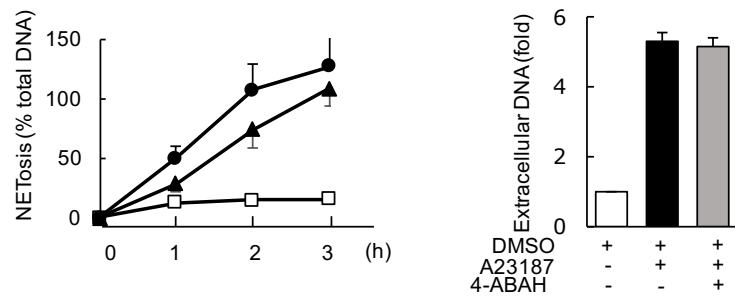
NETosis における細胞膜の崩壊には MPO によって産生される ClO^- が重要と考えられているため、MPO 阻害剤である ABAH の影響を検討した。ABAH の前処理によって、PMA 誘発 NETosis を顕著に抑制したが、A23187 誘発 NETosis は抑制できなかった (図 7A および B)。このとき、実際に ClO^- が産生されているかを明らかにするために、強い活性を持つ ROS (ClO^- など) に反応する APF を用いて ClO^- を検出した。 ClO^- 産生は、PMA 刺激後に好中球様 HL-60 細胞および好中球様 ρ^0 細胞の両方で観察されたが、A23187 刺激では観察されなかった (図 7C)。さらに、A23187 および PMA によって誘導される NETosis における膜破壊の他の潜在的なメカニズムを調べるために、好中球様 HL-60 細胞における NETosis に対する MLKL の関与を検討した。MLKL 阻害剤である NSA の前処理によって、A23187 誘発または PMA 誘発 NETosis は抑制された (図 7D および E)。これらの結果から、NOX 依存性および非依存性 NETosis には、Necroptosis の誘導に重要な MLKL が一部関与すると考えられる。

考察

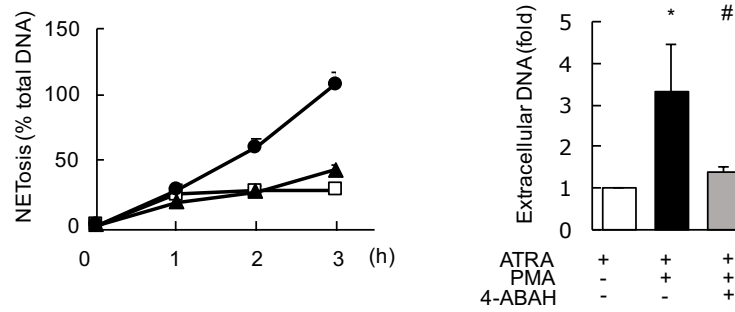
好中球は PMA などの刺激によって MPO が ClO^- を産生する。 ClO^- は、強力な酸化力をもった ROS であり、強い抗菌作用を示す。この抗菌力は、脂質やアミノ酸を酸化することによって発揮されるだけでなく、生体膜の構造を破壊することが報告されている (32)。本実験では、NOX 依存性刺激物質である PMA の場合は、MPO の阻害剤を添加することで NETosis が抑制された。したがって、NOX 依存性 NETosis 誘導では、 ClO^- によって膜構造を破壊して細胞内のクロマチンを放出さすと思われる。一方、NOX 非依存性の刺激物質である A23187 では、その効果が認められなかったため、これ以外の経路で膜構造を破壊すると考えられた。実際に、 ClO^- の産生をフローサイトメーターで検出すると、PMA では刺激直後に ClO^- を産生するが、A23187 では刺激直後に ClO^- を産生しない。したがって、NOX 非依存性の NETosis には他の細胞膜崩壊機構が働いていると考えられる。そこで、Necroptosis 様の細胞膜破壊が起きている可能性について検討した。Necroptosis 様の細胞膜破壊では MLKL が細胞膜破壊の実行因子として働くので、その特異的阻害剤を用いて実験を行った。その結果、部分的ではあるが NOX 依存性および非依存性 NETosis とともに抑制された。したがって、NOX 依存性 NETosis では、MPO 由来の ClO^- と Necroptosis 様の膜

崩壊にかかわる MLKL が実行因子として働いているが、NOX 非依存性 NETosis の膜崩壊には C10 は関与せず、MLKL が部分的に実行因子として働いているものと考えられた。

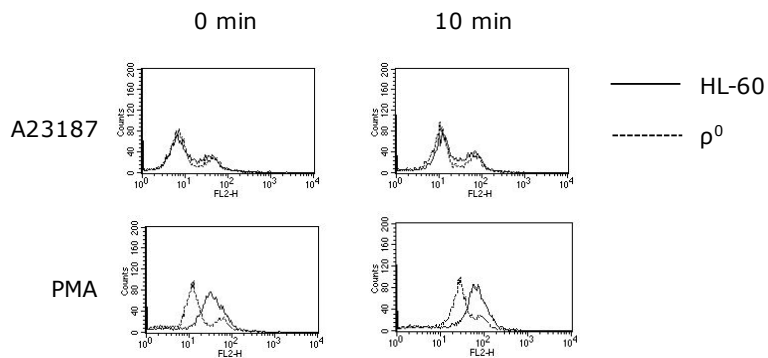
A



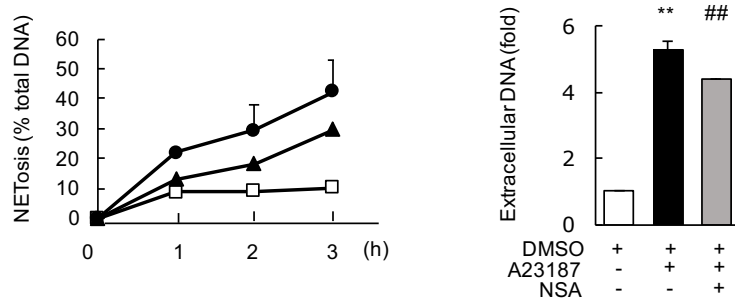
B



C



D



E

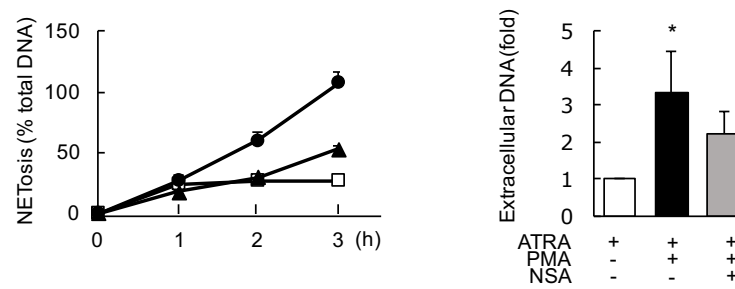


Figure 7. Analysis of plasma membrane disruption during NET formation in neutrophil-like HL-60 cells. (A) NETosis and extracellular DNA levels in A23187-stimulated HL-60 cells with or without ABAH treatment. HL-60 cells were treated with 1.25% DMSO for 72 h for neutrophil differentiation. The resulting neutrophil-like cells were treated with 500 μ M ABAH for 3 h and then with 10 μ M A23187. (B) NETosis and extracellular DNA levels for phorbol myristate acetate (PMA)-treated HL-60 cells with or without ABAH treatment. HL-60 cells were treated with 1 μ M ATRA for 72 h for neutrophil differentiation. The resulting neutrophil-like cells were treated with 500 μ M ABAH for 3 h and then with 25 nM PMA. (C) Aminophenyl Fluorescein (APF)-based flow cytometry analysis of ClO^- generation before (0 min) and at 10 min after A23187 or PMA stimulation. (D) NETosis and extracellular DNA levels in A23187-stimulated HL-60 cells with or without necrosulfonamide (NSA) treatment. HL-60 cells were treated with 1.25% DMSO for 72 h for neutrophil differentiation. The resulting neutrophil-like cells were treated with 50 μ M NSA for 30 min and then with 10 μ M A23187. (E) NETosis and extracellular DNA levels for phorbol myristate acetate (PMA)-treated HL-60 cells with or without NSA treatment. HL-60 cells were treated with 1 μ M ATRA for 72 h for neutrophil differentiation. The resulting neutrophil-like cells were treated with 50 μ M NSA for 30 min and then with 25 nM PMA. (●): stimulated cells, (▲): stimulated and inhibitor-treated cells, (□): unstimulated and untreated (control). Student's *t* test analysis was performed. Data represent mean \pm SD (n = 3). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. control (-), #*p* < 0.01 vs. PMA-stimulated cells, ##*p* < 0.01 vs. A23187-stimulated cells.

第四章

NETosis におけるエストロゲンの影響の解析

緒言

NETosis は自然免疫の重要な現象であるが、過剰な NETosis は生体に細胞の機能不全や臓器障害などの有害な影響を与えることが報告されている(33)。実際、NETosis の過剰な誘導は、血栓症と血管内皮細胞損傷を引き起こす(34)。また、NETosis は SLE などの自己免疫疾患の増悪に関与していることも報告されている(35)。SLE やリウマチ性関節炎の罹患率の男女比は 1 対 9 と圧倒的に女性に多い疾患であることが知られおり、女性ホルモンによって影響されることが報告されている(36)。この女性ホルモンの影響は疾患時だけではない。例えば、妊娠中に PAD4、シトルリン化ヒストン H3、および MPO を含む NETosis マーカーの増加を特徴とする NETosis 誘導が増加することも報告されている(37)。最近になって、女性ホルモンが、エストロゲン受容体、特にエストロゲン核内受容体 (ER α /ER β) を介して NETosis の発生を増加することが報告された(37)。エストロゲン受容体には核内受容体 (ER α /ER β)だけでなくエストロゲン膜受容体 (GPR30)が存在する(38)。そこで、本章では、DMSO で分化した好中球様 HL-60 細胞を使用して、in vitro でエストロゲンが NETosis に影響するかを解析し、さらに、その影響が膜受容体 (GPR30)を介するかどうかを検討した。

実験方法

4-1 細胞培養

第 2 章 実験方法 2-1 細胞培養に準じた。

4-2 細胞外 DNA の定量

第 1 章 実験方法 1-3 細胞外 DNA の定量に準じた。ただし、 17β -estradiol (E2) または G-protein receptor 30 (GPR30) agonist である G-1 はそれぞれ 5 μ M、1 μ M の濃度で使用し、1.25% DMSO で処理するのと同時に加えた。また、GPR30 antagonist である G-15 は、1 μ M の濃度で使用し、E2 または G-1 を加える 1 時間前に添加した。

4-3 NETosis の定量

第 1 章 実験方法 1-4 NETosis の定量に準じた。ただし、E2 または G-1 はそれぞれ 5 μ M、1 μ M の濃度で使用し、1.25% DMSO で処理するのと同時に加えた。また、G-15 は、1 μ M の濃度で使用し、E2 または G-1 を加える 1 時間前に添加した。

4-4 NETosis の形態観察

第 1 章 実験方法 1-5 NETosis の形態観察に準じた。ただし、E2 または G-1 はそれぞれ 5 μ M、1 μ M の濃度で使用し、1.25% DMSO で処理するのと同時に加えた。

4-5 蛍光免疫染色

ポリリジンコートされたガラス上に細胞を播種し、10 μ M A23187 で 4 時間処理した後、4% paraformaldehyde で固定した。洗浄後、1% Triton-X 100 で 15 分間処理し、5% ウシ血清アルブミンで室温 1 時間処理した。抗 CD11b 抗体 (500 倍希釈)、抗 GPR30 抗体 (250 倍希釈) またはシトルリン化ヒストン H3 抗体 (500 倍希釈) を一次抗体として、4°C の条件下で一晩反応させた。洗浄後、抗ウサギ IgG 抗体 (Alexa Fluor 488 または 647; 500 倍希釈) を二次抗体として、室温・暗所の条件下で 1 時間反応させた。その後、DNA を DAPI または SYTOX green で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

4-6 活性酸素 (ROS) の測定

HL-60 細胞は、1.25% DMSO を添加するのと同時に 5 μ M E2 または 1 μ M G-1 を加え、分化させた。 4×10^3 個の細胞と ROS 検出試薬である 500 μ M L-012 を混合し、10 μ M A23187

を処理した後、96 well-white plate に移し、37°Cの条件下で Microplate Luminometer (Orion II; Roche Diagnostics K.K., 日本) を用いて化学発光量を測定した。

4-7 ウェスタンブロット

第2章 実験方法 2-6 ウェスタンブロットに準じた。ただし、抗 PAD4 抗体、抗シトルリン化 H3 抗体または二次抗体は 3000 倍希釈で使用した。

4-8 リアルタイム RT-PCR

HL-60 細胞は、1.25% DMSO を添加すると同時に 5 μ M E2 または 1 μ M G-1 を加えた。Total RNA は ISOGEN II (NIPPON GENE) を使用して抽出し、ReverTraAce[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて cDNA を作製した。リアルタイム RT-PCR は、GeneAce SYBR qPCR Mix α (NIPPON GENE) と Table 2 のプライマーを使用して行った。

Table 2

GPR30	5'-cgtcattccagacagcaccgag-3', 5'-cgaggagccagaagccacatc-3'
-------	---

結果

好中球様 HL-60 細胞における A23187 の NETosis への影響

1.25% DMSO によって分化誘導した好中球様 HL-60 細胞は、A23187 によって NETosis を誘導された (図 8A および B)。このとき、分化によって PAD4 の発現が亢進し、A23187 刺激によってヒストンシトルリンも亢進した (図 8C および D)。これらの結果から、DMSO によって分化された好中球様細胞は A23187 によるヒストンのシトルリン化によって NETosis が誘導されると考えられた。

エストラジオールの GPR30 を介する NOX 非依存性 NETosis への影響

エストロゲンの一種である E2 は核内受容体である ER α/β を介して NETosis を亢進させることが知られている(37)。そこで、DMSO によって分化誘導された好中球様 HL-60 細胞が E2 によって NETosis を誘導するかどうか、エストロゲンの膜受容体である GPR30 に焦点を当て検討した。E2 または GPR30 のアゴニストである G-1 は A23187 誘発 NETosis を亢進させた (図 9A および B)。また、この効果は GPR30 の拮抗薬である G-15 によって抑制されたことから (図 9B)、E2 の効果は GPR30 を介する可能性があると考えられた。次に、E2 や G-1 の効果が ROS 産生を介して誘導されるかどうかを確認するために、E2 や G-1 を添加したときの A23187 誘発 ROS 産生を評価した。その結果、E2 や G-1 は A23187 誘発 ROS を亢進させず、むしろ減少させた (図 9C)。これらの結果から、E2 や G-1 における A23187 誘発 NETosis の亢進は ROS 産生を介さないと考えられた。

好中球様 HL-60 細胞における GPR30 の発現

上記の結果から、E2 が GPR30 を介して NETosis に関与することが示唆されたため、実際に好中球様 HL-60 細胞に GPR30 が発現しているかどうかを明らかにするため、その発現を免疫染色によって解析した。DMSO によって好中球様 HL-60 細胞に分化させたとき、CD11b の発現が亢進したが、GPR30 は分化前の状態から細胞膜周辺に発現していることがわかった (図 10A および B)。また、その発現は分化により減少傾向であり、mRNA レベルにおいても分化誘導によって減少することがわかった (図 10B および C)。本実験における E2 や G-1 添加は DMSO 処理と同時に行っており、これらの作用は未分化状態の HL-60 細胞において作用した可能性が示唆された。

E2 または G-1 誘導性 NETosis 亢進における PAD4 とヒストンシトルリン化の関与

上記の結果から、E2 または G-1 による NETosis 亢進には NETosis の誘導因子の一つである ROS が関与しないことが明らかになったため、もう一つの因子である PAD4 の関与について評価した。E2 または G-1 処理は PAD4 発現を有意に増加させ、G-15 での前処理は G-1 処理による PAD4 発現の増加を抑制し、E2 処理による増加を弱く抑制した (図 11A)。さらに、ヒストンのシトルリン化について検討したところ、細胞内、細胞外ともにシトルリン化ヒストン H3 量が亢進した (図 11B および C)。これらの結果から、E2 は部分的に GPR30 を介して PAD4 発現およびヒストンシトルリン化を増加させ、NETosis を増加させたと考えられる。

考察

ER α と ER β は最もよく知られている E2 受容体であり、タモキシフェンやラロキシフェンなどの選択的拮抗薬は、PMA 誘導 (NOX 依存性) NETosis を促進させることが報告されていた (39)。この研究は、エストロゲンが実際に NETosis に関与していることを示したが、NOX 非依存性 NETosis に対する影響については検討していなかった。さらに、エストロゲン膜受容体 GPR30 についても検討されなかった。ER α および ER β は、ヒト好中球および好中球様 HL-60 細胞で発現するが、GPR30 発現もこれらの細胞で発現している。また、好中球様 HL-60 細胞と比較して、HL-60 細胞では GPR30 発現が高い。したがって、NETosis に対する GPR30 アゴニストの効果は好中球様細胞への分化中に亢進すると考えられたため、HL-60 細胞を E2 で処理し、GPR30 アゴニスト G-1 を 1.25%DMSO と同時に添加した。その結果、E2 でも G-1 でも、PAD4 発現と細胞内および細胞外ヒストン H3 シトルリン化を増加し、NETosis をさらに増加させた。ヒストンシトルリン化の増加は、PAD4 発現だけでなく、E2 と GPR30 の相互作用によって増加することが知られている細胞内カルシウムイオンの増加によっても引き起こされる可能性があるが、分化後の E2 あるいは G-1 の短時間処理では PAD4 の発現もヒストンのシトルリン化も変化しなかった (date not shown)。したがって、好中球様 HL-60 細胞における E2 による NETosis 亢進は、分化前からの GPR30 への E2 の結合が重要であると考えられた。

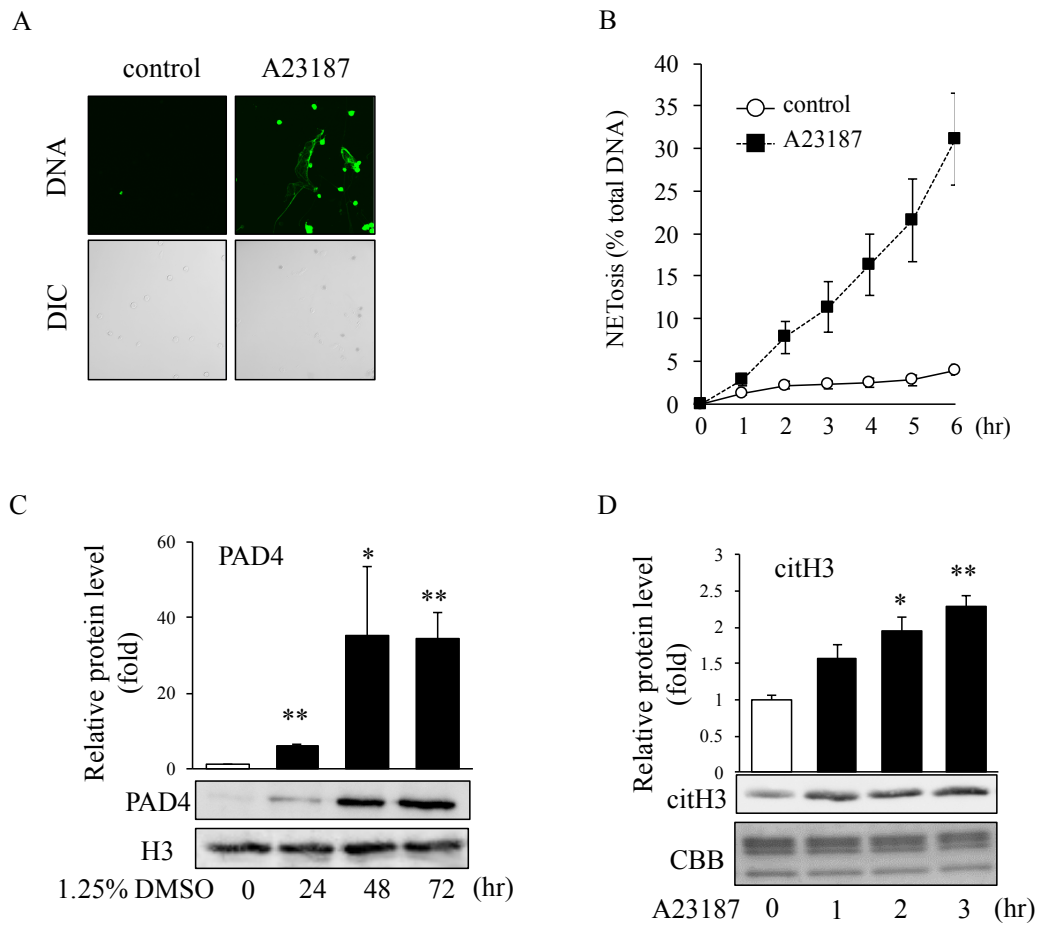
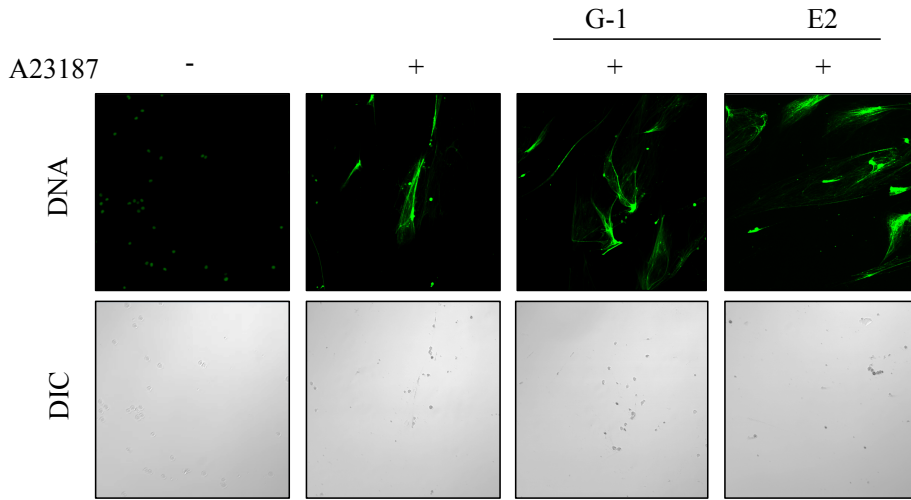
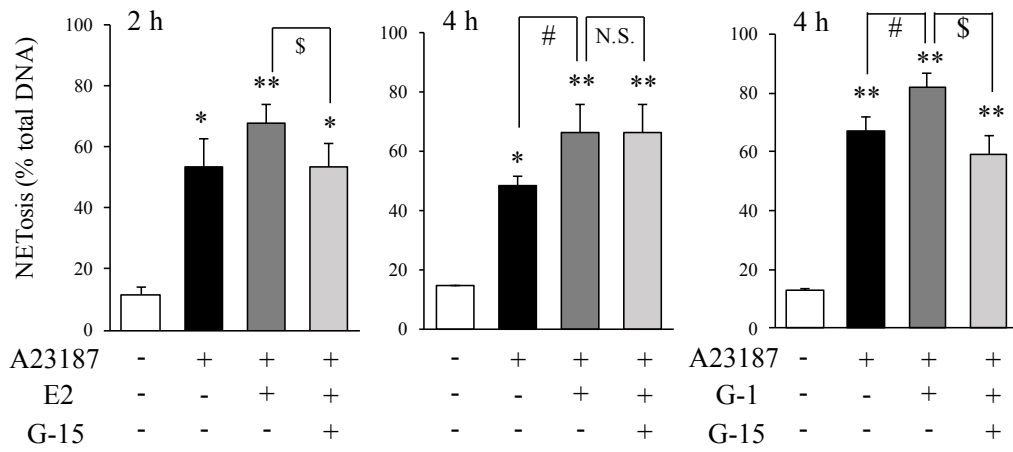


Figure 8. A23187-induced neutrophil extracellular trap formation (NETosis) is increased during neutrophil differentiation stimulated by DMSO. (A) After treating HL-60 cells with 1.25% DMSO for 72 h, 10 μ M A23187 (calcium ionophore) or 25 nM phorbol myristate acetate (PMA) was added for 4 h. Images of NETosis were shown based on confocal microscopy (SYTOX green (DNA)): top panels; differential interference contrast (DIC) images: lower panels). (B) NETosis levels were analyzed by performing a SYTOX green assay for indicated times. (C) After treating HL-60 cells with 1.25% DMSO for indicated times, nuclear protein extraction was carried out. PAD4 expression (normalized to H3 levels) was determined by western blotting. (D) Neutrophil-like HL-60 (nHL-60) cells were treated with 10 μ M A23187 for the indicated times. Following histone extraction, citrullinated histone H3 (citH3) protein levels were analyzed by western blotting. The loading of histones was monitored by Coomassie Brilliant Blue staining (CBB). Student's *t* test analysis was performed. Data represent mean \pm SD ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 0 h.

A



B



C

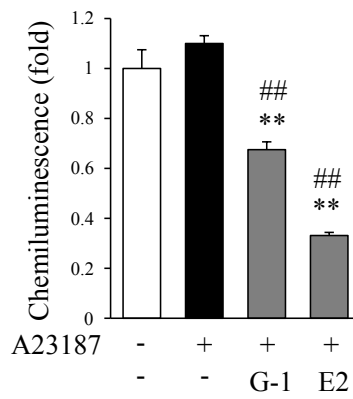


Figure 9. 17 β -estradiol (E2) or a GPR30 agonist (G-1) increases A23187-induced NETosis (NOX-independent NETosis). (A) After treatment with or without 5 μ M E2 or 1 μ M G-1 during differentiation, images of NETosis were obtained by confocal microscopy (SYTOX green (DNA): top panels; and DIC images: lower panels) using nHL-60 cells treated with (+) or without (-) 10 μ M A23187 for 2 h. (B) After treatment with or without 5 μ M E2 or 1 μ M G-1 during differentiation, NETosis levels were analyzed by performing a SYTOX green assay using the nHL-60 cells treated with (+) or without (-) 10 μ M A23187 for 2 or 4 h. Treatment with 1 μ M G-15 was performed for 1 h before treatment with E2 or G-1. (C) Quantitative chemiluminescence analysis of superoxide concentration in the culture media of these nHL-60 cells incubated with or without 10 μ M A23187 for 1 h was performed. Data represent mean \pm SD (n = 3). Student's *t* test analysis was performed. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. control (-), and #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 vs. A23187-treated cells, \$ *p* < 0.05 vs. A23187 plus E2 or G-1-treated cells.

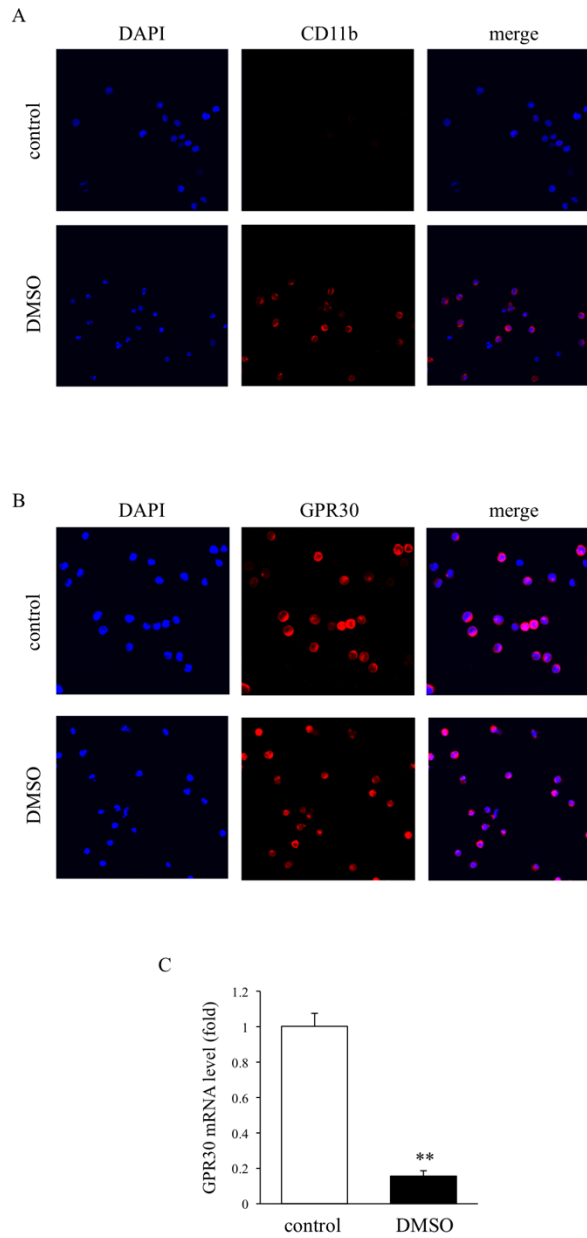


Figure 10. GPR30 is expressed at the HL-60 and nHL-60 cell membrane. (A, B) After treating HL-60 cells with or without (control) 1.25% DMSO for 72h, microscopic analysis was performed to visualize cell nuclei (DAPI), CD11b (A), or GPR30 (B) staining. (C) GPR30 mRNA expression was analyzed by real-time RT-PCR. The data were normalized based on GAPDH levels. Student's *t* test analysis was performed. Data represent mean \pm SD (n = 3). ***p* < 0.01 vs. control (-).

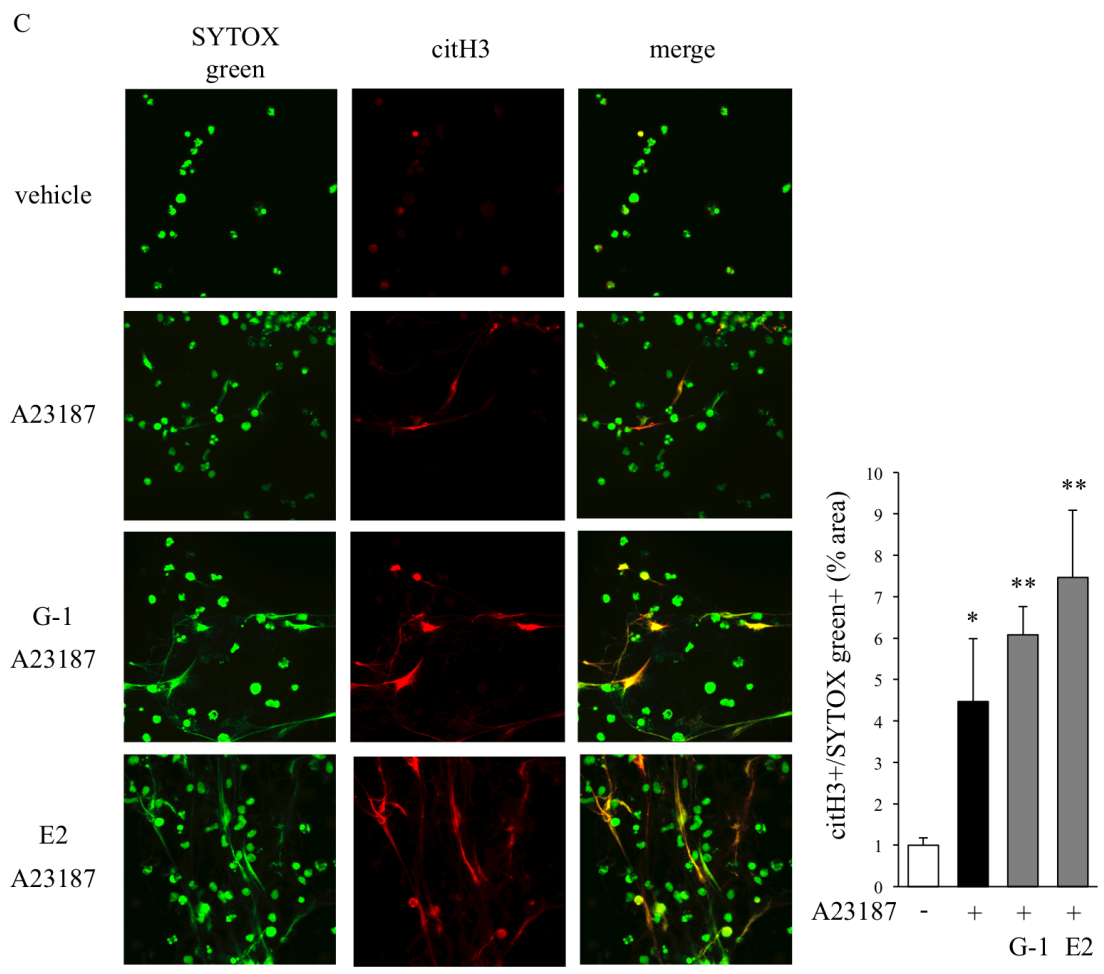
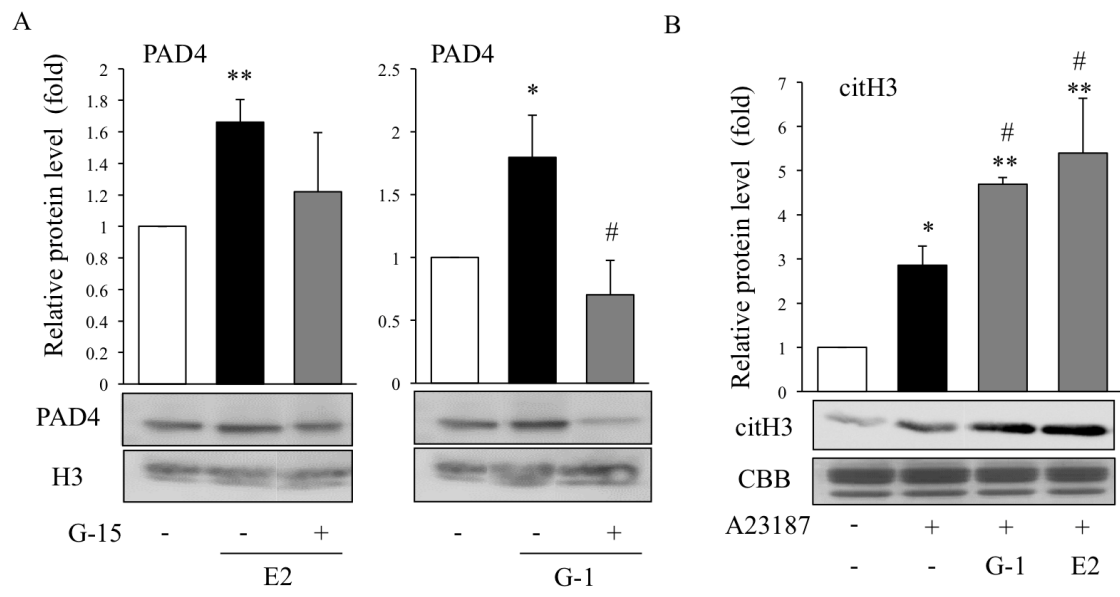


Figure 11. 17 β -estradiol (E2) and G-1 enhance PAD4 expression and histone citrullination. (A) nHL-60 cells were incubated with or without 1 μ M G-1 or 5 μ M E2. Treatment with 1 μ M G-15 was performed for 1 h before treatment with E2 or G-1. After nuclear extraction, PAD4 expression (normalized to H3 protein levels) was determined by western blotting. (B, C) nHL-60 cells (also treated with or without 1 μ M G-1 or 5 μ M E2) were treated with or without 10 μ M A23187 for 1 h (B) or 4 h (C). Following histone extraction, citrullinated histone H3 (citH3) protein levels were analyzed by western blotting. The loading of histones was monitored by Coomassie Brilliant Blue staining (CBB) (B). (C) Microscopic analysis of DNA (SYTOX green) or citH3 staining. Student's *t* test analysis was performed. Data represent mean \pm SD (n = 3). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. vehicle (-), #*p* < 0.05 vs. A23187-treated cells.

結語

1. PMA は NOX 依存性、A23187 は NOX 非依存性 NETosis を誘導する。
2. NOX 依存性 NETosis はミトコンドリアに影響されず、NOX 非依存性 NETosis はミトコンドリア依存的に NETosis を誘導する。
3. NOX 依存性 NETosis の膜崩壊は、主に ClO^- によるものであり、一部 Necroptosis 様の膜崩壊によるものである。
4. NOX 非依存性 NETosis の膜崩壊は、Necroptosis 様の膜崩壊が一部関与しているが、主な崩壊機構については明らかにならなかった。
5. エストラジオール処理された好中球は、PAD4 の発現増加を介して NETosis 誘導を増加させた。

好中球は NETosis を誘導することで細菌を捕獲・殺菌する。また、NETosis によって放出された DNA は炎症反応をさらに増加させ、自然免疫反応を高める。そのため、NETosis は生体防御において重要な役割をもつ。しかしながら、過剰な NETosis 誘導は自己免疫疾患や炎症性疾患を悪化させてしまう。本研究では、NETosis 誘導機構の一端のうち NADPH oxidase 非依存性の NETosis におけるミトコンドリアの重要性を明らかにした。また、女性に好発する SLE や関節リウマチに影響するとされる NETosis における女性ホルモンの影響を明らかにした。本研究では、SLE や関節リウマチの増悪に対する治療において、好中球の膜崩壊やミトコンドリア ROS、PAD4 をターゲットとすることで新たな治療戦略となる可能性があることを証明した。

引用文献

- 1 Kathleen D. Metzler, Tobias A. Fuchs, William M. Nauseef, *et al.* Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 2011; **117**: 953–959.
- 2 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; **303**:1532-1535.
- 3 Anna Lutz, Julia Sanwald, Maria Thomas, *et al.* Interleukin-1 β Enhances FasL-Induced Caspase-3/-7 Activity without Increasing Apoptosis in Primary Mouse Hepatocytes *PLoS One*. 2014; **9**
- 4 Ying Wang, Li Guo, Jueqiong Wang, *et al.* Necrostatin-1 ameliorates the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing apoptosis and necroptosis of oligodendrocyte precursor cells. *Exp Ther Med*. 2019; **18**: 4113–4119.
- 5 Ine Jorgensen Yue Zhang, Bryan A. Krantz, Edward A. Miao Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. *J Exp Med*. 2016; **213**: 2113–2128.
- 6 Yiqun Jiang, Yuchen He, Shuang Liu, Yongguang Tao. Chromatin remodeling factor lymphoid-specific helicase inhibits ferroptosis through lipid metabolic genes in lung cancer progression. *Chin J Cancer*. 2017; **36**: 82.
- 7 Yan Cheng, Xingcong Ren, William N. Hait, Jin-Ming Yang Therapeutic Targeting of Autophagy in Disease: Biology and Pharmacology. *Pharmacol Rev*. 2013; **65**: 1162–1197.
- 8 Porto BN, Stein RT. Neutrophil extracellular traps in pulmonary diseases: too much of a good thing? *Front Immunol* 2016; **7**: 311.
- 9 Craig N. Jenne, Paul Kubes. Virus-Induced NETs – Critical Component of Host Defense or Pathogenic Mediator? *PLoS Pathog*. 2015; **11**
- 10 Parker H, Albrett AM, Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J Leukoc Biol*. 2012; **3**: 369-376.
- 11 Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; **176**: 231–241.
- 12 Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2010; **191**: 677-791.

- 13 Papayannopoulos V, Staab D, Zychlinsky A. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PLoS One*. 2011;**6**
- 14 Piu Saha, Beng San Yeoh, Xia Xiao, *et al.* PAD4-dependent NETs generation are indispensable for intestinal clearance of *Citrobacter rodentium*. *Mucosal Immunol*. 2019; **12**: 761–771.
- 15 Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2012; **32**: 1777–1783.
- 16 Jonathan Cools-Lartigue, Jonathan Spicer, *et al.* Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*. 2013; **8**: 3446–3458.
- 17 Bicker KL, Thompson PR. The protein arginine deiminases: structure, function, inhibition, and disease. *Biopolymers*, 2013; **99**: 155–163.
- 18 Hakkim A, Fümrohr BG, Amann K, *et al.* Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 9813–9818.
- 19 Shuai Liu, Xiaoli Su, Pinhua Pan, *et al.* Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury. *Sci Rep*. 2016; **6**
- 20 Behnen M, Leschczyk C, Möller S, *et al.* Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *J Immunol*. 2014;**193**:1954-1965.
- 21 Ahmed B Al-Khafaji, Samer Tohme, Hamza Obaid Yazdani, *et al.* Superoxide Induces Neutrophil Extracellular Trap Formation in a TLR-4 and NOX-Dependent Mechanism. *Mol Med*. 2016; **22**: 621–631.
- 22 Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, *et al.* Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 2009; **114**: 2619–2622.
- 23 Parker H, Dragunow M, Hampton MB, *et al.* Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol*. 2012; **92**: 841-849.
- 24 Gouri P. Hule, Umair Ahmed Bargir, Manasi Kulkarni, *et al.* Does Pioglitazone Lead to Neutrophil Extracellular Traps Formation in Chronic Granulomatous Disease Patients? *Front Immunol*. 2019; **10**: 1739.
- 25 Amini P, Stojkov D, Felser A, *et al.* Neutrophil extracellular trap formation requires OPA1-dependent glycolytic ATP production. *Nat Commun*. 2018; **9**: 2958.

- 26 Emma C. Vaux, Eric Metzen, Kay M. Yeates, *et al.* Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. *Blood*. 2001; **2**:296-302.
- 27 King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*. 1989; **246**:500-503.
- 28 Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; **112**: 2817-2822.
- 29 Jiang Y, Kelly R, Peters A, *et al.* Interspecies somatic cell nuclear transfer is dependent on compatible mitochondrial DNA and reprogramming factors. *PLoS One*. 2011; **6**
- 30 Maianski NA, Geissler J, Srinivasula SM, Alnemri ES, Roos D, Kuijpers TW.: Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death Differ*. 2004;11(2):143-153.
- 31 Dara L, Liu ZX, Kaplowitz N. Questions and controversies: the role of necroptosis in liver disease. *Cell Death Discov*. 2016; **2**:16089.
- 32 Panasenkov OM, Chekanov AV, Arnhold J, *et al.* Generation of free radicals during decomposition of hydroperoxide in the presence of myeloperoxidase or activated neutrophils. *Biochemistry (Mosc)*. 2005; **70**:998-1004.
- 33 Sakurai K, Miyashita T, Okazaki M, *et al.* Role for Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Platelet Aggregation in Early Sepsis-induced Hepatic Dysfunction. *In Vivo*. 2017; **31**: 1051-1058.
- 34 Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2012; **32**: 1777–1783.
- 35 Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, *et al.* Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 9813–9818.
- 36 Moulton VR. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Front Immunol*. 2018; **9**: 2279.

- 37 S. Giaglis, M. Stoikou, C. Sur. Chowdhury, *et al.* Multimodal regulation of NET formation in pregnancy: progesterone antagonizes the pro-NETotic effect of estrogen and G-CSF, *Front Immunol.* 2016; **7**; 565.
- 38 Szwejszer E, Maciuszek M, Casanova-Nakayama A, *et al.* A role for multiple estrogen receptors in immune regulation of common carp. *Dev Comp Immunol.* 2017; **66**: 61-72.
- 39 Ross Corriden, Andrew Hollands, Joshua Olson, *et al.* Tamoxifen Augments the Innate Immune Function of Neutrophils Through Modulation of Intracellular Ceramide. *Nat Commun.* 2016; **6**: 8369.

謝辞

本研究を進めるに当たり、指導教官の佐藤英介教授からは多大な助言を賜りました。厚く感謝を申し上げます。また研究の遂行に協力して頂いた鈴鹿医療科学大学薬学部の安田浩之助手ならびに医化学研究室の皆さまにも感謝の意を表します。

英文要旨

Neutrophil extracellular trap (NET) formation plays an important role in inflammatory diseases. Although it is known that NET formation occurs via NADPH oxidase (NOX)-dependent and NOX-independent pathways, the detailed mechanism remains unknown. Therefore, in this study, we aimed to elucidate the role of mitochondria in NOX-dependent and NOX-independent NET formation. We generated mitochondrial DNA-deficient cells (ρ^0 cells) by treating HL-60 cells with dideoxycytidine and differentiated them to neutrophil-like cells. These neutrophil-like ρ^0 cells showed markedly reduced NOX-independent NET formation but not NOX-dependent NET formation. However, NET-associated intracellular histone citrullination was not decreased in ρ^0 cells. These results highlight the importance of mitochondria in NOX-independent NET formation. Furthermore, cell membrane disruption in NOX-dependent NET formation occurred in a Myeloperoxidase (MPO) and mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL)-dependent manner; however, cell membrane disruption in NOX-independent NET formation partially occurred in an MLKL-dependent manner.

Cell death-associated neutrophil extracellular trap formation (NETosis) occurs during various autoimmune diseases including systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, as well as during gestation. Although increasing estrogen concentrations associated with pregnancy might induce NETosis via nuclear estrogen receptor ($ER\alpha/ER\beta$), little is known about the mechanisms associated with estrogen-induced NETosis. Here, we investigated the effects of estrogen (17- β -estradiol; E2) on NETosis, focusing on mechanisms associated with estrogen membrane receptor (GPR30) in neutrophil-like HL-60 cells. Our results show that E2 and the GPR30 agonist G-1 increases level of NETosis and NET formation. Moreover, NETosis-associated intracellular and extracellular histone citrullination and peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4) expression were also increased by E2 or G-1 treatment. Furthermore, GPR30 antagonist pre-treatment inhibited increases in NETosis and PAD4 expression mediated by G-1 and partially inhibited these effects mediated by E2. These results demonstrate that E2 treatment enhanced NETosis via not only $ER\alpha/ER\beta$ but also GPR30 in neutrophil-like HL-60 cells.