

NET 形成における
酸化脂質と好中球エラスターゼの協調効果の解明

研究室 免疫制御学研究室

学位申請者 徳弘 拓斗

目次

	項
第 1 章 背景	2
第 2 章 実験方法および実験試薬	4
第 3 章 結果	
1. NET 形成における脂質過酸化の関与	13
2. MPO と NE の NET 形成における役割の違い	14
3. MPO は脂質過酸化依存的 NET 形成に関与する	14
4. MPO の酵素活性は脂質酸化依存的 NET に重要な役割を果たす	15
5. NE はネトーススにではなく NET 形成に重要である	17
6. 酸化リン脂質と NE は協調してクロマチン脱凝縮を引き起こす	17
7. 図表	19
第 4 章 考察	33
参考文献	34
謝辞	36

第1章 背景

好中球は免疫細胞の1種であり、分葉核やアズール顆粒などの形態学的特徴を有する細胞である。好中球の機能としては、細菌およびウイルス感染時に貪食・除去することにより生体防御に貢献することがよく知られている。一方で、腫瘍形成や自己免疫疾患などの病態悪化に関与することも報告されており¹、好中球特性の深い理解および好中球の機能制御は医学的に重要な課題となる。

近年、好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular trap: NET) と呼ばれる、好中球が独自に放出する細胞死構造物が注目を集め、盛んに研究がなされている。NETとは、脱凝縮されたクロマチンおよび、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)や好中球エラスターゼ(NE)などの顆粒成分から構成される網状の構造物であり^{2,3}、好中球をホルボール12-ミリスタート13-アセタート(PMA)やイオノマイシン、細菌、ウイルス、および免疫複合体(ICs)などにより刺激することにより細胞外に放出される⁴。このNETは、通常ネトーシスと呼ばれる核エンベロップの崩壊と消失を特徴とした細胞死を伴い発生することを特徴としており⁵、放出されたNET構造物は病原体を物理的に隔離し、殺菌効果を有していることが知られている⁴。一方で、感染症に対する病態緩和効果とは対照的に、自己免疫疾患、血栓症、癌転移など、様々な疾患の病態増悪に関与することも知られている¹。そのためNET形成はこれら疾患の治療戦略確立において重要な治療標的となり、その発生機序の理解は重要な課題となる。

NET形成機構には様々な関与因子が報告されている。NETに特徴的なクロマチン脱凝縮にはペプチジルアルギニンデアミナーゼ4(PAD4)およびNEの2種のタンパク質の関与が報告されている。PAD4はカルシウムシグナル伝達により活性化され、ヒストンH3のシトルリン化によりクロマチンDNAの脱凝縮に関与する⁶。実際にPAD4を欠損したマウスでは細菌感染の影響を受けやすいことが報告されている⁷。その後PAD4と同じく好中球エラスターゼ(NE)がクロマチン脱凝縮を引き起こすことが報告され、このNEはヒストンの分解を行うことによりクロマチンの脱凝縮を引き起こす。このNEは、同じ顆粒タンパク質であるMPO依存的な放出制御を受け、活性化される⁸。

また、クロマチン脱凝縮に関与する責任因子以外にも、ネトーシスとNET形成を引き起こすシグナル伝達経路の研究が進められている。NET誘導剤として知られるPMAなどいくつかの誘導剤は、NADPHオキシダーゼの活性化を通してROS産生を引き起こし、このROSがNET発生に関与する因子として有力視されている。実際にマウスやヒトにおけるNADPHオキシダーゼの遺伝的欠損はNET形成を抑制し^{5,9}、さらにROS産生がPAD4活性化に重要であることが示されている¹⁰。しかしながらネトーシスおよびNET

形成における ROS 産生下流の詳細なメカニズムは不明な状態にある。

我々は以前、スルファサラジン (SSZ) をはじめとするいくつかの化合物が、リン脂質過酸化の発生を強化することによりネトーシスおよび NET 形成を促進することを報告した¹¹。これはネトーシスおよび NET 形成におけるリン脂質過酸化の重要性を示唆する結果である。

本研究では、様々な NET 誘導刺激においてリン脂質過酸化がネトーシスおよび NET 形成に重要な役割を果たすこと、加えて MPO の酵素活性がその脂質過酸化を引き起こすことを示した。さらに NET 形成のクロマチン脱凝縮には酸化リン脂質と NE が協調的な役割を行う可能性についても言及した。今回報告する内容は、これまで不明瞭であった NET 形成メカニズムの一端を明らかにし、新たな視点を示すものである。

第2章 実験方法および実験試薬

動物およびヒトドナー由来末梢血

C57BL/6JマウスはCLEA Japanから購入した。MPO KOマウス (C57BL/6バックグラウンド) は、荒谷教授¹²により提供された。マウスを用いたすべての実験は、東京薬科大学動物愛護委員会の承認を得て、適用されるガイドラインおよび規則に従って実施された。健康なヒトのドナー由来の末梢血の使用は、東京薬科大学の倫理委員会の承認を得て行われ、日本における人を対象とする医学・保健学研究のための倫理指針に準拠して実施された。また献血者全員からインフォームドコンセントを得た。

試薬

ホルボール12-ミリスタート13-アセタート (PMA), anti-human albumin antibody, human serum albumin, ジメチルスルホキシド (DMSO), LPS (O111:B4), 4,4'-ジアミノジフェニルスルホン (DDS), (±)-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (trolox), 2-hydrazinobenzothiazole (SC002), 1-(6-methoxy-benzo[d]thiazol-2-yl)hydrazine (SC007), (5-chloro-2-methoxy-phenyl)hydrazine hydrochloride (SC008) and 1-[5-chloro-3-(trifluoromethyl)-2-pyridyl]hydrazine (SC009) はSigmaで購入した。イオノマイシン と TBARS Assay Kit はCaymanで購入した。Anti-NE antibody and anti-histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17) antibody はabcamで購入した。Polyclonal rabbit anti-human MPOはDAKOで購入した。Anti-human/mouse MPO antibody はR&D Systemsで購入した。Anti-GAPDH mAb HRP-Direct はMBLで購入した。ヒト好中球エラストラーゼとヒト多形核白血球由来MPO はMerckで購入した。1-Palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAPC) はAvanti Polar Lipidsで購入した。Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit, SYTO™ Green Nucleic Acid Stain, SYTO™ Orange Nucleic Acid Stain, and BODIPY 581/591 C11 は Thermo Fisher Scientificで購入した。4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) はDOJINDOで購入した。TMBペルオキシダーゼ基質はSeraCare Life Sciencesで購入した。2-Hydrazino-4-(trifluoromethyl)pyrimidine (SC001), 1-naphthalenyl hydrazine hydrochloride (SC004), 2-hydrazinoquinoline (SC005), phthalic hydrazide (SC014) and 4-phenylurazole (SC017) は東京化成工業で購入した。2-Hydrazinobenzothiazole (SC002), 1-(6-methoxybenzo[d]thiazol-2-yl)hydrazine (SC007), (5-chloro-2-methoxyphenyl)hydrazine hydrochloride (SC008) と 1-[5-chloro-3-(trifluoromethyl)-2-pyridyl]hydrazine (SC009) はMerckで購入した。Fluoren-9-ylidene-hydrazine (SC003) と 2-hydrazinopyridine (SC006) はWakoで購入した。Ethyl 2-(phenylcarbonyl)hydrazine-1-carboxylate

(SC015), 1-methyl-4-phenyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione (SC 016) と 2-methyl-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione (SC018)は佐藤助教(東北大学)により提供された。

マウス好中球の調製

マウス好中球を調製するために、WTマウスの大腿骨と脛骨からマウス骨髄 (BM) 細胞を採取し、Fcブロッカー (2.4G2 ; Biolegend) とインキュベートし、ビオチン化抗Ly-6G (RB6-8C5 ; Biolegend) 抗体で標識した。次に、細胞を抗ビオチン-マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) とインキュベートした。Ly-6G high細胞は、磁気ソーティングによって精製された。単離したマウス好中球の純度は、フローサイトメトリー (FACSVerse ; BD Bioscience) により95%以上であることを確認した。

ヒト末梢血好中球の調製

ヒト末梢血好中球を調製するために、健康な成人ボランティアからヘパリンを用いて末梢血を採取した。赤血球は、HetaSep™ (STEMCELL Technologies) 沈降を用いて除去した。その後、RPMI1640培地で2回洗浄し、密度75%、65%、55%の層からなる不連続Percoll PLUS (GE-Healthcare) 勾配でさらに分画した。混合物を500×gで30分間遠心分離した後、65%層と75%層の間の界面を回収し、RPMI1640培地で2回洗浄した。すべての手順は室温で行われた。ヒト好中球の純度はフローサイトメトリー分析により、95%以上がCD15+CD16+好中球であることを確認した。細胞生存率はトリパンブルーアッセイにより、98%以上であることを確認した。

HL-60の細胞培養と分化

HL-60は理研バイオリソースセンターから購入し、10% FBSと1% penicillin-streptomycinを添加したRPMI-1640培地で、37°C・5%・CO₂の条件下で継代した。好中球様細胞への分化は、HL-60を1.25% DMSO・10% FBS・1% penicillin-streptomycinを添加したRPMI-1640培地で、37°C・5%・CO₂条件下で6-8日間培養することにより行った。

CRISPR/Cas9システムを用いたMPOおよびNE欠損HL60細胞株の作製

CRISPR direct によって、ヒトMPO遺伝子およびELANE遺伝子(NEをコードする遺伝子)を標的としたsgRNA配列を設計し、pLentiCRISPRv2GFPプラスミド (Addgene #82416) で使用できるように配列を調整したオリゴDNAを、Thermo Fisher Scientificから購入した。

以下に配列を示す：

ヒトMPO（フォワード：5'-CACCGTTGTTGCACATCCCGGTGA-3'；リバーズ：5'-AAACTC ACCGGGATGTGCAACAAC-3'）

ヒトELANE（フォワード：5'-CACCGGAAAAGACGCGAGTCGG-3'；リバーズ：5'-AA ACCGACTCGCGTCTTCC-3'）

これらの配列をそれぞれpLentiCRISPRv2GFPにクローニングした。レンチウイルス粒子の作製のため、まずHEK293T細胞（ 2.2×10^6 個）を60 mmディッシュに播種し、10%FBSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン入りのD-MEM培地で、37°C、5%CO₂の条件下で培養した。この細胞に対して、Lipofectamine 3000（Thermo Fisher Scientific）により、ヒトMPOまたはELANE gRNAを挿入したpLentiCRISPRv2GFP、psPAX2、およびpMD2.G (Addgene)をトランスフェクションした。細胞をオーバーナイトで培養した後、10% FBS および 1% BSA を添加した D-MEM 培地に交換した後、細胞を60時間培養した。培養上清を $3,000 \times g$ 、10分間、4°Cで遠心分離し、Millex-HVフィルター0.45 μ m（Merck）でろ過し、形質導入に使用した。レンチウイルス粒子は、使用するまで-80°Cで保存した。レンチウイルス粒子によるHL-60への形質導入は、6ウェルプレートで行われた。レンチウイルス粒子（2 mL）を、 1×10^6 細胞存在する10% FBSおよび1% penicillin-streptomycinを添加したRPMI1640培地2 mLに加え、室温、 $1,200 \times g$ で2時間遠心分離を行った。オーバーナイトで培養し、SH-800 cell sorter (SONY)によりGFP⁺細胞を分取した。分取したGFP⁺ HL-60細胞は、限界希釈によりクローニングした。それぞれのクローンについて、ウェスタンブロットにより、MPOもしくはNEの欠損を確認した。

ウェスタンブロット法

MPOとNEの検出のために、クローンHL-60（ 1×10^6 個）をPBSで洗浄し、RIPAバッファー（1 mM PMSF/1 μ M pepstatin/1 μ M leupeptin/50 mM Tris-HCl pH 8.0/150 mM NaCl/0.5% sodium deoxycholate/1% NP-40）で溶解した。SDSサンプルバッファー中のタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にロードして分離し、PVDFメンブレンに転写した。一次抗体としてウサギポリクローナル抗MPO抗体（Dako）またはウサギモノクローナル抗NE抗体（Abcam）を反応させ、5%スキムミルク/PBST（PBS/0.2% Tween 20）で1時間膜をブロッキングした。PBSTで洗浄後、二次抗体としてヤギHRP-抗ウサギIgG抗体（Dako）を反応させた。PBSTで洗浄後、SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)を反応させ、LAS4000mini (GE Healthcare) でシグナルを検出した。

肺のcitH3のタンパク質量を評価するために、肺（100mg）をプロテアーゼ阻害剤を含む1mLのRIPAバッファー中で、ホモジナイザー（Bioprep-6、Allsheng、杭州、中国）により3800rpm、2サイクル、30秒間の条件下でホモジナイズした。

20,000×g、4°Cで10分間遠心分離し、上清のタンパク質濃度をBicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (#23225, Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。SDSサンプルバッファー中のタンパク質 (30μg) をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にロードし、分離し、PVDF膜に転写した。ブロッキングバッファー [0.1% Tween 20 (PBST) 入りリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の5%スキムミルク] 中で室温で60分間インキュベートし、抗citH3抗体 (#ab5103、アブカム) または抗GAPDH mAb-HRP-DirecT (#M171-7, メディカル&バイオロジーラボラトリーズ) で4°Cで一晩プロービングした。次に、citH3の検出のために、メンブレンをPBSTで5分間3回洗浄し、ポリクローナルヤギ抗ウサギIgG-HRP (#P0448, Dako) とともにブロッキング緩衝液中で室温で30分間インキュベートし、再びPBSTで3回洗浄した。SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (#34580, Thermo Fisher Scientific)を用いて検出した。

MPOおよびNE酵素活性の評価

HL-60 (0.4または 1×10^6 個) をPBSで洗浄し、100μLの溶解バッファー (MPO酵素活性測定用: PBS/0.2% Triron X-100、NE酵素活性測定用: PBS/1% Triron X-100) で溶解した。作成したセルライセートを4°C、20,000×gで20分間遠心分離し、上清を回収後にタンパク質濃度をPierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)により測定した。

MPO酵素活性を評価するために、TMB Microwell Peroxidase Substrate Systemの調整液をセルライセート (25μg/mLまたは125μg/mL) に添加し、室温、暗所で10分間反応させた。650nmの吸光度をSH-9000 Lab (CORONA) で測定した。

NE酵素活性の評価は、1 mg/mLのセルライセートにElastase Substrate, Fluorogenic (MeOSuc-AAPV-AFC) (ab142178) (Abcam)を反応させ、380/500nmの蛍光強度を2分毎に37°Cで20分間、SH-9000Labで測定した。 Δ RFU (相対蛍光強度) は $[\Delta$ RFU 380/500 nm = (RFU2-RFU2BG) - (RFU1-RFU1BG)]の式により算出した。0分後の蛍光強度をRFU1、20分後の蛍光強度をRFU2とし、RFUBGはバックグラウンド値を用いた。IC₅₀はGraphPad Prismソフトウェアで算出した。

MPO過剰発現HL-60の構築

ヒトMPO cDNAを得るために、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いてHL-60からRNAを抽出した。ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO)を用いて逆転写を行った。逆転写産物を鋳型としてPCRを行い、MPO cDNAを増幅させた。プライマー配列は (forward, 5' -CGGGATCCGATTGAGCAGCCCAGGAGAA-3', reverse, 5' -CCGCTCGA GCTAGGAGGCTTCCTCCAGGAAGCCAGGTTCAA-3') である。

今回作成したMPO cDNA に対して、CRISPR用のgRNA によるゲノム編集を避けるため、PCR による部位特異的変異導入¹³を用い、gRNA に対応する配列にアミノ酸配列は変化しない変異を導入し、変異型 MPO cDNAを作成した。プライマー配列を次に示す (forward, 5'-CGGGATCC GATTGAGCAGCCCAGGAGAA-3', reverse, 5'-CCGCTCGAGCTAGGAGGCTTCCCTCCAGGAAGCCAGGTTCAA-3', forward, 5'-TTACTGGAATGTGTAATAATAGACGCAGCCCCACGCTGGG-3', reverse, 5'-ATTATTACACATTCCAGTAATGGTGCGGTATTTGTCCTGC-3'). cDNAをpMXs-puro (pMXs-puro-hMPO1)のBamHIとXhoI部位にクローニングした。pMXs-puro-hMPO1はWT(酵素活性あり) MPO の発現プラスミドとして使用された。

酵素不活性型の変異MPOを発現させるため、pMXs-puro-hMPO1を鋳型としてPCRによる部位特異的変異導入により、軽鎖アミノ酸の96にアスパラギン酸からアラニンへの変異が生じる点変異 (D96A)¹⁴を導入した。プライマー配列を次に示す (forward, 5'-CGGGATCCGATTGAGCAGCCCAGGAGAA-3', reverse, 5'-CCGCTCGAGCTAGGA GGCTTCCCTCCAGGAAGCCAGGTTCAA-3' forward, 5'-AATGGGGCCAGCTGTTGGACCACGCCCTCGACTTCACCCCTGAG-3', reverse, 5'-CTCAGGGGTGAAGTCGAGGGCGTGGTCCAACAGCTGGCCCCATT-3').

このcDNAをpMXs-puroのBamHIおよびXhoI部位にクローニングした (pMXs-puro変異体hMPO2)。

レトロウイルス粒子を生成するために、D-MEM培地 (10%FBS/1%ペニシリン-ストレプトマイシン) に懸濁したPLAT-GP細胞 (2.2×10^6 、セルバイオラボ) を60mmディッシュに播種し、一晩インキュベートした。この細胞に、FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega) を用いてエンベロープベクター pVSV-G, pMXs-puro-hMPO1 または pMXs-puro mutant hMPO2 expression vector をトランスフェクションし、48時間培養を行った。このcDNAをpMXs-puroのBamHIおよびXhoI部位にクローニングした (pMXs-puro変異体hMPO2)。レトロウイルス粒子を生成するために、D-MEM培地 (10%FBS/1%ペニシリン-ストレプトマイシン) に懸濁したPLAT-GP細胞 (2.2×10^6 、Cell Biolabs) を60 mmディッシュに播種し、そして一晩インキュベートした。この細胞に、FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega) を用いてエンベロープベクター pVSV-G, pMXs-puro-hMPO1 または pMXs-puro mutant hMPO2 expression vector をトランスフェクションし、48時間培養を行った。上清を回収し、3,000rpm、4°Cで10分間遠心分離した後、Millex-HV filter 0.45 μ m (Merck) でろ過し、レトロウイルス溶液を得た。レトロウイルスベクターを濃縮するため、32% PEG buffer [32% polyethylene glycol (Wako)/400 mM NaCl/40 mM HEPES (DOJINDO)] とレトロウイルス溶液を 1:3 の割合で混合し、レトロウイルス溶液を調製した。この混合物を1,500 \times g、4°Cで45分間遠心分離し、上清を除去した。ペレ

ットをPBSで希釈し、レトロウイルス溶液とした。RPMI-1640培地（10%FBS/1% penicillin-streptomycin）に懸濁したMPO欠損HL-60（ 5×10^4 細胞）を24ウェルプレートに播種した。レトロウイルス溶液を1:1の量で加え、室温、 $2,000 \times g$ で2時間遠心分離し、限界希釈によりクローニングした。ウェスタンブロット解析により、全てのクローンにおいてMPOタンパク質の発現を確認した。

試薬調製

OxPAPCは、クロロホルム中のPAPCをガラス管内で蒸発乾固し、陰圧下で少なくとも1時間乾燥させた後、 37°C のインキュベーターで48時間、空気酸化した。無血清培地（Advanced RPMI-1640; Thermo Fisher Scientific）を加え、室温で5分間ボルテックスした後、2分間超音波処理を行い、OxPAPCを水和させた。

ICsの調製には、抗ヒトアルブミン抗体（Sigma）をPBSで1 mg/mLに希釈し、等モルのヒト血清アルブミン（Sigma）を添加した。この混合物を 37°C で30分間インキュベートした。ICsを実験に必要な濃度に希釈し、実験を行った。

ネトーシス評価

ネトーシスを評価するために、ヒト好中球、マウス好中球、またはdHL60細胞（ 1.4×10^4 個）を96ウェルプレートに播種し、PMA、ionomycin、またはICsで刺激した。その後、SYTOX Green ($0.5 \mu\text{M}$, Thermo Fisher Scientific) とHoechst 33342 ($1 \mu\text{g/ml}$, Thermo Fisher Scientific)を添加した。30分後、Operetta CLS（PerkinElmer）を用いてSYTOX Green⁺細胞数をカウントすることにより、ネトーシスの定量を行なった。

NET評価

単離したヒト好中球（ 1.4×10^4 個）を96ウェルプレートに播種し、PMAまたはICsで3.5時間刺激後、DAPIを添加した。5分後、蛍光顕微鏡（BZ-X710、キーエンス）で撮影し、形態解析を行った。

形態解析

HL-60またはdHL-60の形態解析は、Cytospin 4 (Thermo Fischer Scientific) を用いて、細胞（ 4×10^4 個）を $1,000 \text{ rpm}$ で2分間遠心し、サイトスピンスライドを作製した。この細胞を Diff-Quick Stain (Sysmex) で染色し観察した。

BODIPY 581/591 C11による脂質過酸化の評価

脂質過酸化を評価するために、 1.4×10^4 個の好中球を丸底96ウェルプレートに播種

し、PMA、ionomycin、またはICsで刺激した。2もしくは20 μM のBODIPY 581/591 C11 (Thermo Fisher Scientific) を添加し、30分間インキュベートした。BD FACSVerserを使用しフローサイトメトリーにより評価を行なった。

TBARSアッセイ

PBSで調整した30 μg のEgg PC (Avanti Polar Lipids) を、5 mMの過酸化水素存在下で、リコンビナントMPO (R&D System) と37°Cで60分間インキュベートした。その後、TBARS Assay Kit (Cayman社製) を用いて、過酸化脂質を定量した。

好中球からの脂質抽出

マウス好中球 (5×10^6 個) に氷冷メタノールを加えて、monospin C18カラム (GL Sciences) を用いて脂質を抽出した。PC (17:0/14:1), PE (17:0/14:1), PI (17:0/14:1), PS (17:0/14:1), PG (17:0/14:1) をそれぞれ最終濃度100 nMで加え、内部標準として使用した。抽出した脂質は、クロロホルム：メタノール=1：2の40 μL に溶解し、使用するまで-80°Cで保存した。

ワイドターゲット分析

ACQUITY UPLC system (Waters)とtriple quadrupole MS (QTRAP 6500, Sciex) を組み合わせ、ワイドターゲット分析を実施した。LC分離には逆相カラム[ACQUITY UPLC HSS T3 (50 mm \times 2.1 mm inner diameter, 1.8 μm particle size; Waters)] を用い、mobile phase A (50 mM 酢酸アンモニウムと10 nM EDTAを含むメタノール/アセトニトリル /水 = 1:1:3 v/v/v) と mobile phase B (50 mM 酢酸アンモニウムと10 nM EDTA を含む100%イソプロパノール)からなるグラジエント溶出を採用した。LCグラジエントは、溶媒 (A/B : 100/0) を1分間保持した後、溶媒A/B : 50/50に4分間線形変換、溶媒A/B : 36/64に7分間線形変換、溶媒A/B : 5/95に1分間線形変換し、さらに1分間保持した。その後、溶媒 A/B:100/0に戻し、5分間保持して再平衡化した。注入量は3.5 μl 、流速は0.350 mL/min、カラム温度は50°Cとした。MRM (Multiple Reaction Monitoring) モードにより、生体試料中の酸化リン脂質の定量を行った。

免疫蛍光分析

マウス好中球またはdHL60におけるヒストンH3のシトルリン化を検出するために、 2.5×10^5 個の細胞を35mmポリ-L-リジンコートガラスボトムディッシュ

(MATSUMAMI) に播き、PMA、PMA+DDS、またはICsで刺激した。次に、細胞を4%パラホルムアルデヒドで室温10分間固定し、10% 正常ヤギ血清 (Sigma) , ウ

シ血清アルブミン (Sigma) および0.01%Tween 20を添加したHBSSで1時間インキュベートし、ブロッキングを行った。細胞を、まずハムスター抗ヒストンH3 (シトルリンR2+R8+R17) (citH3) 抗体 (11-11B-4F) (14) でインキュベートし、次に Alexa Fluor 488または647 (Thermo Fisher Scientific) と結合した抗ハムシIgG抗体でインキュベートした。DNAはDAPI (DOJINDO) を用いて標識した。

肺におけるヒストンH3のシトルリン化を検出するために、C57BL/6JマウスにPBSまたはLPS (0.25mg/mlの濃度で50 μ L) を経鼻投与した。24時間後、肺を採取し、SCEMコンパウンド (SECTION-LAB) に包埋した。切断面を粘着フィルム

(Cryofilm type IIC9、SECTION-LAB、日本) で覆い、ミクロトーム (CM3050S、Leica Microsystems) を用いて凍結切片 (5 μ m) を作製した。得られた切片を100% EtOHで10秒、4% PFA/PBS(-)で10秒後固定し、PBS(-)で20秒洗浄後、TN Blocking Buffer [0.1 M Trizma Base, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% (w/v) blocking reagent (PerkinElmer, FP1020)] とともに室温で1時間インキュベーションを行った。次に、切片をTNブロッキングバッファー中で抗citH3抗体 (Abcam, #ab5103, 1:250) または抗MPO抗体 (R&D Systems, AF3667, 1:100) と室温で1時間インキュベートした。PBS(-)で3回洗浄後、切片をCy3 donkey anti-rabbit IgG (1:1000, Biolegend) または AlexaFluor488 donkey anti-goat IgG (1:1000, Jackson ImmunoReserch) と1時間暗所でインキュベートした。PBS(-)で3回洗浄後、切片をDAPIで対比染色し、観察した。

フローサイトメトリー解析

BD FACSVerserを用いてフローサイトメトリーを行い、FlowJo Xを使用してデータ解析を行った。細胞表面マーカー発現に用いた抗体は、抗CD11b-PE (クローン ICRF44) はBioLegendから購入し、抗CD16-APC (クローン3G8) は、BD Biosciences社から購入した。

定量的RT-PCR (qRT-PCR)

HL-60またはdHL-60のmRNAを解析するために、FavorPrep Total RNA Extraction Column (Favorgen社製) を用いて、製造者のプロトコルにしたがってRNAを抽出した。qRT-PCRは、ReverTra Ace (TOYOBO) を用いてcDNAを合成し、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いてcDNAのqRT-PCRを実施した。発現量は18sリボソームRNA(rRNA)で正規化した。各遺伝子について、以下のプライマー配列を用いた。*PAD4* forward 5'-ACCAGAGCTGTGAAAGATCAGA-3', reverse 5'- TCACAGTTCACCAGCAGGAT-3'; *NCF1* forward 5'-GTCGTG GAGAAGAGCGAGAG-3', reverse 5'-TTCCGTCTCGTCAGG ACTGT-3'; *18s rRNA* forward 5'-CGGACAGGATTGACAG ATTG-3', reverse

5'CAAATCGCTCCACCAACTAA-3'.

細胞外ROS産生の解析

HL-60またはdHL-60 (7×10^3 個) を200 μ M ルシゲニン存在下で、100 nM PMAで刺激した。ROSの放出は、Microplate Luminometer (Berthold Technologies, LB96V)を用いて37°Cで60分間モニターした。

単離核を用いたクロマチン脱凝縮の解析

HL-60から核を単離するために、0.05% NP-40/PBSで細胞を溶解後、1,400 rpm、室温で4分間遠心分離を行い、核を含むペレットをPBSに懸濁した。クロマチンの脱凝縮を分析するために、単離した核をNEおよび/またはoxPAPCと37°Cで120分間インキュベートし、SYTOX Greenで染色した。クロマチン面積は、Image-Jソフトウェアを用いて定量した。単離核からのDNA放出を評価するために、単離核を上記のようにインキュベートした後、100 μ U/ml DNase I (Worthington Biochemical) と10分間インキュベートした。その後、Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて上清中のDNA量を定量した。ヒストンH4の分解能を評価するために、単離した核を上記のようにインキュベートした。全サンプルを同量の2x RIPAバッファーで希釈した。SDS-サンプルバッファー中のサンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にロードし、分離し、PVDFメンブレンに移した。膜を5% BSA/PBST (PBS/0.2% Tween 20)で1時間ブロッキングし、一次抗体としてRabbit polyclonal anti-histone H4 (Millipore)を反応させた。PBSTで洗浄後、二次抗体としてgoat HRP-anti-rabbit IgG抗体 (Dako) を反応させた。PBSTで洗浄後、SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) を反応させ、LAS4000mini (GE Healthcare) でシグナルを検出した。

統計解析

2群間の比較には、Unpaired two-tailed Student's *t*-testsを使用した。複数群間の比較には一元配置分散分析 (One-way ANOVA) を用いた。すべての統計解析はGraphPad Prismを用いて行った。

第3章 結果

1.NET形成における脂質過酸化の関与

我々は以前、スルファサラジン (SSZ) や4,4'-ジアミノジフェニルスルホン (DDS) などのスルファピリジン構造を有するサルファ剤が、リン脂質の過酸化を促進することにより、マウスおよびヒト好中球におけるネトーシスおよびその後のNET形成を促進することを報告した¹¹。この知見は、様々な誘導剤によるネトーシスおよび NET形成に、リン脂質の過酸化が関与している可能性があることを示唆している。そこで我々はまず初めに、ネトーシス・NET形成の特徴付けおよび、脂質過酸化との関連付けを行うために、各種細胞死阻害剤・抗酸化剤を使用し、ネトーシスのプロファイリングを行った。ヒト末梢血好中球に対して、各抗酸化剤および細胞死阻害剤を前処理後、ホルボール-12-ミリスタート-13-アセタート (PMA)、イオノマイシン、免疫複合体 (immune complexes: ICs) 刺激によりネトーシスの誘導を行った。ネトーシスの評価には、死細胞染色試薬であるSYTOX greenを用いて行った。図.1aに示すように、PMAまたはICs刺激で誘導されたネトーシスは各抗酸化剤および細胞死阻害剤に対して同様のプロファイルを示した。これら2つの刺激により誘導されたネトーシスは脂溶性の脂質酸化阻害剤であるトロロックスにより効果的に抑制されたが、2-メルカプトエタノール (2-ME) の処理では影響されなかったことから、脂質過酸化がこれらの刺激によるネトーシスに関与している可能性が示された(図.1a-c)。トロロックスは、脂質過酸化を阻害することにより、鉄依存性に起こる細胞死であるフェロトーシスを抑制することが知られている¹⁵。また、フェロトーシスは、フェロスタチン-1 (Fer-1) や鉄のキレート剤であるデフェロキサミン (DFO) によっても抑制される。しかしながらトロロックスがネトーシスを効果的に抑制することとは対照的に、Fer-1やDFOはわずかな抑制効果しか示さなかった。この結果は、ネトーシス誘導時に起こる脂質過酸化が、フェロトーシスとは異なるメカニズムで発生することを示している。また、核酸染色試薬である4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) を用いた検証により、トロロックスはNET形成に対しても、強い阻害活性を示すことが明らかとなった(図.1d)。一方で、イオノマイシン誘導によるネトーシスのプロファイルは、PMAやICsとは全く異なり、トロロックスでは阻害されないことから、脂質過酸化に依存しない機序で発生することを示している。次に、PMAまたはICs刺激が細胞内脂質過酸化を誘導するのか、さらに、トロロックス処理による脂質過酸化への影響についても評価を行った。ヒト末梢血好中球に対してトロロックスを前処理し、PMAもしくはICsで刺激を行った。続いて、好中球にBODIPY 581/591 C11を添加し、細胞内の脂質過酸化をフローサイトメーターにより評価した。PMAまたはICs刺激により好中

球に脂質過酸化が誘導され、この脂質過酸化はトロロックスにより完全に抑制された(図.1e,f)。続いて、脂質過酸化が*in vivo*で形成されるNETにも関与しているのか検証した。この検証のために、C57BL/6Jマウスにリポ多糖 (LPS) を経鼻投与し、肺に浸潤する好中球にNETを誘導した。まず、免疫蛍光染色法を用いて検討したところ、LPS経鼻投与24時間後に、好中球マーカーであるミエロペルオキシダーゼ (MPO) およびNET形成のマーカーであるシトルリン化ヒストンH3 (citH3) の共局在が観察され、肺においてNETの形成を確認することができた(図.1g)。さらに、ウエスタンブロッティング法によっても、LPS経鼻投与24時間後、肺においてcitH3のバンドが認められた (図.1h)。このNET形成指標であるcitH3量の増加は、トロロックスを腹腔内投与することにより、有意に抑制された(図.1 i,j)。この結果より、脂質過酸化が肺におけるNET形成にも関与していることが示唆された。

2. MPOとNEのNET形成における役割の違い

好中球顆粒内に存在するMPOとNEは、ネトーシス誘導およびNET形成に重要な役割を果たすことが報告されている^{2,3,16}。次に、ネトーシス誘導およびNET形成における、これら2つの酵素と脂質過酸化の関係を明らかにすることを目的として検証を行った。はじめにネトーシス誘導およびNET形成に対するMPOまたはNE阻害剤の効果を検討した。MPO阻害剤は、トロロックスと同様に全てのドナー由来のヒト末梢好中球においてPMA誘導性のネトーシス誘導を抑制した。一方で、NE阻害剤の効果はドナー間で異なり、ヒト末梢血好中球におけるネトーシス誘導に必ずしも必要ではないことが示唆された(図.2a)。NETは形成される過程で、好中球核が膨潤することが知られている。そこで、Operetta CLS ハイコンテンツ共焦点イメージングシステムを使用して得られた画像から核の形態分析を行い、ネトーシス誘導時に観察される核の膨潤に対するMPOまたはNE阻害剤の影響を評価した。その結果、トロロックスおよびMPO阻害剤において、核の膨潤が抑制されることが明らかとなった(図.2b-g)。NE阻害剤においても同様に核の膨潤が抑制されたものの、興味深いことに、ネトーシス誘導を抑制できなかったドナー好中球においても、核の膨潤が抑制される結果となった (図2e-g)。以上の結果をまとめると、MPOは脂質酸化依存的ネトーシス誘導およびNET形成に重要であることが示唆された。一方で、NEはネトーシス誘導に必ずしも必要ではなく、NET形成過程で起こる核の膨潤に関与する可能性が示された。

3. MPOは脂質過酸化依存的NET形成に関与する

MPO阻害剤とトロロックスのネトーシス誘導およびNET形成に対する抑制効果が、強い正の相関関係を示すことから、MPOと脂質過酸化の因果関係が考えられ

た。この仮説を検証するために、MPO欠損マウスを用いて、MPOが脂質酸化依存的NET形成に関与しているかどうか調査した。以前に我々は、PMAおよびDDS刺激がマウス好中球に脂質過酸化依存的NET形成を誘導するのに対し、PMA単独ではマウス好中球のネトーシス誘導およびNET形成にほとんど影響を与えないことを報告した¹¹。この実験系を利用し、マウス好中球におけるMPOと脂質過酸化の関係を検討した。PMA+DDS刺激は野生型(WT)マウス好中球に対して、脂質過酸化、ネトーシス、およびNET形成を誘導し、これらの誘導はトロロックスにより完全に抑制された(図.3a-d)。これらの結果は、これらの刺激がマウス好中球に対して脂質過酸化依存的にネトーシスおよびNET形成を誘導することを示している。一方で、PMA+DDS刺激によるネトーシス誘導およびNET形成はMPO欠損マウス好中球では観察されなかった(図.3e,f)。続いて、PMA+DDSにより誘導される脂質過酸化にMPOが関与しているかどうか検証した。WTマウス好中球ではPMA+DDS刺激により、脂質過酸化がPMA単独刺激と比較して有意に増強されたが、MPO欠損マウス好中球ではその傾向は観察されなかった(図.3g,h)。さらに、リポドミクス解析により、WTもしくはMPO欠損マウス好中球の細胞内酸化リン脂質量の変動を調べた。WTもしくはMPO欠損マウス好中球をPMA+DDSで刺激し、細胞から脂質を抽出後、網羅的な酸化リン脂質解析を行った。WTマウス好中球では、9-ヒドロキシオクタデカジエン酸 (9-HODE) および 13-ヒドロキシオクタデカジエン酸 (13-HODE)を含む酸化リン脂質量の増加が確認されたが、MPO欠損好中球ではその傾向は認められなかった(図.3i)。これらの結果は、MPOが脂質過酸化を実行する重要なメディエーターであることを示している。続いて、肺における脂質酸化依存的NET形成におけるMPOの関与を検討した。WTマウスと比較し、MPO欠損マウスでは肺におけるcitH3レベルの有意な減少が確認された(図.3j)。以上の結果により、MPOが脂質酸化依存的NET形成に関与していることが明確に示された。

4. MPOの酵素活性は脂質酸化依存的NETに重要な役割を果たす

活性化したMPOはNEを好中球内顆粒から放出させ、酵素活性非依存的にNET形成を誘導すると報告されている⁸。しかしながら、図.2の検討では酵素活性を抑制するMPO阻害剤がネトーシスおよびNET形成を抑制する結果が得られた。そこで、脂質過酸化依存的ネトーシス誘導にMPO酵素活性が必要であるか検討した。ヒドラジン構造は、いくつかのMPO阻害剤の活性中心であることが明らかにされている¹⁷。ネトーシスに対する抑制活性とMPO酵素活性に対する抑制効果の相関関係を15種類のヒドラジン化合物を用いて検討した。図4aに示すように、ネトーシス誘導を阻害するためのIC₅₀とこれらの化合物におけるMPO酵素活性の阻害のためのIC₅₀の間に有意な正の相関関係があった。さらに、これら2つの阻害効果は、MPO阻害剤による

脂質過酸化抑制効果とも強い相関を示した(図4b)。これらのデータは、MPOの酵素活性が脂質過酸化およびそれに依存したネトーシスの誘導に重要な役割を果たすことを強く示唆している。次に、MPOがリン脂質を酸化する能力を持っているかどうかを検討した。この目的のために脂質酸化測定法の一つであるTBARS(2-チオバルビツール酸反応性物質)アッセイを用いた。MPOと過酸化水素の存在下でホスファチジルコリンをインキュベートすると、MPOの濃度に応じて脂質過酸化のマーカーであるMDA(マロンジアルデヒド)の量が増加した(図4c)。これらの結果は、MPOがネトーシスおよびNET形成中に直接リン脂質に作用して脂質過酸化を誘発することを示唆している。

ネトーシス誘導とNET形成におけるMPO酵素活性の関与をさらに検証するために、別の角度からの検証を行った。検証にはヒト前骨髄球性白血病細胞株であるHL-60を使用した。ジメチルスルホキシド(DMSO)で処理されたHL-60は、好中球様に分化することが知られている。そこで、HL-60が好中球様に分化するか確認するため、DMSOで処理したHL-60(dHL-60)の解析を行った。dHL-60は分葉状の核を示し、未処理細胞は丸い核を有していた。dHL-60細胞は未処理細胞と比較してCD11bおよびCD16の細胞表面発現が増加し、dHL-60は、PAD4およびp47phoxの発現増加も確認できた。加えて、dHL-60はPMA刺激により活性酸素(ROS)を産生することも確認できた。以上の結果より、dHL-60は好中球様の特徴を有することが確認できた。さらにこの細胞モデルを用いたNET誘導に関する検証においても、dHL-60において脂質酸化依存的NET形成が起きることが確認された(図4d-g)。

この細胞株を対象として、CRISPR/Cas9システムを用いMPO欠損HL-60クローンの確立を行った。各クローンにおけるMPOの遺伝子変異および欠損はシークエンスとウエスタンブロットにより確認された(図4h)。図4iおよびjに示すように、MPO欠損dHL-60ではネトーシスおよびNET形成は誘導されなかった。加えて、脂質過酸化はMPO欠損株で著しく抑制された(図4k,l)。

次に、MPO欠損HL-60細胞を用いて、WT MPOまたは酵素不活性変異体MPOを再発現させたクローンを作製した(図4m)。酵素不活性変異体MPO再発現株では、MPO軽鎖のアスパラギン酸をアラニンに変異(D96A)させることによってMPOの酵素活性が消失している(図4n)。WT MPO再発現株では、ネトーシス誘導およびNET形成が認められたが、酵素不活性変異体MPO再発現株では認められなかった(図4o,p)。これらの結果と一致して、脂質過酸化はWT MPO再発現株では認められたが、酵素不活性変異MPO再発現株では認められなかった(図4q)。以上の結果は、MPOが酵素活性を通してリン脂質を酸化することによってネトーシス誘導とNET形成の実行に寄与していることを強く示している。

MPOがリン脂質過酸化を介してネトーシス誘導とNET形成の実行に寄与し、酸化

リン脂質がNET形成を引き起こす背景を踏まえると¹¹、酸化リン脂質はMPO欠損株においてもネトーシスを誘導できる可能性が考えられる。この仮説を証明するために、酸化リン脂質がMPO欠損HL-60細胞にネトーシスを誘導するか検討した。図4rに示すように、酸化された1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(oxPAPC)をWT HL-60細胞に直接作用させるとネトーシスが誘導され、このネトーシスはトロロックスにより抑制されなかった。また、MPO欠損HL-60細胞に直接作用させるとWT HL-60細胞と同程度のネトーシスが誘導された(図4s)。これまでの結果をまとめると、MPOは酵素活性依存的にリン脂質を酸化し、その後形成された酸化脂質がネトーシス誘導とNET形成を引き起こす可能性が示された。

5.NEはネトーシスではなくNET形成に重要である

脂質酸化依存的ネトーシスおよびNET形成におけるNEの役割をさらに明らかにするために、NE欠損HL-60細胞株を樹立した(図5a)。NE欠損株では細胞内NE活性が消失していることを確認した(図5b)。PMA刺激により誘導されるネトーシスは、親株と同程度に誘導された(図5c)。PMA刺激によって誘導される脂質過酸化の程度はNE欠損により影響を受けなかった(図5d、e)。これらの結果は、NEが脂質酸化依存的ネトーシスに関与していないことを示している。一方で、抗citH3抗体を用いた免疫蛍光染色によりNET形成を評価したところ、NE欠損株ではcitH3陽性細胞の数が有意に減少した(図5f、g)。これらの結果は、NEが脂質過酸化依存的NET形成に必須ではないもの、何らかの関与をしており、NE非依存的なメカニズムと混在することを示す結果である。

6.酸化リン脂質とNEは協調してクロマチンの脱凝縮を引き起こす

これまでの結果より、酸化リン脂質とNEの両方がNET形成に関与していることが示された。これら2種の因子がどのようにNET形成に関与するか検討するため、単離核を使用してクロマチン脱凝縮への影響を評価した。SYTOXGreenで染色されたクロマチンエリアを測定することにより評価したところ、リコンビナントNEと単離核のインキュベーションは有意な核の膨潤を引き起こし、この膨潤はNE阻害剤により阻害された(図6a)。単離核へのoxPAPCの添加も核の膨潤を誘導したが、この膨潤はNE阻害剤により阻害されず、NEに依存しないシステムで膨潤を引き起こすことが示された(図6a)。さらに、NEとoxPAPCの併用条件では、クロマチンの脱凝縮が促進され、培養上清中のDNA量が増加した(図6b,c)。NEはヒストンを分解することにより、クロマチン脱凝縮を引き起こすことが報告されている²。そこで、oxPAPCがヒストンの分解に影響を与えるかどうか検討した。単離核へのoxPAPC単独の添加ではヒストンH4の分解に影響をおよぼさなかった(図6d,e)。これは

oxPAPCがNEとは別のメカニズムによりクロマチン脱凝縮を引き起こすことを示す結果である。以上の結果から、酸化リン脂質とNEはそれぞれ別の機序によりクロマチン脱凝縮を引き起こし、協調的に作用する可能性が示された。

7. 図表

図 1

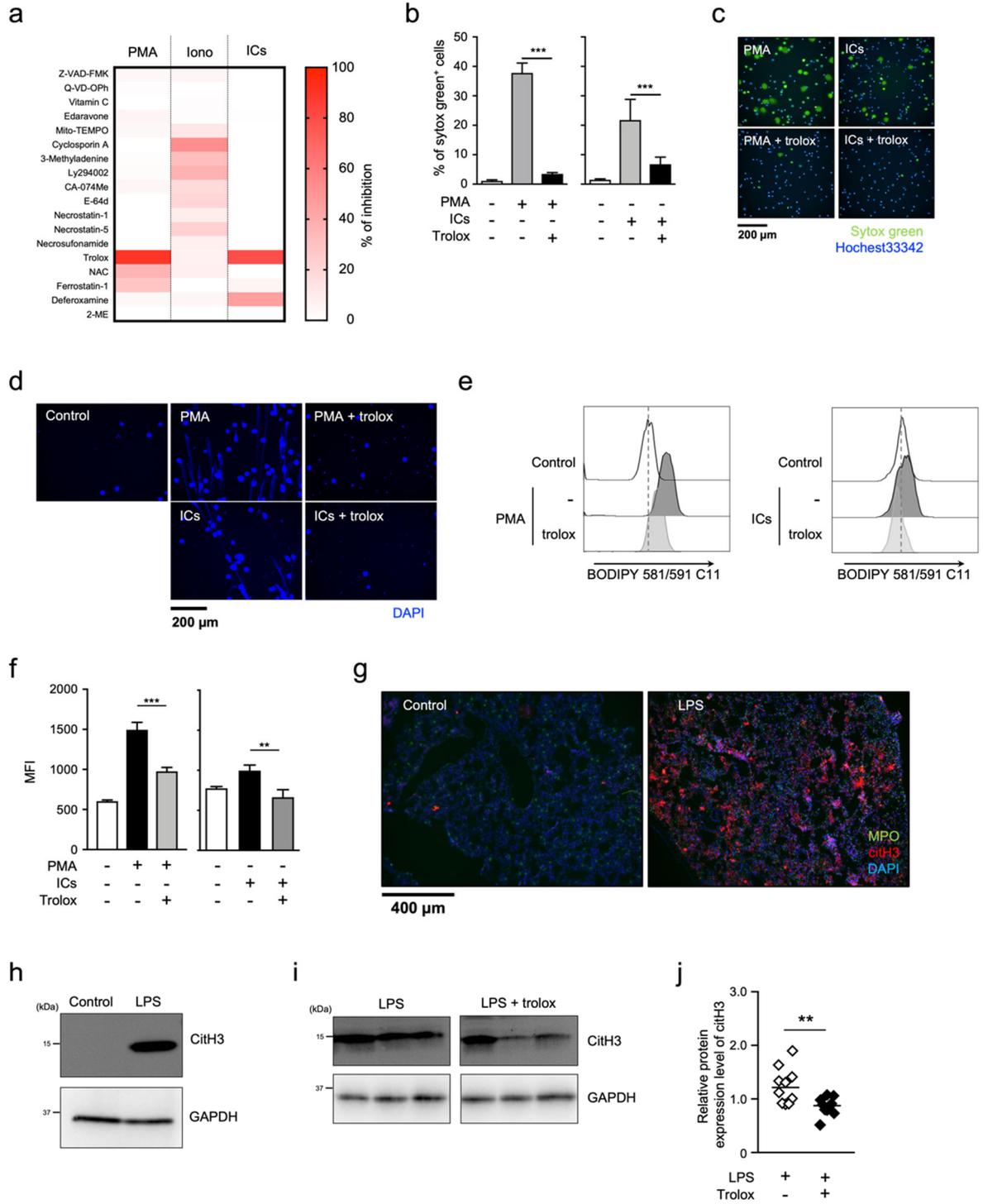


図 1 . NET 形成における脂質過酸化の関与

(a) 細胞死阻害剤を用いたネトーシスプロファイリング

2 人の健常人から採取したヒト末梢血好中球に対して各種細胞死阻害剤の存在下もしくは非存在下で 50 nM PMA、5 μ M ionomycin、または 3 μ g/mL IC で 4 時間刺激した。細胞は SYTOX Green と Hoechst 33342 で染色された。ネトーシスの割合は、ハイコンテックス解析システムを用いて SYTOX Green⁺ 細胞数を測定し、算出した。各阻害剤の効果をヒートマップで示す。

(b-d) PMA または ICs 誘導性のネトーシスおよび NET 形成に対するトロロックスの阻害効果

(b,c) ヒト好中球は、1.6 mM トロロックスの存在下または非存在下で、50 nM PMA または 3 μ g/mL ICs のいずれかで 4 時間刺激された。ネトーシスの割合は(A)と同じ方法を用いて算出した。1 つの実験における 3 つのサンプルの平均値と s.d.を示す(b)。***P < 0.005, one-way ANOVA。代表的な画像を示す(c)。

(d) ヒト好中球を、1.6mM トロロックスの存在下または非存在下において、PMA または ICs で刺激した。細胞は DAPI で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

(e,f) ネトーシス誘導における好中球の脂質酸化レベル

ヒト好中球を、1.6 mM トロロックスの存在下または非存在下で、PMA または ICs で 1 時間刺激し、BODIPY 581/591 C11 とインキュベートした。リン脂質の過酸化をフローサイトメトリーで解析した。代表的なフローサイトメトリーのプロットを示す (e)。4 つの実験における 12 サンプルの蛍光強度の中央値(MFI: median fluorescence intensity) と s.d.の平均値を示す (f, 左)。1 つの実験における 3 つのサンプルの平均蛍光強度と s.d.の平均値を示す (f, 右)。*P < 0.05, **P < 0.01, one-way ANOVA

(g,h) C57BL/6J マウスに PBS または 10 μ g の LPS を経鼻投与した。投与 24 時間後に肺を摘出した。(g) 肺切片を、抗 MPO 抗体 (MPO、緑)、抗 CitH3 抗体 (CitH3、赤)、および DAPI (青) により免疫蛍光分析を行った。代表的な画像を示す。(h)マウスの肺における citH3 タンパク質のウェスタンブロット解析

(i,j) 肺の citH3 に対するトロロックスの抑制効果

LPS 経鼻投与 24 時間前と投与直前に 40 mg/kg のトロロックスを腹腔内投与した。LPS 投与 24 時間後の肺を、抗 citH3 抗体を用いたウェスタンブロット法で解析した。各群 3 匹のマウスの代表的な画像を示す (i)。CitH3 の発現量は、Evolution Capt Software を用いて GAPDH の発現量により標準化した。各群 (コントロール群 : n=10、トロロックス投与群 : n=10) における citH3 タンパク質レベルの平均値および s.d.を示す(j)。**P < 0.01, unpaired t-test

2

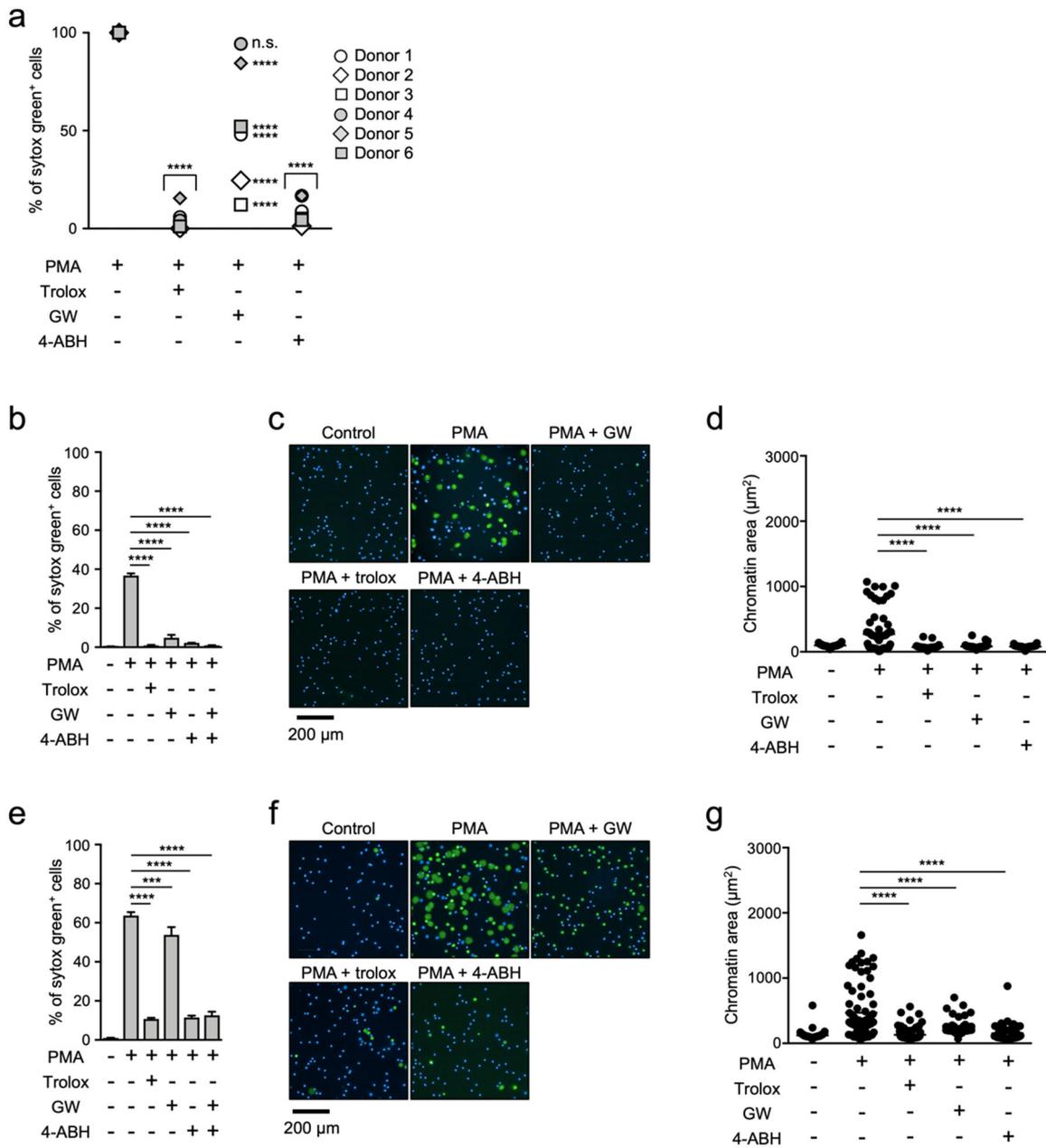


図 2. MPO と NE の NET 形成における役割の違い

(a) ヒト好中球は 6 人の健常人から単離された。好中球を 1.6 mM トロロックス、500 μ M 4-ABH、または 20 μ M GW311616 の存在下または非存在下で、50 nM PMA で 4 時間刺激した。細胞は SYTOX Green と Hoechst 33342 で染色された。ネトーシスの割合は、図 1a と同じ方法を用いて決定した。

(b-g) ヒト好中球の核膨張に対する NE 阻害剤の効果

好中球は 2 人の健常人の血液から単離した。好中球を 1.6 mM トロロックス、500 μ M 4-ABH、または 20 μ M GW311616 の存在下または非存在下で 50 nM PMA で 3.5 時間刺激し、続いて SYTOX Green および Hoechst 33342 で染色を行った。ネトーシスの割合は、図 1A と同じ方法を用いて決定した。NE 阻害剤感受性ドナー (b-d) および NE 阻害剤非感受性ドナー (e-g) の結果を示す。1 回の実験における 3 つのサンプルの平均値および s.d.を示す。***P < 0.005, ****P < 0.001, one-way ANOVA (B,E)。代表的な画像を示す (c,f)。70-76 個の好中球のクロマチン面積は、Image-J ソフトウェアを用いて計算した。****P < 0.001, one-way ANOVA (d,g)。

3

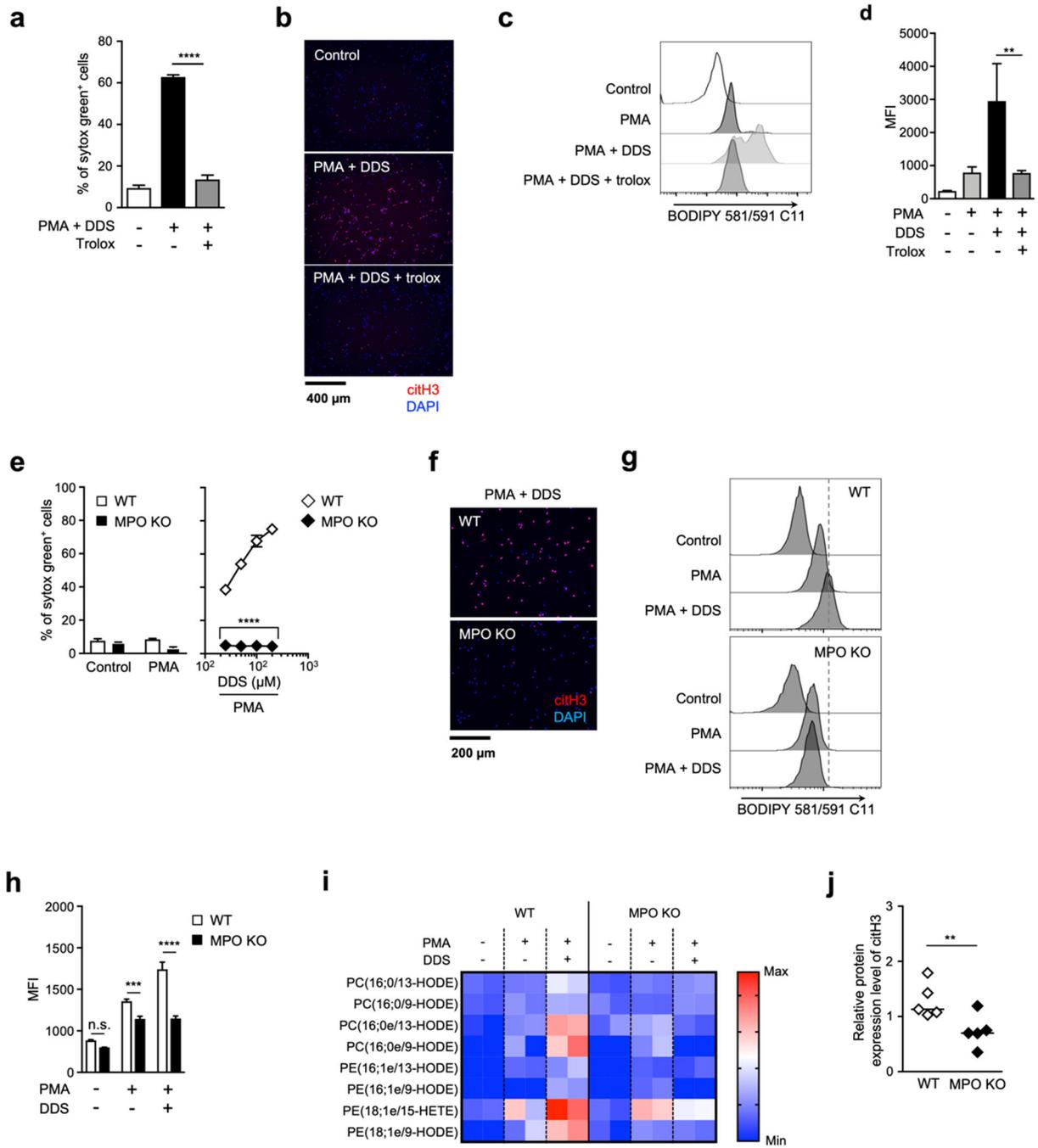


図 3. MPO は脂質過酸化依存的 NET 形成に関与する

(a-d) PMA と DDS はマウス骨髄好中球に脂質酸化依存的 NET 形成を誘導する

(a,b) 好中球を、400 μ M トロロックスの存在下または非存在下で、1 μ M PMA および 200 μ M DDS で 4 時間刺激した。(a) 図 1A と同じ方法で、ネトーシスの割合を決定した。1 つの実験における 3 つのサンプルの平均値および s.d.を示す。***P < 0.001、one-way ANOVA

(b) NET 形成は、DNA (DAPI) および抗 citH3 モノクローナル抗体での染色により可視化した。代表的な画像を示す。

(c,d) 好中球を 400 μ M トロロックスの存在下または非存在下で、1 μ M PMA および 200 μ M DDS で 1.5 時間刺激し、BODIPY 581/591 C11 を添加した。脂質過酸化のレベルをフローサイトメトリーにより評価した。代表的なフローサイトメトリーのプロットを示す (c)。3 つのサンプルの平均 MFI 値および s.d.を示す。**P < 0.01、一元配置分散分析(one-way ANOVA) (d)。

(e-j) MPO は脂質酸化依存的ネトーシス誘導と NET 形成に必須である

WT および MPO 欠損好中球に対して、PMA 単独もしくは DDS 併用で刺激した。ネトーシス誘導 (e) および NET 形成 (f) は図 1a と同じ方法で評価した。1 回の実験における 3 つのサンプルの平均値および s.d.を示す。****P < 0.001, unpaired t-test。

(g,h) WT および MPO 欠損マウス好中球に対して、PMA 単独もしくは DDS と併用して刺激した。リン脂質過酸化のレベルを、図 1e,f と同じ方法で評価した。1 回の実験における 3 つのサンプルの平均値および s.d.を示す。***P < 0.005, ****P < 0.001, n.s., not significant, one-way ANOVA (e), unpaired t-test (h)

(i) 酸化リン脂質のワイドターゲットリポドミクス解析

WT および MPO 欠損マウス好中球を、1 μ M PMA と 200 μ M DDS で 1.5 時間刺激した。この好中球から脂質を抽出し、ACQUITY UPLC システムとトリプル四重極 MS を組み合わせてワイドターゲット分析を行った。各酸化リン脂質レベルをヒートマップで示す。

(j) MPO 欠損マウスの肺では NET 形成が抑制される

WT または MPO 欠損マウスに 10 μ g の LPS を経鼻投与した。投与 24 時間後、肺の citH3 レベルを抗 CitH3 抗体によるウェスタンブロットで評価した。CitH3 量は Evolution Capt Software を用いて定量し、GAPDH で標準化した。各群 (WT: n = 5, MPO KO: n = 5) における citH3 レベルの平均値および s.d.を示す。**P < 0.01、unpaired t-test

4

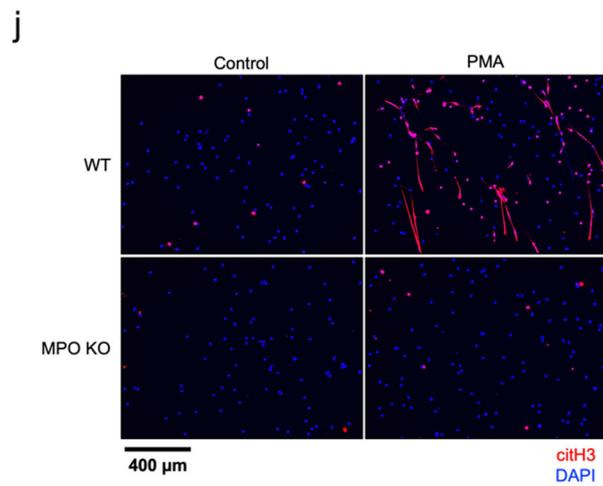
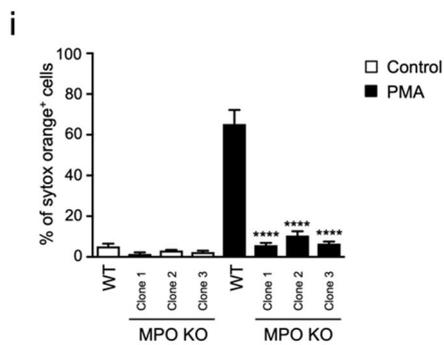
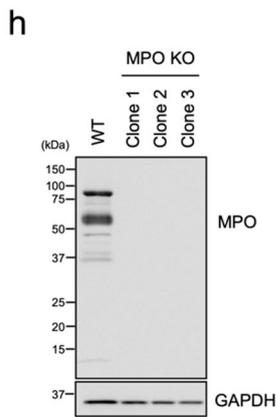
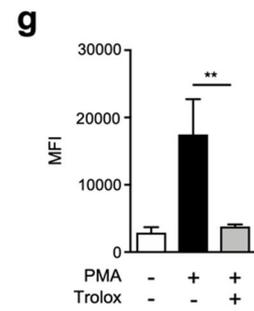
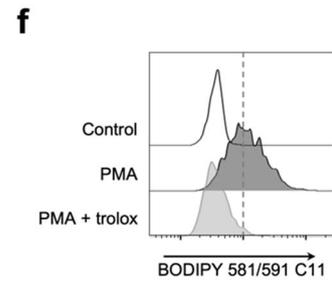
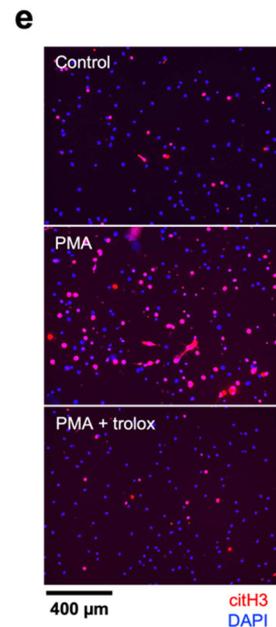
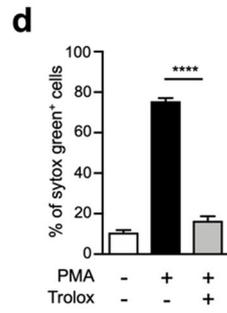
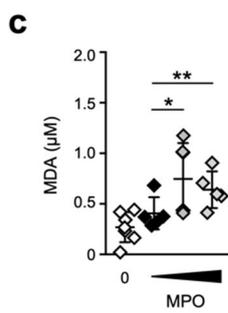
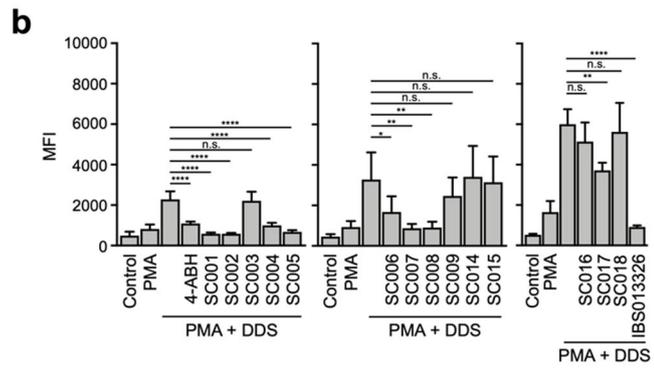
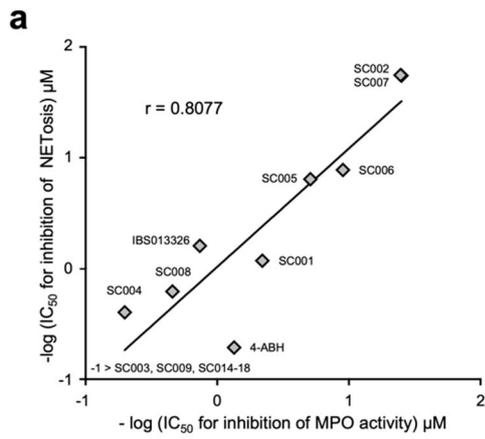
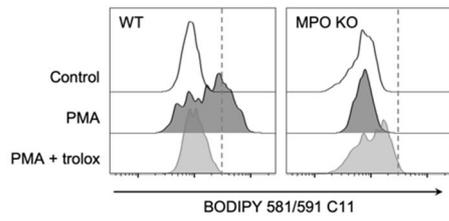
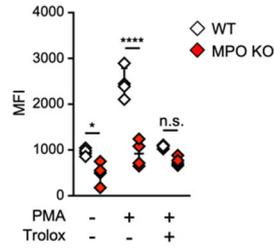


図 4 続き

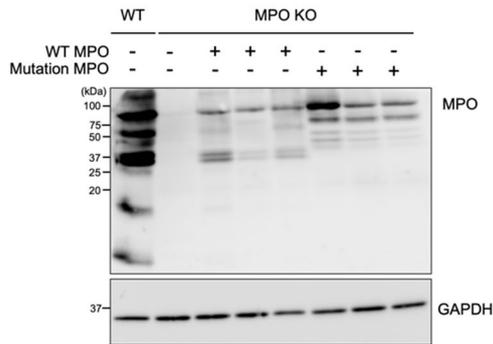
k



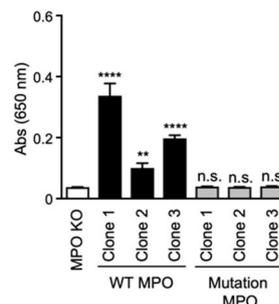
l



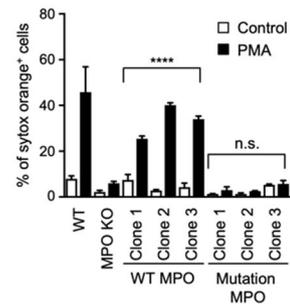
m



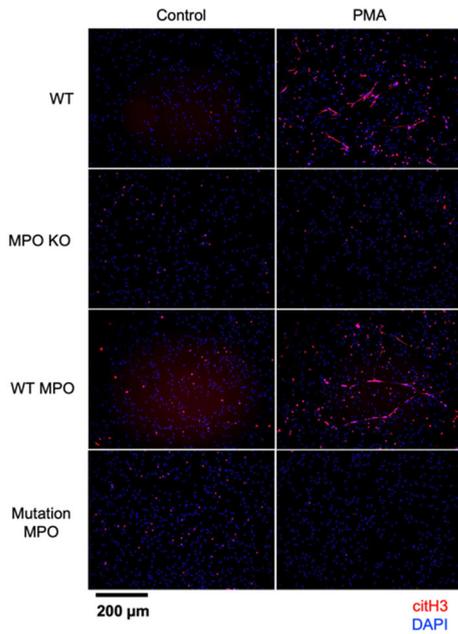
n



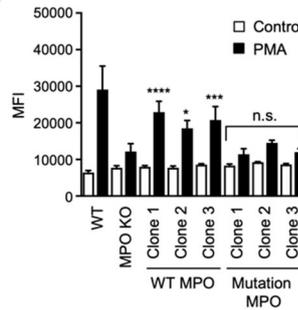
o



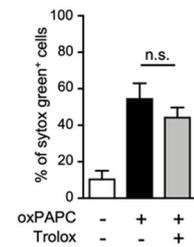
p



q



r



s

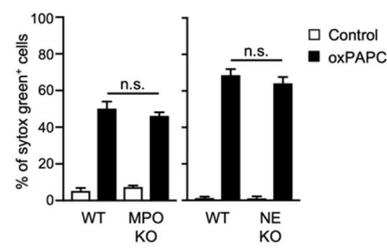


図 4. MPO の酵素活性は脂質酸化依存的 NET に重要な役割を果たす

(a) ヒドラジン化合物の MPO 阻害活性と NET 阻害活性との相関関係

各化合物の MPO の酵素活性に対する阻害作用は、"実験方法および実験試薬"の項に記載したように評価した。マウス好中球を、各ヒドラジン化合物の存在下または非存在下で、1 μ M PMA および 200 μ M DDS で 3 時間刺激した。図 1a と同様の方法でネトーシスの比率を算出した。MPO 阻害活性および NET 阻害活性に対する各化合物の IC₅₀ をプロットし示した。

(b) マウス好中球を各ヒドラジン化合物の存在下または非存在下で、1 μ M PMA および 200 μ M DDS で 1 時間刺激した後、BODIPY 581/591 C11 を添加した。脂質酸化レベルをフローサイトメトリーにより評価した。3 つのサンプルの平均 MFI 値および s.d.を示す。
*P < 0.05, **P < 0.01, ****P < 0.001, n.s., not significant, one-way ANOVA

(c) MPO の脂質過酸化能力の評価

Egg PC を、H₂O₂ 存在下で MPO とインキュベートした。MDA レベルを TBARS アッセイにより評価した。4~7 サンプルの平均値および s.d.を示す。
*P < 0.05, **P < 0.01, one-way ANOVA

(d,e) dHL-60 を 1.6 mM トロロックスの存在下または非存在下で 50nM PMA で 4.5 時間刺激し、図 1A と同じ方法でネトーシスの比率を算出した。**** P < 0.001, one-way ANOVA。3 つのサンプルの平均値および s.d.を示す(d)。NET 形成は、DAPI と抗 citH3 モノクローナル抗体で細胞を染色することにより可視化した(e)。代表的な画像を示す。

(f,g) dHL-60 を 1.6 mM トロロックスの存在下または非存在下で 0.1 μ M PMA により 1 時間刺激し、BODIPY 581/591 C11 を添加した。脂質酸化レベルをフローサイトメトリーで解析した。代表的なフローサイトメトリーのプロットを示す (f)。3 つのサンプルの平均 MFI 値および s.d.を示す(g)。
**P < 0.01, one-way ANOVA

(h-l) CRISPR/Cas9 を用いた MPO 欠損 HL-60 の樹立および評価

MPO 欠損を確認するウエスタンブロット (h)。GAPDH はローディングコントロールとして使用した。WT-および MPO 欠損 dHL-60 クローンのネトーシス (i)、NET 形成 (j)、および脂質過酸化 (k, l) の評価。
*P < 0.05, ****P < 0.001, n.s., not significant, one-way ANOVA

(m-q) MPO 欠損 HL-60 に、WT MPO または酵素不活性型の変異 MPO のいずれかを再発現させた。WT または変異体 MPO (D96A)を確認するウエスタンブロット (m)。GAPDH をローディングコントロールとして使用した。MPO の酵素活性は、MPO 欠損 HL60、WT MPO 再発現株もしくは変異体 MPO 再発現株で測定した (n)。ネトーシス誘導 (o)、NET 形成 (p)、および脂質過酸化 (q) の評価。
*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.001, n.s., not significant, one-way ANOVA

(r) dHL-60 細胞を、1.6 mM trolox 存在下または非存在下で、100 μ g/mL oxPAPC で 4 時

間刺激した。ネトーシスの割合は、図 1a と同じ方法で決定した。3 つのサンプルの平均値および s.d.を示す。

(s) WT、NE 欠損もしくは MPO 欠損の dHL-60 を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の oxPAPC で 3.5 時間刺激し、図 1a と同じ方法でネトーシスの比率を決定した。3 つのサンプルの平均値および s.d.を示す。

5

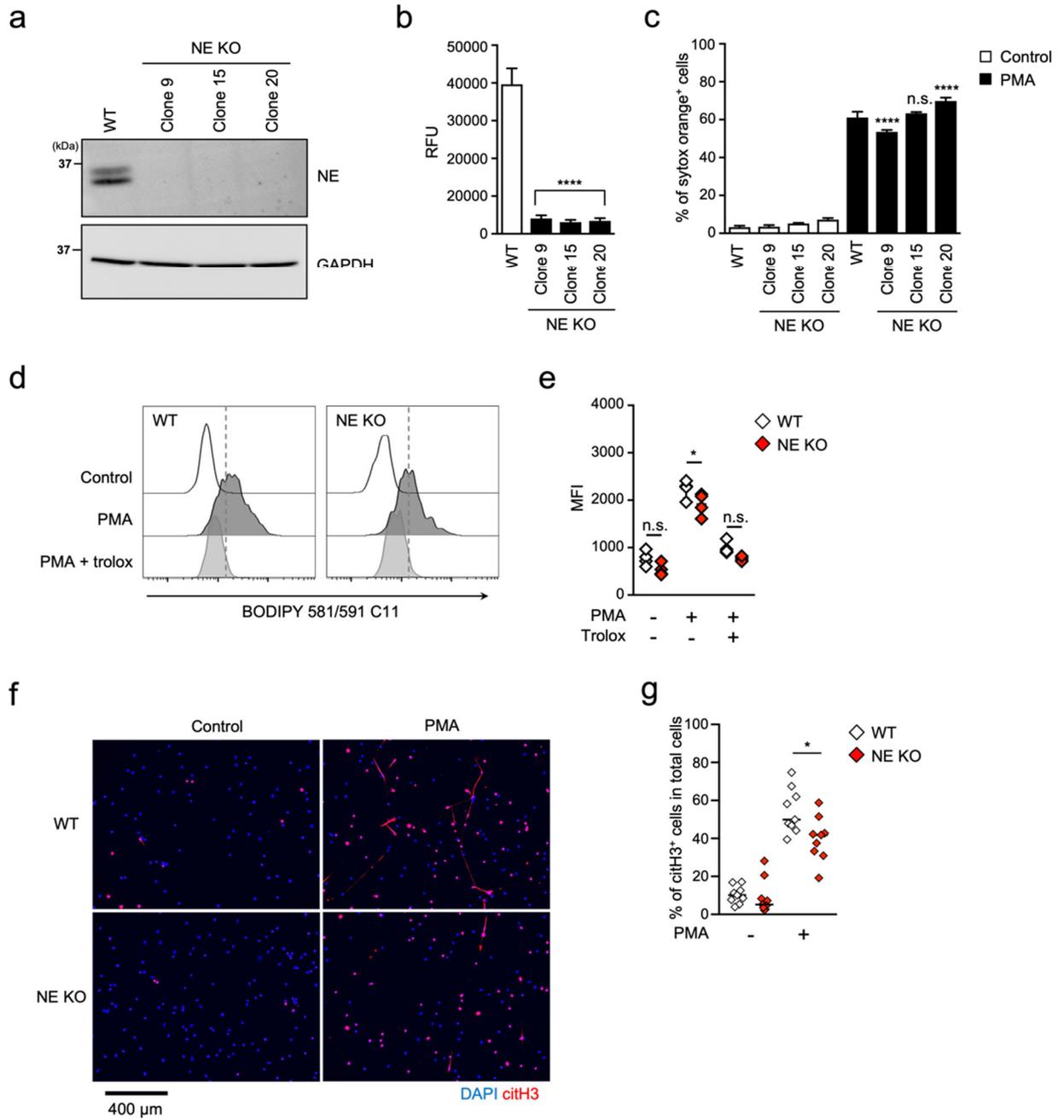


図 5. NE はネトーシスにではなく NET 形成に重要である

(a-c) CRISPR/Cas9 による NE 欠損 HL-60 細胞株の樹立

(a) HL-60 における NE 欠損の代表的なウエスタンブロットの結果を示す。GAPDH をローディングコントロールとしておいた。

(b) NE の酵素活性は、"実験方法および実験試薬"の項に記載したように評価した。3つのサンプルの平均値および s.d.を示す。****P < 0.001、one-way ANOVA

(c) WT または NE 欠損 dHL-60 細胞を 50 nM PMA で 3.5 時間刺激し、図 1a と同じ方法でネトーシスの割合を算出した。3つのサンプルの平均値および s.d.を示す。****P < 0.001, n.s., not significant, one-way ANOVA

(d,e) WT または NE 欠損 dHL-60 を、1.6 mM トロロックス存在下または非存在下で 50 nM PMA で 1 時間刺激し、BODIPY 581/591 C11 を添加した。脂質酸化レベルをフローサイトメトリーにより評価した (d)。3つのサンプルの平均 MFI 値を示す(e)。WT dHL-60 と比較して、*P < 0.05, n.s., not significant, one-way ANOVA

(f,g) WT もしくは NE 欠損 dHL-60 細胞を、50 nM PMA で 3.5 時間刺激した。NET 形成は、DAPI と抗 citH3 モノクローナル抗体で細胞を染色することにより可視化した (f)。citH3⁺細胞の割合は、Image-J ソフトウェアを用いて決定した(g)。*P < 0.05, one-way ANOVA

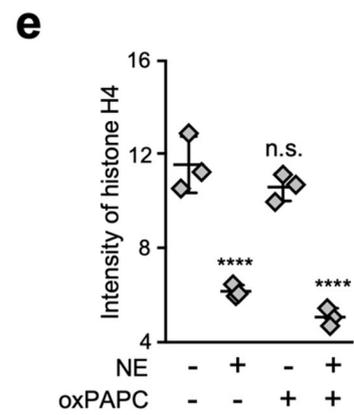
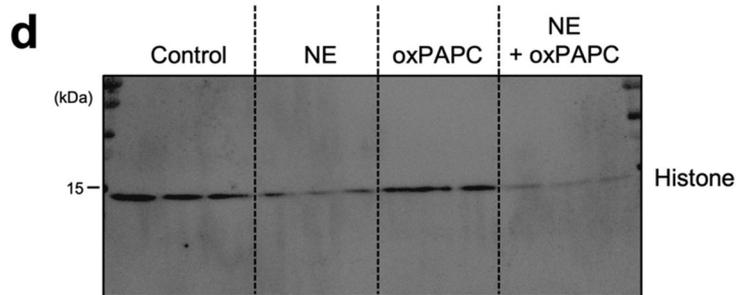
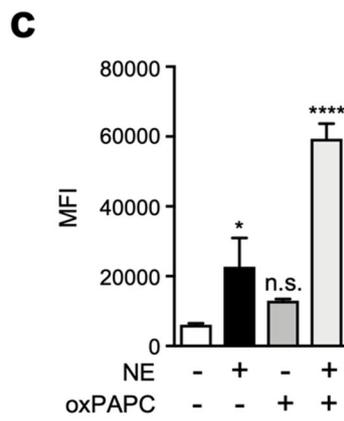
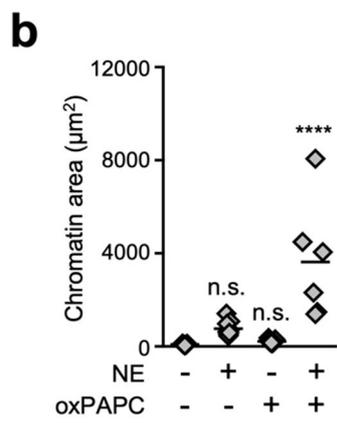
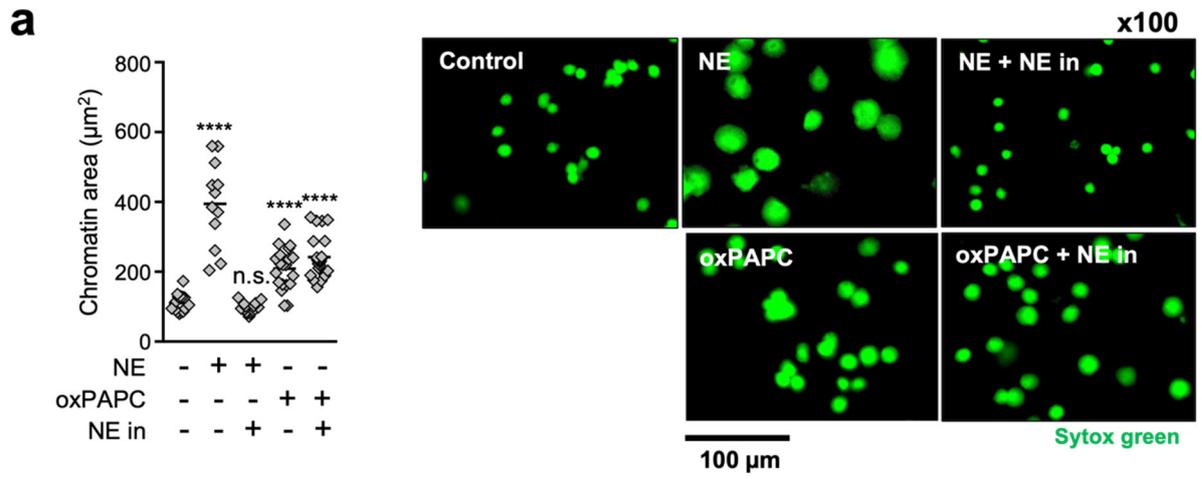


図 6. 酸化リン脂質と NE は協調してクロマチン脱凝縮を引き起こす

(a) oxPAPC のクロマチン脱凝縮能力の評価

HL-60 から単離した核を PBS、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NE または 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oxPAPC 中で 37°C、60 分間インキュベートし、SYTOX Green で染色した。NE 阻害剤には GW311616 を使用した。クロマチンエリアは Image-J ソフトウェアを用いて定量した。12 個の核の平均値と s.d. を示す (左)。****P < 0.001, n.s., not significant, one-way ANOVA。代表的な画像を示す (右)。

(b,c) クロマチン脱凝結における NE および oxPAPC の相乗効果

(b) HL-60 から分離した核を、PBS、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NE、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oxPAPC、または NE + oxPAPC で 37°C、120 分間インキュベートし、SYTOX Green で染色した。クロマチンエリアは Image-J ソフトウェアで定量した。6-15 個の核の平均値および s.d.を示す。*P < 0.01, one-way ANOVA

(c) HL-60 細胞から単離した核を、PBS、NE 単独、oxPAPC 単独、または NE + oxPAPC で、37°C、120 分間インキュベートした。上清中の DNA 量は、"実験方法および実験試薬"の項に記載したように定量した。3 つのサンプルの平均値および s.d.を示す。*P < 0.05, ****P < 0.001, n.s., not significant, one-way ANOVA

(d,e) NE, oxPAPC によるヒストン分解能力の評価

単離した核を NE 単独、oxPAPC 単独、または NE + oxPAPC とともに、37°C で 120 分間インキュベートした。各サンプル中のヒストン H4 の量をウェスタンブロッティングにより評価した。3 つのサンプルの平均値および s.d.を示す(e)。****P < 0.001, n.s., not significant, one-way ANOVA。

第4章 考察

今回の検証により、脂質過酸化がPMAやICsなどのNET誘導試薬により誘導されるネトーシスおよびNET形成に関与していることが明らかとなった。脂質過酸化はフェロトキシスの発生に重要な役割を果たすことが知られている¹⁸。しかしフェロトキシス阻害剤を含むネトーシスのプロファイリングは、脂質過酸化の発生機序がフェロトキシスとは異なることを示している。具体的に、ネトーシスへの鉄キレートの効果は微弱であり、ネトーシスにおける脂質過酸化は鉄に依存しない経路であることを示している（図1a）。

加えて、MPOがネトーシスにおける脂質過酸化の実効分子であることが明らかとなった。以前、ヒト末梢血好中球に対するMPO阻害剤を用いた検証、およびMPO欠損患者のヒト好中球を用いた検証は、ネトーシスおよびNET形成にMPOが必要であることが示されている^{2,3,8}。しかしながらMPOの役割は不明であった。Metzlerらは、MPOとNEが協調して働きクロマチンの脱凝縮に関与すること、この働きにMPOの酵素活性は関与しないことを報告している⁸。具体的にはMPOがネトーシス中のアズール顆粒からのNE放出に寄与し、それはMPOの酵素活性非依存的な活性によるものであるというものである。しかしながら、その他のMPO阻害剤を用いた研究報告により、MPOの酵素活性がネトーシスおよびNET形成に必須であるとするという主張も存在する^{2,3,19,20}。今回の我々の研究では、MPOの酵素活性がリン脂質の酸化を引き起こすことにより、ネトーシスおよびNET形成を引き起こすことを明確に示した。

NEはNET形成におけるクロマチン脱凝縮を引き起こす実行分子として認識されており^{2,8}、NE阻害剤はNET関連疾患における治療薬として期待されている。実際に、NE阻害剤はアテローム性動脈硬化症や癌転移などの疾患に対する治療効果が報告されている^{21,22,23}。一方でNET媒介性疾患である血栓症の治療ではNE阻害剤の治療効果が不十分であることも報告されている²⁹。今回の研究により、NEと酸化リン脂質がクロマチン脱凝縮を相乗的に促進することが示され、リン脂質過酸化とNEを二重に標的とした治療戦略確立が重要となる可能性を示している。ネトーシスおよびNET形成における酸化脂質の役割をより明確に示すためには、特異的なアンタゴニストの開発などが重要となる。

以上の内容を踏まえ、酸化脂質の動態メカニズムの正確な理解には、酸化リン脂質を介した核脱凝縮メカニズムやそのダイナミクスをさらに検証する必要がある。

参考文献

1. Jorch, S. K., and Kubes, P. (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.* 23, 279–287. doi: 10.1038/nm.4294
2. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., and Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 191, 677–691. doi: 10.1083/jcb.201006052
3. Metzler, K. D., Fuchs, T. A., Nauseef, W. M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., et al. (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 117, 953–959. doi: 10.1182/blood-2010-06-290171
4. Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 134–147. doi: 10.1038/nri.2017.105
5. Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., et al. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231–241. doi: 10.1083/jcb.200606027
6. Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., et al. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* 184, 205–213. doi: 10.1083/jcb.200806072
7. Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N., and Wang, Y. (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 207, 1853–1862. doi: 10.1084/jem.20100239
8. Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., and Papayannopoulos, V. (2014). A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* 8, 883–896. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.044
9. Rohm, M., Grimm, M. J., D’Auria, A. C., Almyroudis, N. G., Segal, B. H., and Urban, C. F. (2014). NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.* 82, 1766–1777. doi: 10.1128/iai.00096-14
10. Neeli, I., Khan, S. N., and Radic, M. (2008). Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J. Immunol.* 180, 1895–1902. doi: 10.4049/jimmunol.180.3.1895
11. Yotsumoto, S., Muroi, Y., Chiba, T., Ohmura, R., Yoneyama, M., Magarisawa, M., et al. (2017). Hyperoxidation of ether-linked phospholipids accelerates neutrophil extracellular trap formation. *Sci. Rep.* 7:16026.
12. Aratani, Y. (2018). Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch. Biochem. Biophys.* 640, 47–52. doi: 10.1016/j.abb.2018.01.004
13. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., and Pullen, J. K. (1989). Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59. doi:

10.1016/0378-1119(89)90358-2

14. Shin, K., Hayasawa, H., and Lonnerdal, B. (2001). Mutations affecting the calcium-binding site of myeloperoxidase and lactoperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 1024–1029. doi: 10.1006/bbrc.2001.4448
15. Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., et al. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149, 1060–1072. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042
16. Bjornsdottir, H., Welin, A., Michaelsson, E., Osla, V., Berg, S., Christenson, K., et al. (2015). Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 1024–1035. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.398
17. Malle, E., Furtmuller, P. G., Sattler, W., and Obinger, C. (2007). Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br. J. Pharmacol.* 152, 838–854. doi: 10.1038/sj.bjp.0707358
18. Yang, W. S., and Stockwell, B. R. (2016). Ferroptosis: death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol.* 26, 165–176. doi: 10.1016/j.tcb.2015.10.014
19. Palmer, L. J., Cooper, P. R., Ling, M. R., Wright, H. J., Huissoon, A., and Chapple, I. L. (2012). Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 261–268. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04518.x
20. Neubert, E., Meyer, D., Rocca, F., Gunay, G., Kwaczala-Tessmann, A., Grandke, J., et al. (2018). Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nat. Commun.* 9:3767.
21. Cools-Lartigue, J., Spicer, J., McDonald, B., Gowing, S., Chow, S., Giannias, B., et al. (2013). Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.* 123, 3446–3458. doi: 10.1172/jci67484.
22. Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q., and Papayannopoulos, V. (2015). Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 349, 316–320. doi: 10.1126/science.aaa8064
23. Albregues, J., Shields, M. A., Ng, D., Park, C. G., Ambrico, A., Poindexter, M. E., et al. (2018). Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* 361:eaao4227. doi: 10.1126/science.aao4227
24. Martinod, K., Witsch, T., Farley, K., Gallant, M., Remold-O'Donnell, E., and Wagner, D. D. (2016). Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 14, 551–558. doi: 10.1111/jth.13239

謝辞

本研究の遂行および論文執筆にあたり、多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました。

指導教官である田中正人先生、四元聡志先生には、研究指針および研究遂行など多岐にわたり助言を賜りました。

清水先生(東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授)には、本研究の起点となった化合物ライブラリーを提供していただきました。

佐藤先生(東北大学 学際科学フロンティア研究所 助教)には、本研究で使用したヒドラジン化合物を提供していただきました。

青柳先生(慶應義塾大学薬学部薬学科 代謝生理化学講座 助教)には、本論文のデータで用いたリポドミクス解析をしていただきました。

ご協力していただいた先生方に、心より感謝いたします。

また、本研究の遂行にあたりご協力いただいた免疫制御学研究室の皆様にも、感謝の意を表します。