

博士論文

炎症性疾患における好中球細胞外トラップ (NETs)

抑制物質としてのラクトフェリンの機能解析

大 久 保 光 修

炎症性疾患における好中球細胞外トラップ (NETs) 抑制物質としての
ラクトフェリンの機能解析

所属 東京大学大学院医学系研究科
医学博士課程
内科学専攻腎臓内科分野

指導教員名 南学 正臣 教授

申請者名 大久保 光修

要旨

好中球は貪食や脱顆粒に加え、細胞外に放出した自らのクロマチン線維の束である好中球細胞外 traps: NETs によって宿主を防御する。NETs は外来微生物を捕捉し生体を防御する一方、自己免疫性疾患や炎症性疾患、血栓症の病態形成に関与している。我々は NETs 上に同定されている好中球顆粒成分の一つであるラクトフェリンが活性酸素発生系とは独立に NETs 形成を顕著に抑制すること、放出された NETs を凝集させることを見出した。In vivo では好中球依存性血管炎である自己免疫性小型血管炎および出血性血栓性血管炎において、ラクトフェリンが NETs 形成を抑制し病態を改善させた。ラクトフェリンの炎症性疾患を始めたとする NETs 関連疾患への応用が期待される。

序文

好中球は炎症性刺激によって局所へ遊走し、貪食や脱顆粒によって外来微生物から生体を防御している[1]。活性化した好中球は Neutrophil extracellular traps (NETs) と呼ばれる抗微生物活性を有するクロマチン線維を細胞外に放出し外来微生物を捕捉し生体を防御している[2]。NETs は細菌だけでなく、結核[3]、真菌[4]、寄生虫[5]も捕捉することが知られている。NETs 形成において好中球核膜の崩壊に引き続くクロマチンの膨張と細胞膜の破裂は特徴的であり、この一連の細胞死の過程は NETosis と呼ばれている[6]。

NETs 形成は生体防御という生体に有益な側面だけではなく、不利益な側面も知られている。例えば、敗血症においては血小板と好中球の相互作用が NETs 形成を介して血管内皮細胞障害を引き起こすことが知られている[7]。輸血関連急性肺障害: transfusion related acute lung injury (TRALI)ではNETsが血管内皮細胞、肺傷害を引き起こす。一部の自己免疫性疾患において NETs は形質細胞様樹状細胞を活性化させる自己抗原として認識され、自己反応性 B 細胞の活性化を引き起こすことが知られている[8]。全身性エリテマトーデス: systemic lupus erythematosus (SLE)においては、NETs 除去能を有する酵素 DNase1 の機能不全がループス腎炎の進展を引き起こす。また、自己免疫性小血管炎においては抗好中球細胞質抗体: anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)が直接好中球を刺激

し NETs 形成を引き起こす[9]。

ラクトフェリンはヒトの母乳や涙液等の外分泌液や腸管粘膜に含まれる成分で、ヒト好中球二次顆粒(secondary granules)にも多く含まれており[10, 11]、抗微生物活性をもつことが知られている[12-15]。臨床では便中ラクトフェリン濃度が潰瘍性大腸炎のような炎症性疾患において上昇するためラクトフェリンが炎症活動性のマーカーになり得るという報告がある[16]。さらに関節リウマチの病勢と抗ラクトフェリン抗体価が相関することを示唆する報告や[17]、SLE 患者の抗ラクトフェリン抗体価が病勢と関連したとする報告がある[18]。また新生児においてラクトフェリンが敗血症の発生率、敗血症による死亡率を低下させたという臨床試験がある[19]。これらの報告はラクトフェリンが自己免疫性疾患、炎症性疾患において保護的に機能する内因性物質であることを示唆する。

DNA やヒストン等の核内成分に加えて、NETs 上にはラクトフェリンやエラスターゼ等の顆粒蛋白が存在している[20]。エラスターゼは NETs 形成には必須とされている[21]が、ラクトフェリンの生理学的意義は現在のところ不明の部分が多い。本研究において我々はラクトフェリンが NETs 形成に及ぼす影響を検証し、ラクトフェリンが NETs 形成の内因性抑制物質であり、その外因性投与より抗炎症効果が発揮されることを見出した。

方法

動物

6~11 週齢の雌 spontaneous crescentic glomerulonephritis – forming mouse/Kinjoh (SCG/kj)、8 週齢の野生型雄 C57BL6/j を購入（日本エスエルシー）した。全ての動物実験は東京大学大学院動物実験委員会の規則に則り承認を得たうえで施行した（承認番号 医 - P11 - 081）。

SCG/kj における生存曲線、血漿 MPO-ANCA 抗体価、DNA 濃度、腎組織

SCG/kj の食餌は 2%ウシラクトフェリン含有又は非含有飼料（ラクトフェリンは NRL ファーマが供与、オリエンタル酵母で精製）を 8 週齢から経口投与した。血清 MPO-ANCA 抗体価は 12 週齢の SCG/kj から血漿 DNA 濃度は 13 週齢の SCG/kj から EDTA 採血管に末梢血を採取し 6000 rpm、5 分間遠心し Picogreen dsDNA assay reagent (Invitrogen/Life Technologies)、Multiplex により測定した。18 週齢の SCG/kj から腎臓を採取し 4%パラホルムアルデヒド(PFA)中に保存し腎組織標本を作製、マッソントリクローム染色を行い顕微鏡下に観察した。

Local Shwartzman Reaction (LSR) 及び air pouch model

薬物誘発性局所血管炎である Local Shwartzman Reaction (LSR)に対するラクトフ

エリンの効果を過去の報告[22]と同様に検証した。C57BL6/j に 2%ウシラクトフェリン含有又は非含有飼料を 6 週齢から 2 週間経口投与した。第 1 日目 PBS(-) を溶媒とした大腸菌由来 lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich) 100 µg/100 µL/匹を 30G 針により皮下注射した(注射部位は 2 日前にあらかじめ剃毛を済ませた)。第 2 日目 recombinant mouse TNFα (R&D Systems) 0.3 µg/100 µL/匹を同部位に皮下注射した。第 3 日目に同部位を肉眼的に評価し皮膚を採取後マッソントリクローム染色下で観察した。また、LSR において惹起される皮下出血及び血栓形成が NETs に起因することを確認する目的で背部皮下に 5 mL 空気の注射により air pouch を作製した。LPS 刺激 2 日前に背部皮下に 30G 針を用い 5 mL の空気を急速に注射した。第 1 日目に LPS 100 µg/100 µL/匹を air pouch 内に注入した。第 2 日目に TNFα 0.3 µg/100 µL/匹を air pouch 内へ注入、6 時間後に 2 mL の PBS(-)で洗浄した。NET-DNA を含む洗浄液を 6000 rpm で 5 分間遠心し上澄み中の NET-DNA を Picogreen dsDNA assay reagent を用いて測定した。好中球を含む細胞成分をスライドガラス上に Cytospin 2 (Block Scientific, Inc)を用いて収集し DNA 染色剤 5 µM DRAQ5 (Abcam)で染色、顕微鏡下に観察した。

好中球抽出

ヒト末梢血(15 mL)を定期的内服薬のない健常成人より採取した。EDTA 含有採

血管に採取したヒト末梢血を Mono-Poly Resolving Medium (DS Pharma Biomedical, Co. Ltd)を用い分離した。赤血球は氷冷蒸留水により 30 秒間で溶血させた。採取した好中球は 2%ヒト血清アルブミン(Sigma-Aldrich)、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich)、4 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich)中に 8°Cで保存した。採取細胞はギムザ染色を行い、純度が 95%以上の分葉核好中球で構成されていることを光学顕微鏡下に確認した。血小板分離は過去の報告と同様[23]に、クエン酸含有採血管に採取したヒト末梢血を遠心分離し血小板含有血漿を得た。赤血球を塩化アンモニウムにより溶血した後、得られた血小板を培養液中に分離した。以上の血小板の分離は全て室温下で施行した。全ての方法は東京大学医学部倫理委員会の許可を得たうえで施行した(承認番号 3796)。

NETs 形成の定量分析

好中球を顕微鏡観察用培養皿 μ -Slide 8well plates (Ibidi)に 1×10^5 cells/well となるよう注入し、2-200 $\mu\text{g/mL}$ ヒト好中球由来ラクトフェリン(Sigma-Aldrich)、NADPH oxidase 抑制薬として 10 μM diphenyleneiodonium chloride (DPI, Sigma-Aldrich)、カタラーゼ抑制薬として 1 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3AT; Wako)、200 U/mL カタラーゼ(Sigma-Aldrich)、5 ng/mL recombinant human TNF α (R&D

systems)、200 µg/mL トランスフェリン(Wako) を刺激 30 分前処置した。12.5-25 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich)により好中球を刺激し顕微鏡下に観察、3 時間後に培養液中 DNA 濃度の定量により NETs 形成を評価した。また、5 µg/mL 抗 myeloperoxidase (MPO)-ANCA 抗体(Acris Antibody)により好中球を刺激し顕微鏡下に観察を行い刺激から 3 時間後に培養液中 DNA 濃度を定量した。また、 5×10^5 好中球あたり 5×10^6 活性化血小板により好中球を刺激し、1 時間後に培養液中 DNA 濃度を定量し NETs 形成を評価した。血小板は 50 µM トロンビン受容体刺激蛋白; thrombin receptor-activating peptide (TRAP, Sigma-Aldrich)30 分間の前処置によりあらかじめ活性化し、好中球の刺激に使用した。画像撮影においては DNA 染色のために好中球に 500 nM SYTOX green (Invitrogen/Life Technologies)、5 µM DRAQ5 (Abcam)を添加、次亜塩素酸; hypochlorous acid (HOCl)検出に Kenmoku ら[24]が開発した 500 nM HySOx、細胞膜の染色に 5 µg/mL weat germ agglutinin (WGA; Invitrogen/Life Technologies)を刺激 30 分前に好中球へ添加した。NETs 形成の可視化のため蛍光共焦点顕微鏡 (Leica SP5)を用い 37°C 下で観察した。SYTOX green、HySOx、tetramethylrhodamine 標識 WGA、DRAQ5 の蛍光強度はそれぞれ 500-540、560-620、650-750 nm で検出、励起波長はそれぞれ 490、550、630 nm とした。NETs 形成の肉眼的定量には、細胞外へ SYTOX green の蛍光が放出されたものを NETs 形成したと考えカ

ウントし同視野中の全細胞数で除算した。さらに NET-DNA の客観的定量のため、1.5 mL マイクロチューブ内で 400 μ L 培養液中に分注した 1×10^5 個の好中球に PMA 刺激により NETs 形成を惹起し、NET-DNA 濃度を Picogreen dsDNA assay reagent を用い測定した。活性化血小板による NETs 形成を過去の報告[25]と同様に評価した。1.5 mL マイクロチューブ内で 400 μ L 培養液中に分注した 5×10^5 個の好中球に選択的トロンボキサン受容体拮抗薬として 10 μ M SQ29548 (Santa Cruz Biotechnology)、200 μ g/mL ラクトフェリンをそれぞれ刺激 10 分前、30 分前に添加した。

蛍光顕微鏡

1×10^5 個の好中球を 200 μ g/mL ヒトラクトフェリン存在下で 25 nM PMA により刺激した。37°C、5% CO₂ 下で各時間共培養し、サイトスピンによって microslide glass (Matsunami) 上に固定した。好中球は 4% PFA で 15 分間固定し、3% BSA で 1 時間ブロッキングした。あらかじめ蛍光標識した抗ラクトフェリン抗体(1:100, Hytest Ltd)、抗エラスターゼ抗体 (1:200, Calbiochem/Merck millipore)、および DRAQ5、5 μ g/mL WGA により 1 時間室温で染色した。抗ラクトフェリン抗体は Alexa 488 SE (Invitrogen/Life Technologies)、抗エラスターゼ抗体は Alexa Fluor 546 (Invitrogen/Life Technologies) で PD-10 30 columns (GE Healthcare UK Ltd) を用いて

蛍光標識した。

活性酸素種産生の分析

1×10^5 好中球を 1.5 mL マイクロチューブに分注し、200 $\mu\text{g/mL}$ ラクトフェリン、10 μM DPI、Setsukinai ら[26]が開発した 500 nM HPF (ヒドロキシラジカル; $\text{OH}\cdot$ の蛍光プローブ) および 500 nM HySOx と 30 分間室温で共培養した後、25 nM PMA により各時間(0~4 時間)刺激した。HPF、HySOx はそれぞれヒドロキシラジカル、次亜塩素酸に対する蛍光プローブとして使用した。PMA により ($t=0$) 37°C、5% CO_2 下で刺激し、蛍光強度を BD Accuri C6 flow cytometer (BD)を用いて測定した。

siRNA トランスフェクション

Neutrophil-like human myeloid leukemia cell line (HL-60)細胞 (CCL240, ATCC)を 20% fetal bovine serum (FBS; ATCC)、抗生物質 (50 $\mu\text{g/mL}$ ペニシリン、50 $\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン、100 $\mu\text{g/mL}$ ネオマイシン; Sigma-Aldrich)含有 IMDM (ATCC)中に 37°C、5% CO_2 で培養した。HL-60 細胞に対するラクトフェリン siRNA のトランスフェクションを manufacture's instruction (Qiagen)に従い施行した。6-well プレートに 1×10^5 個の HL-60 細胞を分注し、300 ng ラクトフェ

リン siRNA (Cat No; SI00036407, Sequence: ACCCTTGATGGTGGTTTCATA, Qiagen)またはネガティブコントロールとしての非特異的 siRNA (Qiagen)を 24 μ L Hipertext transfection reagent (Qiagen)を用いて一晩、37°C 5% CO₂ 下で HL-60 細胞にトランスフェクションした。翌日から HL-60 細胞を HL-60 granulocyte へ分化させる目的で 1.25% Dimethyl sulfoxide (DMSO; ATCC)と 3 日間培養し分化した HL-60 顆粒球を得た。ラクトフェリン mRNA のノックダウンを確認するため RNeasy (Qiagen)を用いて RNA を抽出し High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems/Life Technologies)を用いて cDNA を合成した。遺伝子発現評価のため comparative threshold cycles (CTs)を、TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems/Life Technologies)と下記の 6-carboxyfluorescein (FAM)で標識したプライマーを用いた Step One Plus Real-Time PCR systems (Applied Biosystems/Life Technologies)によって解析した。プライマーは LTF; TCTGGTGCCTTCAAGTGTCTGAGAG, Lot: Hs00914334-m1 又は GAPDH; CAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACT, Lot: Hs03929097-g1 を使用した。Real-Time PCR 解析では holding stage として 50°C 2 分、95°C 10 分、計 40 サイクルの cycling stage として 95°C 15 秒、60°C 1 分 の条件下で反応させた。NET-DNA を定量するため、HL-60 細胞、siRNA 又は negative control siRNA 処置をした HL-60 細胞を 1×10^5 個ずつ 1.5 mL マイクロチューブに分注し 400 μ L の

培養液に懸濁した後、25 nM PMA で刺激し NETs 形成を惹起した。37°C、5% CO₂ 下で 3 時間培養した後、培養液上清 400 μL 中の DNA 濃度を Picogreen dsDNA assay reagent を用いて測定した。

ウェスタンブロッティング

好中球を 200 μg/mL ラクトフェリンまたは 10 μM DPI と 30 分間室温で培養し、25 nM PMA により各時間(0 - 3 時間)まで 37°C、5% CO₂ で刺激した。無細胞条件下でラクトフェリンがエラスターゼによってひき起こされるヒストン分解 (elastase-mediated degradation of histones)に及ぼす影響を検証するため、1 μg ヒト由来ヒストン H1 (New England BioLabs)、1 μg ヒト由来ヒストン H4 (New England BioLabs)と 200 μg/mL ラクトフェリンを 30 分間室温で処置後、20 mU/μL ヒト白血球由来エラスターゼ(Sigma-Aldrich) を添加し(t = 0)、各時間(0 - 2 時間)37°C、5% CO₂ で培養した。ラクトフェリン siRNA の標的となるラクトフェリン蛋白の発現量を確認するために未分化 HL-60 細胞または分化 HL-60 細胞および siRNA トランスフェクション HL-60 細胞を Cell lysis buffer (20 mM Tris-HCl、pH 7.6、150 mM NaCl、1% Triton X-100、1 mM EDTA 及び EGTA、蛋白分解酵素阻害カクテル[Sigma-Aldrich])で溶解した。DC protein assays (BIO-RAD Laboratories)により検体の蛋白濃度を測定し検体の蛋白量を均一にした。検体は

10%または12% – 20% gradient Mini-PROTEAN Precast Gels (Bio-Rad Laboratories) に SDS-PAGE し PVDF membrane(GE Healthcare UK Ltd)に転写し 5% skim milk でブロッキングした。抗体はマウス抗ヒストン H1 抗体 (1:200 Merck Millipore)、ウサギ抗ヒストン 2B 抗体(1:1000 Merck Millipore)、ウサギ抗ヒストン H3 抗体 (1:1000 Merck Millipore)、ウサギ抗ヒストン H4 抗体(1:1000 Merck Millipore)、ウサギ抗ヒストン citH3 抗体(1:2000 Abcam)、horseradish peroxidase (HRP) 結合ウサギ抗ラクトフェリン抗体(1:1000 Abcam)、ウサギ抗 β アクチン抗体(1:1000 Abcam)、二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 結合ヒツジ抗 IgG 抗体 (Abcam)を使用した。抗ラクトフェリン抗体によって得られたバンドがラクトフェリンに特異的なバンドであることは、蛋白中和法により manufacture's instruction (Santa Cruz Biotechnology, data not shown)に従い確認した。シグナルは Image J processing software を使用しバンドの濃度を測定後、補正のために β アクチンバンドの濃度で除算することで定量した。

エラスターゼ活性測定

ラクトフェリンのエラスターゼへの直接的な抑制効果を検証するため SenoLyte Green Elastase Assay Kit (ANA Spec)を用いてエラスターゼ活性を manufacturer's instructions に従い測定した。蛍光色素標識化エラスチンがエラスターゼによって

分解され、それに伴い増加する蛍光強度を測定することでエラスターゼ活性を定量した。蛍光強度は Wallac 1420 ARVO MX (Perkin Elmer) を使用し測定した。

電子顕微鏡

1×10^6 個の好中球に 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ラクトフェリンを 30 分間前処置し 25 nM PMA により刺激後 37°C、5% CO_2 で 3 時間培養した。透過型電子顕微鏡: Transmission electron microscopy (TEM) による観察では、スライドガラス上へ接着した好中球を 2% グルタルアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) により 4°C 下で固定した。さらに 2% OsO_4 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) により後固定した。検体をエタノールで乾燥、プロピレンオキサイド処置後 epoxy resin (Quetol 812) で固定した。Leica EM UCT ultra microtome を用いて超薄切片を作成し 2% ウラニル酢酸で染色した。検体を JEM-1200EX 電子顕微鏡 (JEOL, 80kV) を用いて観察した。走査型電子顕微鏡: Scanning electron microscopy (SEM) においては 2% グルタルアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) および 2% OsO_4 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) により固定した。検体をエタノールで乾燥後 osmium plasma coater (OPC80N; Filgen) を用いてコーティングし SEM (JSM-6320F; JEOL) により観察した。

NETs 電気泳動

NETs 電気泳動は過去に報告されている方法[27]に従い、 1×10^7 好中球を 25 nM PMA で刺激後 37°C、5% CO₂ で培養し NETs を惹起した。刺激から 3 時間後に遠心分離したペレットから DNA Extractor SP kit (Sigma-Aldrich)を用い NET-DNA を TE buffer に溶出させた。抽出した NET-DNA と 200 µg/mL ラクトフェリン、10 U/mL ヘパリン(Sigma-Aldrich)、1 mg/mL LPS、1 U/mL DNase1 (Roche Diagnosis) を 37°C、5% CO₂ で 1 時間培養した。検体を 5×10^4 好中球由来 NET-DNA/lane とするよう 1% アガロースゲルに電気泳動を行い、臭化エチジウムで染色後、紫外線により可視化した。

統計解析

生存曲線は Kaplan-Meier 法で作成し、ログランクテストで検証した。データは平均 ± 標準誤差: Standard error of the mean (SEMs) で表示した。2 群を比較するために unpaired t test を用い、 $P < 0.05$ を有意差とした。統計分析は JMP 10 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。

結果

ラクトフェリンは *in vitro* で NETs 形成を抑制する

ヒト由来好中球に対しプロテインキナーゼ C の活性化薬である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を用いて NETs 形成を惹起した。細胞膜非透過性の DNA 染色剤である SYTOX green に染色された細胞外への DNA 放出を刺激から 3 時間後に観察した。NADPH oxidase inhibitor である DPI は活性酸素種産生遮断によって PMA が惹起する NETs 形成を抑制することが知られており [6]positive control として使用した。ラクトフェリンは顕微鏡下での肉眼的評価 (図 1A, B) において NETs 形成を著明に抑制した。NETs 形成の客観的な指標として培養液中 DNA 放出量を定量(図 1C)したところ、肉眼的評価と同様に NETs 形成を濃度依存性に抑制した。一方でラクトフェリンと同様鉄結合蛋白の一つであり同程度の分子量(80 kDa)であるトランスフェリンは PMA により惹起される NETs 形成を抑制しなかった(図 1E)。さらに PMA 刺激から 1 時間、2 時間時点でラクトフェリン添加によっても NETs 形成は有意に抑制された(図 1D)が、これはラクトフェリンの NETs 抑制点が NETs 形成の後半にあることを示唆する。走査型電子顕微鏡においてはラクトフェリンが NETs の形態学的特徴に大きな影響を与えている事が示唆される。すなわち PMA の惹起する NETs 形成において、ラクトフェリン非存在下では一本一本の DNA 線維が網目状に拡散するように観察さ

れたのに対し、ラクトフェリン存在下では放出された DNA 線維が一塊に凝集しているように観察された(図 1F)。この実験結果はラクトフェリンが循環血漿中で NETs の拡散を抑制していることを支持する。

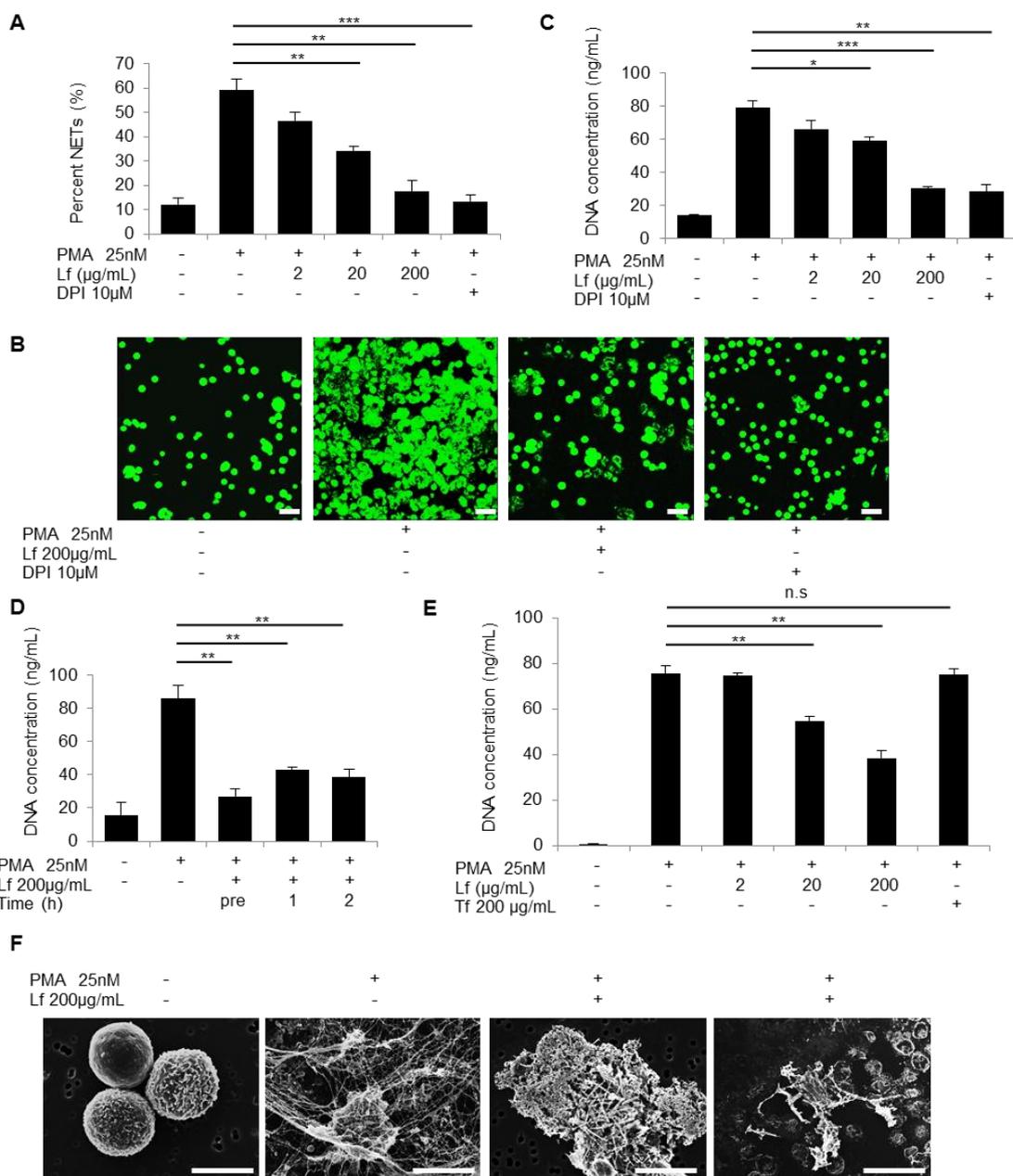


図 1 ラクトフェリンが *in vitro* で NETs 形成を抑制する

(A) 各濃度のヒト由来ラクトフェリン前処置を行った好中球に対し、25 nM PMA により NETs 形成を惹起した。NETs 形成は PMA 刺激後 3 時間の時点で顕微鏡下にカウントした。DPI (10 μM) を positive control として使用した。各群: n = 3, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (B) 200 μg/mL ラクトフェリンの前処置を行った好中球を、刺激から 3 時間後顕微鏡下に観察した。500 nM SYTOX green によって細胞外 DNA を緑色に染色した。Scale bars: 40 μm。 (C) 各濃度のラクトフェリン前処置における培養液中に放出された DNA 濃度。各群: n = 3, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,

*** $P < 0.001$ 。(D) 各時間に 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ラクトフェリンを処置し培養液中への DNA 放出量を定量。各群: $n = 3$, ** $P < 0.01$ 。(E) 好中球を各濃度のラクトフェリン(Lf)及びトランスフェリン(Tf)で前処置後 25 nM PMA により刺激し NETs 形成を惹起、培養液中 DNA 濃度を示す。各群: $n = 3$, ** $P < 0.01$ 。(F)ラクトフェリン処置が及ぼす NETs の形態学的変化を走査電子顕微鏡(SEM)下に観察した。ラクトフェリン非存在下で明瞭に観察された各々の NET 線維(左 2 番目)が、外因性ラクトフェリン存在下(右 2 図)では凝集したように観察される。Scale bars: 5 μm (左 3 図)、40 μm (右図)。データは平均 \pm SEMs で表示し、独立した 3 回の実験で確認した。

内因性ラクトフェリン除去が HL-60 細胞における NETs 形成を増強する

内因性ラクトフェリンが NETs 形成に及ぼす影響を検証した。ヒト末梢血由来好中球は終末分化細胞であり寿命が短いことから遺伝的操作が困難であるため、ヒト骨髄系白血病細胞であり好中球同様に NETs 形成を起こすことが知られている HL-60 細胞 [28]を実験に使用した。HL-60 細胞に対して small-interference RNA (siRNA)を用いてラクトフェリン mRNA のノックダウンを行った。ラクトフェリン mRNA および蛋白の発現量は細胞の分化後に有意に増加した(図 2A, B)。次にラクトフェリン siRNA のノックダウン効率を解析するために、ラクトフェリン mRNA 発現量を real time PCR を用いて、ラクトフェリン蛋白の発現量を western blotting を用いて測定した。ラクトフェリン mRNA 発現量は、negative control (scramble) siRNA 処置細胞、ラクトフェリン siRNA 処置細胞において非処置細胞と比較しそれぞれ 56%、81%の低下をみとめた。Negative control siRNA 処置細胞と比較しラクトフェリン siRNA 処置によるラクトフェリン

mRNA 発現量を 54% ノックダウンし得た(図 2C)。また、ラクトフェリンの蛋白発現量は 49% の低下をみとめた(図 2D)。HL-60 granulocytes に PMA 刺激により NETs 形成を惹起したところ、培養液中の細胞外 DNA 放出量はラクトフェリン siRNA 処置細胞において negative control siRNA 処置細胞と比較し 2.2 倍に増加した(図 2E)。この結果はラクトフェリンが NETs の内因性抑制物質であることを示唆する。

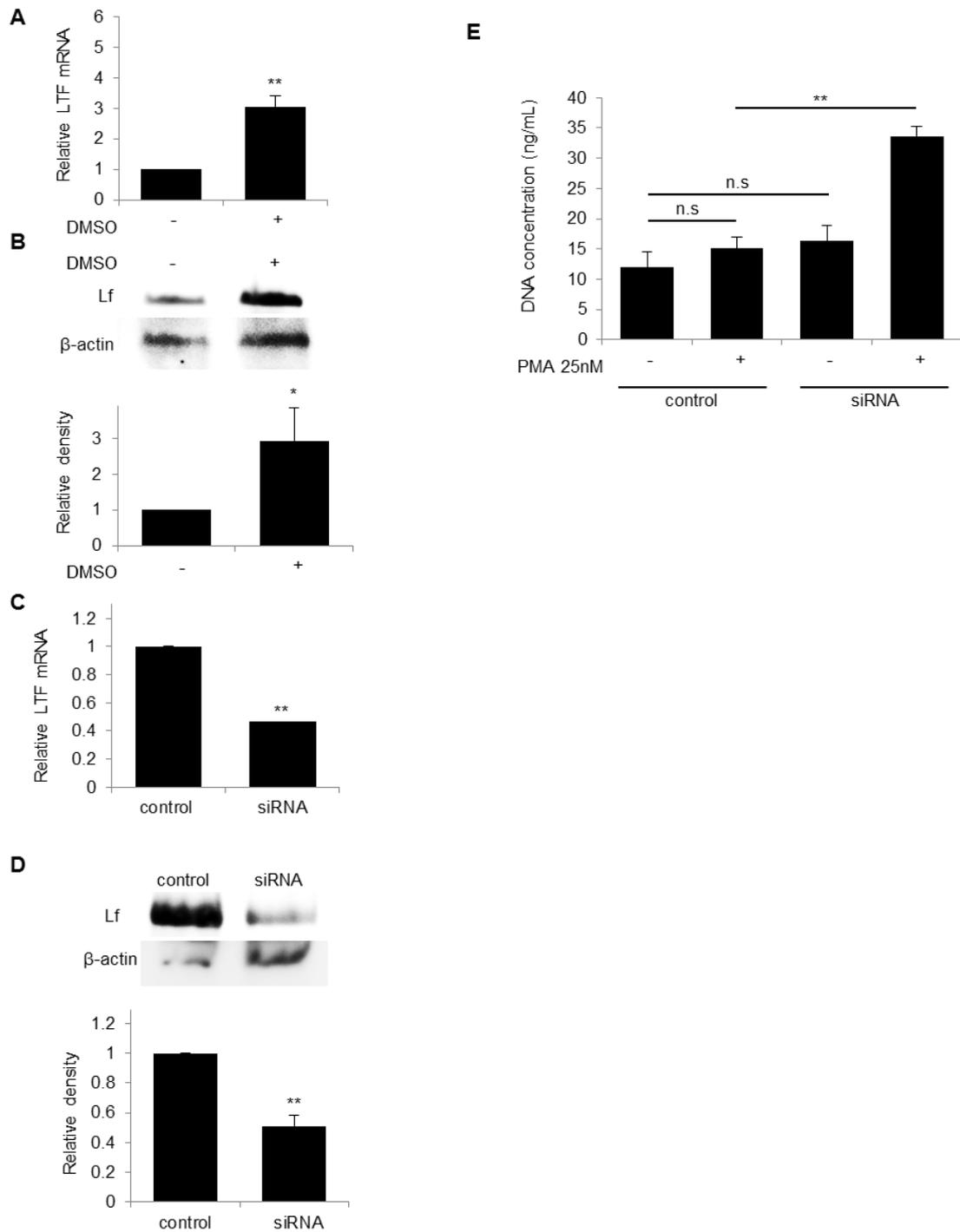


図 2 ラクトフェリン発現の低下が HL-60 細胞における NETs 形成を増強する (A, B) HL-60 細胞分化後の siRNA 処置によるラクトフェリンノックダウンの評価。(A) 1.25 % DMSO による分化後にラクトフェリン mRNA を real time PCR を用い測定した。各群: $n = 6$, $**P < 0.01$ 。(B) ラクトフェリン蛋白量をウェスタンブロットティングによって定量した(上図; メンブレン画像、下図; β アクチン発現量による補正ラクトフェリン蛋白量の比較。各群 $n = 3$, $*P < 0.05$)。(C, D) siRNA トランスフェクションによるラクトフェリン除去。ラクトフェリン siRNA 処置細

胞における(C) ラクトフェリン mRNA 発現量及び(D) 蛋白発現量(上図; メンブレン画像、下図; β アクチン発現量による補正ラクトフェリン蛋白定量)各群: n = 5 (C), n = 3 (D), $**P < 0.01$ 。(E) ラクトフェリン siRNA 処置細胞における培養液中細胞外 DNA 濃度。各群: n = 3, $**P < 0.01$ 。データは平均 \pm SEMs で表示し、独立した 3 回の実験で確認した。

ラクトフェリンは NETosis において細胞膜に局在する

NETosis におけるラクトフェリン、エラスターゼの局在を共焦点顕微鏡下に観察した(図 3A, C, D)。ラクトフェリン、エラスターゼ両者とも無刺激の好中球においては細胞質中に存在していた(図 3A, C)。PMA 刺激 2 時間後、ラクトフェリンは細胞膜に沿って分布した(図 3D)。さらに培養液中へ外因性に添加したラクトフェリンもまた無刺激および PMA 刺激 2 時間後に細胞膜上に分布した(図 3B, E)。刺激 3 時間後にラクトフェリン及び DNA 染色陽性の網目状 DNA 構造が過去の報告と同様[20]に観察された(図 3F)。

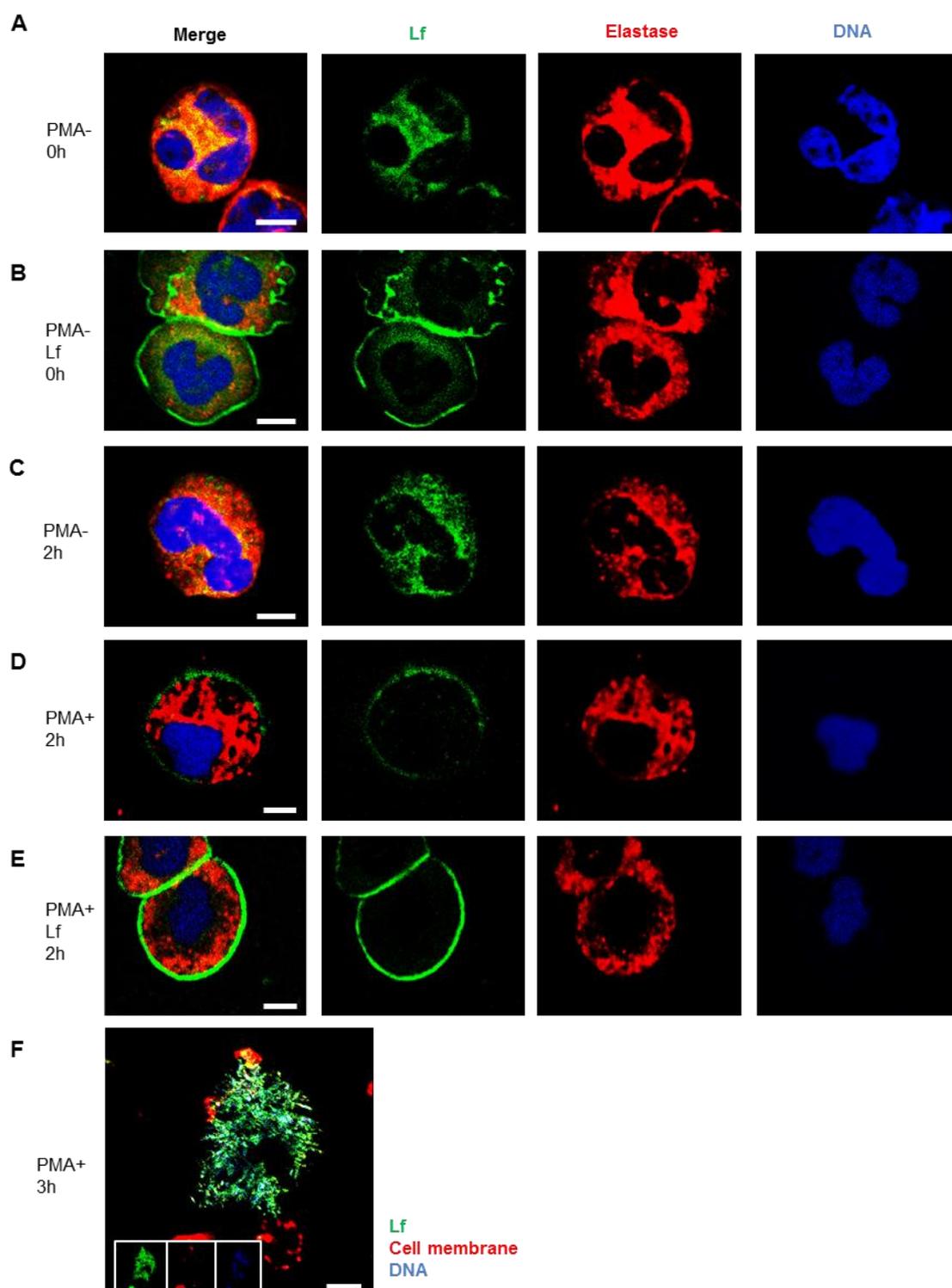


図 3 ラクトフェリンは NETosis において細胞膜に局在する
 (A, C, D) 代表的な蛍光免疫染色画像(ラクトフェリン: 緑、エラスターゼ: 赤、DNA: 青)。ラクトフェリン及びエラスターゼは無刺激の好中球において 0 時間 (A)、2 時間(B)時点で細胞質に存在していた。(D) PMA 刺激から 2 時間後、ラクトフェリンは細胞膜に局在した。外因性ラクトフェリンの添加は 0 時間(B)、2

時間(E)時点で細胞膜に分布した。Scale bars: 5 μm 。(F) 3 時間後、網目状 DNA 構造上にラクトフェリン(緑)、DNA(青)が同定された。Scale bar: 10 μm 。データは独立した 2 回の実験で確認した。

ラクトフェリンは NET-DNA と電荷的に結合する

ラクトフェリンの N 末端に同定されている強い陽性荷電部位が、DNA の陰性荷電と電荷的に結合することが知られている[29, 30]。ラクトフェリンが NET-DNA と電荷的に結合すると仮説を立て検証した。既報と同様[26]に NET-DNA を PMA により刺激したヒト好中球から抽出し電気泳動により解析した。NET-DNA 及びウシ胸腺由来 DNA のバンドはラクトフェリン処置によって上方へシフトしたが、この効果は陰性荷電を帯びた代表的な物質であるヘパリン、LPS の添加によって打ち消された(図 4A, B)。この結果はラクトフェリンが NET-DNA と電荷的に結合することを示唆する。この上方へシフトしたバンドが NET-DNA であることは DNase1 処置によってバンドが消失することにより確認した(図 4C, D)。

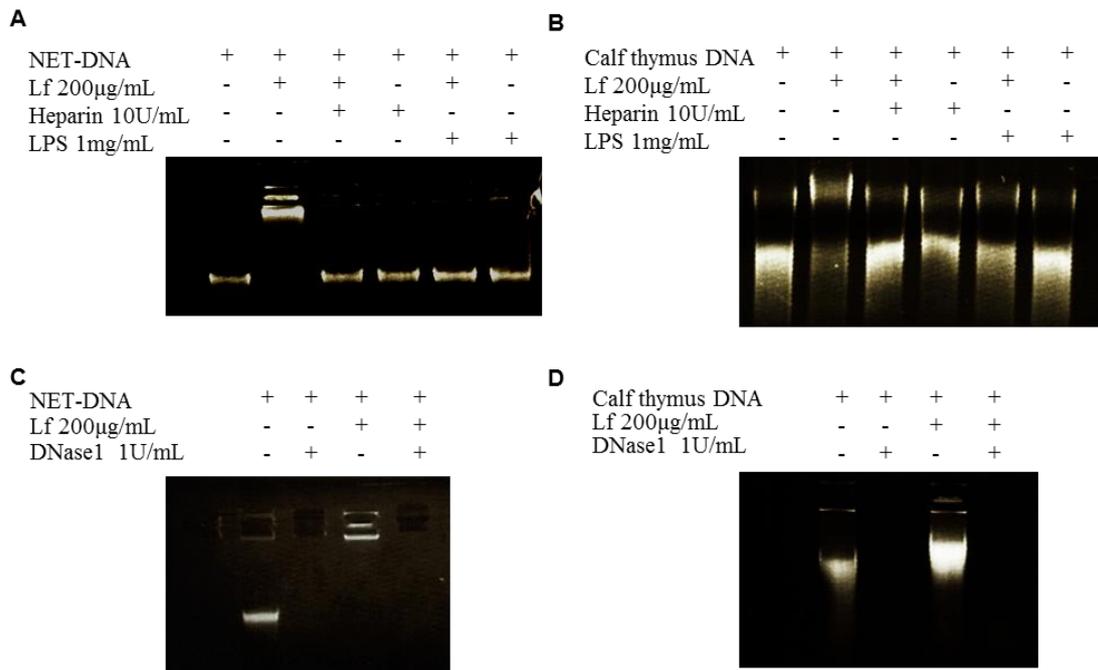


図 4 ラクトフェリンは NET-DNA と電荷的に結合する

ヒト好中球から抽出した NET-DNA (A)及びウシ胸腺由来 DNA(B)をラクトフェリン処置又は未処置後 1%アガロースゲルを使用した電気泳動により解析した。ヘパリン及び LPS を陰性荷電物質として使用し、バンドの上方へのシフトが観察された。NET-DNA (C)及びウシ胸腺由来 DNA(D)をラクトフェリン存在下又は非存在下で DNase1 処置を行った。データは 3 回の独立した実験の代表的画像を示した。

ラクトフェリンは NETosis において ROS 産生及びヒストン H3 シトルリン化を抑制しない

PMA 刺激により惹起される NETs 形成は活性酸素種(ROS)依存性である[6, 31] ため、この過程に対するラクトフェリンの影響を検証した。PMA 刺激を行った好中球に対し生細胞における ROS 産生解析のための蛍光プローブ、すなわち HPF (ヒドロキシラジカル; OH \cdot を始めとした ROS に対する蛍光プローブ)及び

HySO_x (次亜塩素酸; HOCl に対する蛍光プローブ)を用いて解析を行った。これらの ROS に対する蛍光プローブの蛍光強度をフローサイトメトリー(FACS)によって定量したところ、PMA 刺激後 ROS 産生が時間依存的に増加することが示された(図 5A, B, D, E)。NADPH oxidase 抑制薬である DPI がこれらの蛍光プローブの蛍光強度を有意に低下させるのに対しラクトフェリンには ROS 産生の抑制効果はみとめなかった(図 5C, F)。生細胞を用いた動画における ROS 産生の検出系においてもラクトフェリンは HOCl 産生を抑制しなかった(data not shown)。

カタラーゼは過酸化水素の分解を触媒する酵素であるが、NETs 形成を抑制する作用があると報告されている[6]。ラクトフェリンがカタラーゼ活性を上昇させることで NETs 形成を抑制している可能性を検証するために、好中球に対してカタラーゼ抑制薬である 3AT を前処置し PMA 刺激により NETs 形成を惹起した。カタラーゼが培養液中 DNA 放出を有意に抑制する一方で 3AT は培養液中 DNA 放出を逆に増強する傾向をみとめた。ラクトフェリンは 3AT の存在下でもなお培養液中の DNA 濃度を低下させた(図 5G)。この結果はラクトフェリンがカタラーゼとは独立に NETs 形成を抑制していることを示唆する。

Peptidylarginine deiminase 4 (PAD4)が触媒するヒストン H3 シトルリン化は NETs 形成には不可欠であることが知られており[28, 32]、深部静脈血栓症の発症にも重要な役割を持つことが報告されている[33]。PAD4 の基質と PAD4 を反

応させ、その過程で生じる副産物を指標として PAD4 活性を測定したが、ラクトフェリンが PAD4 の活性化を抑制するという所見は得られなかった(data not shown)。また PMA により誘導されたヒストン H3 シトルリン化は DPI で抑制される一方で、ラクトフェリンには抑制効果はみとめられなかった(図 5H)。オートファジーもまた NETs 形成に重要であることが示唆されており[34]、空胞形成がオートファジーの形態学的特徴である[35]。透過型電子顕微鏡(TEM)による解析では、ラクトフェリンの存在下でも PMA 刺激により誘導される細胞内の空胞形成は抑制されなかった(図 5I)。この結果はラクトフェリンがオートファジーとは独立に NETs 形成を抑制したことを示唆する。

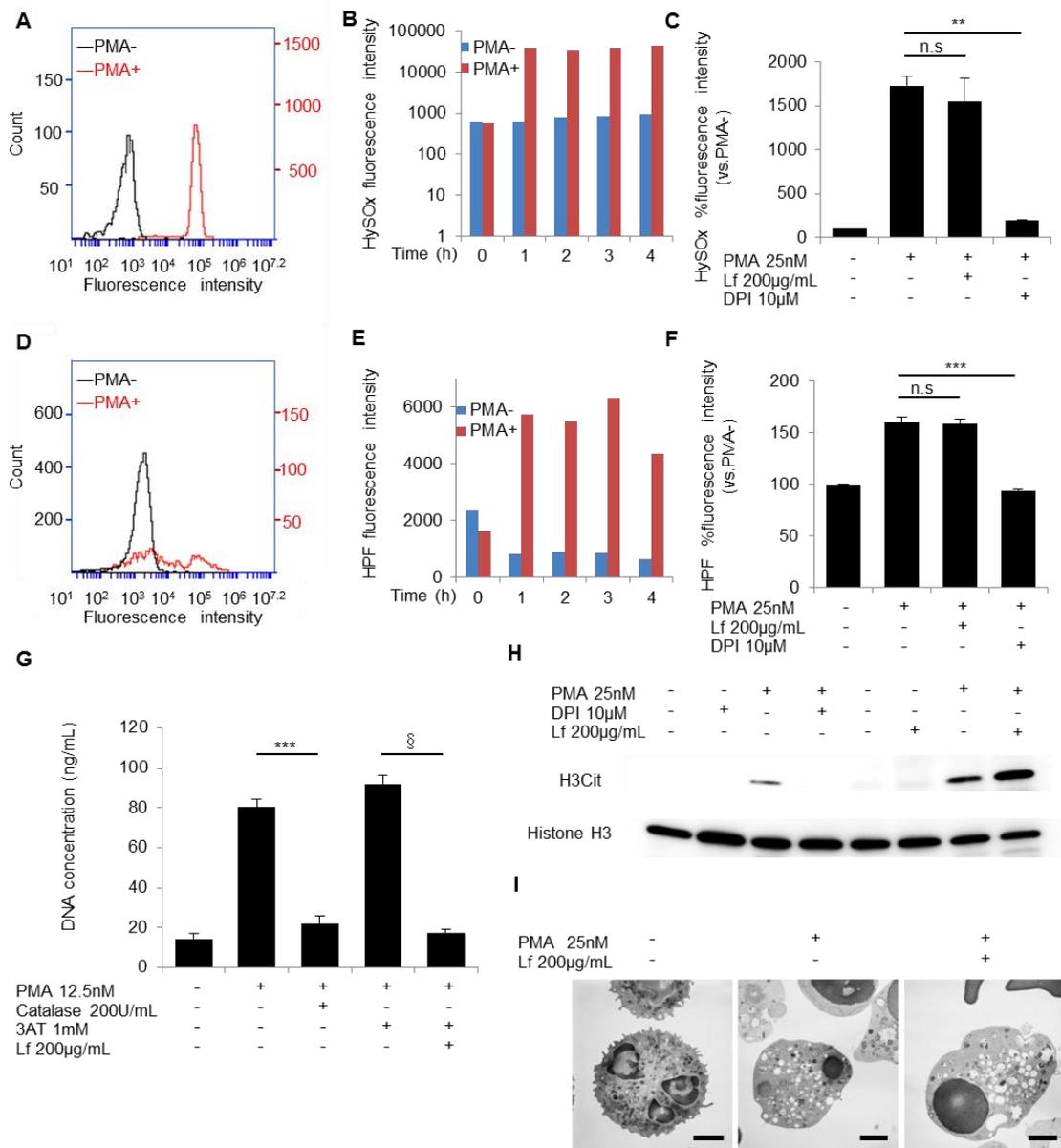


図 5 ラクトフェリンは NETosis において ROS 産生及びヒストン H3 シトルリン化を抑制しない

(A-G) ROS 産生、(H) ヒストン H3 シトルリン化、(I)オートファジーに及ぼすラクトフェリンの影響。PMA 刺激の 30 分前に培養液中に添加した HySOx(A-C)及び HPF(D-F)の蛍光強度を各時間(B, E)又は 1 時間後(A, C, D, F)に測定した。各群: n = 3、**P < 0.01、***P < 0.001。(G) 12.5 nM PMA で刺激後の培養液中 DNA 濃度をカタラーゼ、ラクトフェリン、3AT の存在下(又は非存在下)で測定した。各群: n = 3、***P < 0.001、§P < 0.001。(H) ウェスタンブロッティングを用い PMA 刺激後のヒストン H3 シトルリン化を DPI 及び Lf 存在下に定量した。データは独立した 2 回の実験により確認した。(I) TEM 下に PMA 刺激を行った好中球の

空胞形成を観察した。画像は独立した2回の実験により確認した。Scale bars: 2 μm 。データは平均 \pm SEMで表示した。

ラクトフェリンはエラスターゼの核移行及びエラスターゼによるヒストン消失を抑制しない

NETosisにおいて、好中球エラスターゼが細胞質顆粒から核へ移行し、ヒストンの分解及び核の膨張を引き起こすことが知られている[21]。このプロセスがラクトフェリンによって影響を受ける可能性について検証した。蛍光標識化されたエラスターゼ基質であるエラスチンがエラスターゼによって分解される過程を定量したが、ラクトフェリンはこの過程に影響を及ぼさなかった(図 6A)。PMA刺激後の好中球を4% PFAで固定し抗エラスターゼ抗体を用いた免疫蛍光染色により観察したところエラスターゼの核移行はラクトフェリンの存在下でも影響を受けなかった(図 6B)。エラスターゼはヒストン H1 及び H4 を分解するが、ウェスタンブロット法を用いて無細胞系で検証したところ、ラクトフェリンはエラスターゼが引き起こすヒストン分解に影響を与えなかった。さらにPMA刺激に引き続く好中球細胞内におけるヒストン分解をヒストン H2B、H3 及び H4 に対する抗体を用いて検出したが、ラクトフェリンはこれらのヒストン分解に影響を及ぼさなかった(図 6C)。

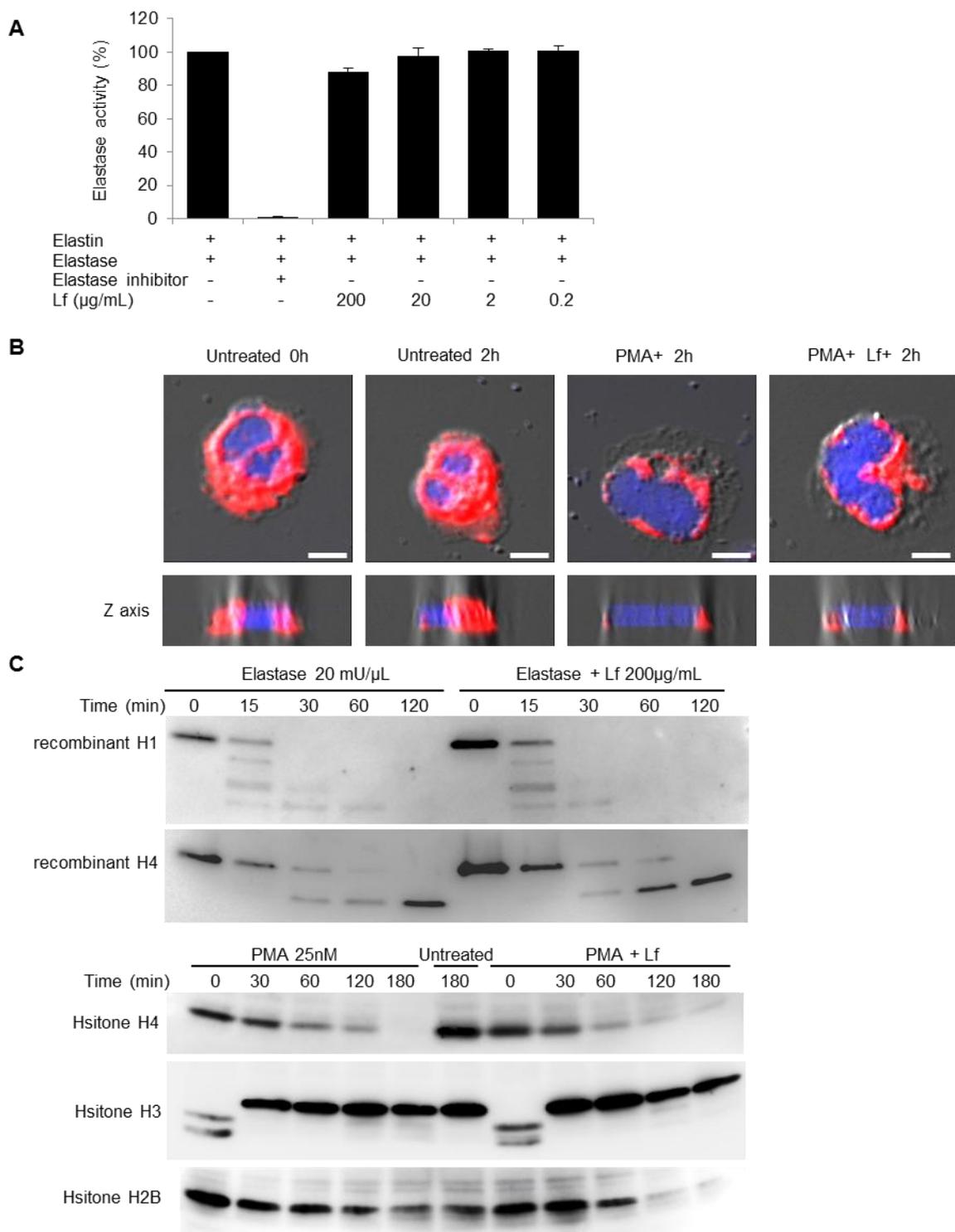


図 6 ラクトフェリンはエラスターゼの核移行及びエラスターゼが惹起するヒストン消失を抑制しなかった

(A) 標識エラスチンがエラスターゼによって分解される過程で増強する蛍光強度を、エラスターゼ活性の指標として測定した。データは独立した 3 回の実験により確認した。(B) ラクトフェリンの前処置を行い PMA 刺激から 2 時間後に

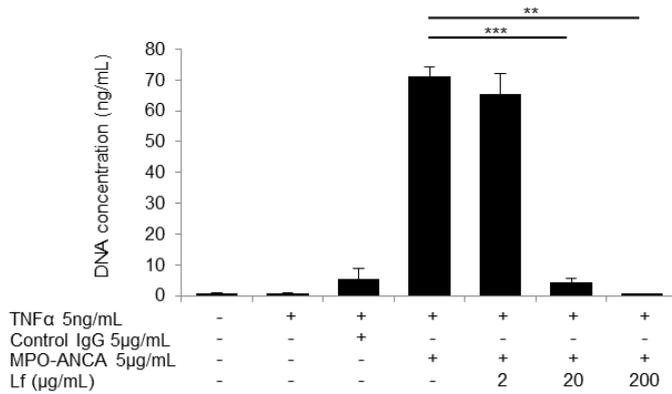
好中球を固定・染色し標識抗エラスターゼ抗体及び DRAQ5 でエラスターゼ(赤)、DNA(青)を共焦点顕微鏡下に観察した。Z 軸画像を下図に示す。(C) ラクトフェリン処置又は未処置のヒト由来ヒストン H1 及び H4 にエラスターゼを処置しウェスタンブロッティング法で解析した(上 2 図)。好中球をラクトフェリン存在下又は非存在下で PMA により刺激し、抗 histone H2B、H3、H4 抗体を用い検出した(下 3 図)。図は独立した 2 回の実験により確認した。

ラクトフェリンは in vitro で MPO-ANCA により惹起される NETs 形成を、in vivo で MPO-ANCA が惹起する腎炎を抑制する

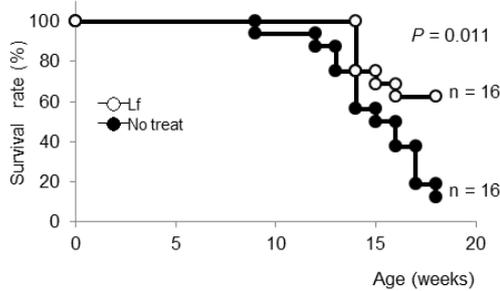
抗好中球細胞質抗体; anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)は好中球細胞質中の分子を抗原とする自己抗体であり、しばしば自己免疫性血管炎患者の血清において産生が亢進している。特に好中球顆粒に含まれる蛋白である myeloperoxidase (MPO)に対する ANCA (MPO-ANCA)は本邦における血管炎患者で高頻度に検出される自己抗体であり、既報の基礎的研究において直接的に好中球を刺激し NETs 形成を惹起することで血管炎の病態に関与することが知られている[9]。ラクトフェリンは MPO-ANCA が惹起する NETs 形成を in vitro において有意に抑制した(図 7A)。次に MPO-ANCA 産生亢進を特徴とする動物モデルで、ヒトの ANCA 関連血管炎の自然発症動物モデルとして知られている SCG/kj マウスに対してラクトフェリンの経口投与を行った。SCG/kj マウスは血尿を伴う急性腎不全を呈し、腎においては半月体形成性糸球体腎炎の病理組織像を呈することが報告されている[36, 37]。我々は 8 週齢の SCG/kj マウスに 2%

ウシラクトフェリンの経口摂取を行った。ラクトフェリンを投与しない群においては 9 週齢から死亡が出現し始め 18 週齢の時点で生存率は 12.5%に低下したのに対し、ラクトフェリン投与群においては 18 週齢時点で 62.5%の生存率であった(図 7B, $P = 0.011$, カプランメイヤー法)。また、12 週齢における血中 MPO-ANCA 産生量はラクトフェリン投与群において有意に低下した(図 7C)。NETs の指標として測定[38-41]した血漿 DNA 濃度はラクトフェリン投与群の 13 週齢の SCG/kj マウスにおいて有意に減少していた(図 7D)。18 週齢の SCG/kj マウス腎組織標本のマッソントリクローム染色においては、ラクトフェリン投与群の半月体形成及び線維化領域の減少をみとめた(図 7E)。

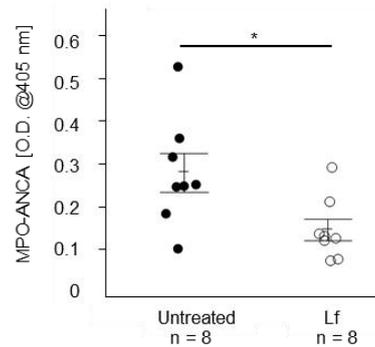
A



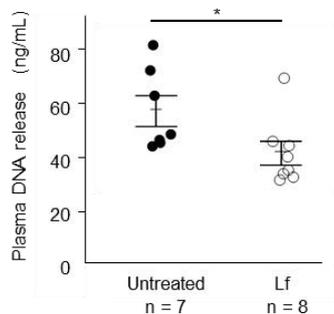
B



C



D



E

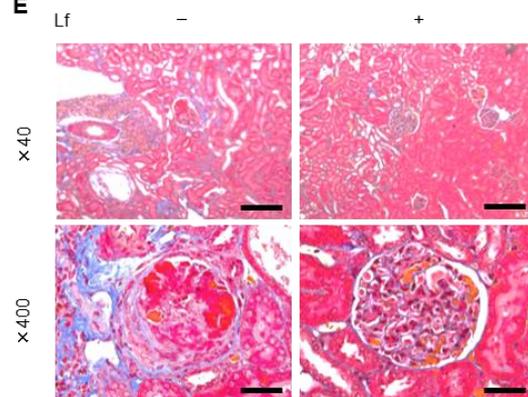


図 7 ラクトフェリンは *in vitro* において MPO-ANCA が惹起する NETs 形成を抑制し、ラクトフェリンの経口投与は SCG/kj マウスにおいて生存率を改善、MPO-ANCA 抗体価、血漿 DNA 濃度、腎糸球体半月体形成を減少させた。

(A)各濃度のラクトフェリンの前処置により MPO-ANCA により惹起される NETs 形成が抑制された。各群: n = 3, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。データは平均 \pm SEM で示し、独立した 3 回の実験により確認した。(B) ラクトフェリン投与群(白丸、n = 16)ではラクトフェリン非投与群と比較し(黒丸、n = 16)、生存率が有意に改善した($P = 0.0111$ 、カプランメイヤー法)。(C) 12 週齢における MPO-ANCA 抗体価はラクトフェリン投与群 (白丸、n = 8) ではラクトフェリン非投与群と比較して (黒丸、n = 8)低値であった。 $*P < 0.05$ 。(D) 13 週齢における血漿 DNA 濃度は、

ラクトフェリン投与群(白丸、n = 8)ではラクトフェリン非投与群(黒丸、n = 7)と比較して低値であった。 $*P < 0.05$ 。(E) 18 週齢における腎組織標本のマッソントリクローム染色では、線維化領域(上図)及び半月体形成(下図)がラクトフェリン投与群において非投与群と比較し抑制された。Scale bars: 200 μm (上図)、50 μm (下図)。画像はラクトフェリン投与群 3 匹、ラクトフェリン非投与群 2 匹から代表的なものを示した。

ラクトフェリンは Local Shwartzman Reaction (LSR) における NETs 形成及び皮下出血、血栓症を *in vitro*、*in vivo* で抑制する

活性化した血小板が NETs 形成を引き起こすことで輸血関連急性肺障害(TRALI)の病態と密接に関わっていることが知られている[25]。ラクトフェリンは活性化血小板によって惹起される NETs 形成を有意に抑制した(図 8A)。活性化血小板と好中球が引き起こす血栓形成性出血を伴う血管炎動物モデル[42]におけるラクトフェリンの影響を検証するため、LPS と $\text{TNF}\alpha$ の連日の皮下注射によって引き起こされる[22, 43]LSR を用いた。LSR 惹起部位においては好中球が遊走し重度の皮下出血と血栓形成がみとめられるが、ラクトフェリンの 2 週間の経口前投与が出血及び血栓形成を抑制した(図 8B: 左)。ラクトフェリン非投与群における平均皮下出血スコアは 3.00 であったのに対し、ラクトフェリン投与群では皮下出血スコアが平均 1.38 と低値(図 8B: 右)であった。さらに皮膚組織標本においては血管外赤血球(図 8C: 下図)及び血栓形成(図 8C: 上図)はラクトフェリン投与群においてコントロールと比較し著明に抑制された。次に、NETs が LSR

に關与していることを確認するため、過去の報告と同様[22, 44]に皮下への空気注入を行い air pouch を造設した。この air pouch 造設の目的は、LSR を air pouch 内に惹起し air pouch 内洗淨液の DNA 濃度を測定することで NETs の定量を行うことである。LPS と TNF α 処置群において air pouch 内の DNA 放出量がコントロールの非処置群(空気注入のみ)よりも上昇した。この結果から air pouch 内に惹起された LSR が NETs 形成と深く関わっていることが示唆される。ラクトフェリンはこの air pouch 内の NET-DNA 上昇を有意に抑制した(図 8D: 右)。また DNA 染色剤である DRAQ5 による核の染色においても形態学的に NETs 形成が減少した(図 8D: 左)。これらの結果からラクトフェリンの経口投与が LSR における NETs 形成を抑制したと考えられる。

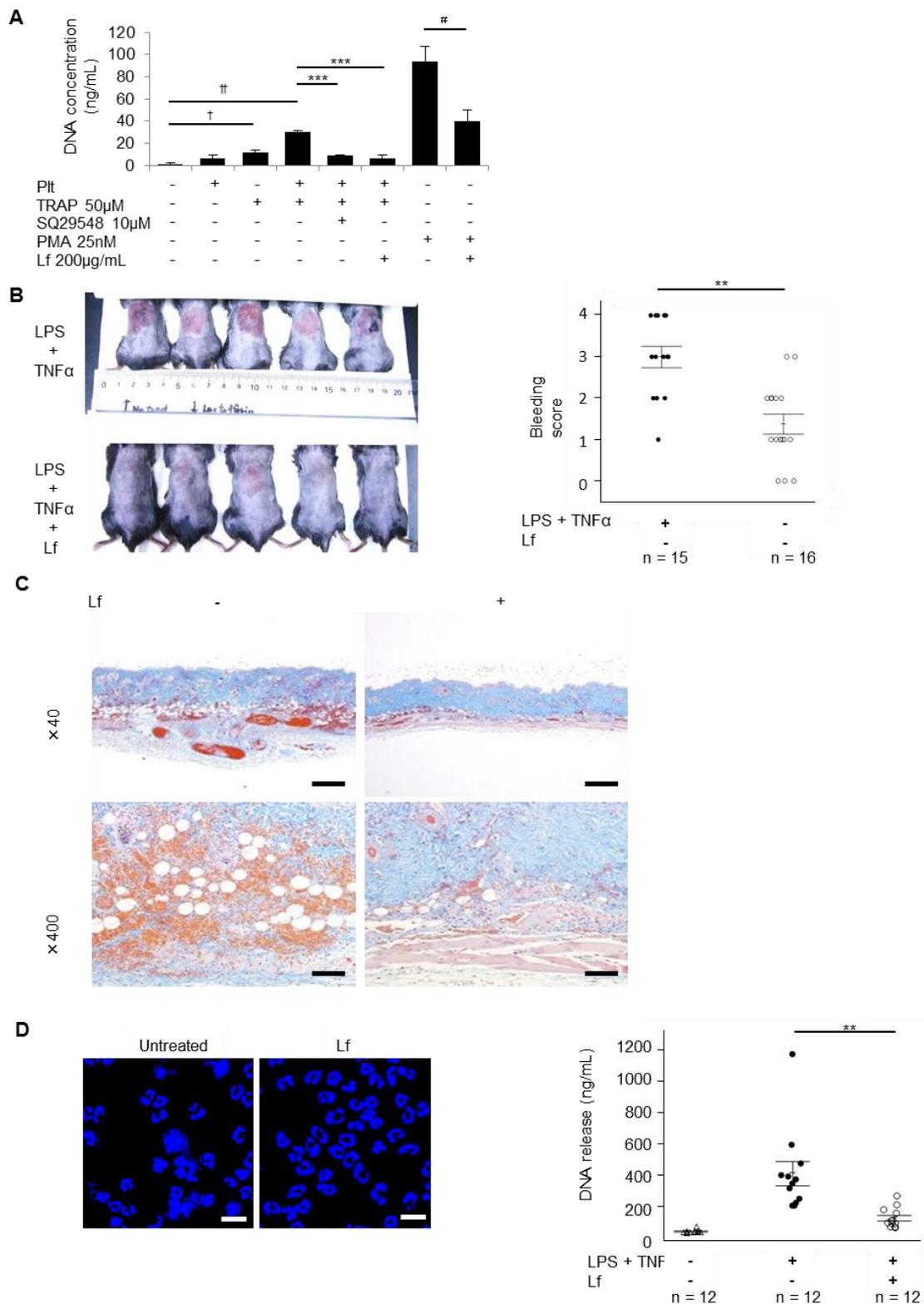


図 8 ラクトフェリンは LSR における皮下出血及び血栓症を減少させる
 (A) 活性化血小板が引き起こす NETs 形成をラクトフェリン存在下又は非存在下で測定した。各群: n = 3、 $\dagger P < 0.05$ 、 $\ddagger P < 0.001$ 、 $*** P < 0.001$ 、 $\# P < 0.05$ 。(B)

LSR (左図)の代表的写真を示す。LPS と TNF α の一連の皮下注射により皮下出血を惹起し(下図, LPS + TNF α + ラクトフェリン(Lf); n = 16, 白丸。上図, LPS + TNF α (control); n = 16, 黒丸)、次の様に点数化した: 0、全くみとめない; 1、軽度; 2、中等度; 3、重度; 4、中心壊死を伴う重症出血、*** $P < 0.001$ 。(C) LSR 部位皮膚組織標本のマッソントリクローム染色画像。Scale bars: 500 μm (上図), 100 μm (下図)。(D) LPS + TNF α 群及びコントロール群の air pouch 内への DNA 放出におけるラクトフェリンの効果(右図)。各群: n = 12、** $P < 0.01$ 。好中球を air pouch 中から回収後 DRAQ5 で DNA を染色(青)し蛍光顕微鏡下に観察した(左図)。画像は各群 3 匹のマウスから代表的なものを示した。Scale bars: 20 μm 。データは平均 \pm SEMs で示し、3 回の独立した実験で確認した。

考察

NETs は外来微生物に対し好中球がもつ生体防御機構の一つであり、宿主の感染防御に重要な役割を果たしている[2-5]。しかし NETs 形成の制御不全が自己免疫性疾患や炎症性疾患、血栓症等に関与していることも知られている。我々は本研究においてラクトフェリンの外因性投与が NETs 形成を抑制すること、好中球ラクトフェリンは内因性の NETs 抑制物質であることを見出した。

本研究では NETs 形成に重要な役割をもつと報告されている[6, 31]活性酸素種 (ROS)とは独立して、ラクトフェリンが NETs 形成を抑制することが示された。

ROS 産生はオートファジー、カルシウム依存性の酵素である PAD4 依存性のヒストン H3 シトルリン化、エラスターゼが介在するヒストン消失の契機となり、NETs 放出に至る[21, 28, 34, 45]。予想外にもラクトフェリンは ROS 産生や ROS に関連したプロセスすなわち PAD4 活性やヒストンシトルリン化[46]、エラスターゼによるヒストン消失、過酸化水素除去により NETs を抑制するカタラーゼへの影響はみとめられなかった。

エラスターゼは血栓性出血を引き起こす主要なプロテアーゼである[22]。このような血管外での機能に加えて、好中球エラスターゼは核へ移行しヒストンを消失させることにより NETs 形成を引き起こす[21]。メカニズムは明らかでないが、好中球エラスターゼ及び MPO は NETosis において顆粒から核へ移行するこ

とが分かっている。好中球エラスターゼはヒストンの切断に引き続いてクロマチン膨張を引き起こし、MPO がエラスターゼの機能を補助する[21]。興味深いことに、ラクトフェリンはエラスターゼの核移行を抑制することなく、PMA 刺激から 1 および 2 時間後の添加においても DNA 放出を著明に抑制した。この結果からラクトフェリンは刺激後 2 時間以内の NETosis 初期過程すなわち ROS 産生、PAD4 依存性ヒストンシトルリン化、エラスターゼが介在するヒストン消失に影響するとは考えにくく、その作用点は NETosis 後半すなわち細胞膜破裂の直前であるという仮説に矛盾しない(図 9)。

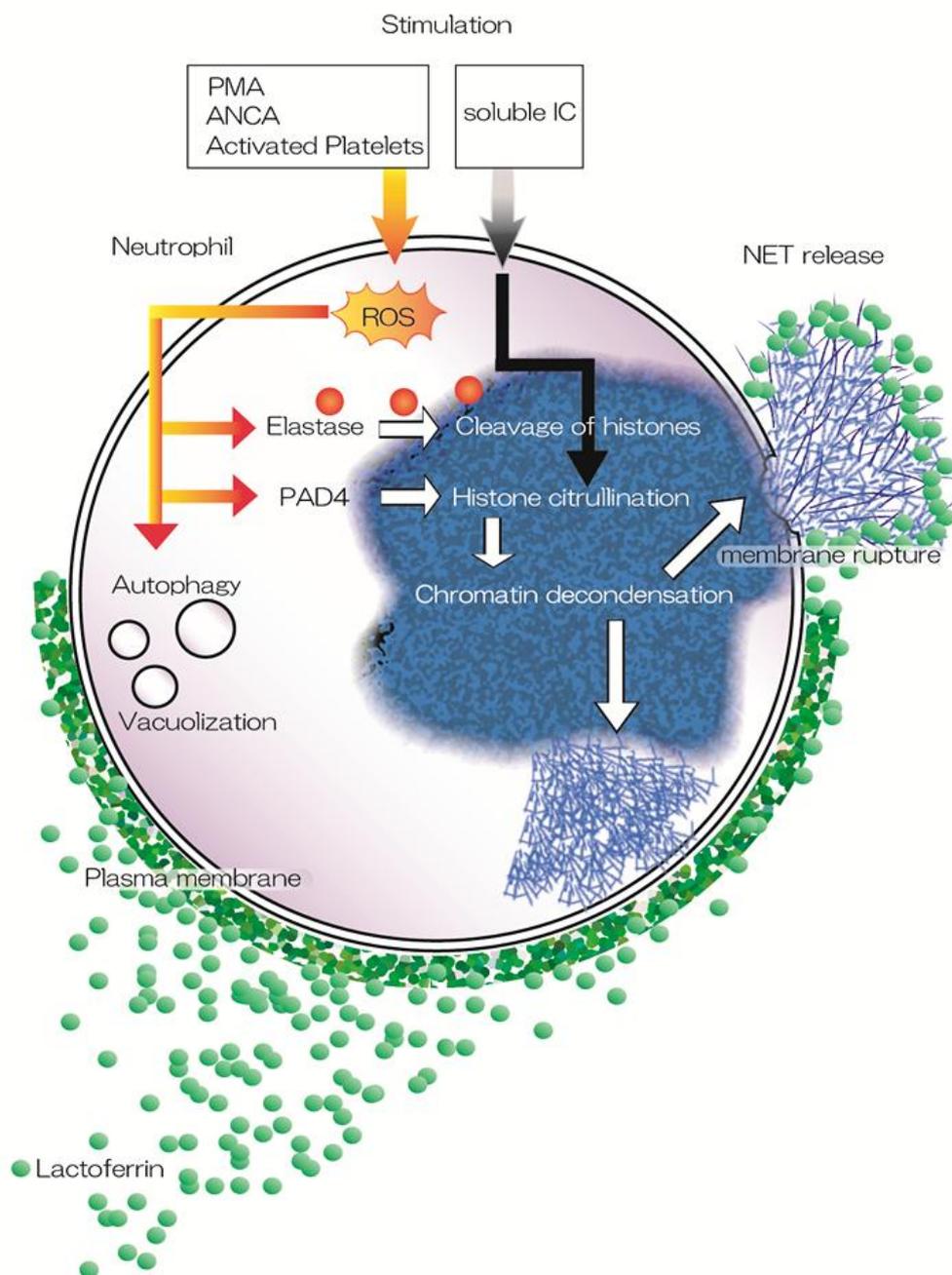


図 9 NETs 形成におけるラクトフェリンの作用メカニズム

本研究の結果から PMA、MPO-ANCA、活性化血小板といった様々な刺激により惹起される NETs 形成を、ラクトフェリンが抑制することが明らかにされた。一方でラクトフェリンは ROS 産生に引き続いて起こるエラスターゼ依存性のヒストン消失、PAD4 が触媒するヒストンシトルリン化、オートファジー等の細胞内プロセスには影響を及ぼさなかった。さらにラクトフェリンは ROS と独立した NETs 形成を引き起こす免疫複合体が惹起する NETs 形成も抑制した。我々はラ

ラクトフェリンが細胞膜上で NETs の拡散を抑制しクロマチン線維を凝集させていると考えた。本図は Illustrator CC (Adobe Systems Incorporated, USA)を用いて作図した。

我々のデータによれば、無刺激の状態では好中球細胞質の顆粒内に存在するラクトフェリンが、PMA 刺激により細胞膜へ移行した。また外因性に添加された細胞膜に局在したラクトフェリンは、クロマチンの膨張は抑制せずに、それに続く細胞膜の破裂を抑制した(data not shown)。ラクトフェリン存在下で放出された NETs を電子顕微鏡で観察したところ、ラクトフェリン非存在下で観察された NETs とは異なり、一塊に凝集したような形態学的特徴を呈することから、ラクトフェリンが NETs を凝集させるという仮説が支持される。

これまでの報告からラクトフェリンは DNA と結合することが知られている[29, 30, 47]。ラクトフェリンには lactoferricin B と呼ばれる強い陽性荷電を持つ部位が同定されている[48]。我々は本研究で、ラクトフェリンが NETs と電荷的に結合することを示したが、これは NETs が放出される直前でラクトフェリンが電荷的にクロマチン線維と結合することによって NETs を縮合させているという仮説を支持する。超微細構造物(陽性荷電が人工的に付与された金粒子)が NETs によって除去されるが、陽性荷電によって超微細構造物と NETs の結合が増強されるという報告もまたこの仮説を支持する[49]。

経口投与されたラクトフェリンは小腸に存在する受容体から血中へ吸収され

ることが知られている[50, 51]。MPO-ANCA の過剰産生と腎における半月体形成性腎炎を特徴とし自己免疫性血管炎の自然発症動物モデルとして知られる SCG/kj マウスにおいて、ラクトフェリン経口投与は MPO-ANCA 抗体価の低下、NETs の指標として測定した血漿中遊離 DNA 濃度の低下、腎糸球体半月体形成の減少、生存率の改善をもたらす病勢を改善させた。ラクトフェリンが血管内皮細胞に直接的に保護的に作用した可能性や腸管や血中の免疫担当細胞に影響を与えたか否かに関する検討を行ってはいないことや、血漿 DNA 濃度の他に NETs に特異的な指標は測定していないため、ラクトフェリンが NETs を抑制したことが病態の改善に直接影響したとは断定できないが、ラクトフェリンが NETs 形成を抑制することによって病態における悪循環[9]を遮断した可能性が考えられる。様々な自己免疫性疾患において循環 DNA の上昇が報告されており[52]、その一部には好中球から放出された NETs が関わっている。我々は SCG/kj における循環血漿中の遊離 DNA 濃度がラクトフェリンによって低下することを示したが、ラクトフェリンが NETs 形成および循環遊離 DNA の減少に重要な役割を持つことが示唆される。

LSR モデルは好中球依存性、IgG 非依存性の局所血管炎モデルである[22, 43]。細胞外ヒストンは血管内皮細胞障害を引き起こすことが知られており[53]、NETs が LSR における皮下出血及び血栓症に関与している可能性がある。NETs の関連

する血管炎の解析を行うため、敗血症や TRALI における血小板と好中球の相互作用を介した血管内皮細胞障害[7, 25]に類似したモデルである LSR を用いた。Air pouch 内洗浄液中の DNA 放出量は有意に上昇したことは LSR が NETs 形成と関連していることを示唆するが、経口ラクトフェリン投与は air pouch 内での DNA 放出量を減少させた。活性化血小板は NETs 形成を惹起することが知られており、深部静脈血栓症の病態と密接に関わっている[54]。我々の結果では、in vitro で活性化血小板が引き起こす NETs 形成を抑制したが、これはラクトフェリンが血栓症を制御する可能性を示唆する。これらの結果からラクトフェリンが様々な刺激による NETs 形成を抑制することが示唆された。

過去にいくつかの NETs 形成抑制物質が報告されている。NETs 形成は Raf-MEK-ERK 経路(NADPH oxidase の上流)の遮断によって抑制されるため、この経路は NETs 抑制薬の標的の一つと考えられている[55]。TRALI においては血小板が NETs 形成に関与しており、アスピリンが血小板活性化を制御し NETs 形成を抑制することで病勢の進展を予防する[25]。また ROS によって活性化されヒストンのシトルリン化を触媒する酵素である PAD4 の抑制が、NETs 形成を抑制することが報告されている[56]。しかしながら NETs 抑制物質として安全に使用可能な内因性物質はこれまでに報告されておらず、我々の結果からラクトフェリンがそのような内因性の NETs 抑制物質であると考えられる。

結論として、我々はラクトフェリンが NETs の拡散を予防することで NETs を抑制していることを見出し、この結果はラクトフェリンが NETs の関連する疾患に対する新規の安全な治療選択肢となり得ることを示唆する。ラクトフェリンが NETs を抑制する機構を明らかにするため、さらなる研究が必要である。

謝辞

本研究を行うにあたりメカニズムに関する深い洞察及び御指導をいただいた指導教員の南学正臣教授に感謝致します。また本研究の細部から全体に至るまで、毎日の議論を通じ多大な御指導をいただいた平橋淳一先生、討論の場を設けていただき本研究に熱心な御指導をいただいた東京大学先端科学技術研究センターの藤田敏郎教授に感謝致します。また画像データの解析、活性酸素発生系に関わる実験で御指導いただいた東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻医用生体工学講座生体情報学分野の神谷真子先生、浦野泰照教授、SCG/kj マウスにおける MPO-ANCA 測定にご協力いただいた千葉大学大学院医学研究院免疫発生学・炎症制御学研究室の長尾朋和先生、帝京大学医学部附属病院安全管理部・医療共通教育センターの鈴木和男教授に深く感謝致します。日常的な議論、血液検体の提供に御協力いただいた黒澤美穂先生、田中基嗣先生、広浜大五郎先生、ラクトフェリンに関する多くの知識を御指摘いただいた株式会社 NRL ファーマの加賀谷伸治氏に感謝の意を申し上げます。

引用文献

- [1] C. Nathan, Neutrophils and immunity: challenges and opportunities, *Nat Rev Immunol*, 6, 173-182, 2006.
- [2] V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, A. Zychlinsky, Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science*, 303, 1532-1535, 2004.
- [3] V. Ramos-Kichik, R. Mondragón-Flores, M. Mondragón-Castelán, S. Gonzalez-Pozos, S. Muñiz-Hernandez, O. Rojas-Espinosa, R. Chacón-Salinas, S. Estrada-Parra, I. Estrada-García, Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis (Edinb)*, 89, 29-37, 2009.
- [4] D. Ermert, C.F. Urban, B. Laube, C. Goosmann, A. Zychlinsky, V. Brinkmann, Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections, *J Innate Immun*, 1, 181-193, 2009.
- [5] A.B. Guimarães-Costa, M.T. Nascimento, G.S. Froment, R.P. Soares, F.N. Morgado, F. Conceição-Silva, E.M. Saraiva, *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 6748-6753, 2009.
- [6] T.A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch,

V. Brinkmann, A. Zychlinsky, Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps, *J Cell Biol*, 176, 231-241, 2007.

[7] S.R. Clark, A.C. Ma, S.A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M.M. Kelly, K.D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G.D. Sinclair, E.M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C.J. Doig, F.H. Green, P. Kubes, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood, *Nat Med*, 13, 463-469, 2007.

[8] R. Lande, D. Ganguly, V. Facchinetti, L. Frasca, C. Conrad, J. Gregorio, S. Meller, G. Chamilos, R. Sebasigari, V. Riccieri, R. Bassett, H. Amuro, S. Fukuhara, T. Ito, Y.J. Liu, M. Gilliet, Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus, *Sci Transl Med*, 3, 73ra19, 2011.

[9] K. Kessenbrock, M. Krumbholz, U. Schönemmarck, W. Back, W.L. Gross, Z. Werb, H.J. Gröne, V. Brinkmann, D.E. Jenne, Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis, *Nat Med*, 15, 623-625, 2009.

[10] H.E. Broxmeyer, A. Smithyman, R.R. Eger, P.A. Meyers, M. de Sousa, Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitor of colony-stimulating activity production, *J Exp Med*, 148, 1052-1067, 1978.

[11] P.F. Levay, M. Viljoen, Lactoferrin: a general review, *Haematologica*, 80, 252-267,

1995.

[12] J.J. Bullen, J.A. Armstrong, The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes, *Immunology*, 36, 781-791, 1979.

[13] R.T. Ellison, T.J. Giehl, Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme, *J Clin Invest*, 88, 1080-1091, 1991.

[14] R. Adão, K. Nazmi, J.G. Bolscher, M. Bastos, C- and N-truncated antimicrobial peptides from LFampin 265 - 284: Biophysical versus microbiology results, *J Pharm Bioallied Sci*, 3, 60-69, 2011.

[15] K. Pütsep, G. Carlsson, H.G. Boman, M. Andersson, Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study, *Lancet*, 360, 1144-1149, 2002.

[16] I. Masoodi, B.M. Tijjani, H. Wani, N.S. Hassan, A.B. Khan, S. Hussain, Biomarkers in the management of ulcerative colitis: a brief review, *Ger Med Sci*, 9, Doc03, 2011.

[17] I. Kida, S. Kobayashi, K. Takeuchi, H. Tsuda, H. Hashimoto, Y. Takasaki, Antineutrophil cytoplasmic antibodies against myeloperoxidase, proteinase 3, elastase, cathepsin G and lactoferrin in Japanese patients with rheumatoid arthritis, *Mod Rheumatol*, 21, 43-50, 2011.

- [18] D. Caccavo, A. Rigon, A. Picardi, S. Galluzzo, M. Vadacca, G.M. Ferri, A. Amoroso, A. Afeltra, Anti-lactoferrin antibodies in systemic lupus erythematosus: isotypes and clinical correlates, *Clin Rheumatol*, 24, 381-387, 2005.
- [19] P. Manzoni, M. Rinaldi, S. Cattani, L. Pagni, M.G. Romeo, H. Messner, I. Stolfi, L. Decembrino, N. Laforgia, F. Vagnarelli, L. Memo, L. Bordignon, O.S. Saia, M. Maule, E. Gallo, M. Mostert, C. Magnani, M. Quercia, L. Bollani, R. Pedicino, L. Renzullo, P. Betta, F. Mosca, F. Ferrari, R. Magaldi, M. Stronati, D. Farina, I.a.S.o.N. Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections, Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial, *JAMA*, 302,1421-1428, 2009.
- [20] C.F. Urban, D. Ermert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, W. Nacken, V. Brinkmann, P.R. Jungblut, A. Zychlinsky, Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*, *PLoS Pathog*, 5, e1000639, 2009.
- [21] V. Papayannopoulos, K.D. Metzler, A. Hakkim, A. Zychlinsky, Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps, *J Cell Biol*, 191, 677-691, 2010.
- [22] J. Hirahashi, D. Mekala, J. Van Ziffle, L. Xiao, S. Saffaripour, D.D. Wagner, S.D.

Shapiro, C. Lowell, T.N. Mayadas, Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy, *Immunity*, 25, 271-283, 2006.

[23] I. Müller, A. Klocke, M. Alex, M. Kotsch, T. Luther, E. Morgenstern, S. Zieseniss, S. Zahler, K. Preissner, B. Engelmann, Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets, *FASEB J*, 17, 476-478, 2003.

[24] S. Kenmoku, Y. Urano, H. Kojima, and T. Nagano, Development of a highly specific rhodamine-based fluorescence probe for hypochlorous acid and its application to real-time imaging of phagocytosis, *J Am Chem Soc*, 129:7313-7318, 2007.

[25] A. Caudrillier, K. Kessenbrock, B.M. Gilliss, J.X. Nguyen, M.B. Marques, M. Monestier, P. Toy, Z. Werb, M.R. Looney, Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury, *J Clin Invest*, 122, 2661-2671, 2012.

[26] K. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, H.J. Majima, T. Nagano, Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species, *J Biol Chem*, 278, 3170-3175, 2003.

[27] D. Nakazawa, U. Tomaru, A. Suzuki, S. Masuda, R. Hasegawa, T. Kobayashi, S. Nishio, M. Kasahara, A. Ishizu, Abnormal conformation and impaired degradation of NETs induced by propylthiouracil: Implication of disordered NETs in

MPO-ANCA-associated vasculitis, *Arthritis Rheum*, 64, 3779-87, 2012.

[28] P. Li, M. Li, M.R. Lindberg, M.J. Kennett, N. Xiong, Y. Wang, PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps, *J Exp Med*, 207, 1853-1862, 2010.

[29] J. He, P. Furmanski, Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA, *Nature*, 373, 721-724, 1995.

[30] B.E. Britigan, T.S. Lewis, M. Waldschmidt, M.L. McCormick, A.M. Krieg, Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells, *J Immunol*, 167, 2921-2928, 2001.

[31] M. Bianchi, A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R.A. Seger, A. Zychlinsky, J. Reichenbach, Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis, *Blood*, 114, 2619-2622, 2009.

[32] Y. Wang, M. Li, S. Stadler, S. Correll, P. Li, D. Wang, R. Hayama, L. Leonelli, H. Han, S.A. Grigoryev, C.D. Allis, S.A. Coonrod, Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation, *J Cell Biol*, 184, 205-213, 2009.

[33] K. Martinod, M. Demers, T.A. Fuchs, S.L. Wong, A. Brill, M. Gallant, J. Hu, Y. Wang, D.D. Wagner, Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is

critical for deep vein thrombosis in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 8674-8679, 2013.

[34] Q. Remijsen, T. Vanden Berghe, E. Wirawan, B. Asselbergh, E. Parthoens, R. De Rycke, S. Noppen, M. Delforge, J. Willems, P. Vandenabeele, Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation, *Cell Res*, 21, 290-304, 2011.

[35] B. Levine, G. Kroemer, Autophagy in the pathogenesis of disease, *Cell*, 132, 27-42, 2008.

[36] K. Kinjoh, M. Kyogoku, R.A. Good, Genetic selection for crescent formation yields mouse strain with rapidly progressive glomerulonephritis and small vessel vasculitis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 3413-3417, 1993.

[37] S. Miyazawa, K. Saiga, K. Nemoto, T. Mae, O. Hotta, A repeat biopsy study in spontaneous crescentic glomerulonephritis mice, *Ren Fail*, 24, 557-566, 2002.

[38] A. Hakkim, B.G. Fürnrohr, K. Amann, B. Laube, U.A. Abed, V. Brinkmann, M. Herrmann, R.E. Voll, A. Zychlinsky, Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 9813-9818, 2010.

[39] W. Meng, A. Paunel-Görgülü, S. Flohé, I. Witte, M. Schädel-Höpfner, J. Windolf,

T.T. Lögters, Deoxyribonuclease is a potential counter regulator of aberrant neutrophil extracellular traps formation after major trauma, *Mediators Inflamm*, 2012, 149560, 2012.

[40] R.S. Keshari, A. Jyoti, M. Dubey, N. Kothari, M. Kohli, J. Bogra, M.K. Barthwal, M. Dikshit, Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition, *PLoS One*, 7, e48111, 2012.

[41] T. Lögters, S. Margraf, J. Altrichter, J. Cinatl, S. Mitzner, J. Windolf, M. Scholz, The clinical value of neutrophil extracellular traps, *Med Microbiol Immunol*, 198 , 211-219, 2009.

[42] P.F. Piguet, C. Vesin, J.E. Ryser, G. Senaldi, G.E. Grau, F. Tacchini-Cottier, An effector role for platelets in systemic and local lipopolysaccharide-induced toxicity in mice, mediated by a CD11a- and CD54-dependent interaction with endothelium, *Infect Immun*, 61, 4182-4187, 1993.

[43] C.A. STETSON, R.A. GOOD, Studies on the mechanism of the Shwartzman-phenomenon; evidence for the participation of polymorphonuclear leucocytes in the phenomenon, *J Exp Med*, 93, 49-63, 1951.

[44] M. Hachicha, M. Pouliot, N.A. Petasis, C.N. Serhan, Lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor 1alpha-initiated neutrophil

responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis, *J Exp Med*, 189, 1923-1930, 1999.

[45] Q. Remijsen, T.W. Kuijpers, E. Wirawan, S. Lippens, P. Vandenabeele, T. Vanden Berghe, Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality, *Cell Death Differ*, 18, 581-588, 2011.

[46] Y. Wang, J. Wysocka, J. Sayegh, Y.H. Lee, J.R. Perlin, L. Leonelli, L.S. Sonbuchner, C.H. McDonald, R.G. Cook, Y. Dou, R.G. Roeder, S. Clarke, M.R. Stallcup, C.D. Allis, S.A. Coonrod, Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination, *Science*, 306, 279-283, 2004.

[47] R.M. Bennett, M.M. Merritt, G. Gabor, Lactoferrin binds to neutrophilic membrane DNA, *Br J Haematol*, 63, 105-117, 1986.

[48] T.G. Kanyshkova, D.V. Semenov, V.N. Buneva, G.A. Nevinsky, Human milk lactoferrin binds two DNA molecules with different affinities, *FEBS Lett*, 451, 235-237, 1999.

[49] M. Bartneck, H.A. Keul, G. Zwadlo-Klarwasser, J. Groll, Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells, *Nano Lett*, 10, 59-63, 2010.

[50] H. Kawakami, B. Lönnnerdal, Isolation and function of a receptor for human

lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes, *Am J Physiol*, 261, G841-846, 1991.

[51] S. Iyer, B. Lönnnerdal, Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism, *Eur J Clin Nutr*, 47, 232-241, 1993.

[52] V. Swarup, M.R. Rajeswari, Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases, *FEBS Lett*, 581, 795-799, 2007.

[53] J. Xu, X. Zhang, R. Pelayo, M. Monestier, C.T. Ammollo, F. Semeraro, F.B. Taylor, N.L. Esmon, F. Lupu, C.T. Esmon, Extracellular histones are major mediators of death in sepsis, *Nat Med*, 15, 1318-1321, 2009.

[54] M.L. von Brühl, K. Stark, A. Steinhart, S. Chandraratne, I. Konrad, M. Lorenz, A. Khandoga, A. Tirniceriu, R. Coletti, M. Köllnberger, R.A. Byrne, I. Laitinen, A. Walch, A. Brill, S. Pfeiler, D. Manukyan, S. Braun, P. Lange, J. Riegger, J. Ware, A. Eckart, S. Haidari, M. Rudelius, C. Schulz, K. Echtler, V. Brinkmann, M. Schwaiger, K.T. Preissner, D.D. Wagner, N. Mackman, B. Engelmann, S. Massberg, Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo, *J Exp Med*, 209, 819-835, 2012.

[55] A. Hakkim, T.A. Fuchs, N.E. Martinez, S. Hess, H. Prinz, A. Zychlinsky, H.

Waldmann, Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation, *Nat Chem Biol*, 7, 75-77, 2011.

[56] J.S. Knight, W. Zhao, W. Luo, V. Subramanian, A.A. O'Dell, S. Yalavarthi, J.B. Hodgins, D.T. Eitzman, P.R. Thompson, M.J. Kaplan, Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus, *J Clin Invest*, 123, 2981-2993, 2013.