

論文の内容の要旨

論文題目	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
氏名	大久保 光修

好中球は貪食、脱顆粒により生体を防御しており、外来微生物からの生体防御において重要な役割を果たす最大のポピュレーションを持つ白血球である。最近、好中球がクロマチン線維から成る網目状構造物(Neutrophil Extracellular Traps ; NETs)を細胞外に放出し、細菌、真菌、寄生虫等の外来微生物を補捉することが報告され新たな生体防御メカニズムの一つとして注目されてきている。Apoptosis や necrosis とは異なり、NETs の放出を特徴とするこの細胞死の過程は NETosis と呼ばれる。しかし一方で NETs の制御不全は様々な自己免疫性疾患の病態に関与することが報告されている。抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody ; ANCA)関連血管炎においては ANCA が直接好中球を刺激し NETs 産生が亢進することが知られている。また全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus ; SLE)においては NETs のクリアランスの低下が病態に関わっていることが報告されている。また自己免疫性疾患だけでなく、深部静脈血栓症を始めとした血栓性疾患においても NETs の制御不全に関わることが報告されている。そのため NETs の関連する多くの疾患において、安全な NETs 抑制法の開発が重要な課題となっている。

ラクトフェリン(lactoferrin ; Lf)は主に母乳や涙液等のヒト外分泌液や好中球顆粒内に含まれる多機能蛋白である。これまでに抗ラクトフェリン抗体が SLE 患者において上昇しているという報告や、関節リウマチ患者において抗ラクトフェリン抗体の抗体価がその病勢と相関しているという報告があり、内因性ラクトフェリンの減少がこれらの病態に関与していることが示唆される。また、外因性ラクトフェリン投与により新生児における敗血症による死亡率が低下したことを示唆する無作為化試験があり、この病態におけるラクトフェリンの保護的な機能が示唆される。我々は、ラクトフェリンが NETs 形成において抑制的に機能し、NETs の関連する疾患において保護的に働くと仮説をたて検証した。

我々は *in vitro* の実験系において phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を用いてヒト末梢血由来好中球を刺激し NETs 形成を惹起し共焦点顕微鏡を用いて観察した。NETs 形成が外因性のラクトフェリン前処置により濃度依存性に顕著に抑制されることを、共焦点顕微鏡下に確認した。ラクトフェリンによる NETs 形成の抑制効果を定量するために好中球より放出された培養上清 DNA の濃度を測定したところ、顕微鏡下での結果と対応するようにラクトフェリン前処置

が培養液中 DNA 濃度上昇を抑制した。NETs 形成を惹起する刺激として PMA の他に ANCA、活性化血小板が知られているが、いずれの刺激の場合でもラクトフェリン前処置が濃度依存性に NETs 形成を抑制することを *in vitro* の実験系において示した。

また電子顕微鏡を用い PMA 刺激によりヒト好中球から放出された NETs を観察したところ、ラクトフェリン非存在下では NETs 線維一本一本が網目状に拡散していることが観察されたのに対し、ラクトフェリン存在下では NETs 線維が一塊に凝集したように集簇した像が観察された。

内因性ラクトフェリンの NETs 形成における役割を検証するために、ヒト骨髓球系白血病細胞株 (neutrophil-like human myeloid leukemia cell line ; HL-60) に対してラクトフェリン siRNA 処置を用いてラクトフェリン mRNA のノックダウンを行った。ヒト末梢血由来好中球は終末分化細胞で寿命が短いため遺伝的操作が困難であるため、好中球同様に NETs 形成を起こすことが知られている HL-60 細胞を実験に使用した。ラクトフェリン mRNA 発現、ラクトフェリン蛋白発現は siRNA 処置によって 54%、49%低下したことをそれぞれ real time PCR、western blotting により確認した。siRNA 処置により内因性ラクトフェリンをノックダウンした HL-60 細胞が PMA 刺激により形成する NETs は、negative control siRNA 処置を施行した HL-60 細胞に比較して増強することが示された。このデータからラクトフェリンが内因性の NETs 抑制物質であることが示唆された。

NETs 形成におけるラクトフェリンの局在を検証するためにヒト由来好中球を PMA により刺激し免疫蛍光染色を施行、共焦点顕微鏡を用いて観察した。無刺激の好中球において好中球細胞質に存在していた内因性ラクトフェリンが、PMA 刺激により細胞膜へ移行することが確認された。外因性にラクトフェリンを投与した場合、細胞膜上へのラクトフェリンの集積がより顕著となった。

これまでの報告からラクトフェリンは強い陽性荷電物質であり、陰性荷電をもつ DNA と結合することが知られている。我々はラクトフェリンが NETs 形成を抑制するメカニズムは陽性荷電による NETs への結合および NETs を縮合させることによる NET-DNA 拡散の抑制であると考へた。PMA によりヒト好中球に NETs 形成を惹起、NET-DNA を抽出した。NET-DNA にラクトフェリンを投与し電気泳動で観察したところバンドの上方へのシフトが観察された。興味深いことに陰性荷電物質として知られるヘパリンおよび LPS を前処置することによりバンドの上方へのシフトが解除された。この結果はラクトフェリンが NET-DNA と電荷的に結合したことを示唆する。

これまでに NETs 形成において必須の細胞内現象として活性酸素種(reactive oxygen species ; ROS)の産生が重要な役割を持つことが知られている。さらに好中球内での ROS 産生亢進に続いて起こるエラストラーゼの核内移行によるヒストン消失、ROS により活性化するカルシウム依存性の酵素である peptidylarginine deiminase 4 (PAD 4)が触媒するヒストンシトルリン化等の細胞内現象もまた NETs 形成においては重要な役割をもつことが報告されている。我々は、これらの細胞内現象に対するラクトフェリンの影響を検証した。

ヒト由来好中球を PMA により刺激し NETosis を惹起した。好中球細胞内で産生される次亜塩素酸、ヒドロキシラジカルをそれぞれ Kenmoku、Setsukinai らが開発した HySO_x、HPF の蛍光プローブにより検出しフローサイトメトリーを用いて蛍光強度を測定した。NADPH oxidase inhibitor である DPI がこれらの蛍光強度を有意に抑制する一方で、ラクトフェリンは蛍光強度を抑制しなかった。また、ヒストン H3 シトルリン化を抗ヒストン H3 シトルリン化抗体を用いた western blotting により検出した。PMA 刺激により惹起されたヒストン H3 シトルリン化を DPI が抑制する一方でラクトフェリンはこれを抑制しなかった。次にエラスターゼの核への移行を免疫染色により共焦点顕微鏡を用いて観察した。刺激により起こるエラスターゼの核移行をラクトフェリンは抑制しなかった。また、無細胞系でエラスターゼが引き起こすヒストン蛋白の分解をそれぞれのヒストンに対する抗体を用いた western blotting によって検出したが、ラクトフェリンはエラスターゼが媒介するヒストン消失を抑制しなかった。

我々は *in vivo* においてラクトフェリンが NETs 形成にどのような影響を及ぼすかを検証した。自己免疫性血管炎の自然発症動物であり、血尿を伴う急性腎不全を呈しヒトにおける ANCA 関連血管炎と類似した病態を呈する SCG/kj マウスにラクトフェリンの経口投与を行った。SCG/kj マウスの血中 myeloperoxidase (MPO)-ANCA 抗体価、NETs 形成の指標として測定した血漿 DNA 濃度はラクトフェリン投与群において有意に低下し、SCG/kj マウスの生存率はラクトフェリン投与により有意に改善した。

IgG 非依存性の好中球依存性血管炎モデルとして知られる Local Shwartzman reaction (LSR)におけるラクトフェリンの影響を検証した。野生型マウス皮下への LPS および TNF α の皮下注射により皮下出血・血栓症が惹起されるが、2%ラクトフェリン含有飼料 2 週間の投与によりこの皮下出血・血栓の所見が肉眼的・組織学的に著明に改善した。この LSR におけるラクトフェリンの影響が NETs 形成の抑制であることを示すために、あらかじめマウス背部に 5ml の空気注射によって air pouch を作成した。Air pouch 内への LPS および TNF α 投与によって LSR を惹起し、その洗浄液を解析した。洗浄液を遠心分離し上清中の DNA 濃度を測定することで NETs 形成を客観的に評価した。LSR により air pouch 内の DNA 濃度が著明に上昇したことは LSR が NETs 形成と深く関わることを示唆する。ラクトフェリンの経口投与がこの DNA 濃度上昇を有意に抑制し、洗浄液中の細胞成分を共焦点顕微鏡下に観察したところ NETs 形成が抑制されている画像が得られた。

本研究において我々は以下のことを見出した。①好中球顆粒成分の一つであるラクトフェリンが、無刺激の好中球においては細胞質に分布していたものが、MPO やエラスターゼとは異なり刺激により細胞膜へ移行すること、②外因性に投与されたラクトフェリンは、好中球細胞膜に集積しクロマチン膨張に続いて起こる細胞膜の破裂を抑制した。③電子顕微鏡で観察した NETs 形成は、ラクトフェリン非存在下では一本一本の線維が蜘蛛巣状に拡散するのに対し、ラクトフェリン存在下では一塊に凝集したような形態的特徴を呈した。④ラクトフェリンは NET-DNA と電荷的に結合し、電氣的結合によって NETs 形成を抑制するという仮説が支持された。⑤予想に反してラクトフェリンは NETs 形成に必須とされている細胞内現象、すなわち ROS の産生、

それに引き続くエラスターゼの核移行および核内でのヒストン消失、また ROS により活性化される酵素 PAD4 が触媒するヒストンのシトルリン化などに影響を及ぼすことなく NETs 形成を抑制した。⑥IgG 非依存性局所血管炎モデルにおける LSR では、細胞外に放出された NETs が内皮傷害を引き起こしたと考えられるが、ラクトフェリンの経口投与によって皮下出血は抑制され、ラクトフェリンが *in vivo* においても NETs 形成を抑制することが示唆された。

これまでにいくつかの NETs 形成抑制物質が報告されている。NADPH oxidase の上流である Raf-MEK-ERK の遮断が NETs 形成を抑制するという報告や、活性化血小板が引き起こす NETs に対してアスピリンが抑制的に機能するという報告等がある。しかし、安全に NETs 抑制作用を発揮する内因性物質は報告がない。我々はラクトフェリンが NETs 形成を抑制する内因性物質であることを見出した。この結果は、ラクトフェリンが NETs の関連する様々な疾患に対する安全な治療選択肢となる可能性を示唆する。