

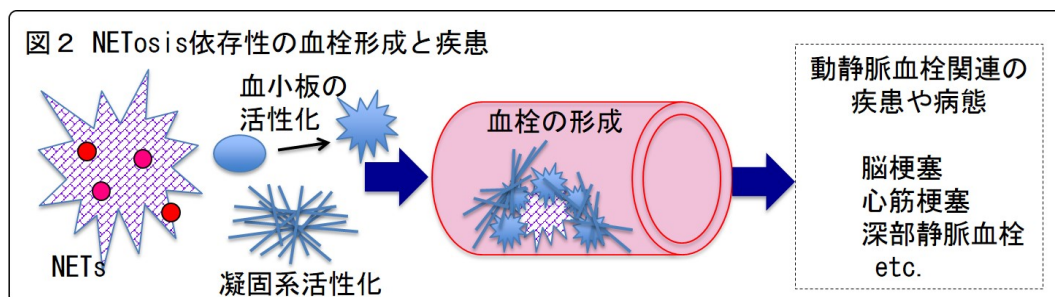
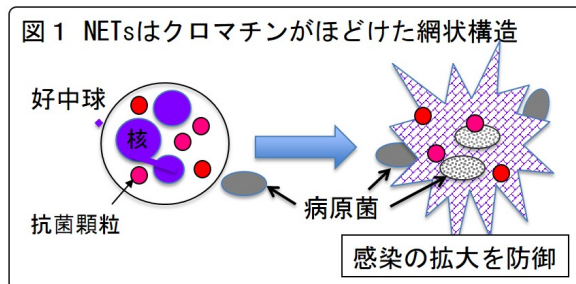
「好中球の NETosis を契機とする血栓誘導の分子メカニズムの解明」

姫路獨協大学・薬学部

通山 由美

1 研究の背景と目的

好中球は生体防御の最前線ではたらく白血球である。近年、好中球の新たな機能として、核酸 DNA を主成分とする抗菌性の網を放出して微生物を包み込む Neutrophil extracellular traps (NETs) の形成が報告された。NETs 形成は、好中球が抗菌網と化して死ぬこと (NETosis) で、微生物を一挙に捉えて感染の拡大を防止する生体防御システムである (図 1)。一方で、NETosis は周囲の組織や細胞にも様々な影響をおよぼす。クリアランスの遅延により NETs 成分が遷延すれば、敗血症や自己免疫疾患、血栓症など様々な病態を招く。なかでも、NETs 成分を足場にして、血小板や血液凝固シグナルが活性化すると、血栓が形成されて脳梗塞や心筋梗塞など、重篤な病態を招くが(図 2)、NETosis から血栓形成に至る分子プロセスは明らかにされていない。そこで本研究では、NETosis を起点とする血栓形成の分子メカニズムの解明を目的とした。



血栓症は、しばしば生命に関わる深刻な状態をもたらすが、早期診断法は未だ確立されていない。NETosis を血栓形成の契機と捉えてその分子メカニズムを明らかにし、将来的には、血栓性疾患の予防や分子標的治療法の開発、医療への応用に繋ぎたい。

2 研究方法・研究内容

研究の概略を以下の (1) ~ (4) に示す。

- (1) NETs 形成過程で有意に変動する好中球由来タンパク質の翻訳後修飾を探索
↓
- (2) 翻訳後修飾を含むタンパク質の遺伝子変異型好中球モデルを作成
↓
- (3) 変異型好中球モデルの NETs 形成への影響について検討
➡ NETs 形成に必須の翻訳後修飾を同定
↓
- (4) NETs 形成に必須の翻訳後修飾による血栓形成への影響を検証

具体的な実験方法を以下に示す。

(1) 標的とする翻訳後修飾のスクリーニング

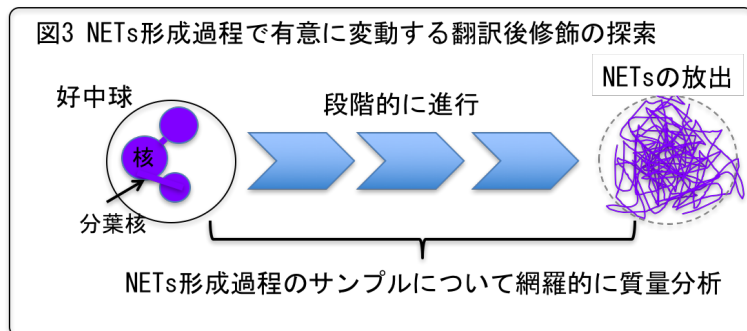
1) 末梢血から密度勾配遠心法で分離, 精製したヒト好中球を、人工的な NETs 形成誘導試薬である PMA (Phorbol 12-Myristate 13-acetate) で刺激して、*in vitro* に NETosis を再現し、NETs 形成の各進行段階 (1~3 時間) でサンプルを採取する。



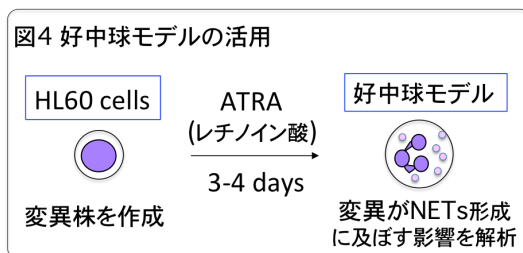
2) 各サンプル同時に、iTRAQ®法による網羅的質量分析を行う。



3) その結果を比較して、相対定量解析する事により、NETs 形成過程で有意に変動する好中球由来タンパク質の翻訳後修飾を探索、同定する (図 3)。



(2) 標的分子の遺伝子変異型好中球モデルの作成



遺伝子編集技術 (CRIPR/Cas9) を利用して、翻訳後修飾を含むタンパク質について遺伝子変異型好中球モデルを作成する。その際、ヒト白血病細胞株 HL60 を ATRA (レチノイン酸) 刺激により分化して好中球のモデルとして利用する (図 4)。

(3) NETs 形成進行状況の評価法

変異型好中球モデルと野生型好中球モデルについて NETosis を誘導し、以下の方法で比較、検討することにより NETs 形成に必須の翻訳後修飾を同定する。

- 1) NETs 誘導刺激をおこなった好中球を、2 種類の核酸結合蛍光試薬 (細胞膜透過型の Hoechst33342 と非透過型の Sytox Green) 共存下で追跡して (共焦点レーザー顕微鏡によるバイオイメージングシステムを利用) 進行状況を確認する。
- 2) NETs 形成マーカーとして、ヒストン H3 のシトルリン化をウエスタンブロッティングで解析する。
- 3) 最終的な NETs の完成を電子顕微鏡 (SEM) により確認する。

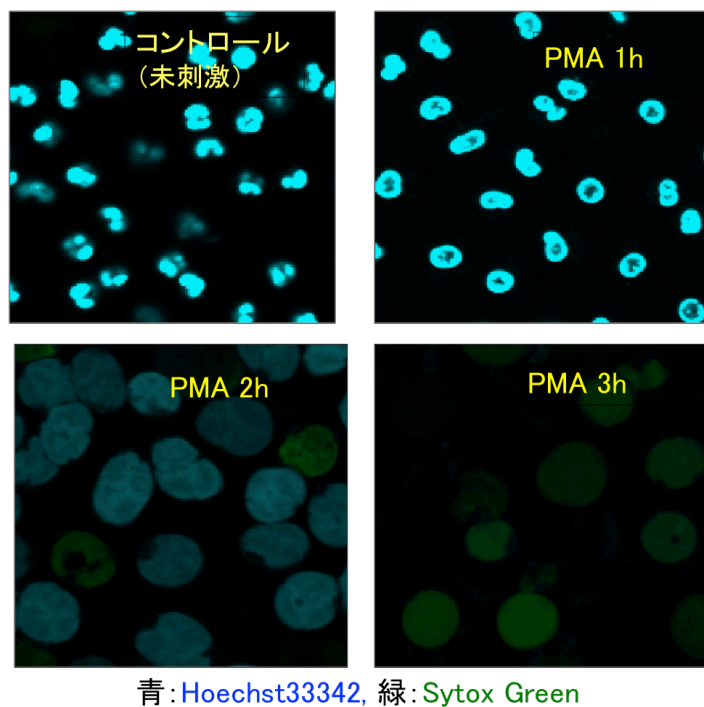
3 研究成果

末梢血より密度勾配遠心法で分離、精製したヒト好中球 (3×10^6 個) を、100ng/ml の PMA で刺激して、1、2、3 時間後に Lysis Buffer、(M-PER :Mammalian Protein Extraction Reagent を利用) により溶解してサンプルとし、iTRAQ®法による網羅的質量分析を行った。同時に、刺激した精製ヒト好中球の一部を、2 種類の核酸結合蛍光試薬、Hoechst33342 および Sytox Green 共存下で観察し、NETs 形成のプロセスを可視的に追跡した。

(1) ヒト好中球の NETs 形成のプロセスの可視的な解析

図5で示すように、末梢血より分離、精製したヒト好中球は、未刺激時には分葉核を有していたが、PMA 刺激1時間後には、核の形態が変化して分葉がほぼ消失した。2時間後には核が膨潤して核酸結合蛍光試薬の蛍光強度も減弱し、細胞質との境界が不明瞭になった。クロマチンの弛緩にともない、核酸 DNA の密度が低下していることが示唆された。3時間後には、膨潤がさらに進行し、細胞膜非透過型の核酸結合蛍光試薬

図5 PMA刺激によるヒト好中球のNETs形成



である Sytox Green と DNA の結合が認められた。細胞膜が崩壊して NETs が細胞外に拡散していると考えられる。

(2) 網羅的質量分析による NETs 形成過程における翻訳後修飾の探索

未刺激および、PMA 刺激 1, 2, 3 時間のサンプルについて、iTRAQ®法による網羅的質量分析をおこない、約 4 万の翻訳後修飾を含むペプチド、およびそれらを含む 1037 のタンパク質を同定した。現在、これらの翻訳後修飾を含むタンパク質についてさらに解析を進めている。とりわけ、1) NETs 形成プロセスで顕著な増加が認められたプロテイン S100 ファミリータンパク質、2) クロマチンを構成するヒストン関連タンパク質に注目しており以下にその概略示す。

1) プロテイン S100 ファミリータンパク質

図5に示したように、PMA 刺激2時間後には、クロマチンの弛緩が進んでいると判断し、2時間後に未刺激時と比して 20 倍以上の増加が認められるペプチド(アミノ酸の翻訳後修飾を含む)を検索した。その結果、15 種類のタンパク質の断片として、81 種類のペプチドを見出した。これら 15 種類のタンパク質のうち、4 種類が細胞骨格タンパク質であるアクチンおよびアクチン結合タンパク質であった。NETs 形成時の急速な形態変化に関与すると考えている。残りの 11 種類のうち、4 種類がプロテイン S100 ファミリーに属するタンパク質であった。S100 ファミリータンパク質は、EF ハンド型カルシウム結合ドメインを持つタンパク質群である。NETs 形成過程において際立って増加しており、かつ一部の S100 ファミリータンパク質の発現が炎症応答を惹起するとの報告もあり注目している。そこで、同定した 4 種の S100 ファミリータンパク質のうち、好中球に発現の高いプロテイン S100-A8、S100-A9 に

について遺伝子変異型好中球モデルを作成し、NETs 形成プロセス、および血栓形成への関与について検討する。

2) ヒストン関連タンパク質

クロマチンの弛緩に直接的に関与する分子メカニズムを見出すため、核内に存在する塩基性タンパク質、ヒストンに注目して解析をおこなっている。未刺激時と比較して、2時間後に増加が認められるヒストン関連タンパク質の翻訳後修飾について検討したところ、コアヒストンの H2A, H2B のグルタミンおよびアスパラギンの脱アミド化、H3 のシステインのメチル化、リンカーヒストンであるヒストン H1 の2箇所セリンのアセチル化等が認められた。特異性および NETs 形成における意義について、今後さらに解析を深める。

3) その他の標的分子

上記、プロテイン S100 ファミリー、ヒストン以外のタンパク質については、NETs 形成プロセスと相関して、刺激後の各進行段階で顕著な変化(増減)が認められる翻訳後修飾に注目して順次解析を進める。今回の解析では、人工的な NETs 形成誘導試薬である PMA を利用したが、カンジダ菌の感染による NETs 形成など、他の NETs 誘導における再現性と特異性にも注目する。

4 生活や産業への貢献および波及効果

血栓症は、しばしば生命に関わる深刻な状態をもたらすが、早期に診断する検査法が未だ確立されておらず、有効な早期診断法が切望されている。本研究は、NETs を契機とする血栓誘導の分子メカニズムの端緒をひもといた段階であるが、さらに研究を進めて、血小板を活性化して血栓誘導に直接繋がる NETs 成分を同定すれば、血栓症の早期診断のバイオマーカーとして血液検査への応用が期待できる。遺伝子診断とは異なる視点からの迅速な診断が可能となる。また、NETs 特異的な化学反応を同定することにより、NETs に起因する様々な病態の分子標的治療薬の開発に繋がる(図6)。さらに、NETs 形成から血小板や凝固系の活性化に繋がる要因を除去することにより、未然に血栓の形成をふせぐ先制医療が可能となる。高齢化社会、ストレス社会を迎え、血栓の予防は健康寿命の延長に大きく貢献する。

