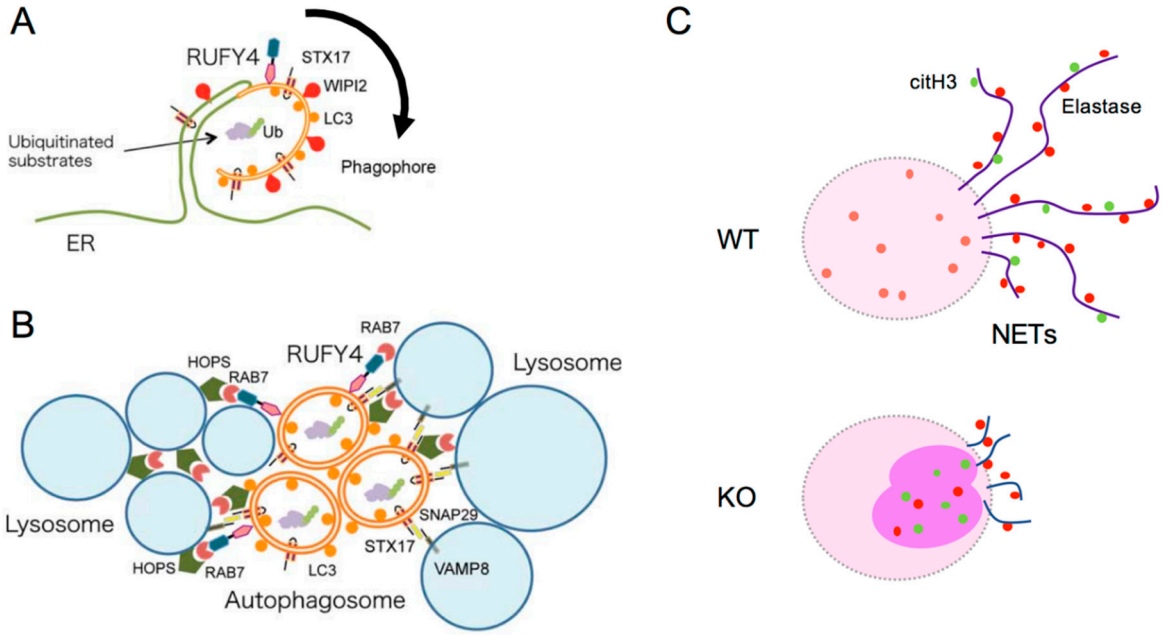
55　オートファジーによる免疫応答制御機構の解明	寺脇　正剛

【目的】マウス骨髄細胞から GM-CSF により樹状細胞を誘導する際、液性免疫応答に不可欠なサイトカイン IL-4 の存在下で分化させるとオートファジー活性が亢進し、MHC クラスⅡ分子への内在性抗原の提示、および細胞内寄生細菌に対するゼノファジーが促進される。このオートファジーの亢進には IL-4 によって発現が誘導される *Rufy4* が寄与している（*J Cell Biol.* 2015）。Rufy4 は隔離膜の伸長促進（図 A）やリソソームのトラフィッキング制御（図 B）によりオートファジーを亢進させていると考えられる。一方 Rufy4 は好中球において恒常的に発現しているが、好中球における機能は明らかになっていない。本研究では好中球においてオートファジーの分子機構の関与が指摘されている細胞死 NETosis に注目し、その分子機構と好中球における Rufy4 の生理学的機能の解明を目的として、研究をおこなった。

【方法】野生型および *Rufy4* 欠損マウスにカゼインを腹腔内投与し、腹腔洗浄液から Percoll を用いた密度勾配遠心にて好中球を単離した。この初代培養好中球を PMA もしくはカルシウムイオノフォア A23187 で刺激することで NETosis を誘導し、NETs の形成を蛍光顕微鏡で観察した。また NETosis を誘導した好中球を S7 ヌクレアーゼ処理し、上清に遊離したエラスターゼの活性を測定することで、放出された NETs の定量をおこなった。

【結果】PMA により刺激された野生型好中球ではクロマチン DNA を大きく放出する典型的な NETosis が認められたのに対し、*Rufy4* 欠損マウス由来の好中球では細胞死は誘導されるものの、形成される NETs は顕著に縮小していた（図 C）。一方、A23187 で誘導した NETosis では明確な差は認められなかった。これと一致して、S7 ヌクレアーゼ処理依存的に検出されたエラスターゼ活性は、*Rufy4* 欠損マウス由来の好中球において低かった。以上の結果は *Rufy4* の欠損下では NETosis の進行や NETs の形成に異常が生じていることを示唆している。Rufy4 を介した NETosis の分子機構、および *Rufy4* 欠損による NETosis 不全が *in vivo* における生体防御機構、さらには NETosis により惹起される炎症応答に与える影響について検討を進めている。

Rufy4 によるオートファジー亢進と NETosis への寄与



55. オートファジーによる免疫応答制御機構の解明

寺脇　正剛

大阪市立大学 大学院医学研究科 分子病態学

Key words：オートファジー，好中球，炎症

緒　言

好中球は生体内に侵入したバクテリアを貪食により取り込み、細胞内で産生される活性酸素やファゴリソソーム内における消化により殺菌することで、感染初期における生体防御を担っている。しかし感染の負荷が非常に高い場合には、好中球はNETosisとよばれる細胞死を誘導し、顆粒内のミエロペルオキシダーゼやエラスターゼとともに自らのクロマチンDNAを放出して細菌を物理的に捕捉するとともに、殺菌していることが報告された［1］。このようにNETosisは感染初期の生体防御において第一線の役割を担っているが、一方でNETosisにおいて放出されるプロテアーゼとクロマチンDNA複合体（NETs）が、DAMPs（Danger-Associated Molecular Patterns）として認識され、敗血症や自己免疫疾患、血管炎などの炎症性疾患の病態形成や増悪に関与していることが示唆されている［2］。これらNETosisの関与が指摘されている疾患の病態解明や治療法の開発にはNETosisの詳細な分子機序の解明が必要であるが、いまだNETosisの分子メカニズムには不明な点が多い。これまでにNETosisの進行過程においては活性酸素の産生によるPAD4（Peptidylarginine Deiminase 4）の活性化がヒストンのシトルリン化を誘導することで、クロマチンDNAがほどけた状態になること［3］、また核膜のみならず全ての細胞内小器官が最終的に消失し、クロマチンDNAが細胞膜を破って放出されるが、この過程にはオートファジーの機構が関わっていることなどが報告されている［4］。

我々は抗原提示機能がもっとも高いとされる樹状細胞におけるオートファジーの制御機構について研究を行ってきた。この研究においてマウスの骨髄細胞から液性免疫応答において重要な働きを持つIL-4の存在下で誘導した樹状細胞ではオートファジー活性が亢進しており、MHCクラスII分子への内在性抗原の提示や、ブルセラ菌などの細胞内寄生細菌に対するゼノファジーが促進されることを見出した［5］。Rufy4は隔離膜の伸長やリソソームのトラフィッキングを制御しており、オートファジー活性の亢進はRufy4と既知のオートファジー誘導機構との相乗作用によるものであると考えられる［6］。一方、好中球ではRufy4はIL-4刺激と関係なく定常的に発現しているが、その生理学的意義は明らかになっていない。Rufy4は隔離膜伸長促進とリソソームの集積を惹起するという非常にユニークな機能を持っていることから、本研究ではオートファジーの関与が指摘されている細胞死NETosisに着目し（図1）、NETosisにおけるRufy4の生理学的機能、さらには炎症性疾患への関与について検討することを目的として、研究をおこなった。

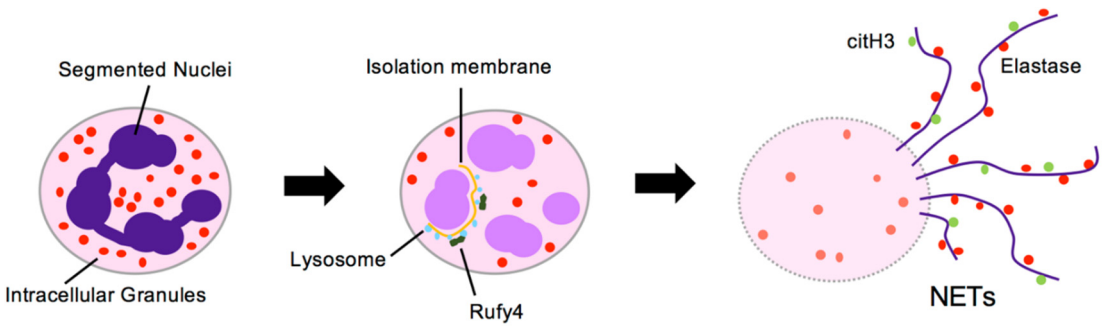


図1. NETosisの進行過程において予測されるオートファジーとRufy4の寄与
NETosisにおいては最終的に核膜をはじめとした細胞内小器官が全て消失するが、それにはオートファジー機構が関与していることが指摘されている。Rufy4はその機能から大規模な細胞内成分の分解を促進する役割があると予測される。

方　法

1. Rufy4 遺伝子欠損好中球における NETosis の誘導

野生型および *Rufy4* 欠損マウスにカゼインを細胞回収の 24 時間前と 4 時間前の 2 回腹腔内投与し、非感染性の好中球を誘導した。カゼイン投与マウスの腹腔を 2% FCS 含有 PBS にて洗浄し、浮遊細胞を回収した。腹腔洗浄液から遠心にて回収した細胞を 63% Percoll に重層して密度勾配遠心にて分離したのち、混入した赤血球を溶血させて得られた細胞画分を好中球として単離した。好中球の純度はサイトスピンサンプルのメイギムザ染色により、常に 95%以上の純度であることを確認している。この初代培養好中球を無血清 RPMI 培地に懸濁し 100 nM の PMA もしくは 25 μM A23187（カルシウムイオノフォア）で 4 時間刺激して NETosis を誘導した。4 時間後細胞を 4% PFA で固定し、DAPI のみ、もしくは膜透過処理を施した後に抗シトルリン化ヒストン抗体、抗好中球エラスターゼ抗体および DAPI にて染色し、スライドグラスに封入した。NETosis の誘導は蛍光顕微鏡によるイメージングにより解析した。

2. NETs 付随エラスターゼ活性の測定による NETosis の定量

NETosis の誘導は不均一であることが知られており、また NETosis が誘導された好中球をイメージングから定量的に解析するのは難しい。今回我々は NETosis によって放出される NETs に付随するエラスターゼ活性を生化学的に定量することにより *Rufy4* の欠損が NETosis に与える影響について検討をおこなった。1.と同様にマウスから好中球を単離し、PMA もしくは A23187 で NETosis を誘導した。4 時間の薬剤処理後上清を除去し、細胞を 2 回洗浄して、分泌もしくは通常の細胞死に起因する遊離エラスターゼを除去した。その後 S7 ヌクレアーゼを含む酵素液を加えて NETs のクロマチン DNA を 1 時間分解処理したものを NETs 付随エラスターゼのサンプルとして得た。このサンプルをエラスターゼの人工基質である（Z-Ala-Ala-Ala-Ala）2Rh110 に加えて反応させ、蛍光強度からエラスターゼ活性を測定した。

結　果

1. NETosis の誘導における *Rufy4* 欠損の影響

PMA により刺激された野生型マウス由来の好中球では、クロマチン DNA を大きく放出する NETosis が認められた。*Rufy4* 欠損マウス由来の好中球でも分葉核が消失し NETosis 様の細胞死は誘導されるものの、形成される NETs が顕著に縮小していた（図 2A）。一方、A23187 で誘導した NETosis では両者に顕著な差は認められなかった。

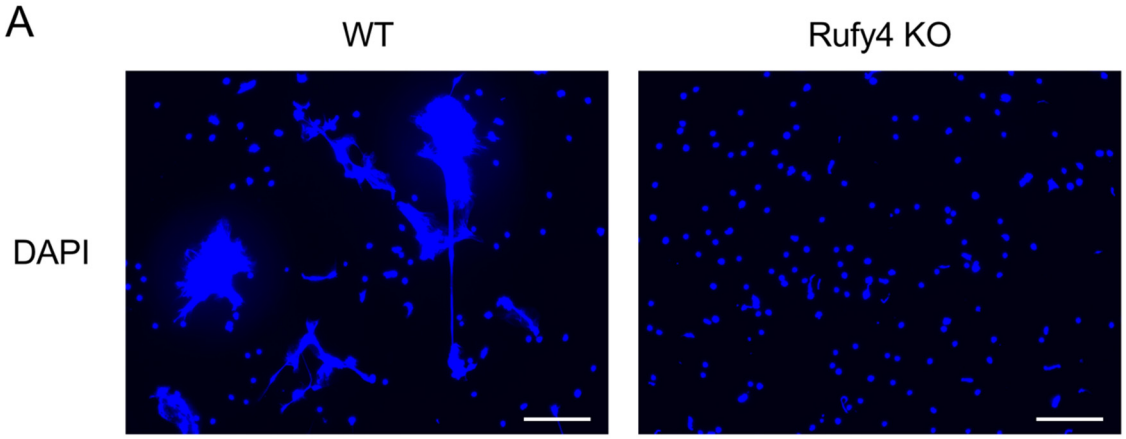


図 2A.　*Rufy4* 欠損好中球における NETosis の誘導

野生型マウス由来（左）および *Rufy4* 欠損マウス由来（右）の好中球を 100 nM PMA により刺激し NETosis を誘導した。NETosis に伴って放出された NETs（クロマチン DNA）を DAPI 染色により可視化した。低頻度で誘導される NETosis 陽性細胞を公正に比較するため低倍率かつシグナルを飽和させて撮影している。

スケールバーは、100 μm。

次に細胞染色により、野生型および *Rufy4* 欠損好中球における NETosis 関連因子の動態について検討をおこなった。その結果、*Rufy4* 欠損好中球ではヒストン H3 のシトルリン化が低下しており、大部分のエラスターゼが DNA とともには放出されず、細胞内に残存している様子が観察された（図 2B）。

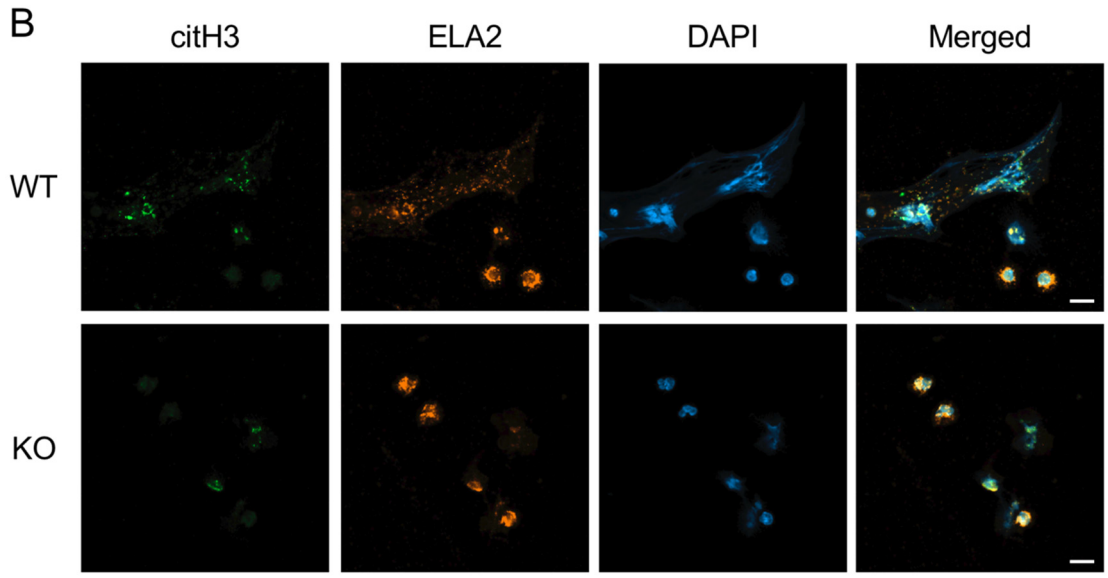


図 2B. NETosis を誘導した野生型および *Rufy4* 欠損好中球の免疫蛍光染色による解析
野生型（上段）および *Rufy4* 欠損（下段）好中球を 100 nM PMA により刺激し NETosis を誘導した。細胞は固定後抗シトルリン化ヒストン（CitH3）抗体、抗好中球エラスターゼ（ELA2）抗体、および DNA を DAPI にて染色し、共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。緑：CitH3、赤：ELA2、青：DAPI。スケールバーは、10 μm。

2. NETs 付随エラスターゼ活性の測定による NETosis の定量

イメージング解析より、*Rufy4* 欠損マウスでは NETosis は開始されるものの、放出される NETs の量が減少していることが示唆された。これを定量的に評価するため、NETs の構成成分であるクロマチン DNA に付随して放出される好中球エラスターゼの活性の測定をおこなった。その結果 S7 ヌクレアーゼ依存的に検出されるエラスターゼ活性、すなわち NETs 付随エラスターゼの活性は、*Rufy4* 欠損マウスでは有意に減少しており、イメージングのデータで認められた NETosis に伴って放出される NETs の減少が裏付けられた（図 3）。

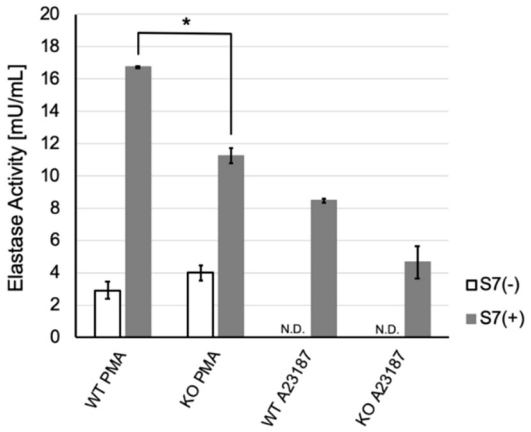


図 3. 好中球エラスターゼの活性測定による NETs の定量
NETosis を誘導した野生型（WT）および *Rufy4* 欠損（KO）好中球を洗浄後に S7 ヌクレアーゼ処理を行い（S7+）、NETs に由来するエラスターゼの人工基質に対する活性を測定した。平均値±S.D.、* $P < 0.05$、Welch's t test。

考　察

NETosis においては、核膜をはじめ最終段階では全ての細胞内小器官が消失することから、大規模分解系の関与が示唆される。これまでの研究でも NETosis の誘導過程においてはオートファジーにおける隔離膜と同様の脂質二重膜が出現することが報告されており、オートファジーの分子機構が NETosis の進行に寄与していることが強く示唆される。本研究では、免疫系において特異的に機能するオートファジー制御因子 Rufy4 が好中球においても発現していることから、Rufy4 が NETosis の進行過程において重要な役割を持っているという可能性について検討した。その結果、*Rufy4* 欠損マウスに由来する好中球では PMA 刺激によって分葉核が消失し NETosis 様の細胞死は誘導されるものの、放出される NETs の量は顕著に減少していた（図 1、3）。また *Rufy4* 欠損好中球ではエラスターゼの放出も抑制されていることから（図 2）、Rufy4 は NETosis の開始には必要ではないが、NETs の形成と放出の前段階として必須となる核や細胞内顆粒といった細胞内小器官を形成する膜成分の除去に関与していると推察される。

共同研究者・謝辞

Rufy4 欠損マウスの作製にあたり、東京都医学総合研究所 花粉症プロジェクトの廣井 隆親先生、および同研究所動物実験開発室の設楽浩志先生、山口碧様に多大なる御協力を頂きました。また本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文　献

1） Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5. PMID: 15001782 DOI: 10.1126/science.1092385

2） Jorch SK1, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. Nat Med. 2017 Mar 7;23(3):279-287. PMID: 28267716 DOI: 10.1038/nm.4294

3） Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. J Cell Biol. 2009 Jan 26;184(2):205-13. doi: Epub 2009 Jan 19. PMID: 19153223 DOI: 10.1083/jcb.200806072

4） Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, Noppen S, Delforge M, Willems J, Vandenabeele P. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. Cell Res. 2011 Feb;21(2):290-304. Epub 2010 Nov 9. PMID: 21060338 DOI: 10.1038/cr.2010.150

5） Terawaki S, Camosseto V, Prete F, Wenger T, Papadopoulos A, Rondeau C, Combes A, Rodriguez Rodrigues C, Vu Manh TP, Fallet M, English L, Santamaria R, Soares AR, Weil T, Hammad H, Desjardins M, Gorvel JP, Santos MA, Gatti E, Pierre P. RUN and FYVE domain-containing protein 4 enhances autophagy and lysosome tethering in response to Interleukin-4. J Cell Biol. 2015 Sep 28;210(7):1133-52. PMID: 26416964 DOI: 10.1083/jcb.201501059

6） Terawaki S, Camosseto V, Pierre P, Gatti E. RUFY4: Immunity piggybacking on autophagy? Autophagy. 2016;12(3):598-600. PMID: 26760128 PMCID: PMC4836005 DOI: 10.1080/15548627.2015.1136772