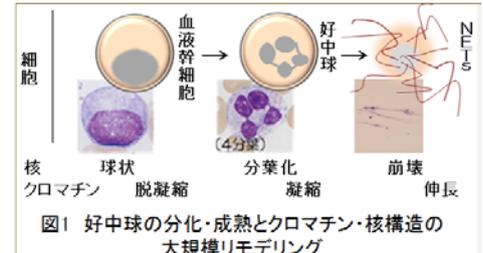


# ヒト好中球の細胞外クロマチン形成による感染防御

熊本大学大学院 自然科学研究科 複合新領域科学  
齊藤 寿仁

## 1. はじめに

好中球はヒトの末梢血中の白血球の 50~70%を占める細胞群です。血液幹細胞から分化する過程で好中球は核を分葉化させる(図1)。分化・成熟した好中球は血液を循環し、外部から侵入してきた細菌を見つけると、それらを貪食し自らのファゴソームに取り囲む。細胞内に取り込まれた細菌は、抗菌ペプチド、ヒストン、高濃度の活性酸素種(ROS)に曝露されて死滅する。2004年に Brinkmann と Zychlinsky らは、細菌の感染後に分葉核内の DNA が自発的に伸長し、ファイバー状になって細胞外に放出される現象を見だし、この細胞外 DNA ファイバーを Neutrophil Extracellular Traps (NETs) と名付けた(図1)(Science 303, 2004)。NETs は抗菌作用を持ちますが、そのメカニズムは不明です。血液細胞の増殖と分化制御の研究は世界中で活発に行われているものの、好中球の分化と成熟過程で観察される大規模な核構造の分子リモデリングについての知見は、申請者の知る限りほとんどない。



## 2. 方法 (詳細は紙面の都合上省略するが、発表論文リスト1および2のMaterials & methodsに記載されている)

2-1 末梢血からの好中球分離とHL-60の培養、2-2 間接免疫蛍光染色法、2-4 冷却ストレスによるNETsの誘導、2-5 細菌トラップ解析、2-5 TUNEL法、2-6 活性酸素(ROS)の検出、2-7 ミトコンドリア活性の検出、2-8 統計処理法

## 3. 結果

### 3-1 低温ストレスによるDAPI染色陽性の繊維状構造の誘導

ヒト末梢血より分離・精製した好中球を  $1 \times 10^6$  cells/ml の濃度で調整後、4°C低温処理を1h行い、その後、37°Cで5h培養し、その際にカバースリップを培養シャーレの中に置いた(Fig. 1A)。その結果、DAPI染色陽性の繊維状構造体が多数観察された。この構造体はPMAで誘導した際のNETsとDAPI染色やライト・ギムザ染色のパターンが極めて類似するものであった(Fig. 1B-D)。

次に、低温処理時の温度を4、15、25、37°Cに分け、その後37°Cへの再加温の有無によりDAPI染色陽性の繊維状構造体を解析した結果、低温処理を4°Cで1h、その後37°Cで再加温を5hしたものが条件検討した中で最もDAPI染色陽性の繊維状構造体が多く観察されることが明らかになり、また順に15、25°Cの低温処理で再加温する際にDAPI染色陽性の繊維状構造体の数が多く観察された。4°Cのみで再加温なしではDAPI染色陽性の繊維状構造体は観察されなかった。このことから、低温処理では温度が低いほうがより効率よくDAPI染色陽性の繊維状構造体を誘導でき、また37°Cによる再加温がこの構造体の誘導に効果的であることが明らかになった(Fig. 2)。

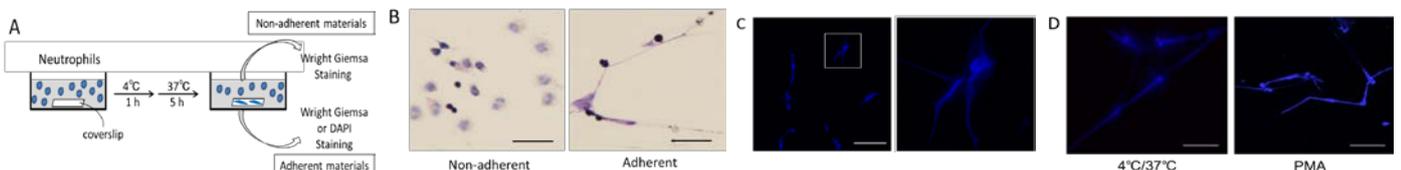


Fig. 1 好中球の低温処理による細胞外クロマチン構造の誘導 A) 末梢血液より精製した好中球をシャーレで培養する際にカバーガラスをシャーレの底に置く。ヒト好中球を4°Cの低温処理1h、その後37°Cの再加温を5h行った後に、カバーガラスをとりだしてDAPI染色あるいはギムザ染色を行い、顕微鏡下で観察する。B) 温度処理後の浮遊細胞とカバーガラスに接着した細胞のライト・ギムザ染色像を示している。下線は50 μmを示す。C) カバーガラスに接着した細胞をDAPI染色したものを示している。左図は接着細胞の形態を示している。右図は、左図で示した領域の高倍率を示している。D) 左図は低温ストレス処理のDAPI染色陽性の繊維状構造体、右図はPMAで誘導したNETsを示している。

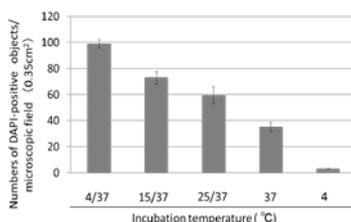


Fig. 2 低温処理条件で観察されたDAPI染色陽性の繊維状構造体のカバーガラス0.35 cm²当たりの数

### 3 - 2 NETs と DAPI 染色陽性の繊維状構造体の生化学的な比較

3 - 1 の結果から DAPI 染色陽性の繊維状構造体と PMA で誘導した NETs の構造が類似することが示された。次にこの構造物は機能的にも NETs に類似するかどうかを確かめることにした。まず細菌捕獲率について解析を行った。NETs は細菌を捕獲する作用が知られていることから、仮に低温で誘導した DAPI 染色陽性の繊維状構造体が NETs に類似の性質を持つとすると、細菌を捕獲する（細菌を結合する）能力が検出されると考えられる。実際に同じ数の大腸菌を NETs と DAPI 染色陽性の繊維状構造体それぞれとインキュベーターとすると通常の NETs 細胞の細菌捕獲率と比較して低温ストレスで誘導した DAPI 染色陽性の繊維状構造体は NETs の 40% 程度しか細菌の捕獲が出来ていなかった (Fig. 3A, B)。

次に、NETs の構成因子として知られる NE、ヒストン H3 およびシトルリン化したヒストン H3 (H3cit) の局在を免疫染色法により観察した。その結果、NE とヒストン H3 は DAPI 染色陽性の繊維状構造体と重なって局在が観察できた。一方、シトルリン化したヒストン H3 (H3cit) については低温処理した繊維状構造体において確認することができなかった (Fig. 4A-F)。

最後に、TUNEL 法を用いて両構造体の比較を行った。その結果、いずれの構造体でも TUNEL 陽性のシグナルは観察されなかった (Fig. 5)。TUNEL 陽性のシグナルはアポトーシス経路の活性化を示すと考えられるが、NETs および低温処理による繊維状構造体の形成はアポトーシス経路とは異なっていると考えられる。

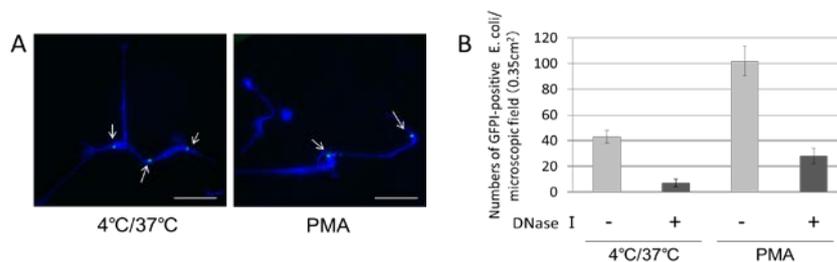


Fig. 3 NETs と低温ストレス誘導細胞の細菌捕獲

Fig. 4 NETs に特異的なマーカータンパク質および翻訳後修飾の解析

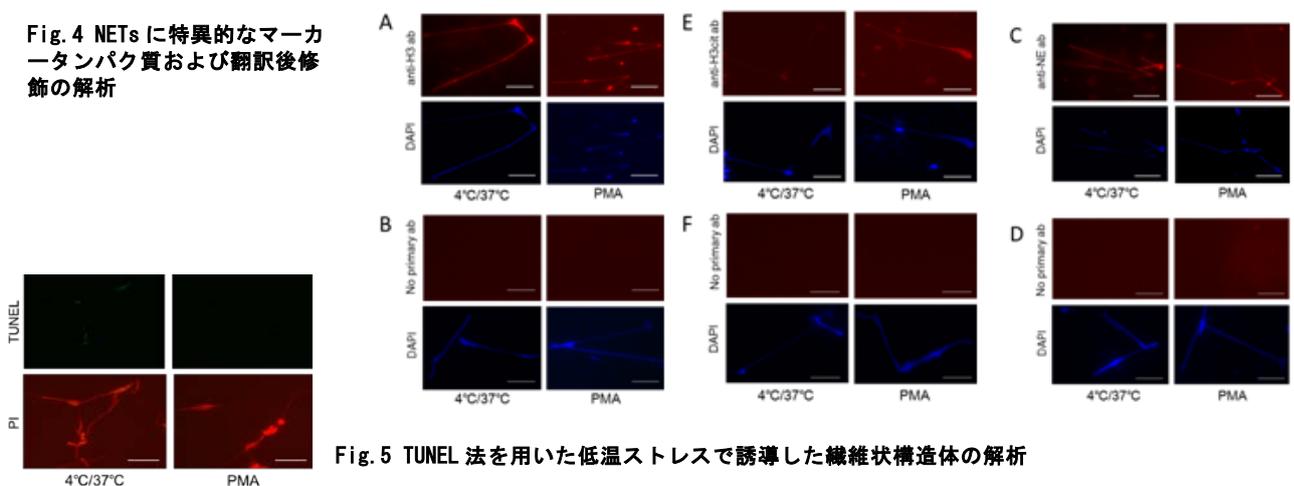


Fig. 5 TUNEL 法を用いた低温ストレスで誘導した繊維状構造体の解析

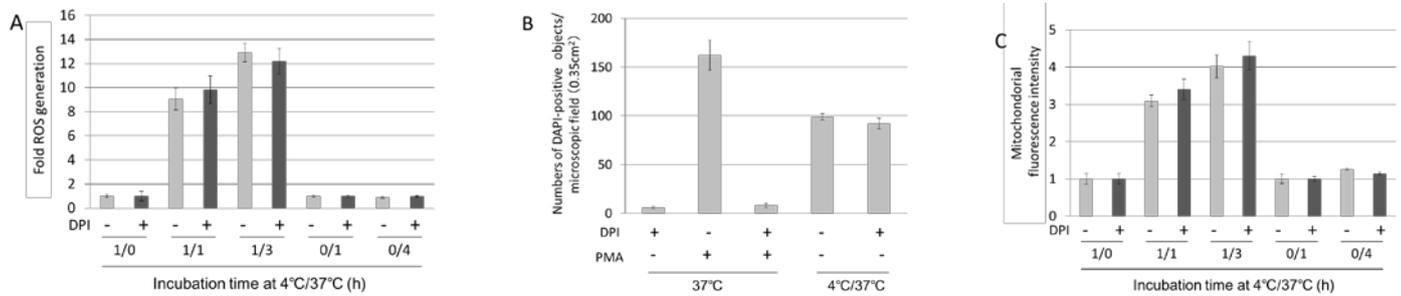
### 2 - 3 - 3 低温と加温処理における細胞内での ROS の蓄積

上記の解析の結果から、低温処理による DAPI 染色陽性の繊維状構造体の生化学的な特性のいくつか NET に類似していることが明らかになった一方で、ヒストン修飾の違いから同一の構造体であると結論付けるのは難しいと考えられる。そこで、次にこれらの構造体の誘導・形成機序に関して解析、比較していくこととした。はじめに、NETs 誘導において重要な引き金になっていることが報告されている細胞内の活性酸素 (ROS) の産生について着目して解析を行った。解析には好中球に ROS 測定試薬である CellROX Deep Red Reagent を添加、37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 30 min 静置し、洗浄したものをフローサイトメトリーにて蛍光強度の測定を行った。

その結果、4°C で低温処理後の 37°C での再加温直後に急激な ROS の蓄積が急速に上昇することが確認され、それは再加温後 3h まで続くことから、この急速な細胞内での ROS の蓄積が DAPI 染色陽性の繊維状構造を誘導する 1 つの原因ではないかと考えられた。しかしながら、好中球を PMA で処理する際に見られる NETs の形成過程で、ROS の産生に関わっている NAD(P)H オキシダーゼの阻害剤である DPI を低温処理から加温する過程で添加しても DAPI 染色陽性の繊維状構造の誘導および細胞内 ROS の蓄積が抑制できていなかった (Fig. 6A-C)。

低温処理から加温の過程で ROS の蓄積が DPI で抑制されなかったことから、NAD(P)H オキシダ

一ゼを介する経路で ROS が生成する可能性が低いことが示唆された。そこで、有酸素呼吸の過程で ROS の生成が活発に行われているミトコンドリア由来の ROS ではないかと推測し、低温処理時のミトコンドリアのエネルギー産生時の呼吸活性について解析を行った。解析には好中球にミトコンドリアの呼吸活性測定試薬である MitoTracker Red CMXRos を添加、37°C の 5% CO<sup>2</sup> インキュベータで 30 min 静置し、洗浄したものをフローサイトメトリーにて蛍光強度の測定を行った。その結果、低温処理後の再加温時において、ミトコンドリアの呼吸が活性化している結果が得られた。



**Fig. 6 低温処理細胞における ROS の産生とミトコンドリアの活性** A) 活性酸素(ROS)を CellROX Deep Red Re agent を用い、細胞内の蛍光強度をフローサイトメトリーにて測定した。4°Cで 1h 処理(1/0)の DPI 添加および無添加の値を基準として上記の条件の測定結果を相対比で示している。B) ヒト好中球を 4°C1h 低温処理後、37°Cで 5h で静置(4°C/37°C)、またはそれに NETs 阻害剤 DPI(100 μM)を添加後、カバーガラス(0.35cm<sup>2</sup>)上で確認された DAPI 染色陽性の繊維状構造体の数を示しており、左図には対照として、PMA で誘導した際に確認された NETs(37°C)の数を示している。C) ヒト好中球(1×10<sup>6</sup> cells/ml)を、4°Cで 1h 処理(1/0)、4°Cで 1h 後、37°Cで 1h 処理(1/1)、4°Cで 1h 後、37°Cで 3h 処理(1/3)、37°Cで 1h 処理(0/1)、37°Cで 4h 処理(0/4)したもの(灰色)、またはそれに NETs 阻害剤 DPI(100 μM)を添加(黒)した時のミトコンドリア活性を MitoTracker Red CMXRos を用い、細胞内の蛍光強度をフローサイトメトリーにて測定した。4°Cで 1h 処理(1/0)の DPI 添加および無添加の値を基準として上記の条件の測定結果を相対比で示している。

#### 4 まとめ

今回の研究から、低温処理後に好中球を加温すると NETs に類似した DAPI 染色陽性の繊維状構造体が誘導されることが示された。<sup>1)</sup> 紙面の都合上、この報告書には記述していないが、好中球で観察されたのと同様の現象を HL-60 細胞でも見いだして報告している。<sup>2)</sup>

好中球の分化と成熟に伴う核の分葉化や NETs の形成は、単なる遺伝子発現様式の変換にとどまらないダイナミックでユニークな生理的なプロセスであると考えられる。それらの分子メカニズムの研究は、生体の持つ未知の機能を知ることであり、新たな学術的な概念を創出する原動力となる。本研究では好中球と HL-60 培養細胞株を用いて、*in vitro* での分葉核の形成と NETs 類似の構造体の誘導系を確立した。特に低温—加温による温度刺激による好中球や血球系の培養細胞で観察された NET 類似構造の形成機序についての解析を行い、核とクロマチン構造の大規模なリモデリングを伴う細胞分化の一連のプロセスを連続的に解析できる実験系を構築した。今後大きく発展する高次の核とクロマチン構造研究に貢献し、今までほとんど解析されていなかった低温ストレスに対する好中球の応答のシグナル経路を理解することにも貢献する。

#### 5 発表論文 (参考文献は紙面の都合上省略するが、以下の発表論文1および2の References を参照)

1) Generation of Unfolded DNA in Human Neutrophils Following Hypothermal Treatment. *CellBio*, Vol. 2, No. 3, pp.117~124. 平成 25 年 9 月 13 日発行に掲載, 著者名 Jin Kawata, Makoto Kikuchi, Hisato Saitoh (査読有り)

2) Genomic DNAs in a Human Leukemia Cell Line Unfold After Cold Shock with Formation of Neutrophil Extracellular Trap-like Structures. *Biotechnology Letters*. 平成 25 年 10 月 8 日にインターネット掲載, 著者名 Jin Kawata, Makoto Kikuchi, Hisato Saitoh (査読有り)

3) HL-60 細胞を用いた Neutrophil Extracellular Traps(NETs)の実験モデルの構築. 熊本保健科学大学保健科学研究誌, 投稿中(リバイズ中)、平成 25 年 10 月 31 日受付 (査読有り)