

# 塩化物イオンが果たす白血球活性化及び臓器炎症の役割解明

西 裕志

東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科

**概要** 近年、食塩と免疫機能の関係が急速に注目を浴びているが、その研究対象はリンパ球や単球・マクロファージの分化過程であることが多い。本研究では、食塩の構成成分である塩化物イオンが自然免疫系で非特異的な生体防御をつかさどる好中球の免疫機能に果たす役割を検証した。好中球は呼吸性バーストでスーパーオキシドや次亜塩素酸を放出し殺菌作用を呈するほか、この作用不全は個体レベルの易感染性を招く。

まず、野生型マウスの骨髄好中球に phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で呼吸性バーストを惹起し、次亜塩素酸に鋭敏に反応するルミノール反応シグナルで定量評価した。好中球ペルオキシダーゼ myeloperoxidase (MPO) 阻害薬で前処理した好中球、或いは MPO を欠損した好中球ではルミノール反応が大きく低下しており、呼吸性バーストによって産生されるスーパーオキシドが MPO によって次亜塩素酸に変換されるという事象を支持した。

次に、塩化物イオンの細胞内移動を担う細胞膜輸送体である嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) が好中球に発現していることを確認し、遺伝学的に細胞及びマウス個体レベルで *Cftr* 遺伝子を発現抑制させた。いずれも今後の機能解析実験に向けて利用価値が高いと考えられる。

今後、*Cftr* 遺伝子発現抑制された培養白血球を使用して CFTR が好中球機能、特に呼吸性バーストや脱顆粒、好中球細胞外トラップ neutrophil extracellular traps (NETS) に及ぼす影響を検証する。また、体外から侵入してくる微生物に対する生体防御のみならずいわゆる無菌的な環境で生じる自己免疫疾患の病態に関与しているのかも、好中球の寄与が大きいことが実験学的に証明されている動物疾患モデルなどで検証を進めていく。

## 1. 研究目的

食塩を構成するナトリウムイオンと塩化物イオンは電解質の“King and Queen”<sup>1</sup>と形容されるが、ナトリウムイオンに比して塩化物イオンの生理作用については研究対象となることが圧倒的に少ない<sup>2,4</sup>。

一方、近年、食塩と免疫機能の関係が急速に注目を浴びている。たとえば、獲得免疫の主役であるリンパ球との関係では、細胞外の食塩濃度の上昇が serum glucocorticoid kinase 1 (SGK1) 活性上昇を介して幼若リンパ球から炎症誘導性の Th17 細胞への分化を進める<sup>5</sup>。生物個体における食塩摂取から Th17 細胞分化促進への因果関係はまた腸内細菌叢の変化からも説明されている<sup>6</sup>。また、自然免疫で研究が進んでいる単球・マクロファージ

についても、食塩摂取の過剰は抗炎症性の M2 マクロファージの活性化を阻害する<sup>7</sup>、或いは、食塩はマクロファージの形質を M2 優位に誘導しヘルパー T 細胞の機能を抑制するという報告もある<sup>8</sup>。

自然免疫を司る免疫細胞のひとつにしてヒト末梢白血球分画の中でも最多の好中球にとって、食塩、そしてその主成分の一つである塩化物イオンの果たす役割は小さくないと予想される。

皮膚・上皮バリアに次いで自然免疫系で非特異的な生体防御をつかさどる好中球は、貪食(オプソナイズ化)および呼吸性バーストと呼ばれる活性酸素の大量産生・放出して侵入した感染微生物を消化する。好中球は、細菌を貪食作用により細胞に取り込む等の炎症性刺激が入力さ

れると、細胞膜 NADPH オキシダーゼ複合体が形成、活性化されて、細胞外で酸素からスーパーオキシドが生産される。スーパーオキシドはそれ自体細菌を撃退する強い酸化力を有するがすぐに失活するため、好中球のもつ高い抗微生物(細菌・真菌)作用の本態は別にもある。すなわち、細胞外のスーパーオキシドの大部分は不均化反応により過酸化水素となり<sup>9</sup>、さらに、もともと Azur 顆粒酵素として蓄えられている細胞内のペルオキシダーゼ myeloperoxidase (MPO) の働きにより次亜塩素酸に変換される。この機構は十分解明されていないが、MPO によって、過酸化水素との反応から生成した反応中間体 compound I が塩化物イオンと反応して次亜塩素酸付加錯体が生成すると考えられている<sup>10, 11</sup>。同酵素の活性が減弱している場合には種々の好中球の活性化が落ちると考えられる。その一方で、次亜塩素酸の産生を左右する MPO の有無が細胞活性にどのように影響を与えるかは十分に解明されていない。

また、好中球に発現する塩化物イオンを通ず細胞膜輸送体としては、プロテインキナーゼ A によって活性化される Cl チャネル、ClC<sub>3</sub> 2Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 等の Cl チャネル、Ca<sup>2+</sup>活性化 Cl チャネル、KCC 等の陽イオン-Cl 共輸送体が知られている<sup>12</sup>。このうち、PKA と関連の深い嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) のゲノム遺伝子変異は嚢胞性線維症の原因になる<sup>13</sup>。同疾患は、肺の慢性細菌感染と肺組織の破壊を特徴とする遺伝性疾患であり、最終的には呼吸不全に至る。現在の治療は、呼吸器感染症に対する抗生物質療法や、膵臓機能不全を治療するためのビタミンや酵素のサプリメントなど、対症療法に終始している。患者が呼吸器感染症を根治させられない要因の一つに好中球の活性化の異常があるとされる。患者好中球では Azur 顆粒からのプロテアーゼ放出が増加しているという報告<sup>14</sup>。しかしながら、患者好中球特有の形質が遺伝的な CFTR 機能不全によるのか<sup>15</sup>、後天的な慢性炎症による二次応答なのか<sup>16, 17</sup>、は明らかではない。好中球内の塩化物イオンの動態も十分解明されておらず、好中球 CFTR の機能解析は基礎科学的にも臨床的にも重要な研究課題と言える。

本研究では、好中球バーストにおける次亜塩素酸の産生機序、特に MPO の寄与に関する検証、及び、好中球

の細胞膜塩化物イオン輸送体の細胞活性化や個体レベルで機能を解析する試みを行った。

## 2. 研究方法

### 2. 1. 試薬・抗体

4-Aminobenzoic Acid hydrazide (4-ABAH, Cayman, 米国), CFTR(inh)-172 (Sigma-Aldrich, 米国), PMA (Sigma-Aldrich), luminol (Sigma-Aldrich) を使用した。

### 2. 2. 培養細胞

未分化状態のマウス白血球細胞 HL-60 (ATCC, USA) に対して、DMSO を 4-5 日間培地添加し分化させて実験に使用した。

### 2. 3. shRNA 発現ウイルスベクター実験

Mission shRNA (Sigma-Aldrich) を購入し、HEK-293 細胞でヒト *Cftr* を標的とする shRNA 発現レンチウイルスを作成した<sup>18</sup>。

### 2. 4. 定量 PCR

細胞から total RNA を抽出し逆転写酵素反応によって cDNA を作成後に(表 1)に塩基配列を示すプライマーを用いて定量的 PCR を行った。

### 2. 5. ルミノール反応

二価陽イオン添加 DPBS に 5 μM luminol 及び検体となる細胞を入れて、各種刺激後に化学発光をルミノメーターで持続的に定量評価した。反応シグナルを誘導するために PMA を懸濁液に添加したほか、4°C で抗 Fcγ 受容体抗体と反応後に 37°C で GM-CSF により細胞をプライミングし、最後に二次抗体を添加して Fc 受容体架橋反応を誘導した。

(表 1) qPCR primers

Cftr (Forward)	CGTCTGCCTTCTGTGGACTT
Cftr (Reverse)	TCCCAGCTCTCTGATCTCTGT
β-actin (Forward)	TCCCCCAACTTGAGATGTATGAAG
β-actin (Reverse)	AACTGGTCTCAAGTCAGTGTACAGG

## 2. 6. マウス

好中球ペルオキシダーゼ欠損マウス(Jackson Lab, 米国)を使用したほか、ヘテロ接合型(ホモ接合体 x C57BL/6NCr Slc)CFTR ノックアウトマウス凍結胚 106 個を国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所:実験動物研究資源バンクからご提供いただいた。*Cfir* 遺伝子の全配列の情報は Ensembl データベースを参照した。C57BL/6NCr マウスの 6 番染色体上の *Cfir* 遺伝子の第 4 エクソンと第 6 エクソンに挟まれた一部を、Cas9 タンパク(Integrated DNA Technologies (IDT), USA)と guide RNAs (gRNAs, 表 2, IDT)を用いて TAKE 法<sup>19</sup>によって欠失させた。融解した胚を野生型メスに移植し出産させた。プロトSpacer隣接モチーフ protospacer adjacent motif (PAM)を以下に示す。

マウス尻尾からゲノムDNAを抽出し、genotypingは(表3)の3プライマーを混合してPCRを行った。

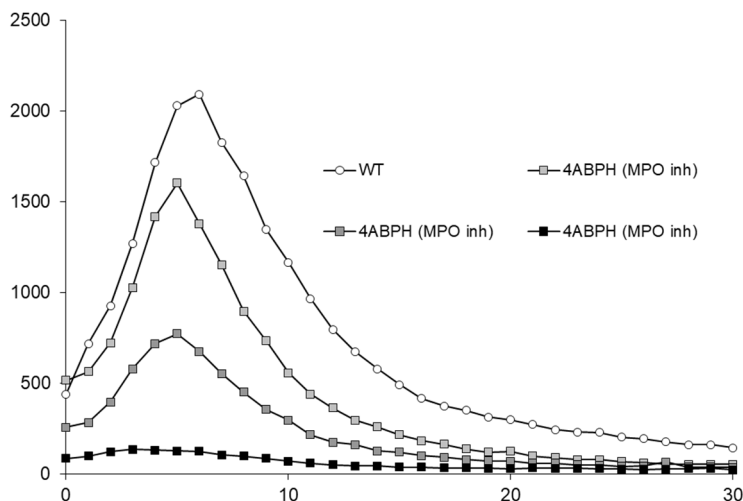
## 2. 7. マウス骨髄好中球単離

Percoll 法を用いてマウス骨髄から好中球を単離した。

## 3. 研究結果

### 3. 1. 塩化物イオンを含む次亜塩素酸の好中球からの産生の修飾因子

野生型マウスの骨髄好中球を用いてPMAによる呼吸性バーストを惹起した。好中球をMPO阻害薬で前処理すると、次亜塩素酸に鋭敏に反応するルミノール反応シグナルが阻害薬濃度依存性にわずかに低下した(図1)。また、MPO欠損マウス由来の骨髄好中球でもさらに顕著な低下が観察された(図2)。PMAではなく、好中球上のFcγ受容体へのIgG結合を契機とした活性酸素の産生においても同様の傾向が認められた(図2)。



(図 1)MPO 阻害薬添加によるマウス骨髄好中球の PMA 誘導性ルミノール応答シグナル. X 軸:時間(分). Y 軸:化学発光強度 (IU).

## 3. 2. 好中球 CFTR 遺伝子発現抑制

細胞内外の塩化物イオンの移動を担う細胞膜輸送体として好中球 CFTR に注目した。培養細胞では好中球様に分化させた HL-60 細胞に *Cfir* 遺伝子の発現が認められた(図 3)。

次に、強制的に発現抑制させて、細胞内外の塩化物イオンの移動を阻害した状況で白血球の活性化を評価することにした。遺伝子発現抑制には現在最も普及していると思われる siRNA 導入法を計画したが、HL-60 細胞が浮遊細胞であるためカトランスフェクション試薬を用いても十分な抑制が得られなかった。このため、構造的に単純な

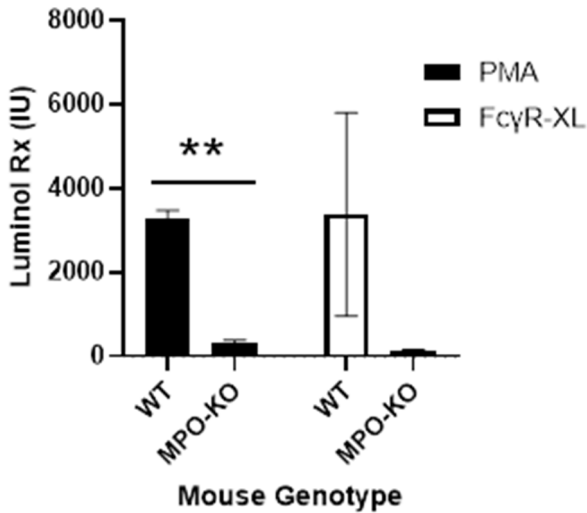
(表 2) guide RNAs

Exon 4 (Reverse strand)	GAACGTTCCACCTTGTTTTTC /TGG
Exon 6 (Forward strand)	CCTTGTTTACTGATAATCC /TGG

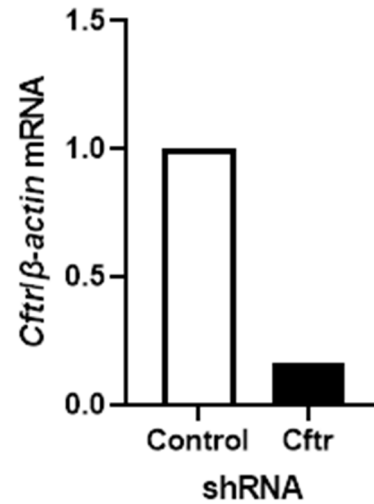
プロトSpacer隣接モチーフ protospacer adjacent motif (PAM)を以下に示す

(表 3) genotyping PCR primers

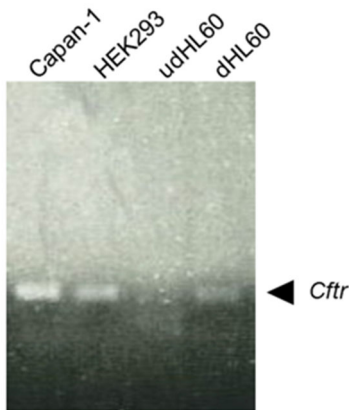
Forward	TGAAATTTAATCACTGCCTTCTCC TGC
野生型アリル reverse	CAGGGCAGCAAACCTCAGCAAAG AAC
遺伝子欠損アリル reverse	GTTAGGGCTTAGAGAAGCCCAAT TCAA



(図 2) MPO 阻害薬添加によるマウス骨髄好中球の PMA 誘導性ルミノール応答シグナル. Rx: reaction, WT: wild-type, \*\*:  $p < 0.01$ .

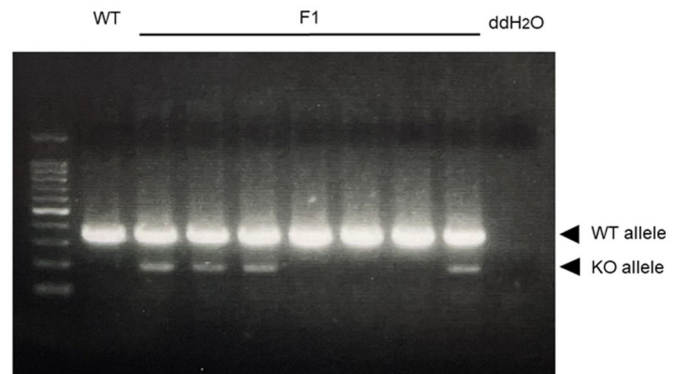


(図 4) 逆転写反応後の定量 PCR による *Cftr* 遺伝子発現の評価



(図 3) 好中球(分化 HL-60 細胞)における *Cftr* 遺伝子の発現. 各細胞の逆転写反応の *Cftr* 遺伝子プライマーを用いた PCR 産物のアガロースゲル電気泳動結果. Capan-1: ヒト膵腺癌細胞 (陽性コントロール), udHL60: undifferentiated HL-60 細胞, dHL60: differentiated HL-60 細胞.

GFP 発現 plasmid を electroporation 法で HL-60 細胞に対して導入を試みた. しかし, 電圧, 細胞数等の条件を検討するなどしたが, やはり十分な導入効率を得られなかった. 次にウイルスベクターを用いた Crispr/Cas9 法<sup>20</sup>を試みたが, これについてもコンストラクトの作成に難渋したため, 計画した plasmid を創出することができなかった.



(図 5) F1 及び野生型マウスの下でのタイピング PCR 産物のアガロースゲル電気泳動. WT: wild-type, KO: knockout, ddH<sub>2</sub>O: double distilled water.

最終的に, 標的遺伝子に対する shRNA を発現するウイルスベクターを作成し, HL-60 細胞への導入を行い, CFTR 遺伝子の発現抑制が得られた ( $n=2$ , 図 4)。

### 3. 3. 好中球 CFTR 遺伝子発現抑制

上記に並行して, 生物個体における CFTR の機能を解析するために全身ノックアウトマウスを利用して表現型を解析することとした. F0 胚移植から離乳にまで至った F1 産仔が 7 匹と寡少であった. これらについて genotyping PCR を実施したところ, 雌雄別の 4 匹のヘテロ接合体が得られた (図 5)。

## 4. 考 察

実験前半の結果からは、MPO の化学的酵素阻害及び内在性欠損の両者が好中球の活性化に伴うリミノール反応で検出される次亜塩素酸の産生を大きく阻害していた。これは好中球の呼吸性バーストによって産生されるスーパーオキシドが MPO によって次亜塩素酸に変換されるという事象を支持する。一方、MPO 活性の低下が好中球の他の抗細菌作用や自己組織攻撃作用にどのような影響を及ぼすかは不明であり、今後の課題である。

実験後半では、疾病に関係する塩化物イオン輸送体として好中球上の CFTR に着目した。CFTR 発現抑制好中球や欠損マウスの創出には予想を大きく上回る時間と苦勞を要したが、そもそも好中球 CFTR の機能が前述のように統一した見解が得られておらず<sup>14-17</sup>、本研究で樹立できた培養細胞及び生物個体での今後の機能解析が極めて重要である。また、嚢胞性線維症は代表的な難治性疾患の一つであるが、最近承認された新薬 ivacaftor は G551D 突然変異のキャリアの欠陥 CFTR を修正する。こうした新規薬剤が患者好中球にどのような影響を与えるのかも今後の研究課題と言える。

以上、好中球における塩化物イオンの動態に着目し、呼吸性バーストにおける次亜塩素酸の産生には好中球 MPO が重要であることを明らかにし、また、好中球上の塩化物イオン輸送体の機能解析研究の基盤を今回確立できた。

## 5. 今後の課題

### 5. 1. 細胞実験

*Cftr* 遺伝子が発現抑制された HL-60 細胞を培養維持して、CFTR が好中球機能に与える影響について検証を行う。とくに自己免疫疾患での関与が指摘されている呼吸性バーストや脱顆粒、Ca チャネル開口に誘導される好中球細胞外トラップ neutrophil extracellular traps (NETS) に及ぼす影響を評価する。

### 5. 2. 動物実験

塩化物イオンが含まれるこれら活性酸素が個体レベルで自己免疫疾患の病態に関与しているのかは全く明らかではない。そこで、次亜塩素酸生成に重要となるこれら分子の遺伝学的欠損マウスが利用可能であることから、免疫異常を基盤とした動物モデルのうち、好中球活性化の寄与が大きいことが実験学的に証明されている糸球体腎炎

モデル<sup>18</sup>、免疫複合体関連関節リウマチモデル<sup>21</sup>、皮下気腫好中球遊走モデル<sup>22</sup>を遺伝子改変マウスに誘導して、その障害程度を評価することとする。これによって、塩化物イオンが含まれる好中球活性酸素のコントロールが疾患にどのように影響を及ぼすのかが評価可能であり、さらには塩化物イオン自体の増減が自己免疫疾患(とくにこの場合は、旧来あまり注目されてこなかった好中球が主体となる急性かつ重度な組織障害)の治療標的になりえるという新しい立場を提示することができる。

## 6. 文 献

1. Berend, K, van Hulsteijn, LH, Gans, RO: Chloride: the queen of electrolytes? *Eur J Intern Med*, 23: 203-211, 2012.
2. Koch, SM, Taylor, RW: Chloride ion in intensive care medicine. *Crit Care Med*, 20: 227-240, 1992.
3. Powers, F: The role of chloride in acid-base balance. *J Intraven Nurs*, 22: 286-291, 1999.
4. Yunos, NM, Bellomo, R, Story, D, Kellum, J: Bench-to-bedside review: Chloride in critical illness. *Crit Care*, 14: 226, 2010.
5. Wu, C, Yosef, N, Thalhammer, T, Zhu, C, Xiao, S, Kishi, Y, Regev, A, Kuchroo, VK: Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*, 496: 513-517, 2013.
6. Wilck, N, Matus, MG, Kearney, SM, Olesen, SW, Forslund, K, Bartolomaeus, H, Haase, S, Mahler, A, Balogh, A, Marko, L, Vvedenskaya, O, Kleiner, FH, Tsvetkov, D, Klug, L, Costea, PI, Sunagawa, S, Maier, L, Rakova, N, Schatz, V, Neubert, P, Fratzer, C, Krannich, A, Gollasch, M, Grohme, DA, Corte-Real, BF, Gerlach, RG, Basic, M, Typas, A, Wu, C, Titze, JM, Jantsch, J, Boschmann, M, Dechend, R, Kleinewietfeld, M, Kempa, S, Bork, P, Linker, RA, Alm, EJ, Muller, DN: Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature*, 551: 585-589, 2017.
7. Binger, KJ, Gebhardt, M, Heinig, M, Rintisch, C, Schroeder, A, Neuhofer, W, Hilgers, K, Manzel, A, Schwartz, C, Kleinewietfeld, M, Voelkl, J, Schatz, V, Linker, RA, Lang, F, Voehringer, D, Wright, MD,

- Hubner, N, Dechend, R, Jantsch, J, Titze, J, Muller, DN: High salt reduces the activation of IL-4- and IL-13-stimulated macrophages. *J Clin Invest*, 125: 4223-4238, 2015.
8. Rucker, AJ, Rudemiller, NP, Crowley, SD: Salt, Hypertension, and Immunity. *Annu Rev Physiol*, 80: 283-307, 2018.
  9. Okochi, Y, Aratani, Y, Adissu, HA, Miyawaki, N, Sasaki, M, Suzuki, K, Okamura, Y: The voltage-gated proton channel Hv1/VSOP inhibits neutrophil granule release. *J Leukoc Biol*, 99: 7-19, 2016.
  10. Cong, Z, Yanagisawa, S, Kurahashi, T, Ogura, T, Nakashima, S, Fujii, H: Synthesis, characterization, and reactivity of hypochloritoiron(III) porphyrin complexes. *J Am Chem Soc*, 134: 20617-20620, 2012.
  11. Yokota, S, Fujii, H: Critical Factors in Determining the Heterolytic versus Homolytic Bond Cleavage of Terminal Oxidants by Iron(III) Porphyrin Complexes. *J Am Chem Soc*, 140: 5127-5137, 2018.
  12. Wang, G, Nauseef, WM: Salt, chloride, bleach, and innate host defense. *J Leukoc Biol*, 98: 163-172, 2015.
  13. Rowe, SM, Miller, S, Sorscher, EJ: Cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 352: 1992-2001, 2005.
  14. Brockbank, S, Downey, D, Elborn, JS, Ennis, M: Effect of cystic fibrosis exacerbations on neutrophil function. *Int Immunopharmacol*, 5: 601-608, 2005.
  15. Painter, RG, Valentine, VG, Lanson, NA, Jr., Leidal, K, Zhang, Q, Lombard, G, Thompson, C, Viswanathan, A, Nauseef, WM, Wang, G, Wang, G: CFTR Expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis. *Biochemistry*, 45: 10260-10269, 2006.
  16. Pizurki, L, Morris, MA, Chanson, M, Solomon, M, Pavirani, A, Bouchardy, I, Suter, S: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator does not affect neutrophil migration across cystic fibrosis airway epithelial monolayers. *Am J Pathol*, 156: 1407-1416, 2000.
  17. McKeon, DJ, Cadwallader, KA, Idris, S, Cowburn, AS, Pasteur, MC, Barker, H, Haworth, CS, Bilton, D, Chilvers, ER, Condliffe, AM: Cystic fibrosis neutrophils have normal intrinsic reactive oxygen species generation. *Eur Respir J*, 35: 1264-1272, 2010.
  18. Nishi, H, Furuhashi, K, Cullere, X, Saggi, G, Miller, MJ, Chen, Y, Rosetti, F, Hamilton, SL, Yang, L, Pittman, SP, Liao, J, Herter, JM, Berry, JC, DeAngelo, DJ, Zhu, C, Tsokos, GC, Mayadas, TN: Neutrophil FcgammaRIIA promotes IgG-mediated glomerular neutrophil capture via Abl/Src kinases. *J Clin Invest*, 127: 3810-3826, 2017.
  19. Kaneko, T, Mashimo, T: Simple Genome Editing of Rodent Intact Embryos by Electroporation. *PLoS One*, 10: e0142755, 2015.
  20. Sanjana, NE, Shalem, O, Zhang, F: Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*, 11: 783-784, 2014.
  21. Rosetti, F, Tsuboi, N, Chen, K, Nishi, H, Hernandez, T, Sethi, S, Croce, K, Stavrakis, G, Alcocer-Varela, J, Gomez-Martin, D, van Rooijen, N, Kyttaris, VC, Lichtman, AH, Tsokos, GC, Mayadas, TN: Human lupus serum induces neutrophil-mediated organ damage in mice that is enabled by Mac-1 deficiency. *J Immunol*, 189: 3714-3723, 2012.
  22. Azcutia, V, Stefanidakis, M, Tsuboi, N, Mayadas, T, Croce, KJ, Fukuda, D, Aikawa, M, Newton, G, Luscinskas, FW: Endothelial CD47 promotes vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation and participates in T cell recruitment at sites of inflammation in vivo. *J Immunol*, 189: 2553-2562, 2012.

## Chloride Ion Contribution to Leukocyte Activation and Organ Inflammation

Hiroshi Nishi

The University of Tokyo Hospital  
Department of Nephrology and Endocrinology

### Summary

Recently the relationship between salt and immune function has been rapidly attracting attention. However, the target of research is often the differentiation process of lymphocytes, monocytes, and macrophages. In this study, we examined the role of chloride ion, which is a principle component of salt, in the immune function of neutrophils, which controls non-specific biological defense in the innate immune system. Neutrophils release superoxide and hypochlorous acid in a respiratory burst and exert a bactericidal action, and this dysfunction leads to individual-level susceptibility to infection.

First, neutrophil respiratory bursts were induced in bone marrow neutrophils with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), which was evaluated using a luminol reaction signal that responds sensitively to hypochlorous acid. The luminol response was significantly reduced in neutrophils pretreated with a neutrophil peroxidase (MPO) inhibitor or MPO-deficient neutrophils. This indicates that the superoxide produced by the respiratory burst is converted to hypochlorous acid by MPO.

Next, we confirmed that the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), which is a cell membrane transporter responsible for the intracellular migration of chloride ions, is expressed in neutrophils. We created cells infected with viral vector particle expressing shRNA against *Cftr* gene and *Cftr*-deficient mouse. This allows us to elucidate whether neutrophil dysfunction partly explains refractory chronic bacterial infection in patients with cystic fibrosis.

In the future, we will examine the effects of CFTR on neutrophil function in terms of self defense against infection and aseptic autoimmune diseases.