

京都大学	博士（人間健康科学）	氏 名	西 中 瑶 子
論文題目	Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. （一重項酸素は好中球細胞外トラップ形成に必須である）		
（論文内容の要旨）			
活性酸素種（reactive oxygen species：ROS）は生命活動に必須の酸素代謝に伴う副産物である。生体においては、生体防御や細胞内信号伝達への関与など有益な面を有する一方、過剰に発生するとその高い反応性から傷害を及ぼすという二面性を有する。また、生体内で産生されるROSの種類は多く、酸素中心型では、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、次亜塩素酸ならびに一重項酸素（¹O₂）がある。そのため、ROSの産生される場所、時間、量、種類は厳密に制御される必要がある。しかし、これまでの多くの研究ではROSの種別を考慮することなく、その検出や作用の検討が行われている。そこで、ROSの種別に留意して研究を進めるため、生体における主なROS産生源であり、上記の酸素中心型ROSの全てを産生する好中球を研究対象とした。 好中球は自然免疫の一端を担っており、その新たな殺菌機構として好中球細胞外トラップ（neutrophil extracellular traps：NETs）が注目されている。NETsとはエラスターゼやヒストンを結合したデオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid：DNA）を細胞外に放出し、食食を伴わない殺菌機構で、細菌や真菌に対して有効であることが報告されている。一方で、NETs形成に伴い、細胞外に放出されたエラスターゼ、ヒストンやDNAの血管傷害や自己免疫疾患への関与が報告されている。NETsは、まずNADPHオキシダーゼ（NADPH oxidase：Nox）が活性化され、続いて核膜の崩壊、クロマチンの脱凝縮が起こり、最終的に細胞膜が崩壊して形成される。この形成の機序は未だ不明であるが、先天的なNox遺伝子の変異により、ROS産生能が欠損した慢性肉芽腫症（CGD）患者好中球ではNETs 形成が誘導されないことから、ROSが関与していることが報告されている。さらに、ミエロペルオキシダーゼ（myeloperoxidase：MPO）欠損症の患者血球ではNETs の形成が見られないことから、NETs 形成にはMPOが必要であることも報告されている。そこで、好中球のROS産生経路においてMPOの下流に位置する一重項酸素（¹O₂）のNETsへの関与を検討した。 まず、健常人好中球において、ホルバルミリステートアセテート（PMA）によりNoxを活性化し、NETs形成を誘導した。NETsは蛍光試薬を用いて死細胞のDNAを染色し観察を行った。この染色された細胞あたりのDNAの面積を計算することで、NETs形成を定量評価した。また、走査型電子顕微鏡を用いた観察によりNETs構造を確認した。このPMAにより誘導されたNETs形成を、¹O₂消去剤は抑制した。¹O₂消去剤としては、¹O₂消去能を確認したスピントラップ剤であるα-フェニルブチルニトロンと脳梗塞治療薬であるエダラボンを用いた。 次に、CGD患者好中球において、これまでの報告と同様にPMA刺激によってNETs形成が誘導されないことを確認した。しかし、CGD患者好中球内に光増感剤を取り込ませ、光励起により¹O₂を発生させると、NETs形成が誘導された。ここで誘導されたNETs形成は、¹O₂消去剤により抑制されることを確認した。今回の¹O₂発生法は、一部の癌治療に使われている光線力学的療法を応用したものである。 以上の所見から、¹O₂がNETs形成に必須であることが示された。今後、¹O₂を標的とするNETs形成の制御により、免疫・炎症性疾患などNETsが関与する病態の緩和に繋がることが期待される。			

（論文審査の結果の要旨） 生体内で発生する活性酸素種（ROS）は、その高い反応性から生体にとって有益、有害な二面性を有する。従ってROSによる傷害を緩和するには、主因となるROSを同定し、種別の役割を考慮した上で制御することが重要である。本研究では、ROSのうち生体での役割に不明な点の多い一重項酸素($^1\text{O}_2$)に着目し、研究を行った。 生体内における$^1\text{O}_2$の産生源である好中球の新たな殺菌機構として、好中球細胞外トラップ（neutrophil extracellular traps：NETs）が食食を伴わない殺菌機構として注目されている。また一方で、NETs形成による血管傷害や自己免疫疾患などの病態への関与も報告されている。このNETsにおける$^1\text{O}_2$の関与を検討した。 その結果、PMA刺激によって誘導したNETs形成を$^1\text{O}_2$消去剤は抑制した。また、先天的なNADPHオキシダーゼの欠損のため、PMA刺激によるNETsが形成されない慢性肉芽腫症患者好中球内で$^1\text{O}_2$を発生させるとNETs形成が誘導された。これらの結果より、$^1\text{O}_2$はNETs形成に必須であることが証明された。 以上の研究は、$^1\text{O}_2$がNETs形成に必須であることを解明し、$^1\text{O}_2$を標的とするNETs形成の調節により、免疫・炎症性疾患などNETsが関与する病態の緩和に繋がることが期待される。 したがって、本論文は博士（人間健康科学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 2 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			