

第 4 回抄読会

nature communications



Article

<https://doi.org/10.1038/s41467-022-34560-7>

Ferritin triggers neutrophil extracellular trap-mediated cytokine storm through Msr1 contributing to adult-onset Still's disease pathogenesis

フェリチンとNET

～Adult-onset Still Diseaseを中心とした話題～

毛利万里子

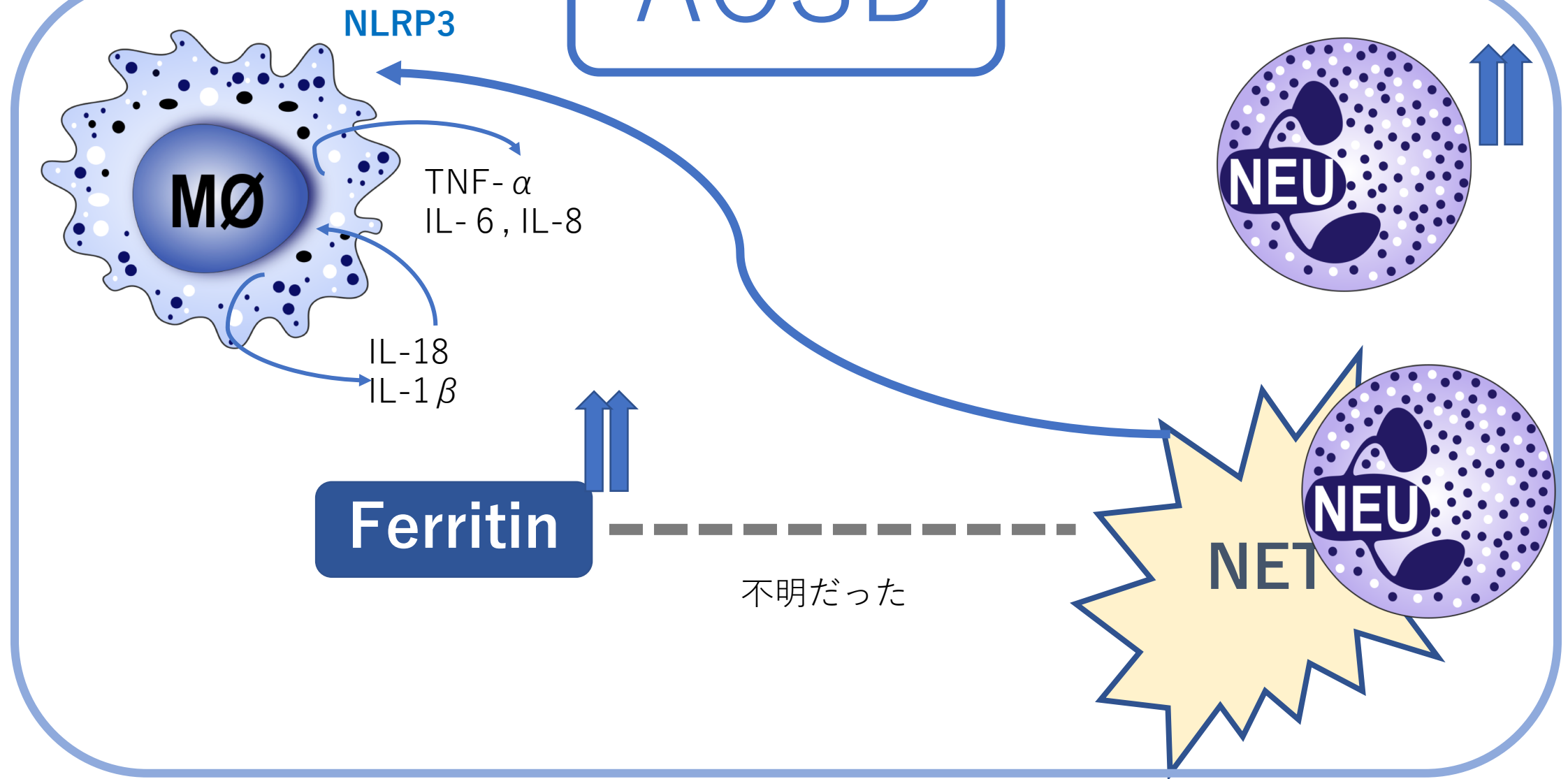


Ferritin triggers neutrophil extracellular trap-mediated cytokine storm through Msr1 contributing to adult-onset Still's disease pathogenesis

Jinchao Jia^{1,4}, Mengyan Wang^{1,4}, Jianfen Meng^{1,4}, Yuning Ma^{1,4}, Yang Wang², Naijun Miao², Jialin Teng¹, Dehao Zhu¹, Hui Shi¹, Yue Sun¹, Honglei Liu¹, Xiaobing Cheng¹, Yutong Su¹, Junna Ye¹, Huihui Chi¹, Tingting Liu¹, Zhuochao Zhou¹, Liyan Wan¹, Xia Chen¹, Fan Wang¹, Hao Zhang¹, Jingjing Ben³✉, Jing Wang²✉, Chengde Yang¹✉ & Qiongyi Hu¹✉

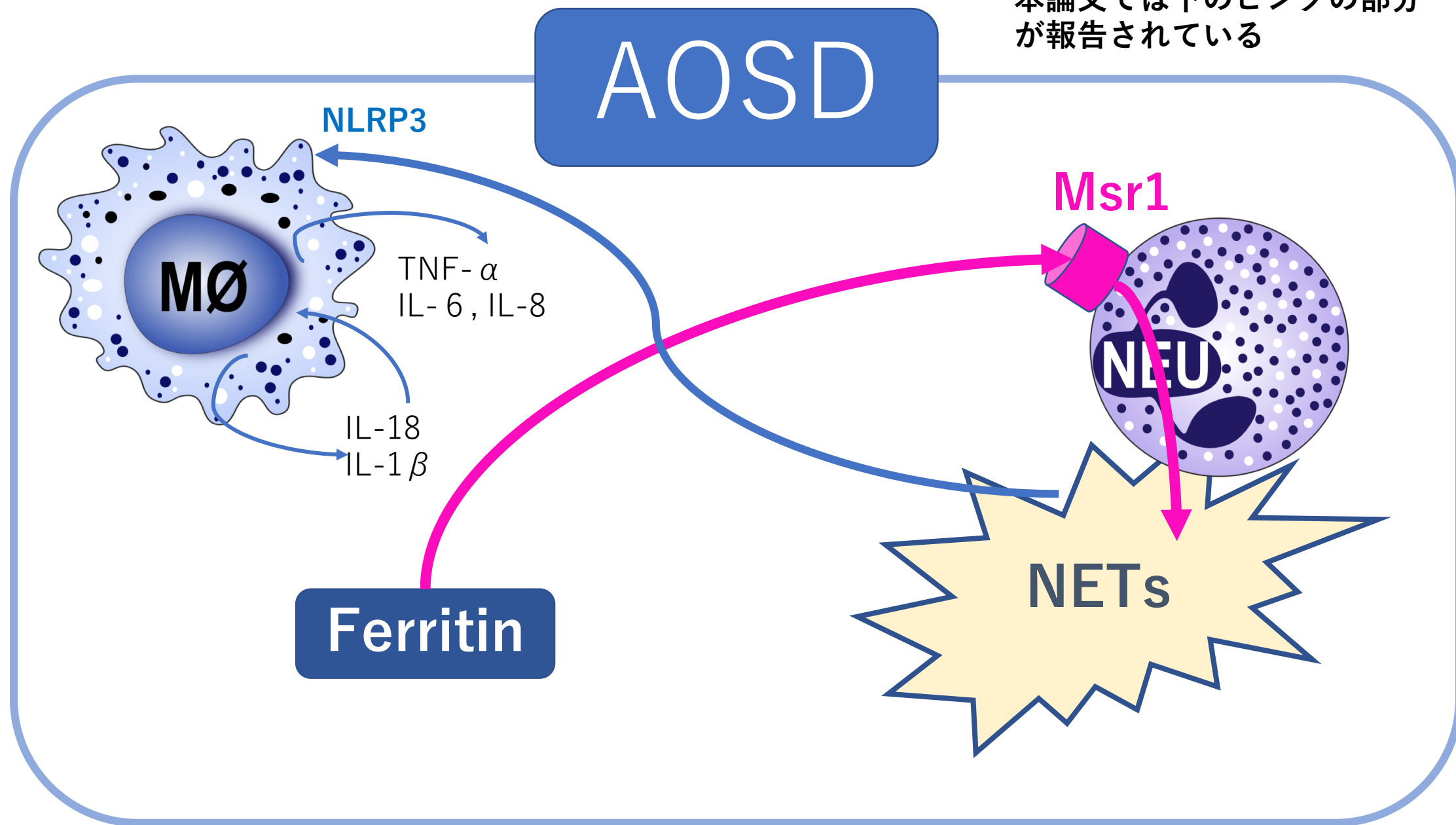
¹Department of Rheumatology and Immunology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China. ²Shanghai Institute of Immunology, Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China. ³Department of Pathophysiology, Key Laboratory of Cardiovascular Disease and Molecular Intervention, Nanjing Medical University, Nanjing, China. ⁴These authors contributed equally: Jinchao Jia, Mengyan Wang, Jianfen Meng, Yuning Ma. ✉e-mail: bjj@njmu.edu.cn; jingwang@shsmu.edu.cn; yangchengde@sina.com; huqiongyi131@163.com

AOSD



NET: 好中球細胞外トラップ

本論文では下のピンクの部分
が報告されている



背景



Hyperferritinemic syndrome

- 成人発症Still 病
- マクロファージ活性化症候群
- 劇症型抗リン脂質抗体症候群
- 敗血症性ショック
- **COVID-19**

高サイトカイン血症

フェリチンとは一体・・・？

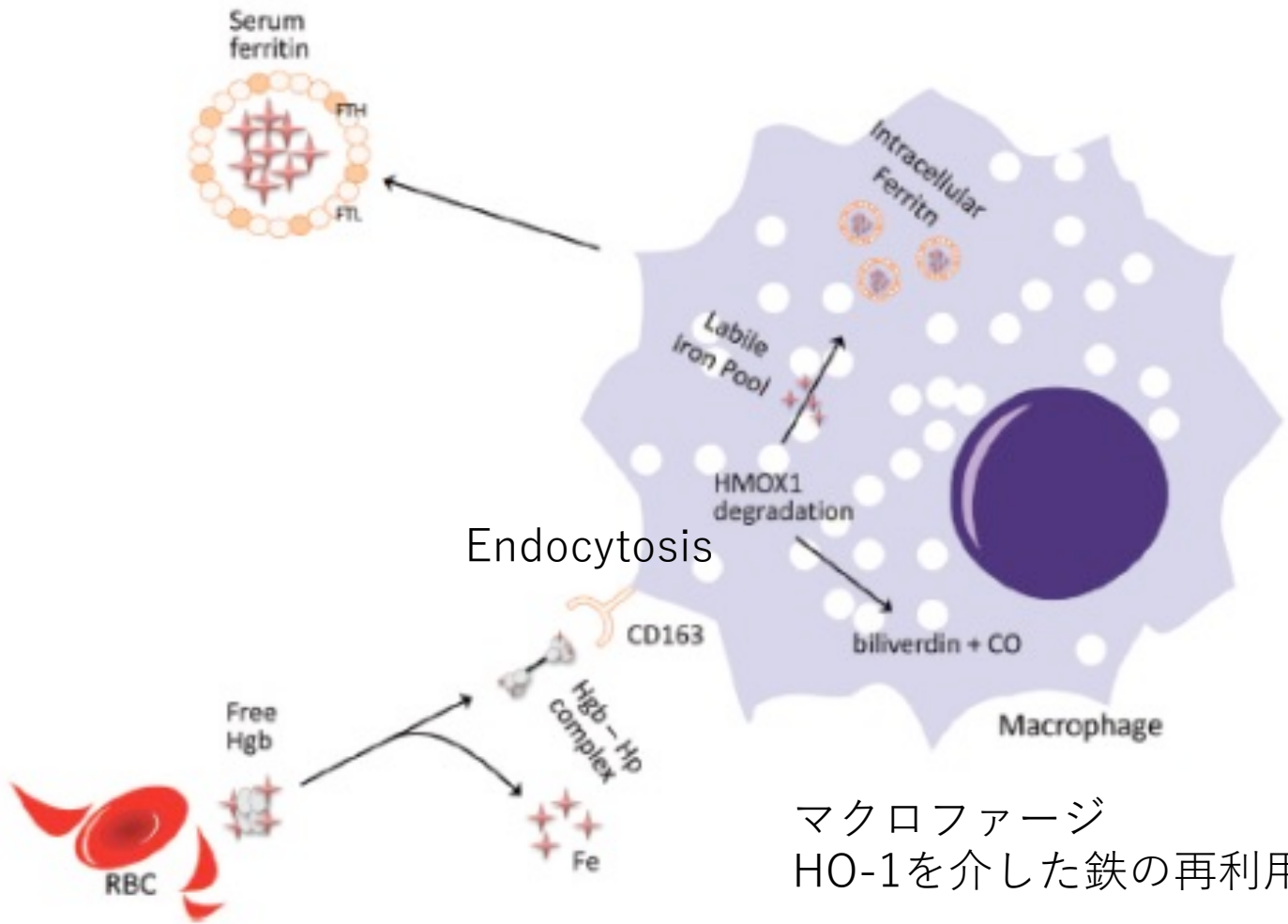
- ✓ 鉄貯蔵タンパク、鉄の恒常性維持の役割を果たす
ほとんどの生物が保持している重要なタンパク
- ✓ **急性期反応物質**の一つ あらゆる炎症応答で上昇する
- ✓ 血球貪食症候群では**かなり上昇**する

フェリチンとは??

ただのバイオマーカー？ 炎症を制御？ もしくは惹起？

(Intern Immunol 2017.29;401-409)

教科書的なフェリチンの役割



ヘモグロビン
→ビリベルジン、CO、遊離鉄(Fe^{2+})に分解

Fe^{2+} → Fenton反応により脂質ROSを発生させ、
細胞障害へ。
フェリチンが取り込むことでフリーラジカルの発生防止。
貯蔵や血漿循環への輸送に対して安定。

マクロファージ
HO-1を介した鉄の再利用

RESEARCH ARTICLE

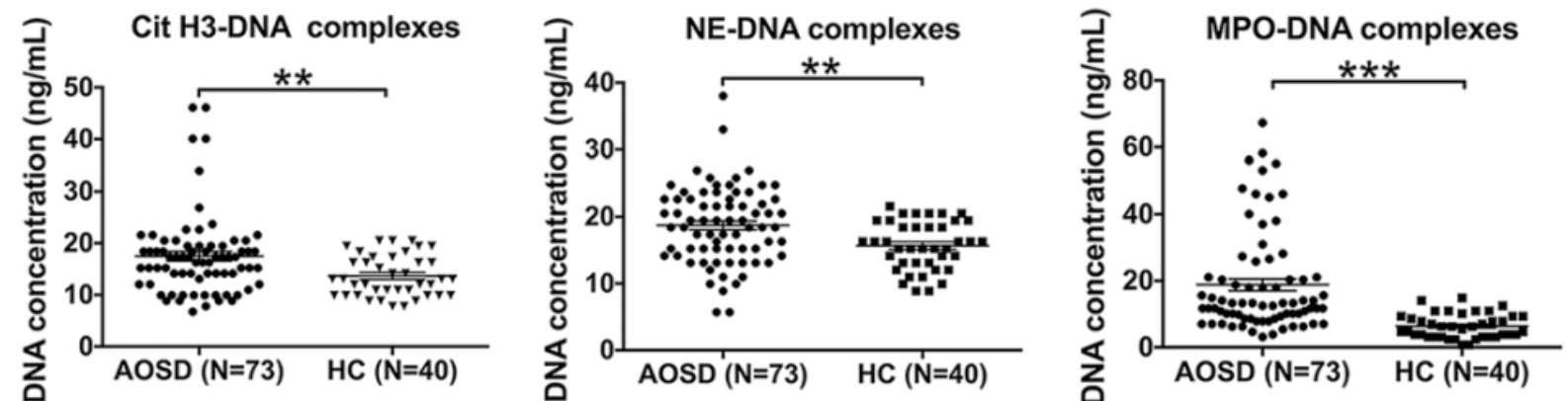
Open Access



Increased neutrophil extracellular traps activate NLRP3 and inflammatory macrophages in adult-onset Still's disease

Qiongyi Hu[†], Hui Shi[†], Ting Zeng, Honglei Liu, Yutong Su, Xiaobing Cheng, Junna Ye, Yufeng Yin, Mengru Liu, Hui Zheng, Xinyao Wu, Huihui Chi, Zhuochao Zhou, Jinchao Jia, Yue Sun^{*}, Jialin Teng^{*} and Chengde Yang^{*}

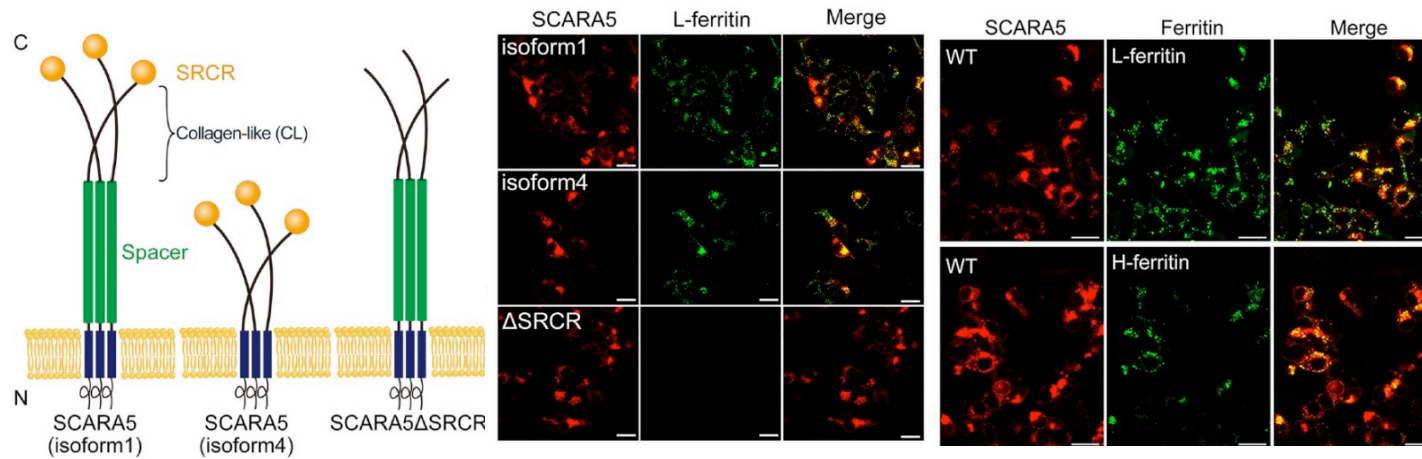
- ✓ AOSDの患者血清中ではNET-DNA複合体が上昇
- ✓ AOSDのNET-DNA複合体はマクロファージを活性化し, IL-1 β , IL-6, TNF- α 発現を増強させた



Interactions of ferritin with scavenger receptor class A members

Received for publication, June 4, 2020, and in revised form, August 31, 2020 Published, Papers in Press, September 9, 2020, DOI 10.1074/jbc.RA120.014690

Bowen Yu^{1,2} , Chen Cheng^{1,2}, Yichun Wu^{1,2}, Luqiang Guo^{1,2}, Dandan Kong^{1,2}, Ze Zhang^{1,2}, Yuanyuan Wang^{1,2}, Enlin Zheng^{1,2}, Yingbin Liu^{3,4}, and Yongning He^{1,2,3,4,*}



MSR1はFerritinのL鎖、H鎖を認識

<Scavenger receptors>

自己/非自己の物質をターゲットとする膜結合型受容体

SR-ClassA：1～5 までである

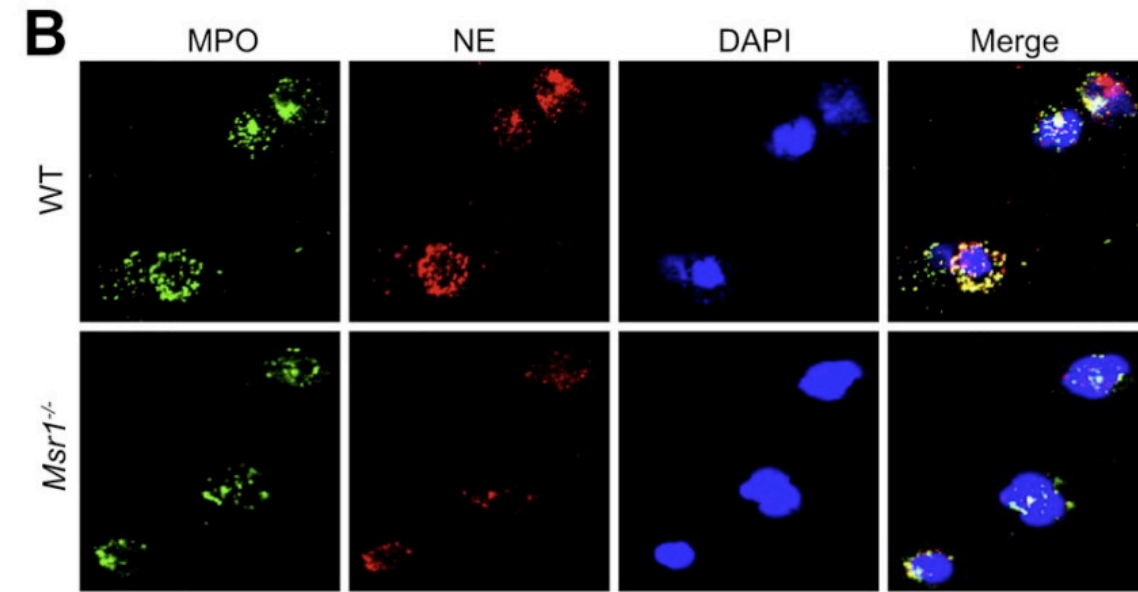
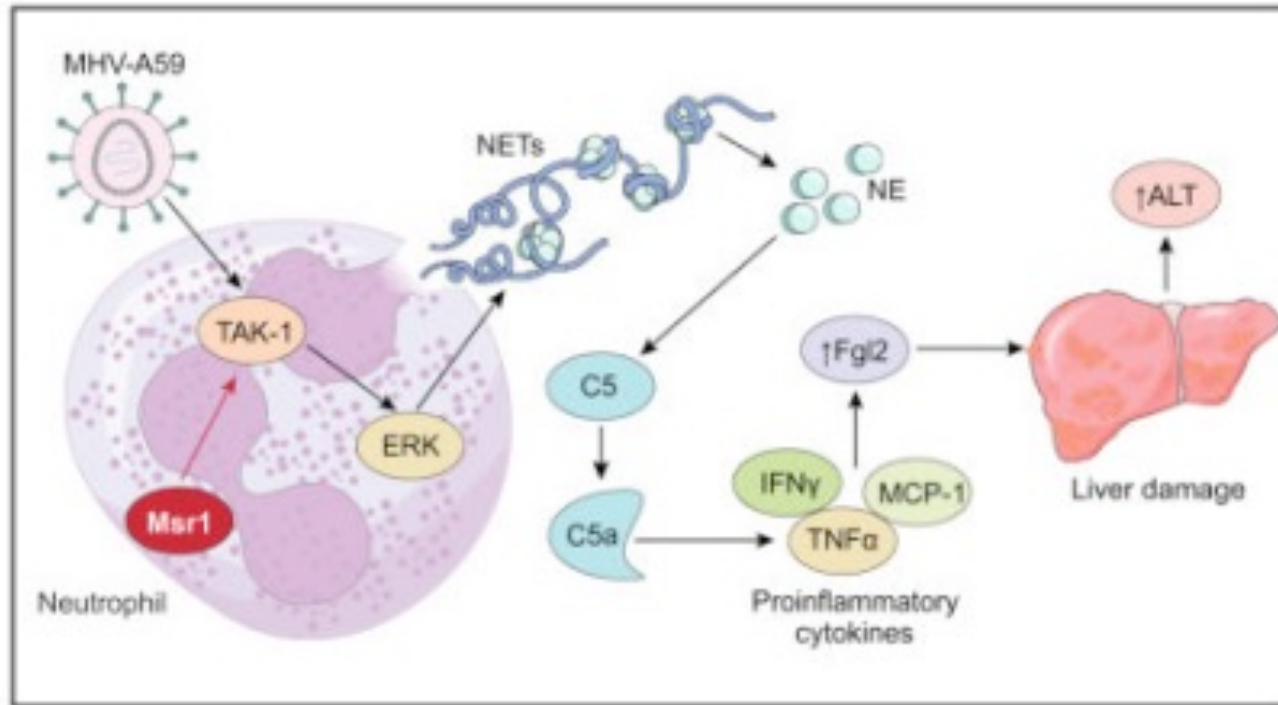
Msr1 (SCARA-5の一種)

：DAMPsを認識し細胞内に取り込み、分解・排除する

例) 脳梗塞後 Nat Med 2012,18.911

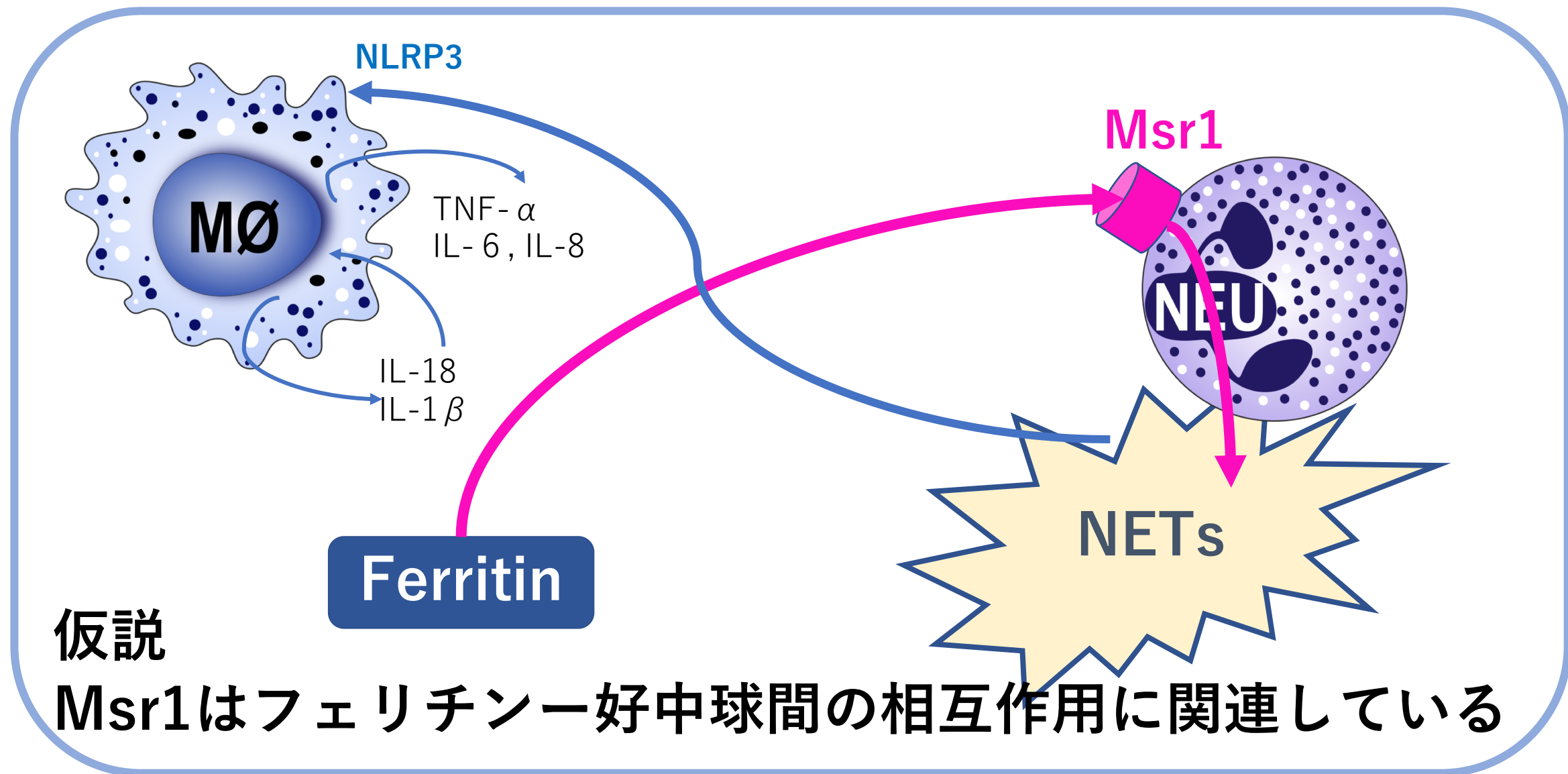
Macrophage scavenger receptor 1 contributes to pathogenesis of fulminant hepatitis via neutrophil-mediated complement activation

Yuan Tang¹, Huifang Li¹, Junru Li¹, Yunzhi Liu¹, Yanli Li¹, Jing Zhou¹, Jia Zhou¹, Xiao Lu¹, Wei Zhao², Jinlin Hou³, Xiang-Yang Wang⁴, Zhengliang Chen^{1,5,*}, and Daming Zuo^{1,5,*}



- ✓ *Msr1*^{-/-} マウスでは野生型マウスに比してNETosisが抑制された
- ✓ マウス肝炎ウイルスによる劇症肝炎における好中球エラスターゼ、C5aを介した*Msr1*^{-/-}のマウスでは抑制された

本論文：仮説



研究の概要

<マウスでの検討>

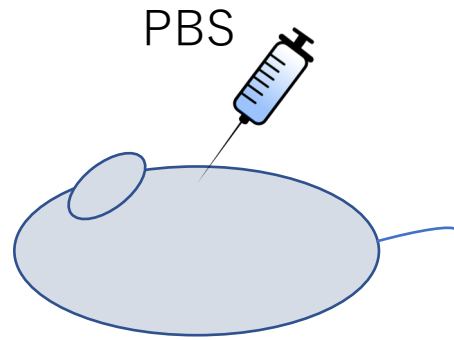
1. FER投与によって組織学、血液・血清学的変化がみられるか
2. FER投与によってNET形成が誘導されるか(@骨髓、肝)
3. 好中球除去でFERによる炎症が制御されるか
4. フェリチンは好中球のMsr1を発現を促進するか
5. Msr1欠損マウスではFER投与によるNET形成が減弱するか

<ヒトでの検討>

AOSDのヒト検体では：好中球のMsr1発現、NETs放出？

結果

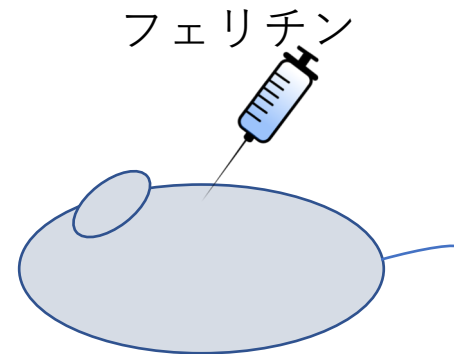
1. FER投与による肝・血液/血清学的変化



野生型マウスにPBSまたはフェリチンを腹腔内投与

<肝>

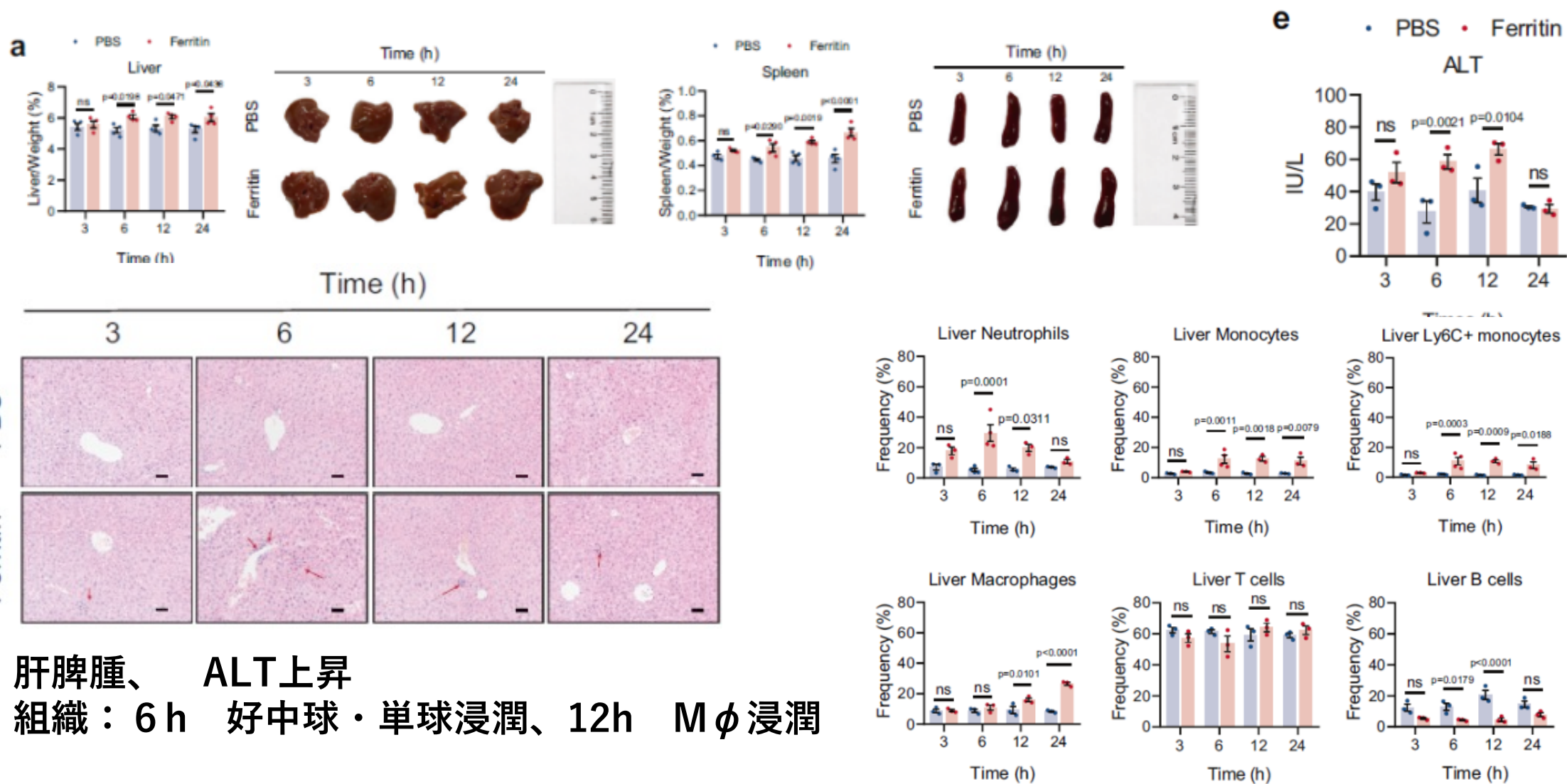
- ✓ 組織学的検討
- ✓ 浸潤細胞について
- ✓ 血清ALT値



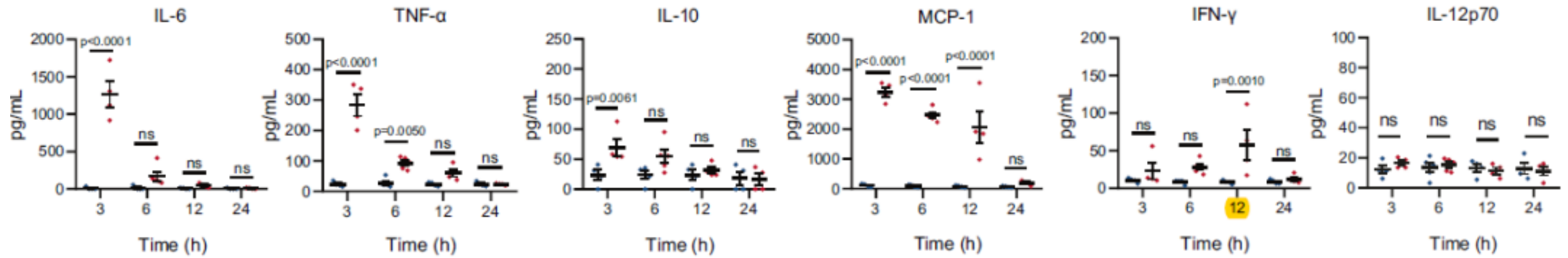
<血清>

- ✓ サイトカイン値、ケモカイン値

肝臟



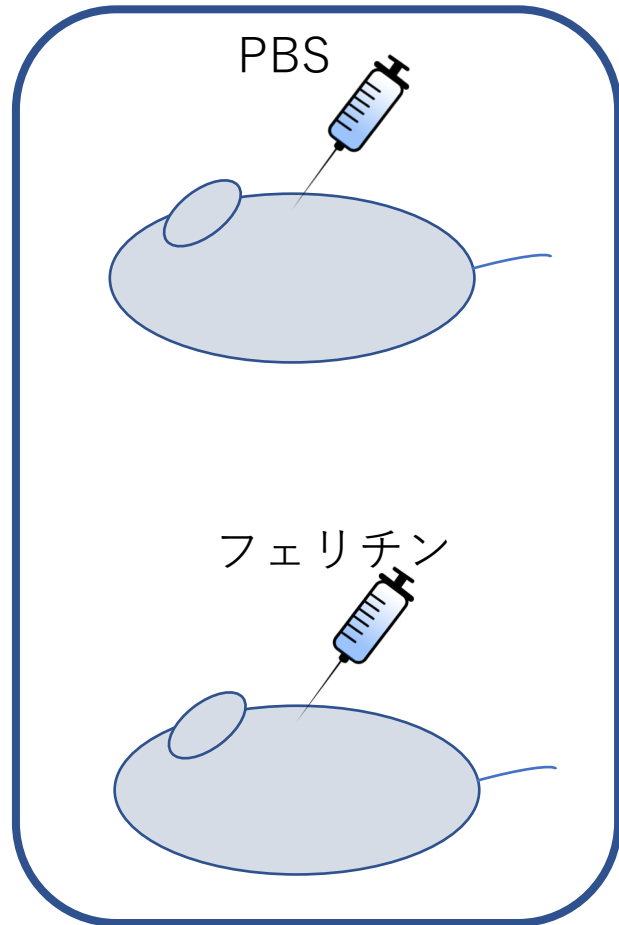
血清 サイトカイン・ケモカイン



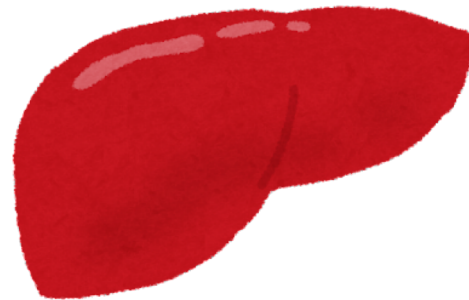
monocyte chemoattractant protein (MCP) – 1

FERは抗サイトカイン血症、好中球増多、肝脾腫を中心とした、全身および肝での炎症を引き起こす

2. FER投与によるNETの形成



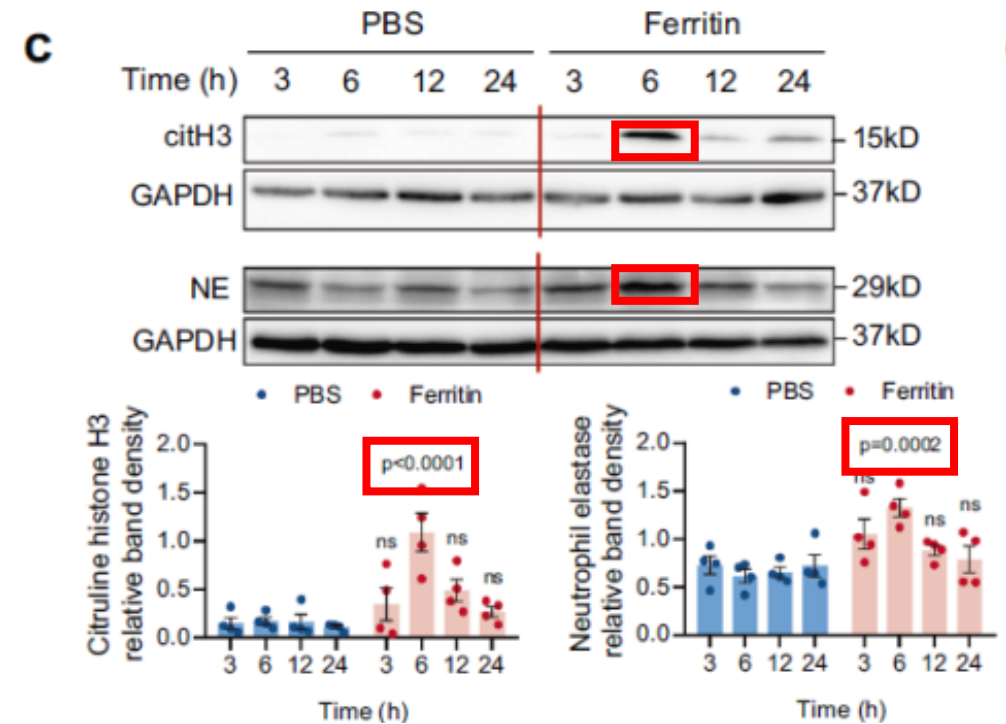
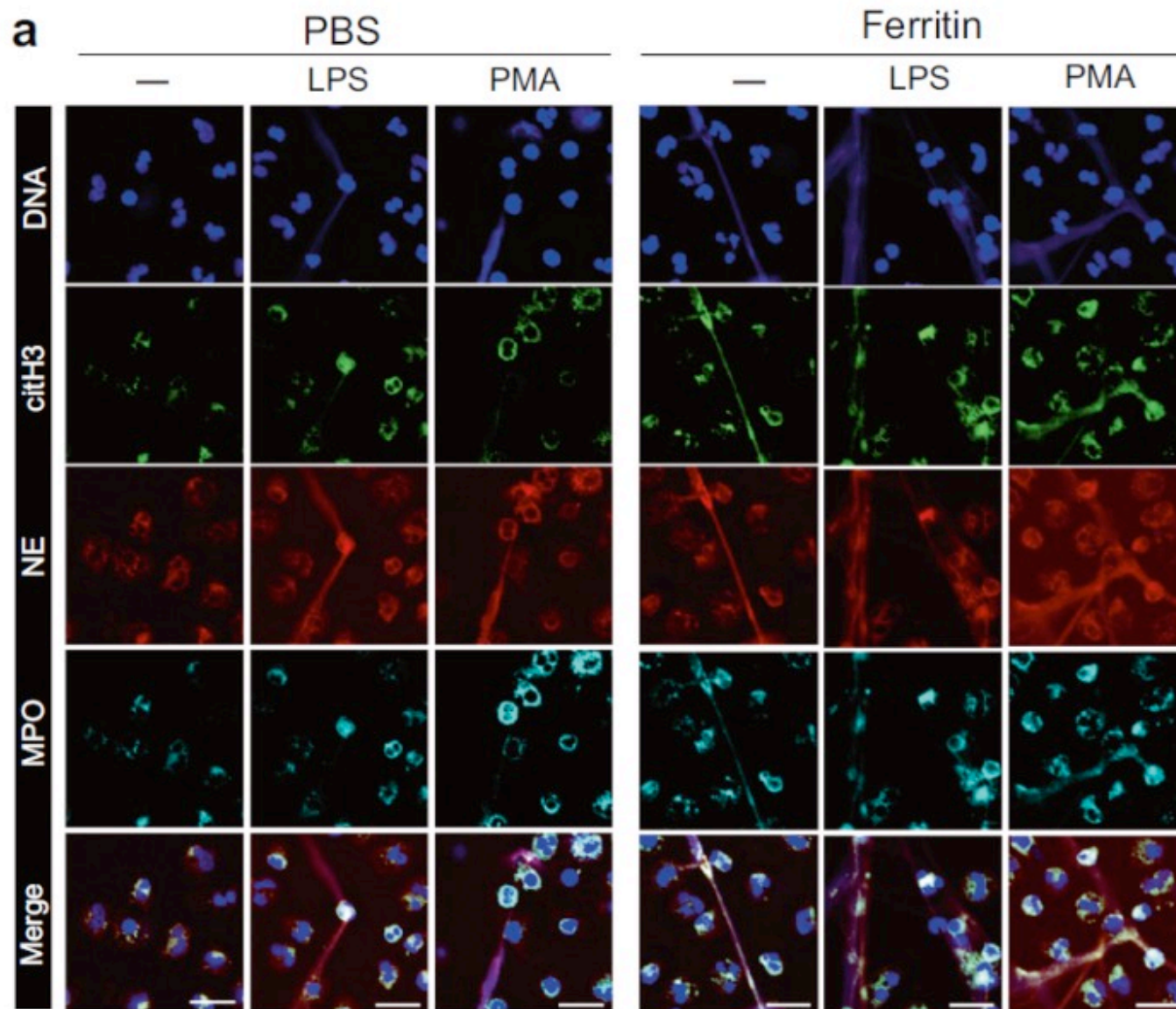
BMDNs



✓ NETsの構成成分であるヒストン, MPO, NEをマーカーとし、蛍光顕微鏡で比較する

✓ 定量ウェスタンブロット(WB)で比較

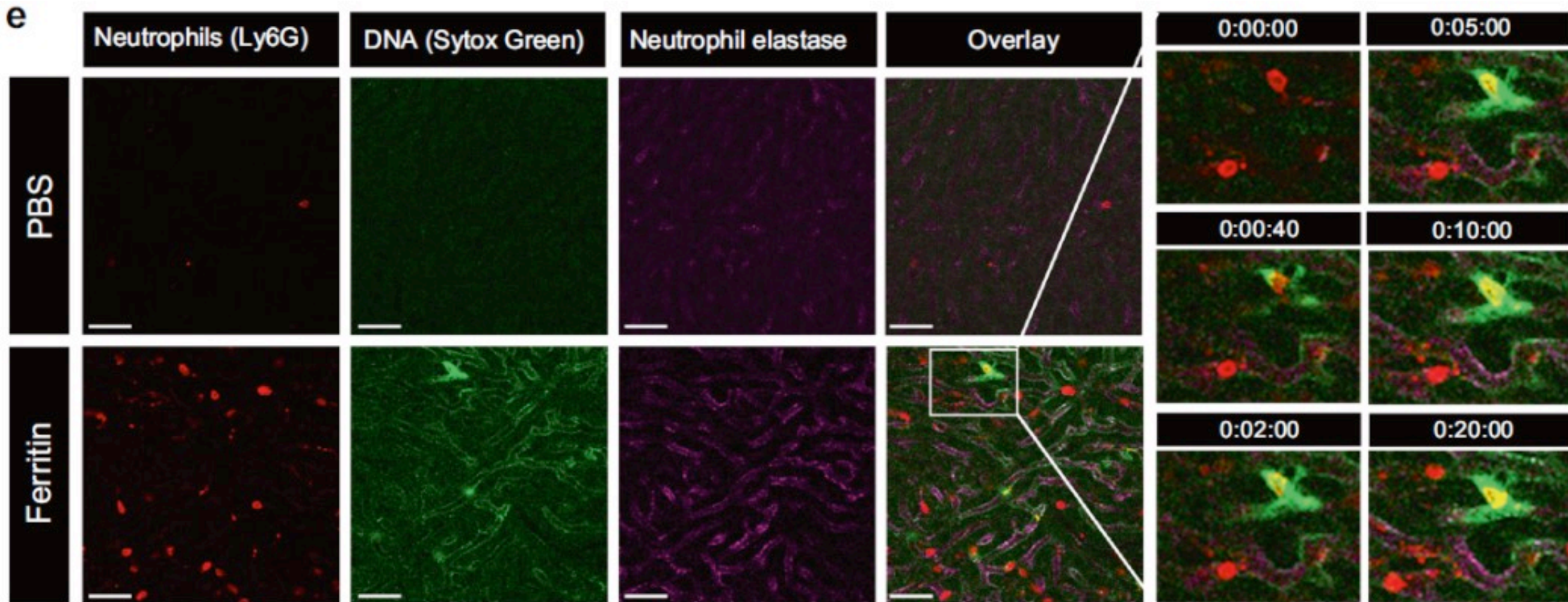
✓ 蛍光顕微鏡でNET形成を経時的に観察する



肝組織の定量WB

6hでNETが最も強く誘導された

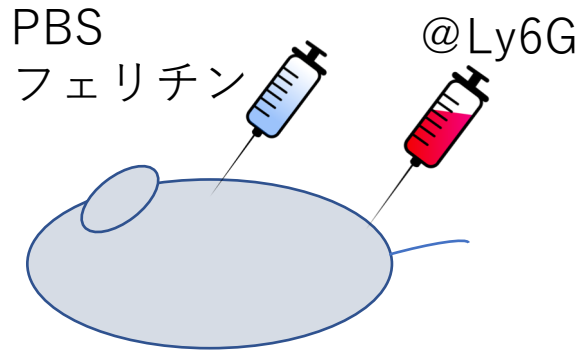
骨髓から採取した好中球はフェリチンでNETが誘導される
LPSとPMAは陽性コントロール



NET形成 経時的变化

FERは野生型マウスにおいて、NET形成を誘導した

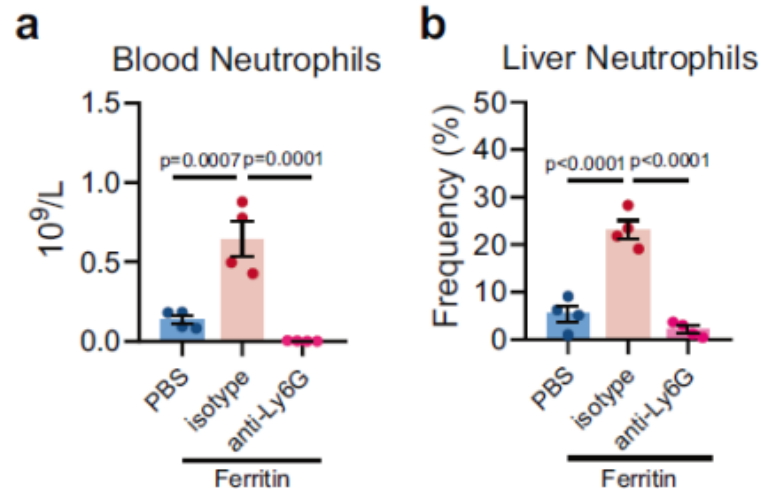
3. FERが誘導する炎症には好中球が必要

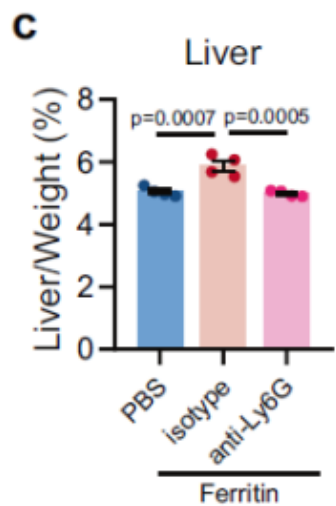


抗Ly6G抗体で好中球を消去

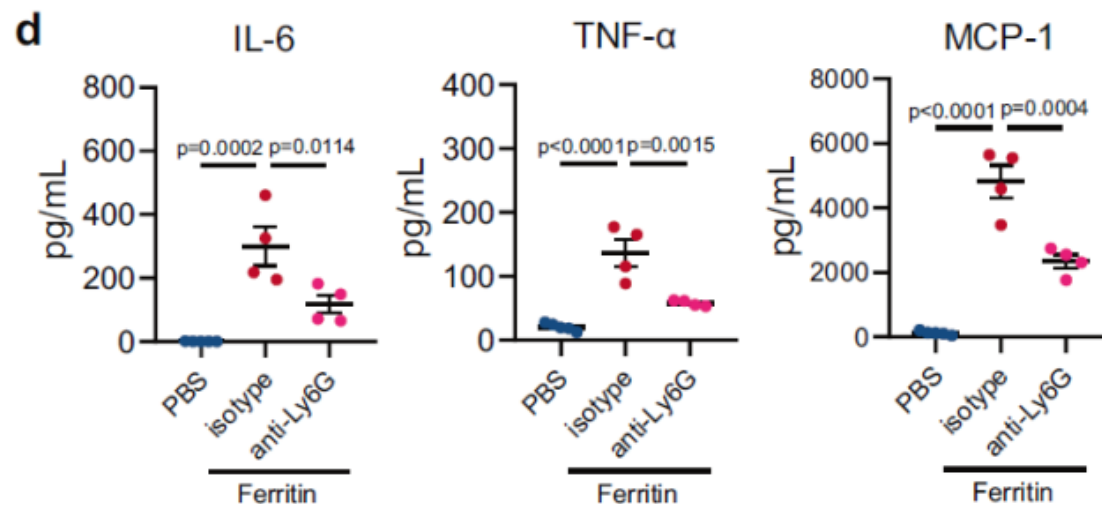
フェリチン投与後6hの

- ✓ 肝重量
- ✓ 血清サイトカインレベル
- ✓ 肝の好中球エラスターゼとcitH3を定量WB
- ✓ 肝のNETs構造を蛍光顕微鏡で確認
- ✓ 肝組織のサイトカインをmRNAレベルで確認

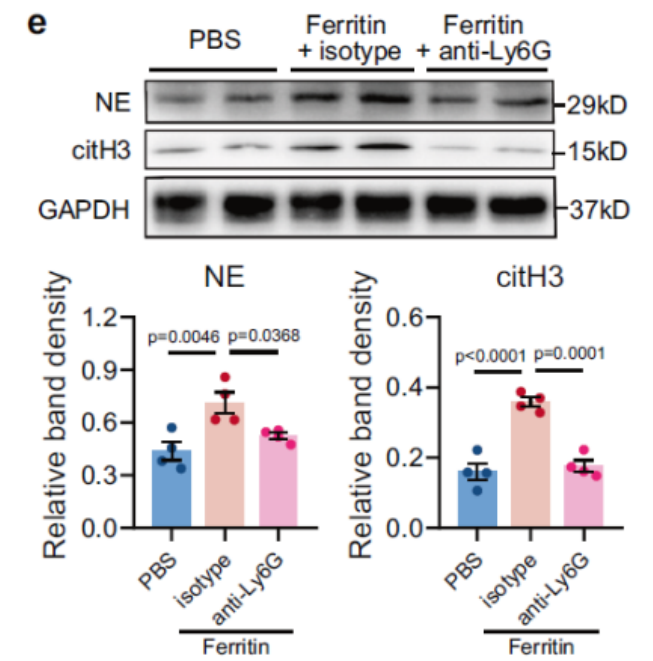




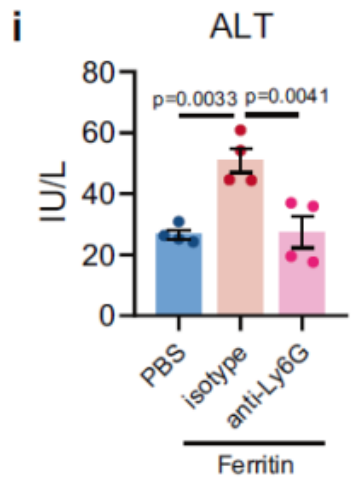
肝重量の減少



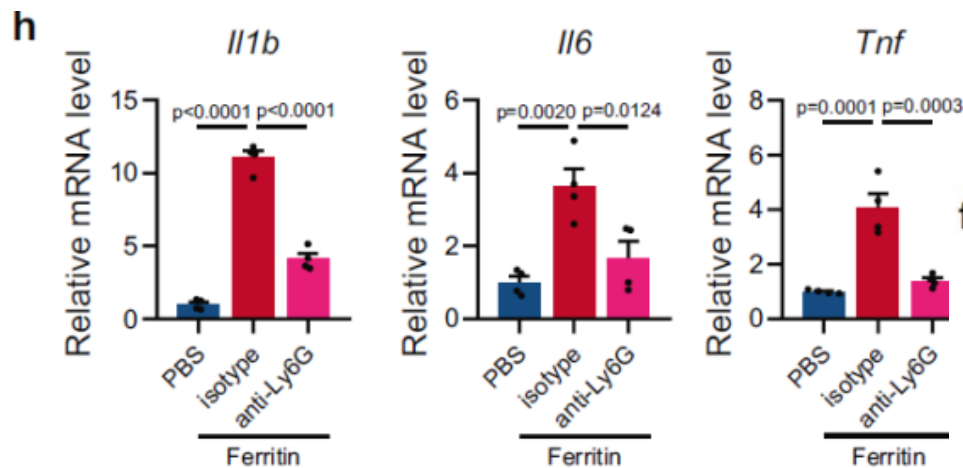
血清IL-6, TNF- α , MCP-1値の低下



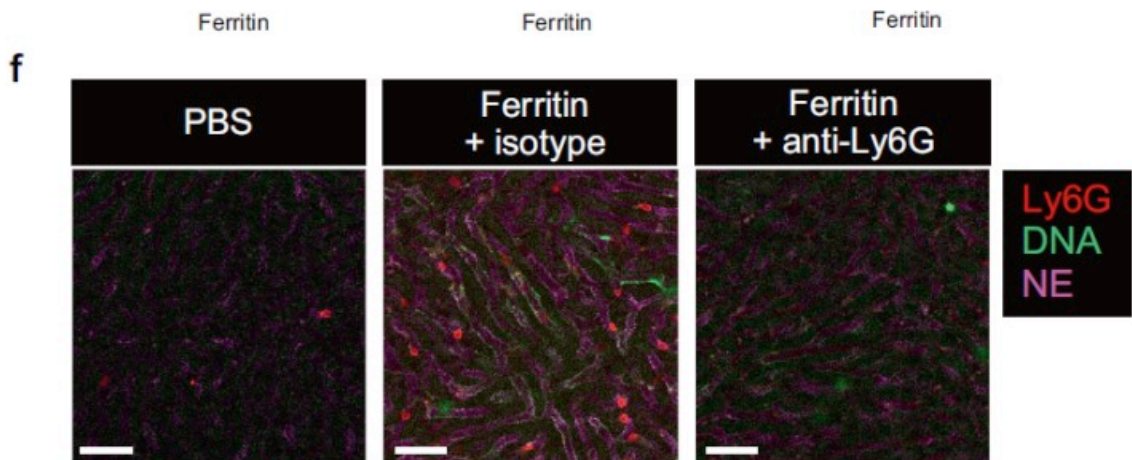
肝組織の定量WB



血清ALT低下

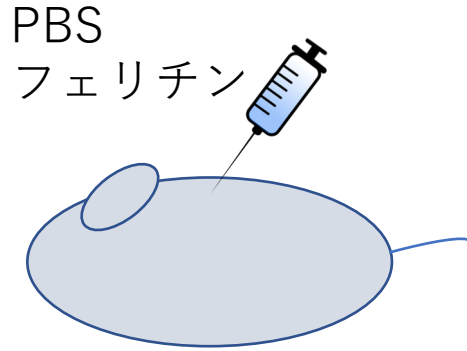


IL-1b, IL-6, Tnf mRNAレベルの減少



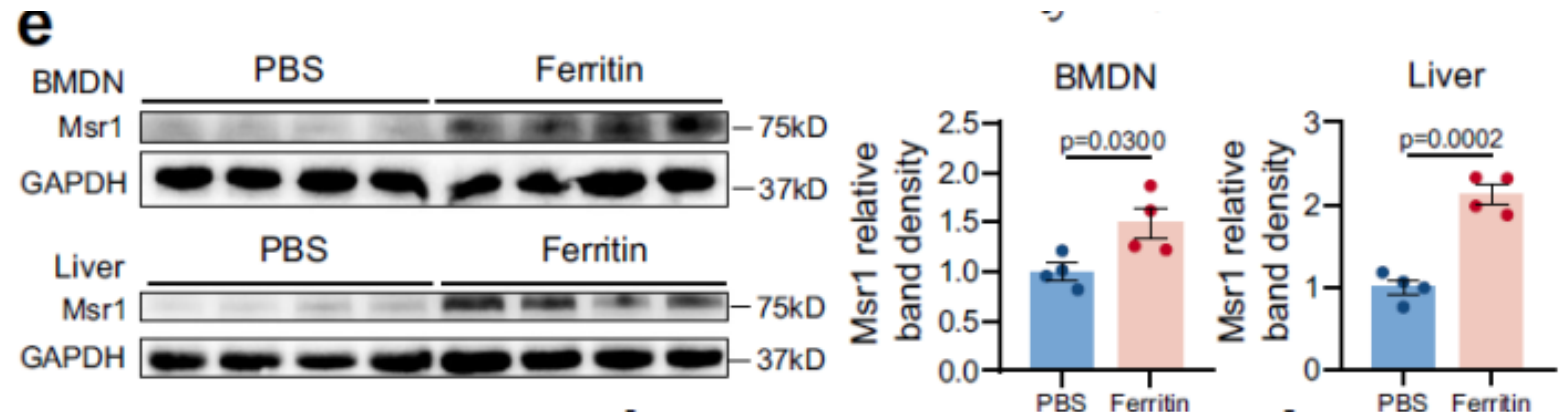
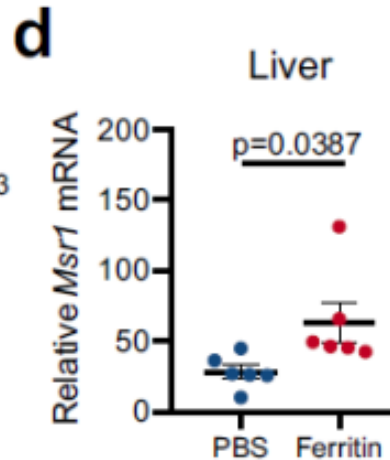
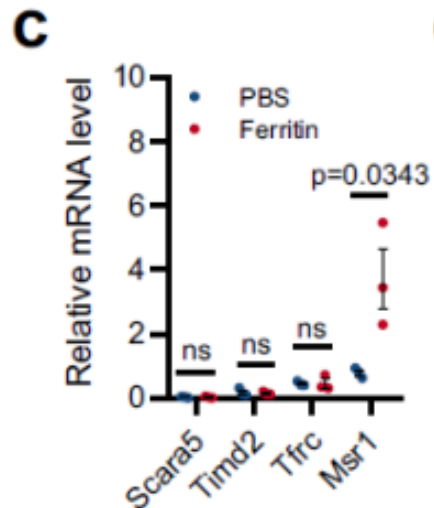
NET構造が減少

4. フェリチンは好中球のMsr1を発現を促進

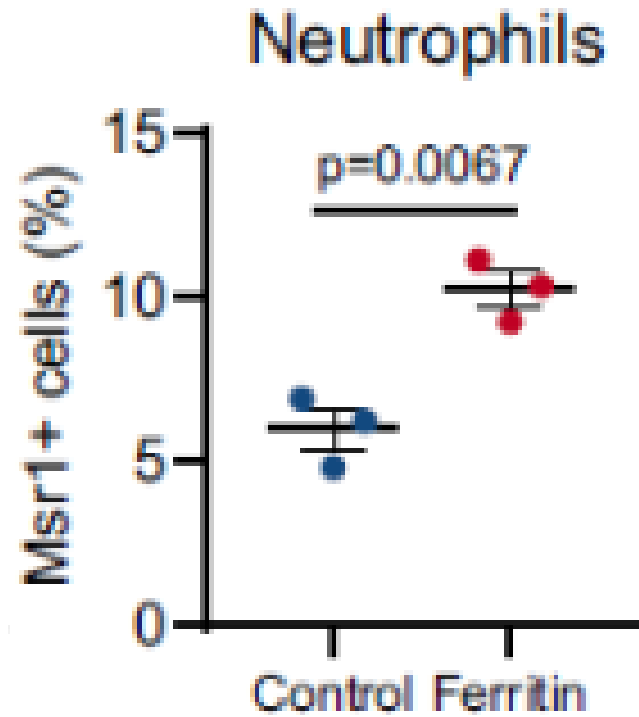


フェリチン/PBS 投与後

- ✓ 骨髄からSortingした好中球(BMDN)のMsr1のmRNAレベルを定量RT-PCR
- ✓ 肝組織のMsr1のmRNAレベルを定量RT-PCR
- ✓ 定量WBでBMDNと肝のMsr1を比較



ヒト好中球での検討

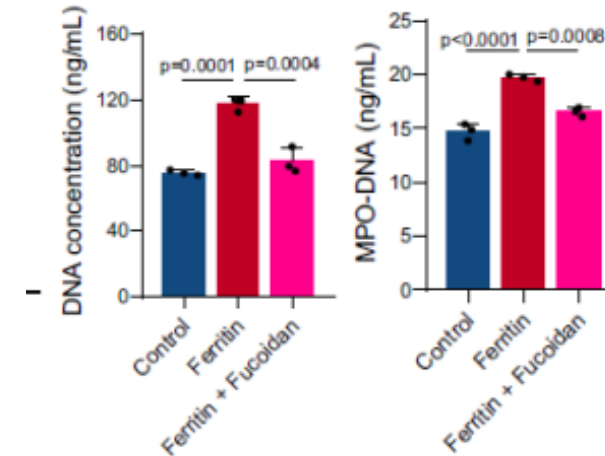


FCM

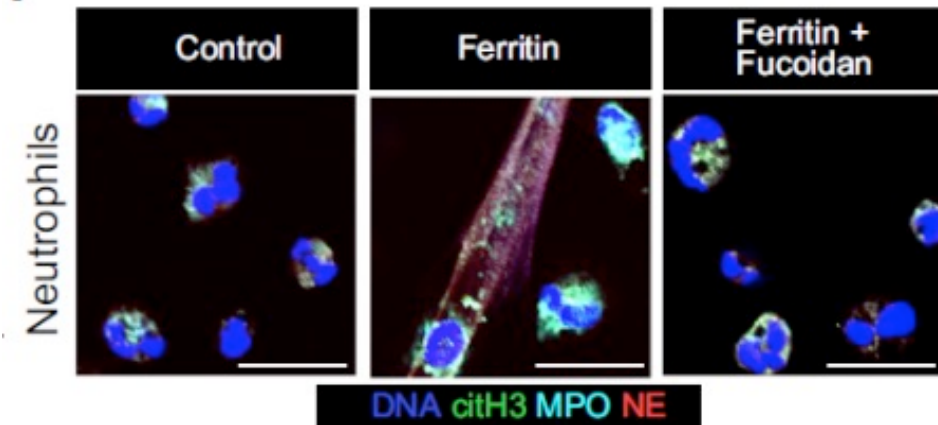
FERにてMsr1発現好中球% ↑

h

Fucoidan : Msr1 antagonist

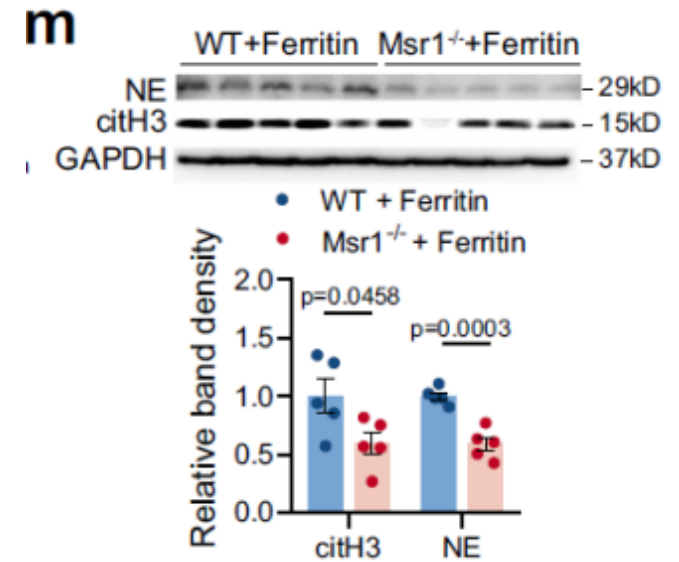
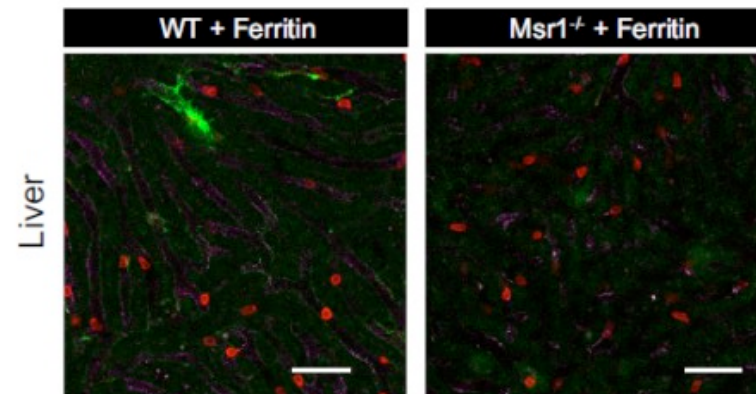
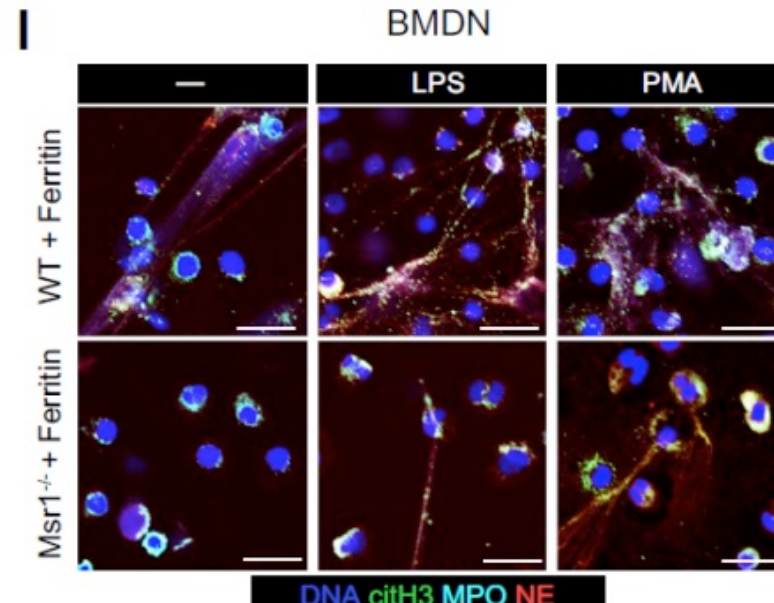
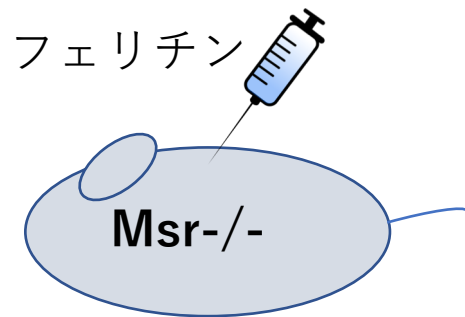


i



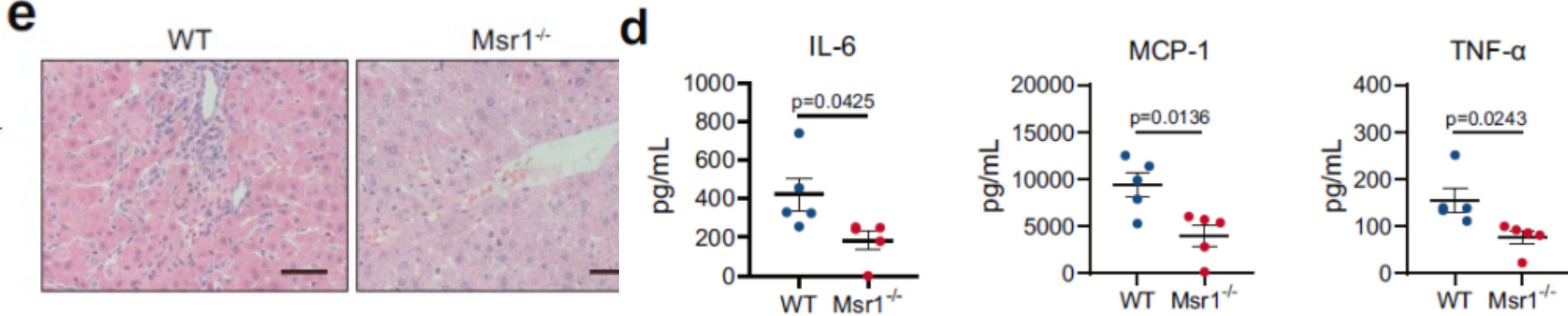
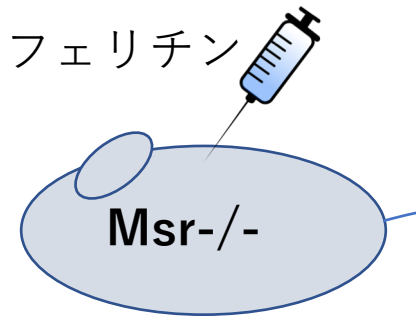
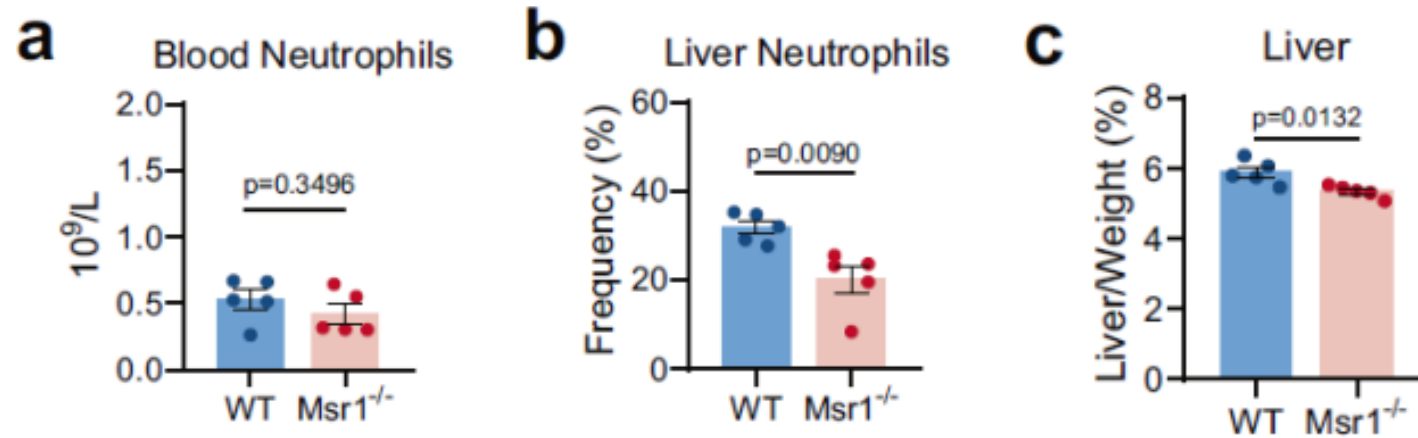
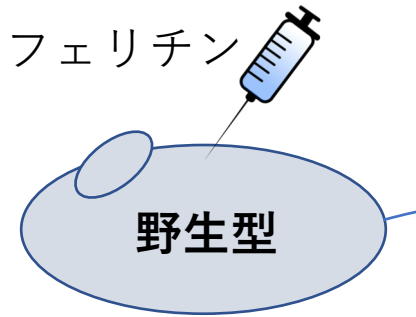
FERによるNET形成はMsr1阻害剤で阻害される

5. Msr1欠損マウスではFER投与によるNET形成が減弱



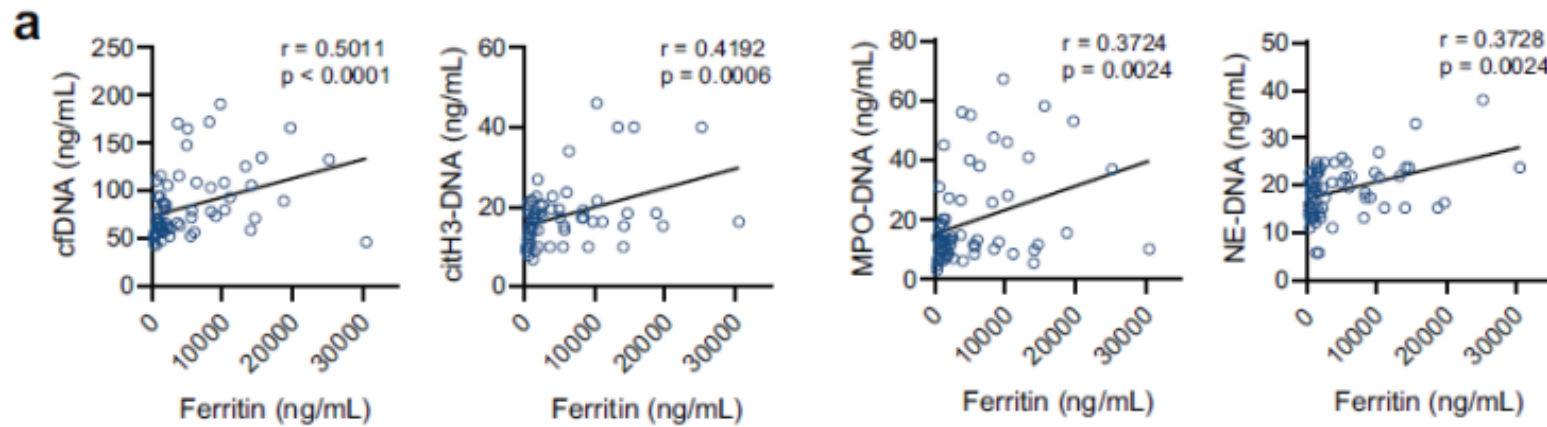
Msr1はフェリチンによるNET形成に重要である

FER投与による肝および全身性炎症

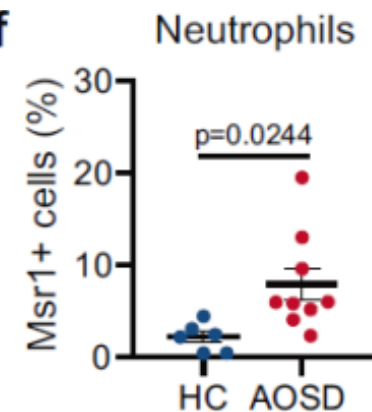
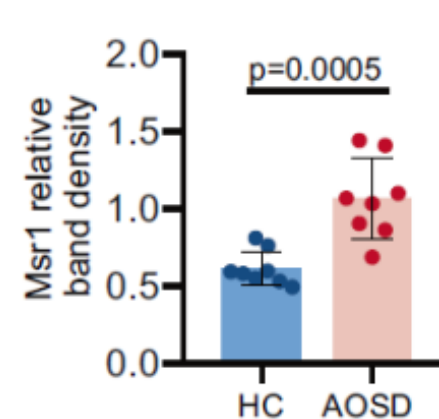
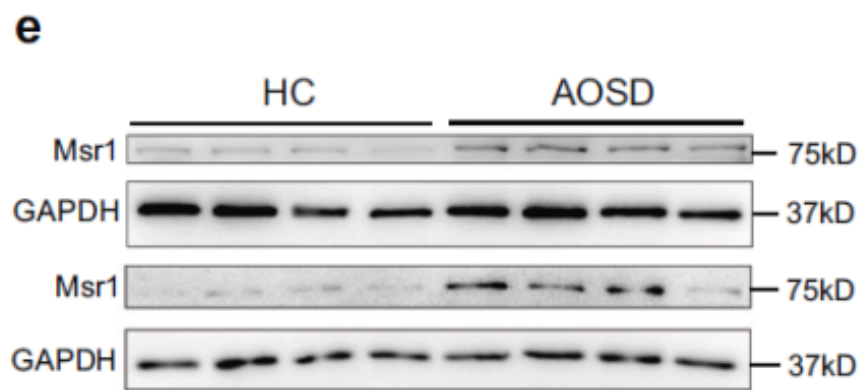
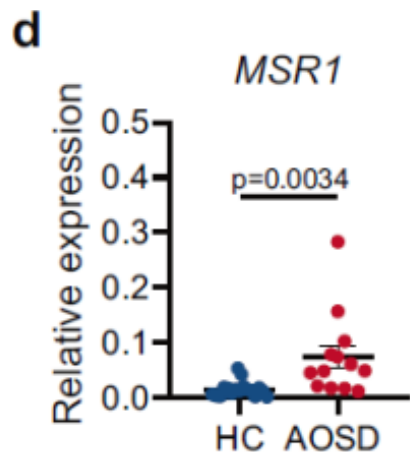


Msr1はフェリチンによる肝障害と炎症病態形成に重要である

AOSD検体での検討(1)

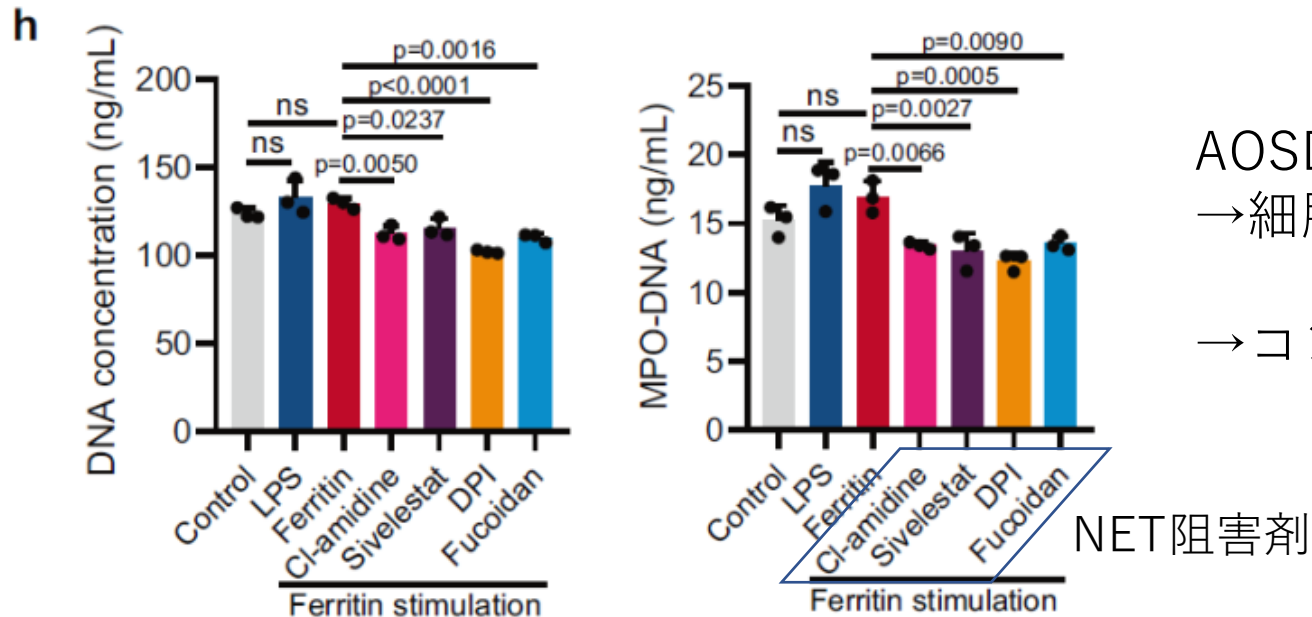


血清中のFERとNET マーカーに相関あり



AOSD患者の好中球におけるMsr1の発現
qRT-PCR, 定量WB, FCMそれぞれで健常者と比較して上昇

AOSD検体での検討(2)



AOSD患者から分離した好中球をFerritinで刺激
→細胞上清のCell free DNAとMPO-DNAを検出

→コントロールと有意な差はないが、高い傾向

AOSD患者において、Msr1はフェリチンによるNETosisの鍵となっている可能性がある

結論

1. 野生型マウスにおいてFERは抗サイトカイン血症、好中球増多、肝脾腫を中心とした、全身および肝での炎症を引き起こした
2. FERは野生型マウスにおいて、NET形成を誘導した
3. FERが誘導する炎症には好中球が必要である
4. 野生型マウスおよびヒト好中球においてFERは好中球のMsr1を発現を促進した
5. Msr1はFERによるNET形成に重要であった
6. AOSD患者の好中球におけるMsr1の発現は健常者と比較して上昇していた

まとめ

- 高フェリチン血症では、フェリチンによるMsr1依存性のNETs形成により、肝および全身性炎症を惹起する
- フェリチン-Msr1-NETs経路の阻害は、高フェリチン血症に伴う炎症病態の治療標的になる可能性がある

感想

1. Msr1の阻害薬がAOSDの治療薬の一つになる可能性がある。
2. 2次性HLHモデルマウスにMsr1阻害薬を用いると、HLHの病態が改善されるのか、興味がある。
3. 本研究では、AOSD検体の好中球でのMsr1発現は上昇は示せたものの、培養上清中のNETsマーカーに差が示せていなかった。今後の研究報告に期待したい。