

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07545

研究課題名(和文) 感染刺激によって放出される抗菌性ペプチドLL-37による動脈硬化の増悪機構

研究課題名(英文) Evaluation of the effect of LL-37, an atherosclerosis-related antimicrobial peptide, on endothelial cells

研究代表者

鈴木 香 (SUZUKI, Kaori)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90631929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：好中球由来の抗菌ペプチドであるLL-37は動脈硬化の病態形成に関わることが示唆されている。本研究ではそのメカニズムを明らかにするため、炎症場の形成に中心的な役割を担う血管内皮細胞の細胞死に着目してLL-37の影響を調べた。LL-37は血管内皮細胞のオートファジーを活性化させた。一方、オートファジーを抑制した血管内皮細胞に対しては細胞死を誘導した。このメカニズムとして、LL-37は血管内皮細胞に取り込まれた後、ユビキチン化とp62との結合を介してオートファジーにより分解されるが、オートファジーの低下した血管内皮細胞においては凝集体として蓄積して細胞死を誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では今日、約5人に1人が動脈硬化性の疾患で死亡しており、動脈硬化の発症・増悪のメカニズム解明は急務である。高脂血症などの代謝異常に加えて、持続的な細菌感染が危険因子であることは古くから疫学的に示されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、動脈硬化の病態形成への関与が示唆されている抗菌ペプチドのLL-37が、オートファジー不全に陥った血管内皮細胞に蓄積して細胞死を誘導することを明らかにした。オートファジー不全は動脈硬化症を含む多くの慢性炎症性疾患の基盤となる。本研究の成果は、細菌感染に対する宿主応答因子が直接、動脈硬化の病態形成に関わることを示した点において意義がある。

研究成果の概要(英文)：Human antimicrobial peptide LL-37, derived from neutrophils, has been suggested to be involved in the pathogenesis of atherosclerosis, however, the mechanism remains unknown. In this study, we investigated the effects of LL-37 on cell death of endothelial cells, which play a central role in vascular inflammation in atherosclerosis. We found that LL-37 activates autophagy in endothelial cells, but induces cell death in the autophagy-dysfunctional endothelial cells. As for this mechanism, we speculated that LL-37 is incorporated into endothelial cells and is degraded through autophagy via the ubiquitination and binding to p62; however, in the autophagy-dysfunctional endothelial cells LL-37 accumulates as aggregates in the cells and induces cell death.

研究分野：血管細胞生物学

キーワード：動脈硬化症 抗菌ペプチド 血管内皮細胞 LL-37 凝集体 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症は血管内皮細胞障害に端を発する血管の慢性炎症と治癒反応として捉えることができる。動脈硬化は一般に脂質異常や高血圧といった代謝性の危険因子の集積により発症すると考えられているが、それに加えて細菌の持続感染も危険因子であることが疫学研究から示されている。実際に、呼吸器感染症の原因菌である肺炎クラミジア (*C. pneumoniae*)、歯周病菌 (*P. gingivalis*)、胃がんの原因菌であるピロリ菌 (*H. pylori*) などが動脈硬化病変で高頻度に分離される。しかし、これらの細菌感染がなぜ動脈硬化に関わるのかについてのメカニズムは明らかにされていない。

近年、感染に対する防御反応として宿主細胞から産生される抗菌ペプチドの LL-37 が動脈硬化に関わることが示唆されている。LL-37 は 37 アミノ酸残基から成る両親媒性ペプチドであり、通常は好中球の顆粒に蓄えられているが、リポ多糖等の菌体成分やサイトカインが刺激となり細胞外に放出される。さらに、LL-37 は免疫細胞に作用して炎症・免疫応答を活性化し、また、血管内皮細胞に対しては血管新生を促進する。一方、LL-37 は動脈硬化症の病変部において高発現し (*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006)、高脂血症により誘導される動脈硬化モデルマウスにおいては、LL-37 の相合体である CRAMP (cathelicidin-related antimicrobial peptide) を欠損させることで病態が軽化する (*Circ Res*, 2012)。これらの報告は、抗菌や血管新生によって生体保護的に働くはずの LL-37 が、ある場面においては動脈硬化の増悪因子として働くことを示している。これには動脈硬化症に潜在する細胞機能の変調が関わる可能性がある。

2. 研究の目的

オートファジーは細胞ストレスによって引き起こされるリソソーム依存的な細胞内分解プロセスであり、オートファジーの機能不全は異常タンパク質の蓄積を引き起こす。動脈硬化モデルマウスにおいて血管内皮細胞、血管平滑筋細胞あるいはマクロファージのオートファジー機能を欠損させることでプラークの不安定化や血栓症が誘発される (*Circ Res*, 2015)。一方、先述のとおり LL-37 は動脈硬化病変に高発現する。そこで、本研究では血管内皮細胞におけるオートファジーの機能低下と LL-37 が協調的に働いて動脈硬化を増悪させるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞のオートファジーに対する LL-37 の効果

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) あるいはヒト冠状動脈内皮細胞 (human coronary artery endothelial cells, HCAECs) にリソソームプロテアーゼ阻害剤 (E-64d および pepstatin A) の存在下あるいは非存在下で LL-37 (2、5、10 $\mu\text{g/ml}$) を 24 時間作用させた。また、atg7 ノックダウン (KD) 細胞およびコントロール細胞 (後述) に同様に LL-37 を作用させた。細胞溶解液を調製し、LC3 と GAPDH のタンパク質レベルをウェスタンブロットで評価した。LC3-II/LC3-I および LC3-II/GAPDH をオートファジーの比活性とした。また、免疫細胞染色により LC3 と LL-37 の細胞内局在を調べた。

(2) オートファジー受容体 p62 と LL-37 の相互作用

HUVECs に LL-37 (5 $\mu\text{g/ml}$) を 4 時間作用させて細胞溶解液を調製した。抗 p62 抗体あるいは抗ユビキチン抗体を結合させた Protein A 磁気ビーズを細胞溶解液に加えて免疫沈降を行った。沈降画分の p62、LL-37、ユビキチン化タンパク質をウェスタンブロットで検出した。

(3) オートファジー必須因子 Atg7 のノックダウン

Atg7 の siRNA およびコントロールとしての non-targeting siRNA をリポフェクションにより HUVECs に導入した。リポフェクションの 24、48、72 時間後に細胞溶解液を調製した。Atg7 の KD 効率は Atg7/GAPDH をコントロール細胞と比較して算出した。atg7 siRNA を導入した細胞における 24、48、72 時間後の Atg7 のタンパク質レベルは、コントロール細胞に比べてそれぞれ約 38%、38%、19%であった。そこで、以下の実験においてはリポフェクション後 48 時間に LL-37 を作用させて最長 24 時間インキュベーションした。

(4) LL-37 による細胞死誘導

atg7 KD 細胞およびコントロール細胞に LL-37 (2、5、10 $\mu\text{g/ml}$) を 24 時間作用させた。また、E-64d および pepstatin A の存在下あるいは非存在下で同様に LL-37 を作用させた。細胞をトリプシン処理して回収し、Annexin V-FITC と propidium iodide (PI) でインキュベーションした後、フローサイトメトリーで細胞死を検出した。細胞死の判定においては Annexin V-FITC 陽性/PI 陽性細胞をアポトーシス、Annexin V-FITC 陰性/PI 陽性細胞をネクローシスに

よる死細胞とした。

(5) 細胞内凝集体の検出

atg7 KD 細胞およびコントロール細胞に LL-37 (5 µg/ml) を 4 時間作用させた。細胞をトリプシン処理して回収し、パラホルムアルデヒド固定とサポニンによる浸透化処理に続いて PROTEOSTAT aggresome detection dye (Enzo Life Sciences) を加えてインキュベーションし、フローサイトメトリーを行った。また、免疫細胞染色においては PROTEOSTAT dye、抗 LL-37 抗体、核染色剤 DAPI でインキュベーションして蛍光顕微鏡で観察した。DAPI 強陽性の核濃縮した細胞を死細胞として判定した。

(6) 動脈硬化モデルマウスの大動脈弁における CRAMP と死細胞の検出

Apolipoprotein E (Apo E) 欠損動脈硬化症モデルマウスおよび野生型マウスの心臓から大動脈起支部にかけてを採取して凍結切片を作製した。大動脈弁を含む切片を選んで抗 CRAMP 抗体と TUNEL 死細胞検出試薬を用いて蛍光組織染色を行った。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞のオートファジーに対する LL-37 の作用と LL-37 の細胞内局在

リソソームプロテアーゼ阻害剤 (E-64d および pepstatin A) の存在下において LL-37 は濃度依存的に LC3-II の発現を増加させた (HUVECs、HCAECs)。また、免疫細胞染色の結果、LL-37 を添加することによって LC3 の核周囲局在と puncta 形成 (オートファゴソーム) が増加した。このとき、LL-37 は LC3 と核周囲で共同在した。さらに、atg7 KD 細胞においても LL-37 を添加することによって LC3-II の増加と核周囲局在が確認された。これらの結果から、LL-37 は血管内皮細胞にオートファジーを誘導することがわかった。さらに、LL-37 は血管内皮細胞に結合し、細胞内に移行してオートファゴソームに局在すると考えられた。LL-37 が血管内皮細胞に取り込まれることはすでに報告している (Suzuki et al., J Immunol, 2006)。

(2) オートファジー受容体 p62 と LL-37 の相互作用

LL-37 を 4 時間作用させた HUVEC の細胞溶解液を用いて抗 p62 抗体による免疫沈降を行った。その結果、沈降画分に LL-37 が検出された。さらに、抗ユビキチン抗体による免疫沈降を行った。その結果、沈降画分に LL-37 が検出された。このとき、LL-37 は分子量より大きいラダー状のシグナルとして検出された。さらに、ユビキチン化タンパク質も高分子領域にラダー状に検出された。これらの結果から、LL-37 は p62 と結合すること、また、LL-37 はユビキチン化などの修飾を受けて高分子化することが示唆された。

(3) LL-37 の分解に対するオートファジーの関与

HUVECs に LL-37 を 15 分間作用させて洗浄し、引き続き 24 時間までインキュベーションした。ウェスタンブロットにより細胞内の LL-37 レベルを調べた結果、コントロール細胞において LL-37 は時間依存的に減少した。一方、Atg7 KD 細胞では LL-37 の減少が遅延した。また、LL-37 の核周囲への集積はコントロール細胞に比べて atg7 KD 細胞において顕著であった。これらの結果から、LL-37 は血管内皮細胞に取り込まれてオートファジーにより分解されるが、オートファジーの低下した細胞においては分解が抑制され、核周囲に集積すると考えられた。

(4) LL-37 により誘導される細胞死とオートファジーの関与

LL-37 (2, 5, 10 µg/ml, 24 時間) は HUVECs と HCAECs の生存に影響しなかった。一方、atg7 KD 細胞あるいはリソソームプロテアーゼ阻害剤の存在下において LL-37 は濃度依存的に細胞死を誘導した (PI 陽性細胞の増加)。LL-37 により誘導される細胞死はアポトーシス (Annexin V-FITC 陽性/PI 陽性細胞) とネクローシス (Annexin V-FITC 陰性/PI 陽性細胞) であると考えられた。

(5) LL-37 により誘導される細胞内凝集体の形成と細胞死との関与

PROTEOSTAT 試薬を用いて細胞内の凝集体をフローサイトメトリーにより検出した。LL-37 はコントロール細胞に凝集体を増加させた。LL-37 は atg7 KD 細胞に対して更に顕著に凝集体を増加させた。また、抗 LL-37 抗体を用いた免疫細胞染色の結果、LL-37 は PROTEOSTAT 陽性の凝集体と共同在することがわかった。これらの結果から、LL-37 は血管内皮細胞に取り込まれてオートファジーによって分解されるが、オートファジーの低下した細胞においては分解が遅延して凝集体として蓄積すると考えられた。

次に、凝集体の蓄積と細胞死との関わりを検討した。atg7 KD 細胞に LL-37 を作用させると細胞死が誘導されたが、このとき、核濃縮を伴う死細胞の約 70% に凝集体が検出された。一方、生細胞における凝集体の存在は 30% 以下であった。また、死細胞において凝集体は LL-37 と共同在した。これらの結果から、オートファジーの低下した血管内皮細胞において LL-37 により誘導される細胞死は、LL-37 自身を含む凝集体の蓄積が関与することが示唆された。

(6) ApoE 欠損動脈硬化症モデルマウスの大動脈弁における CRAMP の蓄積と細胞死

ApoE 欠損マウスの大動脈弁において CRAMP と TUNEL 陽性の死細胞が検出された。CRAMP は弁の表層 (血管内皮細胞) にも検出された。一方、野生型マウスでは確認されなかった。

本研究において、我々は LL-37 が血管内皮細胞に作用してオートファジーを誘導することを見出した。このとき、LL-37 はオートファジー受容体 p62 との結合を介してオートファゴソームに集められて分解されると考えられた。一方、Atg7 の KD によりオートファジーが抑制された細胞においては、LL-37 の分解が遅延して核周囲に集積し、LL-37 自身を含む凝集体の蓄積により細胞死を誘導すると考えられた。動脈硬化巣では血管を構成する細胞 (血管内皮細胞、血管平滑筋細胞) や炎症性細胞 (マクロファージなど) がオートファジーの機能不全に陥り、プラークの進行や不安定化、あるいは血栓形成に関わる (Circ Res, 2015)。一方、Amyloid β などの凝集性ペプチド/タンパク質が動脈硬化病変に蓄積することも報告されている (Front Aging Neurosci, 2015)。LL-37 は抗菌ペプチドあるいは生体防御ペプチドとして認知されている。しかし、今回の研究から、LL-37 はオートファジーの低下した血管内皮細胞に作用し、凝集性ペプチドとして振る舞うことで動脈硬化の病態形成に関わる可能性が示された。一方、我々は動脈硬化に関連する炎症性サイトカインである IL-1 β が HUVECs に対して LC3-II を増加させること、さらに LL-37 はこの作用を拡大することを確認している。また、IL-1 β はリソソームプロテアーゼ阻害剤 (E-64d および pepstatin A) の存在下において細胞死を誘導すること、さらに LL-37 はこの作用を拡大することも確認している。これらの結果から、LL-37 が IL-1 β と協調的に働いてオートファジーの機能障害に陥った血管内皮細胞に細胞死を誘導することも予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suzuki Kaori, Ohkuma Mari, Nagaoka Isao	4. 巻 44
2. 論文標題 Bacterial lipopolysaccharide and antimicrobial LL-37 enhance ICAM-1 expression and NF- B p65 phosphorylation in senescent endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1187-1196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijmm.2019.4294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki K, Ohkuma M, Someya A, Mita T, Nagaoka I	4. 巻 208
2. 論文標題 Human cathelicidin peptide LL-37 induces cell death in autophagy-dysfunctional endothelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2163-2172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2100050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki K, Susaki EA, Nagaoka I	4. 巻 23
2. 論文標題 Lipopolysaccharides and Cellular Senescence: Involvement in Atherosclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms231911148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 香, 洲崎 悦生, 長岡 功
2. 発表標題 ヒト抗菌ペプチドLL-37 はオートファジー機能の低下した血管内皮細胞に細胞死を誘導する
3. 学会等名 第67回トキシシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 香, 長岡 功
2. 発表標題 ヒト抗菌ペプチドLL-3による血管内皮細胞のオートファジー誘導と細胞死のメカニズム
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長岡 功, 熊谷 由美, 細田 浩司, 村上 泰介, 鈴木 香
2. 発表標題 生体防御ペプチドLL-37 の敗血症モデルに対する保護効果
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 香, 大熊 真理, 長岡 功
2. 発表標題 ヒト抗菌ペプチドLL-37 が血管内皮細胞のオートファジーおよび細胞死に及ぼす影響.
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 香, 洲崎 悦生, 長岡 功
2. 発表標題 動脈硬化巣に蓄積する抗菌ペプチドLL-37が血管内皮細胞のオートファジーおよび細胞死に及ぼす影響
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 香, 大熊 真理, 長岡 功
2. 発表標題 ヒト抗菌ペプチドLL-37が血管内皮細胞のオートファジーおよび細胞死に及ぼす影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

順天堂大学大学院医学研究科 生化学・生体防御学 ホームページ
https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/seikagaku_seitaibogyo/html/index_j.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長岡 功 (Nagaoka Isao) (60164399)	順天堂大学・保健医療学部・特任教授 (32620)	
研究分担者	三田 智也 (Mita Tomoya) (90532557)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------