

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07562

研究課題名（和文）好中球細胞外小胞エクソソームの敗血症治療への応用を目指して

研究課題名（英文）Towards therapeutic application of neutrophil-secreted extracellular vesicles in sepsis

研究代表者

熊谷 由美（Kumagai, Yumi）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90277591

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト生体防御ペプチドLL-37は、好中球から抗菌活性・抗炎症作用のある細胞外小胞（Extracellular Vesicles, EV）を放出させ、マウス敗血症モデルに効果的に作用することが示された。また、EVに含まれるラクトフェリンやCAMPが抗菌活性に関与すること、さらにCa²⁺-カルパイン-ROCK経路がLL-37によるEV生成に関与することを見出した。Ca²⁺イオノフォアをLL-37とともに好中球に作用させると、EV生成が増強され、より抗菌活性が向上することも明らかとなった。現在はEVの生理的な標的細胞を同定するために、ノックインレポーターマウスを用いた系を構築している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は細菌感染が主因となっておこるが、未だに有効な治療法は存在せず、先進国でも患者の25-60%が死亡するという致死率の高い重篤な疾患である。研究代表者がすでに示している、好中球由来の細胞外小胞（Extracellular Vesicles, EV）が敗血症モデルマウスの病態を改善するという事実に加えて、本研究では、EVに含まれる抗菌活性分子や、EV生成に関わるシグナル伝達経路を明らかにした。またEVの標的細胞の同定を現在試みているが、これらの研究結果はすべて、EVを利用した敗血症の有効な治療法を開発するための貴重な情報であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The research representative showed that the human host defense peptide LL-37 enhances in releasing extracellular vesicles (EVs) from neutrophils. The EV possesses antimicrobial and anti-inflammatory functions, effectively acting in a mouse sepsis model. Furthermore, lactoferrin and CAMP contained in EVs were implicated in antimicrobial activity, and the Ca²⁺-calpain-ROCK pathway was identified as contributing to LL-37-mediated EV generation. When a Ca²⁺ ionophore was applied to neutrophils along with LL-37, EV generation was enhanced, leading to improved antimicrobial activity. Currently, a system utilizing knock-in reporter mice is being constructed to identify the physiological target cells of EVs.

研究分野：細胞外小胞

キーワード：敗血症 細胞外小胞 好中球 LL-37 抗菌作用 シグナル伝達経路 レポーターマウス

1. 研究開始当初の背景

(1). 治療が困難で致死率の高い敗血症

敗血症は、細菌感染が主因となって大量のサイトカインが産生され、多臓器不全やショックが引き起こされる。しかし未だに有効な治療法が存在せず、敗血症は先進国でも患者の 25-60% が死亡するという致死率の高い重篤な疾患である。急性期の敗血症患者に対しては、広域スペクトルを持つ抗菌薬の迅速投与が推奨されているが、耐性菌の出現が危惧されており、また敗血症で免疫抑制状態に陥った患者に起きる二次感染も問題である (Lancet 392: 75, 2018)。このような状況で、より安全で有効な敗血症治療法の確立が待望されている。

(2). 好中球由来の細胞外小胞と敗血症

好中球をホルミルペプチド fMLF 等で刺激すると、サイズが 0.1 - 数 10 μm の細胞外小胞 (Extracellular Vesicles, EV) が放出される。敗血症の生存患者で好中球由来の EV 数は、非生存患者より多く検出されることから (EMBO Mol Med 6:27, 2018)、好中球 EV が敗血症の病態において保護的に作用する可能性が示唆されている。研究代表者はこれまでに、敗血症モデルマウスにおいても好中球由来の EV が分泌されることを見出した。

(3). ヒト抗菌ペプチド LL-37 の EV 生成と活性への効果

研究代表者は、敗血症の治療法を探索する過程で、ヒト生体防御ペプチド LL-37 が、敗血症マウスにおいて、好中球由来の EV 数を上昇させるのみならず、EV の抗菌活性を増強させることを明らかにしている。また単離した好中球に LL-37 を作用させると、抗菌活性を有する EV の生成を誘導し、この EV には敗血症マウスの病態を改善する効果があることを示した。

(4). 学術的問い

上述の実験結果から、EV が抗菌作用を発揮することで敗血症の病態を改善することが示唆されたが、EV の抗菌活性に関与する分子、また EV 生成に関わるシグナル伝達機構についてはまだほとんど解明されていない。また EV の敗血症治療への適応という観点からは、敗血症治療に応用できるような十分量の EV が未だ生成できないという課題がある。そこで、EV 生成に関わるシグナル伝達機構を明らかにすることで、EV の生成数をさらに向上させ、それを投与することで効果的に敗血症の病態を改善することが可能ではないか? と考えた。

2. 研究の目的

以上の学術的背景と問いに基づいて、本研究では次の 4 点を目的とした。

(1). EV の抗菌活性に関与する分子の同定

EV には好中球由来の分子が含まれるので (Nat Immunol 15:602, 2014)、EV に含まれる可能性のある、ラクトフェリンやカテリシジン等の抗菌タンパク質が活性に寄与するかどうかを明らかにする。

(2). EV 生成に関与するシグナル伝達機構の解明

LL-37 は好中球に対して、P2X₇ (ATP 受容体)、FPR2 (ホルミルペプチド受容体)、CXCR2 (ケモカイン受容体) を介してアポトーシスを抑制したり、サイトカイン (IL-1 β) 産生や Ca²⁺ の流入を促進したりする (J Immunol 176:3044, 2006; Nat Commun 7:10555, 2015; Eur J Immunol 39:3181, 2009)。本研究では、LL-37 刺激による EV 生成に関係する受容体やその下流のシグナル伝達機構を解明する。

(3). EV による敗血症に対する効果を増強させる試み

上述のように、EV 生成に関係するシグナル伝達を明らかにし、このシグナル伝達を促進する物質によって EV 生成数が上昇するかどうか、またこの EV がマウス敗血症に対してより効果的に作用するかどうかを評価する。

(4). ヒト敗血症患者の好中球への適用

(1)-(3)の研究結果に基づいて、ヒト好中球においても、LL-37 およびその他の EV 生成を促進する物質を作用させた時に、EV 生成能がどのように変化するかを明らかにし、上記の知見をヒト敗血症に応用できる可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1). EV の抗菌活性に関与する分子の同定

LL-37 を静脈投与した敗血症マウスの腹水から EV を単離した。またマウス骨髄由来の好中球を LL-37 で刺激して、EV (PMN-LL-37-EV) を生成させ、超遠心法により単離した。また、これら EV に含まれる抗菌分子をウェスタンブロッティング法で同定した。さらに、これらの抗菌分子に対する中和抗体を用いて、EV の抗菌活性が阻害されるかどうかを確認した。抗菌活性を測定する際に用いた細菌は、マウス盲腸から単離した大腸菌である。

(2). EV 生成に関与するシグナル伝達機構の解明

マウスの骨髄から好中球を単離し、LL-37 の受容体 (P2X₇, FPR2, CXCR2) のアンタゴニストと LL-37 を共存させた時の EV 数を測定し、どの受容体に関与しているかを明らかにした。さらに、Ca²⁺シグナルや各種キナーゼ等のシグナル伝達分子が EV 生成に関連するかどうかを各種阻害剤を用いて検討した。EV 数はフローサイトメーターを用いて測定した。

(3). EV による敗血症に対する効果を増強させる試み

EV 生成に関与する受容体やシグナル伝達分子の作用を促進させる物質を、マウス好中球に作用させて、EV 生成数が上昇するかどうかを確認した。またこの EV のマウス敗血症に対する病態改善効果も併せて評価した。

(4). ヒト好中球への適用

ヒト血液から好中球を単離し、LL-37 で刺激することで、EV 生成が誘導されるかどうかを確認した。さらに、上記 3. の EV 生成を増強する物質を作用させたときに、ヒト好中球においても EV 生成が増大するか、またこの EV の抗菌活性やマウス敗血症に対する効果を評価し、本研究のヒト敗血症への応用の可能性を検討した。

4. 研究成果

(1). EV の抗菌活性に関与する分子の同定

好中球 EV の抗菌活性に関与する可能性がある抗菌活性分子として、ミエロペルオキシダーゼ、ラクトフェリンおよび CRAMP (cathelicidin related antimicrobial peptide) と呼ばれるカテリシジンファミリーに属する抗菌タンパク/ペプチドの存在を、ウェスタンブロッティングにより確認した。EV を抗ラクトフェリン、あるいは自家調整した抗 CRAMP 抗体であらかじめ処理すると抗菌活性が減少することから、これらの分子が EV の抗菌活性に関与していることが明らかとなった。

(2). EV 生成に関与するシグナル伝達機構の解明

LL-37 による EV 生成に関与する好中球の受容体を、受容体アンタゴニストを用いて調べた。その結果、ホルミルペプチド受容体である FPR2 とケモカイン受容体である CXCR2 が、LL-37 刺激による EV 生成に関与していることが明らかとなった。また、好中球を細胞外 Ca²⁺キレーター EGTA の存在下で、あるいは細胞内 Ca²⁺のキレーター BAPTAAM で前処理した後に LL-37 を作用させると、EV の生成量が減少した。さらに、Ca²⁺依存性のタンパク質分解酵素カルパインは、細胞膜裏打ち構造のコルタクチンを分解することによって、膜を不安定化させ EV 放出を促進することが知られているが、LL-37 による EV 生成は、カルパイン阻害剤により減少した。さらに、Ca²⁺依存性のタンパク質リン酸化酵素 ROCK の阻害剤により、EV 生成が減少したことから、LL-37 による好中球 EV 生成の過程には、Ca²⁺-カルパイン-ROCK 経路が関与することが示唆された。

(3). EV による敗血症に対する効果を増強させる試み

一方で、Ca²⁺イオノフォアを LL-37 と共に好中球に作用させると、相乗的に EV 生成数が上昇した。また、Ca²⁺イオノフォアと LL-37 の共刺激により放出された EV (PMN-LL-37Ca-EV) は、LL-37 単独刺激時に放出された EV (PMN-LL-37-EV) に比べて、さらに抗菌活性が上昇していることも示された。この PMN-LL-37Ca-EV を敗血症マウスに投与すると、PMN-LL-37-EV を投与した時に比べてマウス体内の生菌数の減少、および早い体重回復が見られたが、予想に反して敗血症マウスのさらなる生存率向上には大きく寄与しなかった。

(4) . ヒト好中球への適用

ヒト血液から好中球を単離し LL-37 で刺激すると、マウス好中球の場合と同様に、EV 生成が増強された。また、ヒト好中球由来の EV にも抗菌活性があり、また敗血症マウスに投与すると、生存率の改善が見られたことから、LL-37 はヒト好中球に対しても、敗血症に対して効果的に作用する可能性が示唆された。

上記(1)-(4)で当初の目的を達成したが、研究が思いのほか順調に進み、補助金に余剰が出たので、研究期間を延長してさらに、PMN-LL-37-EV の敗血症マウスの各臓器に対する効果を評価したり、EV のマウスにおける標的細胞を探索する系を確立するための研究の一部に余剰資金を使用した。その結果を以下に記す。

(5) . 好中球由来 EV のマウス敗血症に対する効果

敗血症マウスに PMN-LL-37-EV あるいはコントロールの PBS を注入し、20 時間後に臓器（肺、脳、腎臓、肝臓）を取り出し、組織染色を行なって病態の変化を観察した。その結果、PMN-LL-37-EV 注入により、特に肺において、炎症の程度が軽減していることが示されたので、PMN-LL-37-EV には抗炎症作用も有することが示唆された。

(6) . EV の標的細胞を探索する系の確立

PMN-LL-37-EV の生理的な標的細胞を検出するために、好中球由来の EV に Cre を含有させ、loxP-red fluorescent-loxP-green fluorescent の配列を導入した レポーターマウスを用いる系を構築することを試みた。そのために、これまでに非常に困難であった好中球の transfection に挑み、その結果 90% という高効率での transfection に成功した。この系を用いて、好中球 EV に Cre を含有させる系が構築できた。また loxP-tdTomato-loxP-EGFP の配列が Rosa26 領域に挿入されたノックインマウスを作出することに成功した。現在は、このマウスが標的細胞探索に使用できるかどうかを評価している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kumagai Y, Murakami T, Kuwahara-Arai K, Iba T, Reich J, Nagaoka I	4. 巻 26
2. 論文標題 Antimicrobial peptide LL-37 ameliorates a murine sepsis model via the induction of microvesicle release from neutrophils.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Innate Immunity	6. 最初と最後の頁 565-579
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1753425920936754	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 該当する

1. 著者名 Nagaoka I, Hu Z, Hosoda H, Kumagai Y	4. 巻 66
2. 論文標題 Therapeutic action of antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 on a murine sepsis model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 297-311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Welsh, J. A., Goberdhan, D. C. I., O'Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., Cai, H., Di Vizio, D., Driedonks, T. A. P., Erdbrugger, U., Falcon-Perez, J. M., Fu, Q.-L., Hill, A. F., Lenassi, M., Lim, S. K., Mahoney, M. G., Mohanty, S.,...Kumagai, Y.,... Witwer, K. W.	4. 巻 13
2. 論文標題 Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Extracellular Vesicles	6. 最初と最後の頁 e12404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jev2.12404	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 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kumagai Y, Kakuta S, Kuwahara K, Susaki E, and Nagaoka I
2. 発表標題 LL-37 ameliorates mouse sepsis by inducing the secretion of antimicrobial microvesicles from neutrophils
3. 学会等名 The international Society for Extracellular Vesicles 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊谷由美, 宮原克, 長岡功, 洲崎悦生.
2. 発表標題 マウス敗血症の病態改善に關与する好中球由来細胞外小胞
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会學術集會
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊谷由美 角田宗一郎 柴原京子 長岡功
2. 発表標題 生体防御ペプチドLL-37は、抗菌活性を有する細胞外小胞の放出を介してマウス敗血症の病態改善をする
3. 学会等名 第94回 日本細菌学会總會
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kumagai Y, Murakami T, Kuwahara-Arai K, Nagaoka I
2. 発表標題 Antimicrobial peptide LL-37 induces neutrophil-derived extracellular vesicles with antibacterial potential and protects murine sepsis
3. 学会等名 The international Society for Extracellular Vesicles 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊谷由美 射場敏明 長岡功
2. 発表標題 生体防御ペプチドLL-37による抗菌活性を有する細胞外小胞の放出を介したマウス敗血症の病態改善
3. 学会等名 第7回 日本細胞外小胞学会 學術集會
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊谷由美, 村上泰介, 長岡功
2. 発表標題 抗菌ペプチドLL-37は好中球からの細胞外小胞の放出を介してマウス敗血症を改善する
3. 学会等名 第66回トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷由美, 村上泰介, 栗原 京子, 長岡功
2. 発表標題 抗菌ペプチドLL-37による好中球細胞外（エクソソーム）の放出を介したマウス敗血症の病態改善
3. 学会等名 第6回日本細胞外小胞学会 学術集会
4. 発表年 2019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 2019年

1. 発表者名 Kumagai Y, Murakami T, Kuwahara-Arai K, Nagaoaka I
2. 発表標題 Antimicrobial peptide LL-37 ameliorates mouse sepsis through microparticle release from neutrophils
3. 学会等名 The 92nd annual meeting of Japanese Society for Bacteriology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kumagai Y, Kunihiro N, Nagaoka I, Susaki AE
2. 発表標題 Anti-bacterial neutrophil-derived ectosomes ameliorate mouse sepsis pathophysiology
3. 学会等名 The 95th annual meeting of the Japanese Society for Bacteriology.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kumagai Y, Murakami T, Kuwahara-Arai K, Nagaoka I
2. 発表標題 Sepsis-protective antimicrobial peptide LL-37 induces neutrophil-derived ectosomes with antibacterial potential and exosomes
3. 学会等名 The 93rd annual meeting of Japanese Society for Bacteriology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊谷由美, 村上泰介, 桑原京子, 長岡功
2. 発表標題 Antimicrobial peptide LL-37 induces antibacterial ectosomes from neutrophils
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 熊谷由美, 角田宗一郎, 洲崎悦生, 長岡功
2. 発表標題 生体防御ペプチドLL-37は、抗菌活性を有する細胞外小胞の放出を促進することでマウス敗血症の病態改善に関与する
3. 学会等名 第28回 日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 熊谷由美, 村上泰介, 栗原京子, Reich Johannes, 田村弘志, 長岡 功	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学図書出版株式会社	5. 総ページ数 82
3. 書名 エンドトキシン・自然免疫研究22 -エンドトキシン・自然免疫研究の新たな可能性を求めて	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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・教授 (32620)	
研究 分担者	射場 敏明 (Iba Toshiaki) (40193635)	順天堂大学・医学部・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
---------	---------