

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590456

研究課題名（和文）敗血症で放出される危険信号分子 alarmin による宿主細胞のアポトーシス制御

研究課題名（英文）Modulation of host cell apoptosis during sepsis by alarmins

研究代表者

長岡 功 (NAGAOKA ISAO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60164399

研究成果の概要（和文）：

抗菌ペプチド（ $\alpha$ -デフェンシン、 $\beta$ -デフェンシン、cathelicidin）は病原微生物に対して強力な抗菌作用を有しており、自然免疫において重要な役割を果たしている。さらに、抗菌ペプチドは抗菌作用の他に、サイトカイン生成や炎症細胞を活性化して免疫調節分子としても働く。好中球は微生物感染において重要な食細胞の一つであるが、その寿命は短く、種々の菌体分子、生体分子によって調節されている。我々は、以前、ヒト cathelicidin である LL-37 とヒト  $\beta$ -デフェンシンである hBD-3 が、P2X<sub>7</sub> 受容体と CCR6 受容体を介して好中球の自発的アポトーシスを抑制することを見出した。そこで、さらに、 $\alpha$ -デフェンシンの好中球アポトーシスに及ぼす影響について検討した。

その結果、 $\alpha$ -デフェンシンの中で HNP-1 がもっとも強くヒト好中球の自発的アポトーシスを抑制することがわかった。そして、その抑制は、アポトーシス促進タンパク質である truncated Bid の減少と、アポトーシス抑制タンパク質である Bcl-x<sub>L</sub> の発現増加をとまっていた。また、アポトーシスにとまなうミトコンドリアの膜電位変化とカスパーゼ3の活性化が抑制されていた。さらに、興味深いことに、P2Y<sub>6</sub> 受容体の選択的アンタゴニストである MRS2578 が UDP のみならず HNP-1 による好中球アポトーシスの抑制をブロックした。これらの結果から、HNP-1 は恐らく P2Y<sub>6</sub> 受容体を介して好中球のアポトーシスを制御すると考えられた。

以上の結果から、 $\alpha$ -デフェンシン、 $\beta$ -デフェンシン、cathelicidin などの抗菌ペプチドは、それら自身で抗菌作用を示すだけでなく、微生物の排除に重要な役割を果たしている好中球の寿命を制御することで生体防御システムに働いていることが推測された。

研究成果の概要（英文）：

Antimicrobial peptides (alpha- and beta-defensins, and cathelicidins) possess the potent antimicrobial activities against invading microorganisms and contribute to the innate host defense. They not only exhibit potent bactericidal activities against Gram-negative and Gram-positive bacteria but also function as immunomodulatory molecules by inducing cytokine and chemokine production, and inflammatory and immune cell activation. Neutrophil is a critical effector cell in host defense against microbial infection, and its lifespan is regulated by various pathogen- and host-derived substances. We previously revealed that human cathelicidin LL-37 and human beta-defensin (hBD)-3 suppress neutrophil apoptosis via the actions on P2X<sub>7</sub> nucleotide receptor and CC chemokine receptor (CCR) 6,

respectively. Here, to further evaluate the role of human alpha-defensins in innate immunity, we investigated the action of human neutrophil peptides (HNPs)-1~3 on neutrophil apoptosis.

Neutrophil apoptosis was assessed using human blood neutrophils based on the morphological changes. Of note, HNP-1 most potently suppressed neutrophil apoptosis among HNP-1~3, accompanied with the downregulation of truncated Bid (a proapoptotic protein), upregulation of Bcl-x<sub>L</sub> (an antiapoptotic protein), and inhibition of mitochondrial membrane potential change and caspase 3 activity. Interestingly, a selective P2Y<sub>6</sub> antagonist MRS2578 abolished the suppression of neutrophil apoptosis induced by HNP-1 as well as UDP (a P2Y<sub>6</sub> ligand).

Collectively, these observations suggest that HNPs, especially HNP-1, can not only kill bacteria but also modulate (suppress) neutrophil apoptosis possibly via the P2Y<sub>6</sub> signaling. Considering their antiapoptotic action, antimicrobial peptides (LL-37, hBD-3 and HNP-1) are expected to exert an advantageous effect on host defense against bacterial infections by prolonging the lifespan of neutrophil, a major phagocyte engaged in the killing of invaded bacteria.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	0	0	0
2012年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生化学・生体防御学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：敗血症、alarmin、アポトーシス、抗菌ペプチド、好中球、マクロファージ、血管内皮細胞、エンドトキシン

#### 1. 研究開始当初の背景

敗血症は救急救命治療の発達した先進国においても未だ致命的経過をたどる重篤な病態であり、その多くにグラム陰性菌、陽性菌感染が関与している。敗血症の病態では、リポ多糖、ペプチドグリカンなどの病原体由来因子（pathogen-associated molecular patterns; PAMPs）が宿主細胞の Toll-like receptor や NOD などパターン認識受容体（pattern recognition receptors; PRRs）によって認識され、サイトカインやメディエーターの過剰生成を介して生体の免疫・防御システムの破綻を招く。敗血症では特に宿主細胞のアポトーシスが変調を来し、感染防御機構が低下し、さらに、組織・臓器障害を起こしやすい状況に陥っ

ている。すなわち、敗血症時には、リンパ球や上皮細胞（腸管上皮、気道上皮など）などの細胞死が誘導され（アポトーシスが亢進）、感染に対する抵抗性が低下し、病原体が生体に侵入しやすい状況にある。さらに、好中球のアポトーシスが抑制され、活性化された好中球が組織障害・多臓器不全の進展をおこす（*J Leukoc Biol* 78: 325-337, 2005）。

一方、生体には危険信号を伝える alarmin と呼ばれる一群の分子が存在し、敗血症などにおいて宿主が病原体に遭遇すると、免疫担当細胞、上皮・血管内皮細胞、あるいは壊死細胞から alarmin が細胞外に放出され、免疫担当細胞に作用して生体防御システムを賦活化する（*Curr Opin*

*Immunol* 17: 359-365, 2005)。今までに抗菌ペプチドであるデフェンシンと cathelicidin (ヒト LL-37)、クロマチン結合タンパク質である HMGB1 (high mobility group box protein 1)、EDN (eosinophil-derived neurotoxin) などの分子が alarmin として認知され、それぞれ特定の受容体を介して好中球、リンパ球、単球・マクロファージ、樹状細胞などの免疫細胞を刺激して、自然免疫ならびに獲得免疫の誘導に関わることが報告されている。

申請者は、今まで抗菌ペプチドの宿主細胞に及ぼす影響、特に免疫担当細胞のアポトーシスに対する効果について検討してきた。そして、ヒト cathelicidin の LL-37 がホルミルペプチド受容体の FPRL1 (formyl-peptide receptor-like 1) およびヌクレオチド受容体の P2X<sub>7</sub> に作用して好中球の自発的アポトーシスを抑制することを見出した (*J Immunol* 176: 3044-3052, 2006)。さらに、ヒトβ-デフェンシンの hBD-3 (human β-defensin-3) がケモカイン受容体の CCR6 を介して好中球の自発的アポトーシスを抑制することを報告している (*Int Immunol* 20: 543-553, 2008)。さらに、LL-37 やヒトβ-デフェンシンが上皮細胞をも活性化することを見出している (*J Immunol* 175: 1776-1784, 2005)。

以上のような研究経過から、申請者は、デフェンシンや cathelicidin を含む alarmin の仲間が宿主細胞 (免疫担当細胞、上皮細胞など) に作用し、それらのアポトーシスを調節することによって敗血症の病態に関わるのではないかという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

そこで、さらに、α-デフェンシンの好中球アポトーシスに及ぼす影響について焦点を当てて検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

〈好中球アポトーシスの検出〉

ヒト末梢血より単離した好中球 (10<sup>6</sup> 細胞/ml) を HNP-1~3 (5~40 μg/ml) あるいは hBD-3 (1~10 μg/ml) と 37°C、18 時間培養した後、Cytospin で塗抹標本を作成、May-Grünwald Giemsa 染色し、顕微鏡下で

アポトーシスをおこした好中球を算定した。

〈truncated Bid, Bcl-x<sub>L</sub> の発現, caspase 3 活性の測定〉

好中球 (10<sup>6</sup> 細胞/ml) を HNP-1~3 (40 μg/ml) あるいは hBD-3 (10 μg/ml) と 37°C で一定時間培養した後、細胞を回収した。そして、ヤギ anti-Bid 抗体およびマウス anti-Bcl-x<sub>L</sub> 抗体を用いて、truncated Bid と Bcl-x<sub>L</sub> 発現をそれぞれウエスタンブロット法で検出した。さらに、acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide を基質として用いて caspase 3 活性を測定した。

〈ミトコンドリア膜電位変化の測定〉

好中球 (10<sup>6</sup> 細胞/ml) を HNP-1 (40 μg/ml) 存在下あるいは非存在下で 37°C 一定時間培養した。その後、細胞を回収し、ミトコンドリアの膜電位依存性の蛍光色素 JC-1 で細胞を染色し、フローサイトメーターでミトコンドリアの膜電位が障害されている細胞と、障害されていない細胞の割合を測定した。

## 4. 研究成果

好中球を 37°C、18 時間培養すると自発的なアポトーシスがおこり、4°C で培養したものに比べると (図 1A)、アポトーシスに特徴的な核の濃縮や細胞質の空胞化が見られた (図 1B)。一方、好中球を HNP-1 存在下で培養するとアポトーシスが抑制されることがわかった (図 1C)。

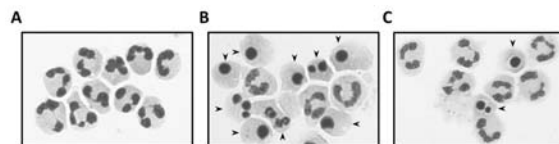


図 1

さらに、HNP-1~3 存在下で培養したところ、α-デフェンシンの中で HNP-1 がもっとも強くヒト好中球の自発的アポトーシスを抑制することがわかった (図 2)。

つぎに、HNP-1 によるアポトーシス抑制の機序を調べるために、アポトーシス促進タンパク質である truncated Bid と抑制タン

パク質である Bcl-x<sub>L</sub> の発現を調べた。その

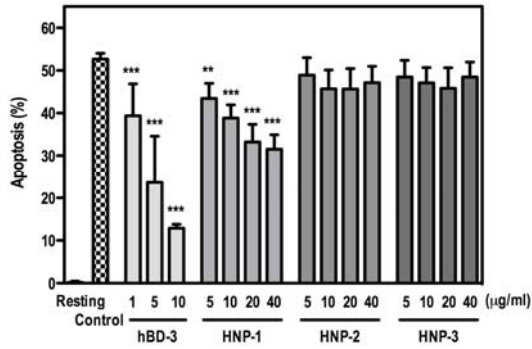


図 2

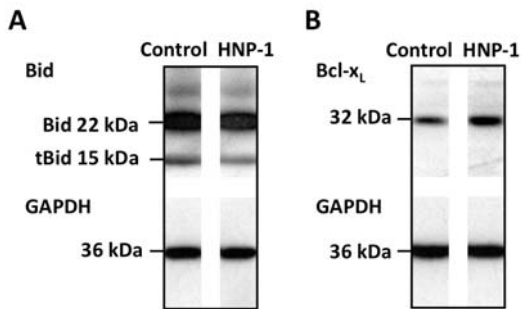


図 3

結果、HNP-1 によるアポトーシス抑制に、truncated Bid の減少と Bcl-x<sub>L</sub> の発現増加をともなっていることがわかった (図 3)。

さらに、アポトーシスにともなうミトコンドリアの膜電位変化 (図 4) とカスパーゼ 3 の活性化 (図 5) について調べた。その結果、HNP-1 によって好中球のアポトーシスが抑制されている状況では、これらの変化が抑制されていることがわかった。

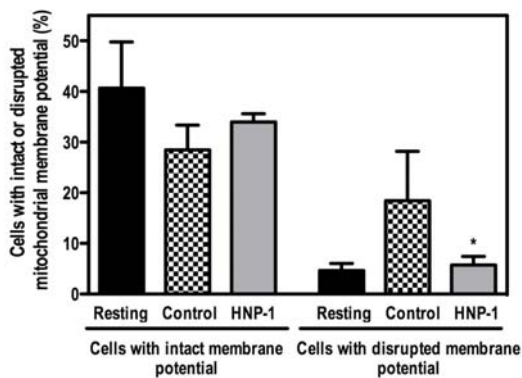


図 4

なお、興味深いことに、UDP の受容体である P2Y<sub>6</sub> 受容体の選択的アンタゴニストである MRS2578 が UDP のみならず HNP-1 による好中球アポトーシスの抑制

をブロックした (図 6)。これらの結果から、

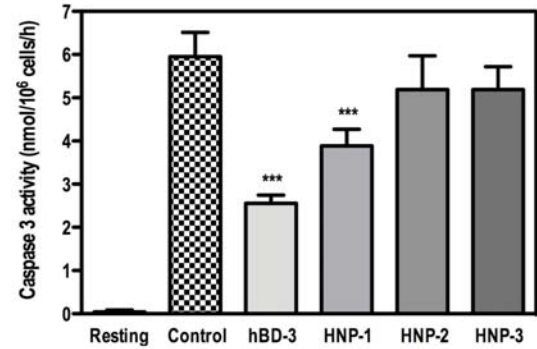


図 5

HNP-1 は恐らく P2Y<sub>6</sub> 受容体を介して好中球のアポトーシスを制御すると考えられた。なお、我々は、RT-PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて、好中球が P2Y<sub>6</sub> 受容体の mRNA とタンパク質を発現していることを確認している (data not shown)。

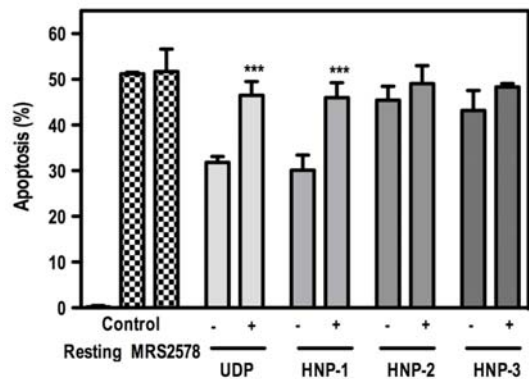


図 6

さらに、LL-37、hBD-3、HNP-1 を組み合わせて好中球に作用させると、これらの抗菌ペプチドが協調的に好中球の自発的アポトーシスを抑制することがわかった (図 7)。

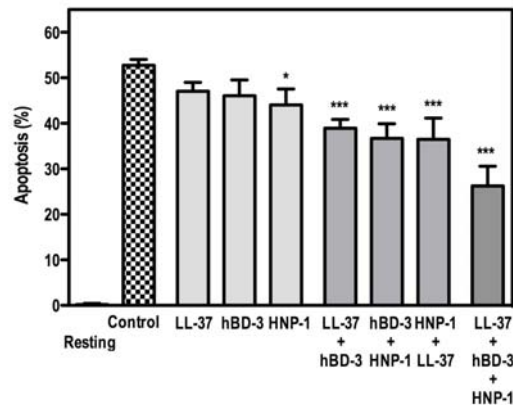


図 7

以上の結果から、HNP-1 は好中球の P2Y<sub>6</sub> 受容体を介して作用し、アポトーシス促進タンパク質 truncated Bid の発現を抑制する一方、アポトーシス抑制タンパク質 Bcl-x<sub>L</sub> の発現を促進することによって、ミトコンドリアの膜電位変化、カスパーゼ 3 の活性化を抑制して、好中球のアポトーシスを阻害することが考えられた。

我々は既に、LL-37 が FPRL1 および P2X<sub>7</sub> に作用してまた、hBD-3 が CCR6 に作用して好中球の自発的アポトーシスを抑制することを報告している。したがって、LL-37、hBD-3、HNP-1 はそれぞれ異なる受容体に作用して、協調的に好中球のアポトーシスを抑制すると考えられる。

敗血症、SIRS、ARDS のような過度の炎症反応をとまなう病態では、好中球のアポトーシスが抑制され、活性化された好中球が細胞障害物質を放出し続けることによって組織・臓器障害を引き起こすと考えられている。今回の結果によって、 $\alpha$ -デフェンシン、 $\beta$ -デフェンシン、cathelicidin などの抗菌ペプチドが好中球のアポトーシスを抑制したことから、これら抗菌ペプチドの働きは、組織・臓器障害の観点からは生体にとって不利に働く可能性がある。一方、緑膿菌感染では菌が産生するフェナジン色素ピオシアニンが外毒素として好中球に作用して、アポトーシスを誘導し、好中球による殺菌から免れようという宿主にとって好ましくない状況を作り出すことが知られている。したがって、抗菌ペプチドが好中球の寿命を延ばすということは、微生物感染に対する防御の観点からは、好中球がより長く生存して殺菌作用を発揮できるという宿主にとって有利な効果をもたらす可能性も考えられる。

抗菌ペプチドは殺菌作用を発揮することによって、自然免疫において重要な働きをすると考えられてきた。しかし、その後の研究によって、抗菌ペプチドが免疫担当細胞の活性化やサイトカインの産生・放出を誘導することがわかり、獲得免疫に関わる分子としても注目されている。そして、今回の研究によって、 $\alpha$ -デフェンシン、 $\beta$ -

デフェンシン、cathelicidin などの抗菌ペプチドが、それら自身で抗菌作用を示すだけでなく、協調的に微生物の排除に重要な役割を果たしている好中球の寿命を制御することで生体防御システムに働いていることが推測された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Suzuki K, Murakami T, Kuwahara-Arai K, Tamura H, Hiramatsu K, Nagaoka I: Human antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 suppresses the lipopolysaccharide-induced apoptosis of endothelial cell. Int Immunol (in press) 2011 査読有
- ② Nagaoka I, Suzuki K, Murakami T, Niyonsaba F, Tamura H, Hirata M: Evaluation of the effect of  $\alpha$ -defensins human neutrophil peptides on neutrophil apoptosis. Int J Mol Med 26: 925-934, 2010. 査読有
- ③ 長岡 功, 渋沢謙太郎, 鈴木 香, 五十嵐庸, 田村弘志: LPS 刺激によるマクロファージ様細胞からの HMGB1 放出と抗菌ペプチド CAP11 の抑制効果. 日本血流血管学会誌 2: 35-37, 2010. 査読有
- ④ Okuda D, Yomogida S, Kuwahara-Arai K, Hiramatsu K, Tamura H, Nagaoka I: Augmentation of the antimicrobial activities of guinea pig cathelicidin CAP11-derived peptides by amino acid substitutions. Int J Mol Med 23: 501-508, 2009. 査読有
- ⑤ Shibusawa K, Murakami T, Yomogida S, Tamura H, Nagaoka I: Antimicrobial cathelicidin peptide CAP11 suppresses HMGB1 release from lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via the prevention of necrotic cell death. Int J Mol Med 23: 341-346, 2009. 査読有
- ⑥ Nagaoka I, Niyonsaba F, Tsutsumi-Ishii Y, Tamura H, Hirata M: Evaluation of the effect of human  $\beta$ -defensins on neutrophil apoptosis. Int Immunol 20: 543-553, 2008. 査読有
- ⑦ 長岡 功: 好中球機能の基礎. 皮膚アレルギーフロンティア 6: 13-20, 2008. 査読無

[学会発表] (計 9 件)

- ① 鈴木 香, 栗原京子, 射場敏明, 山倉文幸, 田村弘志, 村上泰介, 細田浩司, 長岡 功: LPS で誘導される血管内皮細胞のアポトーシスに対するヒト抗菌ペプチド LL-37 の抑制効果. 第 57 回毒素シ

- ンポジウム予稿集, 60-62, 長浜, Jul 2010.
- ② 鈴木 香, 村上泰介, 田村 弘志, 長岡 功: 敗血症モデルマウスにおける肝血管内皮細胞アポトーシスに対する抗菌ペプチド LL-37 の効果. BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会), 2P-1039, 神戸, Dec 2010.
  - ③ 長岡 功, 鈴木 香, 村上泰介, 細田浩司, 田村 弘志: ヒト  $\alpha$ -デフェンシンによる好中球アポトーシスの制御. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会), 2P-1040, 神戸, Dec 2010.
  - ④ Nagaoka I, Suzuki K, Murakami T, Niyonsaba F, Tamura H, Hirata M: Evaluation of the effect of alpha-defensins human neutrophil peptides on neutrophil apoptosis. The three Rs of immunity: recognition, response and resolution. 63, Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology & the International Endotoxin and Innate Immunity Society, Vancouver, Oct 2010.
  - ⑤ Suzuki K, Murakami T, Tamura H, Nagaoka I: An antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 suppresses the LPS-induced endothelial cell apoptosis. The three Rs of immunity: recognition, response and resolution. 109, Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology & the International Endotoxin and Innate Immunity Society, Vancouver, Oct 2010.
  - ⑥ 長岡 功, 渋沢謙太郎, 村上泰介, 鈴木 香, 田村弘志: 抗菌ペプチド CAP11 によるマクロファージ様細胞からの HMGB1 の放出制御機構. 第56回毒素シンポジウム予稿集, 122-127, 岐阜, Aug 2009.
  - ⑦ 鈴木 香, 渋沢謙太郎, 栗原京子, 射場敏明, 山倉文幸, 田村弘志, 長岡 功: Cathelicidin ファミリー抗菌ペプチド LL-37 は LPS で誘導される血管内皮細胞のアポトーシスを抑制する. 生化学 81: 200, 396, 第82回日本生化学会大会, 神戸, Oct 2009.
  - ⑧ Nagaoka I, Shibusawa K, Murakami T, Tamura H: Antimicrobial cathelicidin peptide CAP11 suppresses HMGB1 (high mobility group box-1) release from lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via the prevention of necrotic cell death. Cytokine 48: 97, Tri-Society Annual Conference, Lisbon, Oct 2009.
  - ⑨ 渋沢謙太郎, 村上泰介, 田村弘志, 長岡 功: 敗血症性ショックにおける抗菌ペ

プチド CAP11 による HMGB1 の放出制御. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会講演要旨集: 822, 神戸, Dec 2008.

〔図書〕(計3件)

- ① 長岡 功: 炎症と免疫応答現代栄養学を理解するための分子生物学入門. 加藤茂明 編著, 光生館, 東京, 186-193, 2010. 総ページ数 221
- ② 村上泰介, 田村弘志, 長岡 功: Cathelicidin ファミリーの生体防御ペプチド CAP11 を用いた敗血症性メディエーターの制御. エンドトキシン研究 11 新生「日本エンドトキシン・自然免疫研究会」の発展を願って, 嶋田 紘, 谷 徹, 横地高志, 清水智治 編集, 医学図書出版, 東京, 36-40, 2009. 総ページ数 44
- ③ 渋沢謙太郎, 村上泰介, 田村弘志, 長岡 功: 単核食細胞からの HMGB1 放出に及ぼす生体防御ペプチド CAP11 の効果. エンドトキシン研究 12 自然免疫学の新たな展開, 高田春比古, 谷 徹, 嶋田 紘 編集, 医学図書出版, 東京, 54-57, 2009. 総ページ数 118

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/seikagaku\\_seitaibogyo/html/index\\_j.html](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/seikagaku_seitaibogyo/html/index_j.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長岡 功 (NAGAOKA ISAO)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号: 60164399

### (2) 研究分担者

栗原 京子 (KUWAHARA KYOKO)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 10167976

射場 敏明 (IBA TOSHIAKI)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号: 40193635

### (3) 連携研究者

なし