

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590519

研究課題名(和文)敗血症における新規細胞死ピロトーシスの変調と危険信号分子alarminによる制御

研究課題名(英文)Modulation of a novel death, pyroptosis by alarmins in septic shock

研究代表者

長岡 功(NAGAOKA, Isao)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60164399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ピロトーシスはカスパーゼ-1依存的な細胞死であり、炎症性サイトカインの放出をともなうことから新たな治療標的として注目されている。本研究では、LPS/ATPによるマクロファージ系細胞のピロトーシスに対する抗菌ペプチドLL-37の効果を検討した。

J774細胞をLPS/ATP刺激するとピロトーシスが誘導され、LL-37によって抑制された。また、LL-37はLPSの細胞膜受容体への結合と、ATPによるP2X7を介したカスパーゼ-1の活性化を抑制した。従って、LL-37は、LPSの細胞膜受容体への結合とATPによるP2X7の活性化の抑制を介してマクロファージ系細胞のピロトーシスを抑制すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Pyroptosis is a caspase-1 dependent cell death, associated with proinflammatory cytokine production, and plays a crucial role in sepsis. Pyroptosis is induced by microbial PAMPs and endogenous DAMPs. Notably, human antimicrobial peptide LL-37 protects the septic animal models. Thus, to elucidate the action of LL-37 on sepsis, we utilized LPS (lipopolysaccharide) and ATP as a PAMP and a DAMP, respectively. The data indicated that the LPS/ATP-treatment of macrophage-like J774 cell induces the features of pyroptosis (IL-1 mRNA expression, caspase-1 activation, inflammasome formation and cell death). Moreover, LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced IL-1 expression, caspase-1 activation, inflammasome formation and cell death. Notably, LL-37 suppressed the LPS binding to target cells and ATP-induced/P2X7-mediated caspase-1 activation. These observations suggest that LL-37 potentially inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis by blocking the action of LPS and inhibiting the response of P2X7 to ATP.

研究分野：医歯薬学

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 alrmin ピロトーシス 抗菌ペプチド マクロファージ 細胞死 エンドトキシン カスパーゼ

1. 研究開始当初の背景

真核細胞が産生する抗菌ペプチドは、生体を微生物感染から守るために働いている。近年、新たな抗菌ペプチドファミリーとして cathelicidin が見出されたが、cathelicidin は、その前駆体のプロペプチド領域がブタ好中球の cathelin タンパク質に相同性を示し、また、活性ペプチドが前駆体の C 末端に存在するという特徴をもっている(図1)。

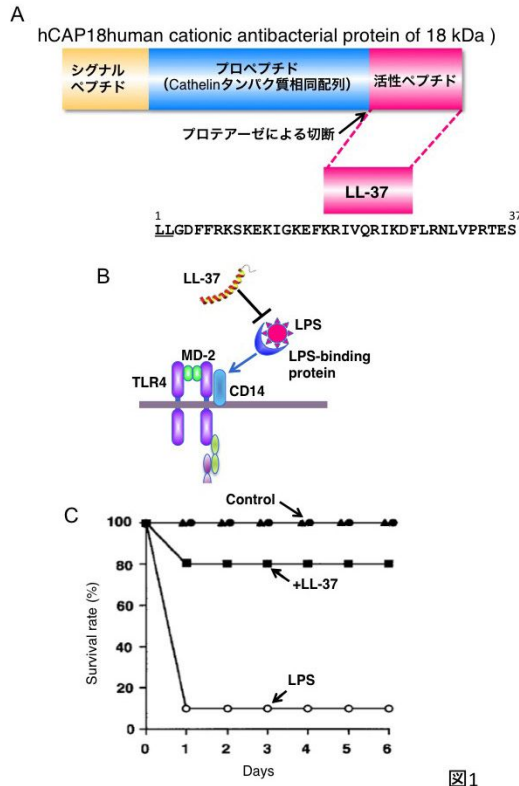


図1

今までに、ヒト、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、ウシ、ブタなどの動物から、cathelicidin ファミリーに属する多くの抗菌ペプチドが単離されている。ヒトでの cathelicidin としては hCAP18 (human cationic antibacterial protein of 18 kDa) が見出されており、その活性ペプチドは、2つのロイシン(LL)から始まる37アミノ酸残基のペプチドであることから LL-37 と呼ばれている(図1A)。そして、LL-37は、グラム陽性菌、陰性菌に対して強い殺菌作用を発揮するだけでなく、LPS (lipopolysaccharide, リポ多糖)を中和する能力を有することから、細菌感染やエンドトキシンショックに対する臨床応用が期待されている。

グラム陰性菌感染では、菌体から遊離した LPS が LPS 結合タンパク質 (LBP, LPS-binding protein) と複合体を形成して、単球・マクロファージなどの LPS 受容体・CD14/Toll-like receptor 4 (TLR4) に作用し、炎症性サイトカインなどの産生を誘導して、敗血症性ショック (エンドトキシンショック) の病態を引き起こす。そして、われわれは、LL-37 のエンドトキシンショックに対する作用とそのメカニズムについて検討

したところ、LL-37 が LPS に結合することによって、LPS/LBP 複合体の形成を阻害し(図1B)、その結果、CD14/TLR4 への LPS の結合、サイトカイン生成を抑制して、エンドトキシンショックにおいて防衛的に働く(エンドトキシンショックによる致死率を低下させる)ことを明らかにした(図1C) (*J Immunol* 167: 3329, 2001)。

一方、近年、敗血症の病態において、宿主細胞の細胞死が重要な役割を果たすことがわかってきた。細胞死の一つであるピロトーシス (pyroptosis) は、カスパーゼ-1 依存的なプログラム細胞死であり、IL-1 β などの炎症性サイトカインの放出をとまうことから、敗血症における過剰な炎症反応の原因として注目されている。すなわち、グラム陰性菌感染において LPS が単球・マクロファージの細胞膜受容体 CD14/TLR4 に結合して、炎症性サイトカイン (IL-1 β) の発現を誘導し、また、死細胞から遊離された ATP が P2X₇ ヌクレオチド受容体を刺激して、インフラマソームの形成を介して、カスパーゼ-1 を活性化する。そして、活性化されたカスパーゼ-1 が IL-1 β のプロセッシング・放出と細胞死ピロトーシスを誘導する(図2)。

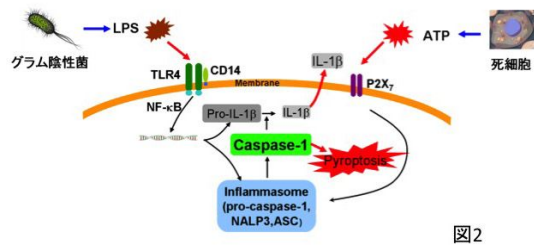


図2

2. 研究の目的

われわれは、上述のように、LL-37 が LPS 中和能を有しており LPS の受容体への結合を抑制することを見出しているが、また一方で、LL-37 が ATP 刺激による P2X₇ 受容体の活性化を制御することも報告されている (*J Immunol* 176: 3044, 2006)。したがって、LL-37 は、LPS と ATP の2つの刺激によって誘導されるマクロファージ系細胞のピロトーシスに対して影響すると思われる。そこで、本研究では、LPS/ATP 刺激によるマクロファージ系細胞のピロトーシスに対する LL-37 の効果について検証した。

3. 研究の方法

(1)ピロトーシスの測定

マウスマクロファージ系 J774細胞を 10 ng/ml LPS (*E. coli* O111:B4) で前処理し、20 mM Ac-YVAD-CHO (カスパーゼ-1 阻害剤) の存在下あるいは非存在下で細胞を ATP で刺激した。得られた培養上清を IL-1 β (ELISA 法) と LDH (細胞死のマーカー) の測定に用い、細胞を蛍光標識したカスパーゼ-1 阻害剤 (FAM-YVAD-FMK)

で染色して、インフラマソームの形成を蛍光顕微鏡で検出した。また、カスパーゼ-1の活性化は、細胞を FAM-YVAD-FMK で標識し、フローサイトメトリーで検出した。

(2)ピロトーシスに及ぼす LL-37 の効果

LL-37 (0.01, 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$) の存在下あるいは非存在下で同様に J774 細胞を LPS および ATP 刺激した後に、IL-1 β の放出、細胞死、カスパーゼ-1 の活性化、インフラマソームの形成を測定した。さらに、LPS の細胞への結合、および ATP 刺激による P2X₇ 受容体の活性化 (ATP 刺激によるカスパーゼ-1 の活性化) に及ぼす LL-37 の効果をフローサイトメトリーで測定した。

4. 研究成果

(1)LPS/ATP 刺激によるピロトーシスの誘導

まず、マウスマクロファージ系 J774 細胞を LPS で前処理し、ATP で刺激し、得られた培養上清の IL-1 β と LDH (lactate dehydrogenase; 細胞死のマーカー) を測定した。その結果、LPS/ATP の共刺激によって J774 細胞から IL-1 β が放出されることと、LDH の放出、すなわち細胞死が誘導されることがわかった (図 3A, B; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001)。また、カスパーゼ-1 の阻害剤 Ac-YVAD-CHO を添加すると、IL-1 β と LDH の放出が有意に阻害されたことから、J774 細胞を LPS/ATP で刺激することによって、カスパーゼ-1 依存的に IL-1 β の放出をとまなう細胞死ピロトーシスが誘導されることがわかった。

さらに、蛍光標識したカスパーゼ-1 阻害剤 (FAM-YVAD-FMK) で細胞を染色してインフラマソームの形成を蛍光顕微鏡で観察したところ、LPS/ATP の刺激によってインフラマソームが形成されることが

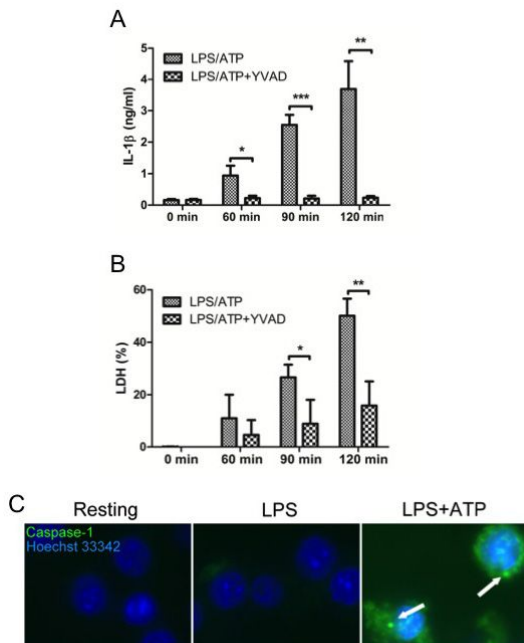


図3

確認された (図 3C)。

(2)ピロトーシスに対する LL-37 の効果

LPS/ATP で誘導されたピロトーシスに対する LL-37 の効果を調べた。その結果、LL-37 は LPS/ATP 刺激による IL-1 β の放出、LDH の放出とカスパーゼ-1 の活性化を濃度依存的に抑制したことから、LL-37 が LPS/ATP 刺激によるピロトーシスを抑制することがわかった (図 4)。さらに、インフラマソームの形成に及ぼす LL-37 の効果を調べたところ、LPS/ATP 刺激によって約 40%の細胞にインフラマソーム形成が誘導されたが、LL-37 はこの形成を有意に抑制した (data not shown)。

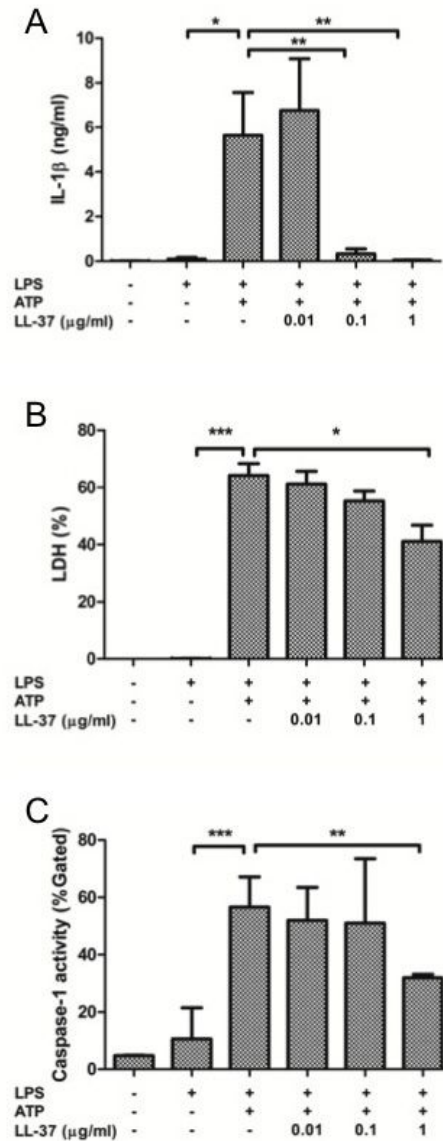


図4

つぎに、LL-37 のピロトーシスの抑制メカニズムを明らかにするために、LPS の細胞への結合に及ぼす LL-37 の効果を調べた。その結果、LL-37 は LPS の細胞への結合を濃度依存的に抑制した (図 5)。なお、CD14/TLR4 の中和抗体が LPS の細胞

への結合を顕著に抑制したことから、LL-37 は LPS の CD14/TLR4 受容体への結合を阻害することがわかった。

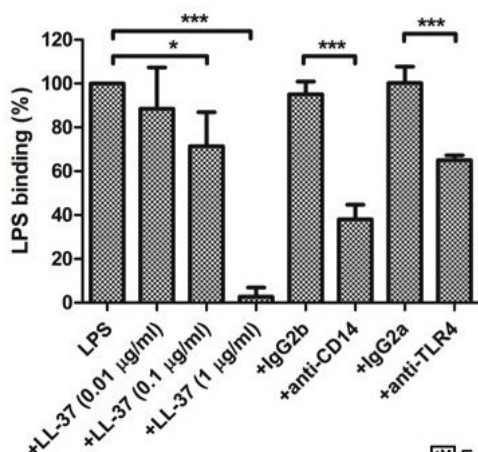


図5

さらに、ATP による P2X₇ の活性化に及ぼす LL-37 の効果を調べた。ATP は単独でもカスパーゼ-1 を活性化したが、この活性化は P2X₇ 阻害剤 KN-62 と KN-93 によって抑制されることが確認された (図 6)。興味深いことに、LL-37 も ATP によるカスパーゼ-1 の活性化を抑制したことから、LL-37 は ATP 刺激による P2X₇ の活性化をも抑制することがわかった。

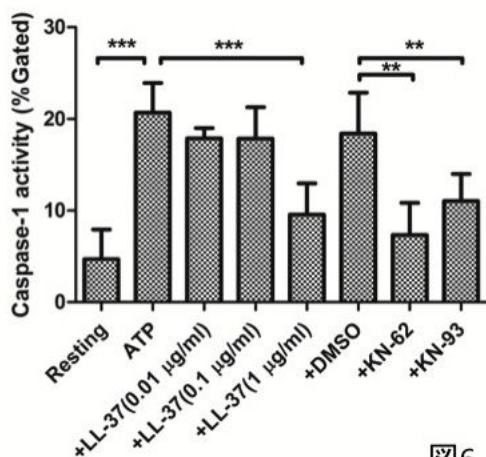


図6

また、マウスの盲腸結紮穿孔 (CLP; cecal ligation and puncture) モデルを使って、敗血症に及ぼす LL-37 の作用を検討した。その結果、CLP によって 48 時間後に 100% のマウスが死亡したが、LL-37 (2 µg/マウス) を静脈内投与すると死亡率が 60% まで改善した。さらに、LL-37 の投与によってピロトーシスをおこしている腹腔マクロファージの細胞数と、腹腔内の IL-1 β の濃度が有意に抑制されることがわかった (data not shown)。これらの結果から、LL-37 は敗血症モデル (*in vivo*) においてもマクロファージのピロトーシスを抑制することによって、敗血症の病態を改善する可能性が示された。

(3)おわりに

今回の結果から、抗菌ペプチドである LL-37 が、LPS/ATP 刺激によるマクロファージ系細胞のピロトーシスを抑制し、その機序に、LL-37 による LPS の CD14/TLR4 への結合抑制と ATP 刺激による P2X₇ の活性化抑制の二つが関与していることがわかった。また、敗血症モデルにおいて、LL-37 がマクロファージのピロトーシスやサイトカイン生成を制御し、生存率を改善することがわかった (図 7)。また、敗血症では宿主細胞のアポトーシスが亢進し、臓器障害などの病態に関わっているが、われわれは、エンドトキシンショックモデルで見られる血管内皮細胞のアポトーシスが LL-37 の投与によって抑制され、マウスの致死率が改善することを既に見出している (*Int Immunol* 23: 185, 2011)。さらに、われわれは、LL-37 のアミノ酸配列を置換することによって、LL-37 の抗菌作用と LPS 中和能を増強できることを示している (*Clin Diag Lab Immunol* 9: 972, 2002; *Inflamm Res* 54: 66, 2005)。したがって、LL-37 のような抗菌ペプチドを用いて、生体内で抗菌作用と LPS 中和能を発揮し、さらに、宿主細胞の細胞死を抑制することによって敗血症の病態を制御することが期待される。

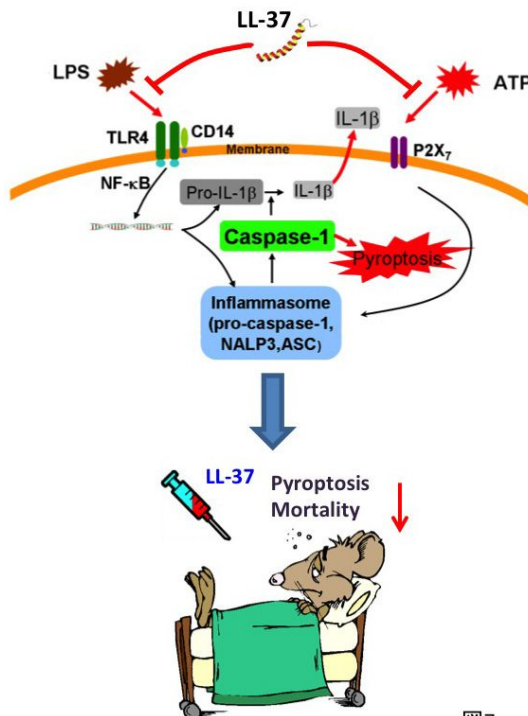


図7

しかし、抗菌ペプチドを医薬品としての使用することを考えた場合、体内動態・安定性、投与方法、供給面でのコストなど検討課題は多く残されている。特に、LL-37 のような内因性抗菌ペプチドは、生体内においてタンパク質分解酵素によって分解され、その効力が弱まる可能性がある。このような問題に対して、タンパク質分解酵

素で分解されにくい D 型アミノ酸からなるペプチドを合成するという考え方や、(20 種類のアミノ酸以外の) 特殊アミノ酸を含む(環状)ペプチドを合成するという考え方がある。特に、後者に関しては、特殊アミノ酸を取り込んだペプチドのライブラリーを自在かつ簡便に合成し、さらに活性のあるペプチドを迅速かつ安価にスクリーニングする技術 RaPID (Random Peptide Integrated Discovery) システムが最近開発され注目されている (*Molecules* 18: 3502, 2013)。今後、これらの技術を使って、内在性の抗菌ペプチドを基に、敗血症治療に応用可能な新たな化学療法剤の開発が期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Hu Z, Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Kuwahara-Arai K, Iba T, Nagaoka I: Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by dual mechanism. *PLOS ONE* 9(1): e85765. doi:10.1371/journal.pone.0085765, 2014. 査読有

長岡 功, 胡 忠双, 鈴木 香, 田村弘志: 抗菌ペプチドによる敗血症ショックの制御. 化学療法の領域 30: 615-623, 2014. <https://www.iyaku-j.com/iyakuj/system/dc8/index.php?trgid=28241> 査読無

Iba T, Miki T, Hashiguchi N, Yamada A, Nagaoka I: Combination of antithrombin and recombinant thrombomodulin attenuates leukocyte-endothelial interaction and suppresses the increase of intrinsic damage-associated molecular patterns in endotoxemic rats. *J Surg Res* 187: 581-586, 2014. doi: 10.1016/j.jss.2013.10.058. 査読有

Nagaoka I, Suzuki K, Niyonsaba F, Tamura H, Hirata M: Modulation of neutrophil apoptosis by antimicrobial peptides. *ISRN Microbiology*, Volume 2012, Article ID 345791, 12 pages, 2012 doi:10.5402/2012/345791. 査読有

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 cells. *Int Immunol* 23: 185-193, 2011. doi: 10.1093/intimm/dxq471. 査読有

[学会発表](計 38 件)

Hu Z, Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Nagaoka I: The effects of LL-37 on the

LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages and a murine sepsis model. 日本細菌学会雑誌 69: 137, 第 87 回日本細菌学会総会, 東京, Mar 2014.

Suzuki K, Nagaoka I: Antimicrobial peptide LL-37 enhances the LPS uptake without cell activation in endothelial cells. 日本細菌学会雑誌 69: 185, 第 87 回日本細菌学会総会, 東京, Mar 2014.

Hu Z, Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Nagaoka I: The effects of antimicrobial peptide LL-37 on the pyroptosis of macrophages and a polymicrobial sepsis model. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology 2014, Program & Abstracts 58, Tokyo, Mar 2014.

Suzuki K, Tamura H, Nagaoka I: Human antimicrobial peptide LL-37 enhances the LPS uptake without cell activation in endothelial cells. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology 2014, Program & Abstracts 59, Tokyo, Mar 2014.

鈴木 香, 長岡 功: 生体防御ペプチドによる LPS シグナルの制御. 日本細菌学会雑誌 68: 90, 第 86 回日本細菌学会総会, 千葉, Mar 2013.

Hu Z, Murakami T, Suzuki K, Nagaoka I: Modulation of the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by antimicrobial cathelicidin peptide LL-37. IEIIS2012 Program & Abstract: 174, The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting, Tokyo, Oct 2012.

長岡 功, 鈴木 香, 田村弘志: 生体防御ペプチドによる宿主細胞のアポトーシス制御. 第 21 回日本 Cell Death 学会プログラム予稿集 27: 名古屋, Jul 2012.

Nagaoka I, Suzuki K, Murakami T, Niyonsaba F, Tamura H, Hirata M: Antimicrobial peptides, human defensins and LL-37, modulate neutrophil apoptosis. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011), Program 131, Sapporo, Sep 2011.

[図書](計 1 件)

鈴木 香, 村上泰介, 田村弘志, 長岡 功: エンドトキシンで誘発される血管内皮細胞のアポトーシスに対する抗菌ペプチド LL-37 の保護効果. エンドトキシン研究 14 自然免疫と生体防御, 福井 博, 谷 徹, 嶋田 紘 編集, 医学図書出版, 東京, 47-51, 2011.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/seikagaku_seitaibogyo/html/link_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：6 0 1 6 4 3 9 9

(2) 研究分担者

射場 敏明 (IBA, Toshiaki)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：4 0 1 9 3 6 3 5

(3) 研究分担者

栞原 京子 (KUWAHARA, Kyoko)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：1 0 1 6 7 9 7 6

(3) 連携研究者

鈴木 香 (SUZUKI, Kaori)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：9 0 6 3 1 9 2 9