

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08840

研究課題名(和文)好中球エクソソームと危険信号分子アラミンに着目した敗血症の新たな病態制御

研究課題名(英文) Regulation of sepsis by alarmin that induces the release of ectosomes with antibacterial potential from neutrophils

研究代表者

長岡 功 (Nagaoka, Isao)

順天堂大学・保健医療学部・特任教授

研究者番号：60164399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：好中球を刺激するとエクソソームと呼ばれる細胞外小胞が放出される。我々は、ヒト抗菌ペプチドLL-37がマウス敗血症の病態を改善することを示している。今回、敗血症の病態改善におけるエクソソームの関与について検討した。LL-37を敗血症マウスに投与するとエクソソームが増加し、また、エクソソームは抗菌活性を有していた。さらに、マウス好中球をLL-37刺激すると抗菌作用を有するエクソソームが放出され、エクソソームを敗血症マウスに投与すると体内の菌数を減少させて致死率が低下した。以上の結果から、LL-37は好中球を刺激して抗菌活性を有するエクソソームを放出することで敗血症の病態を改善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

エクソソームは、敗血症において増加し、宿主細胞機能を変調させることから、敗血症治療の新たな標的として近年注目されている。申請者は、これまで、生体内抗菌ペプチドであるLL-37の宿主細胞に対する作用を解明してきたが、今回、LL-37が好中球を刺激して、抗菌活性をもつエクソソームの放出することで敗血症の病態改善に関与することを明らかにした。本研究の成果は、新たな視点で、生体内抗菌ペプチドの働きを解明したばかりでなく、将来、抗菌ペプチドを用いた安全かつ有効な敗血症治療法を開発するために有用な情報を提供するという点において意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils release microvesicles (ectosomes) upon stimulation.

Interestingly, ectosome level is elevated in sepsis survivors. Previously, we revealed that LL-37, an antimicrobial peptide, improves the survival of septic mice. In the present study, we elucidated the action of LL-37 on septic mice, by focusing on the release of ectosomes from neutrophils. The results revealed that the ectosome level was enhanced by LL-37-administration, accompanied with reduced bacterial load. Importantly, ectosomes from LL-37-injected septic mice contained antimicrobial proteins/peptides, suggesting that LL-37 induces the release of antibacterial ectosomes. In fact, LL-37 stimulated mouse neutrophils to release antibacterial ectosomes. Furthermore, the administration of ectosomes reduced the bacterial load and improved the survival of septic mice. These observations suggest that LL-37 induces the release of antibacterial ectosomes, thereby reducing the bacterial load and protecting mice from sepsis.

研究分野：生体防御学

キーワード：好中球 エクソソーム 敗血症 抗菌ペプチド LL-37 細胞外小胞 アラミン

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、感染に対する過剰な生体反応によって引き起こされ、多臓器不全や致死性のショックに至る¹⁾。しかし、敗血症に対して有効な治療法はいまだ確立されておらず、先進国においても致死率が 25-50%と高い、重篤な疾患である¹⁾。一方、生体には危険信号を伝えるアラミン (alarmin) と呼ばれる一群の分子が存在する。我々は、敗血症に対する有効な治療法を探索する過程において、アラミンの一つであるヒト抗菌ペプチド LL-37 が、盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) によるマウス敗血症モデルの症状を軽減し、生存率を改善させることを報告してきた^{2,3)}。

一方、好中球をホルミルペプチド fMLF 等で刺激すると、エクソソームと呼ばれる 0.1-1 μm の細胞外小胞が放出される^{4,5)}。エクソソームは、好中球の顆粒に由来する抗菌物質を含み、また表面には好中球の細胞膜に存在する分子 (Ly6G, phosphatidylserine [PS] など) を発現している^{4,5)}。興味深いことに、敗血症の生存患者では、血中のエクソソーム数が上昇することから^{6,7)}、エクソソームの敗血症病態への関わりが示唆されている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、好中球から放出されるエクソソームに注目して、マウス敗血症モデルに対する LL-37 の病態改善効果について検討した⁸⁾。

3. 研究の方法

(1) CLP 誘発敗血症モデルの作成

BALB/c マウス (メス; 7~8 週齢) に LL-37 (3 μg/マウス) あるいは PBS (phosphate-buffered saline) を尾静脈注射し、CLP 処置³⁾ を施した。Sham マウスは、開腹手術のみを行ない、結紮穿孔は行なわなかった。CLP 施行 14-18 時間後に、生理的食塩水あるいは HBSS⁺ (Hanks balanced salt solution, Ca²⁺ および Mg²⁺ 非含有) を腹腔内に注射して腹腔浸出液を回収した。また、心臓から血液をヘパリン採血した。そして、腹腔浸出液と血液中の生菌数をコロニー形成法で調べた。

(2) エクソソームの定量

エクソソームを定量するために、腹腔浸出液については、腹腔浸出液を 400 × g で 5 分遠心し、その上清を 10,000 × g で 10 分、さらにその上清を 100,000 × g で 1 時間遠心し、その沈殿 (細胞外小胞画分) を PBS に懸濁した。また、血液については、血液を 5,000 × g で 20 分遠心して血小板を除いた血漿を調製した。これらの画分に含まれるエクソソームを、PE (Phycoerythrin)-Ly6G および FITC-Annexin V (PS に特異的に結合) で蛍光標識して、PE-Ly6G/FITC-Annexin V 陽性の小胞をフローサイトメーターで定量した。

(3) LL-37 刺激による好中球からのエクソソーム放出

マウス骨髄から Percoll を用いた密度勾配遠心法⁹⁾ により単離した好中球 (2 × 10⁶) を HBSS⁺ (Hanks balanced salt solution, Ca²⁺ および Mg²⁺ 含有) 中で、fMLF あるいは LL-37 と 37°C で 30 分間刺激した。その後、上清を 500 × g で 5 分、さらに、その上清を 3,000 × g で 5 分で遠心し、得られた上清中のエクソソームをフローサイトメーターで定量した。

(4) LL-37 刺激により好中球から放出されたエクソソームの敗血症マウスに対する効果

マウスに CLP 処置を施した 2 時間後に、LL-37 刺激により好中球から放出されたエクソソーム (LL-37-MV: 3 × 10⁵) を腹腔内投与して、24 時間後のマウス腹腔浸出液および血液中の生菌数を測定した。また、マウスの生存を 10 日間にわたってモニターした。

(5) 統計解析

データは平均 ± 標準偏差で示した。統計学的検定は Student T、ANOVA、Kaplan-Meier により行い、P < 0.05 を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) LL-37 を投与した CLP マウスにおける生菌数およびエクソソームレベルの変化

BALB/c マウスに LL-37 あるいは PBS を尾静脈注射し、CLP 処置を施した。CLP 処置の 14-18 時間後に、腹腔浸出液と血液を採取し、生菌数をコロニー形成法で調べた。その結果、LL-37 投与した CLP マウスでは、PBS 投与した CLP

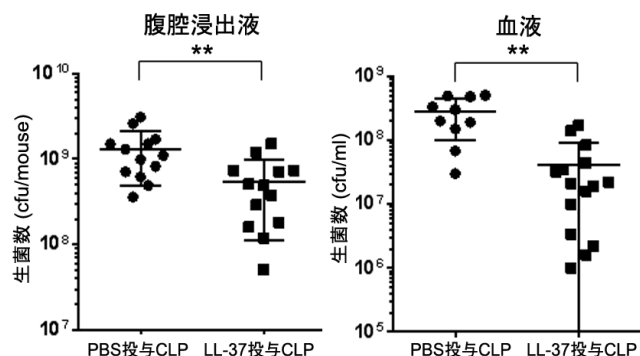


図1 CLPマウスの生菌数に及ぼす LL-37投与の効果
**P < 0.01

マウスと比較して生菌数が有意に低下していた (図 1)。一方、CLP 処置を施さなかった Sham マウスの腹腔浸出液と血液では生菌が検出されなかった (data not shown)。

さらに、エクソソームを定量するために、腹腔浸出液と血漿に含まれるエクソソームを PE-Ly6G および FITC-Annexin V で蛍光標識し、フローサイトメーターで定量した。その結果、腹腔浸出液および血漿中のエクソソーム数は、PBS 投与マウスでも LL-37 投与マウスでも、CLP により有意に増加した (図 2: PBS 投与 Sham vs. PBS 投与 CLP; LL-37 投与 Sham vs. LL-37 投与 CLP)。興味深いことに、LL-37 投与によって、CLP 処置したマウスのエクソソーム数は腹腔浸出液および血漿中において、さらに増加した (図 2: PBS 投与 CLP vs. LL-37 投与 CLP)。また、Sham マウスにおいても、LL-37 投与によってエクソソーム数が有意に増加した (図 2: PBS 投与 Sham vs. LL-37 投与 Sham)。

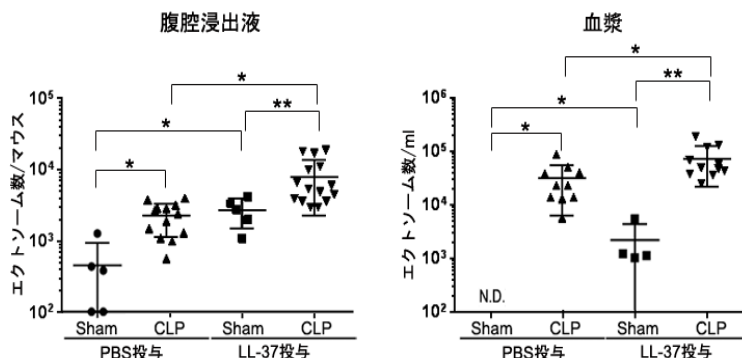


図2 CLPマウスにおけるエクソソーム数に及ぼすLL-37投与の効果

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, N.D.: 検出されず

(2) LL-37 を投与した CLP マウスから単離したエクソソームの抗菌活性

上記のように、LL-37 を投与した CLP マウスでは、PBS を投与した CLP マウスに比べてエクソソーム数は増加したが、生菌数が減少したことから、LL-37 投与によって抗菌活性をもつエクソソームが放出された可能性が考えられた。そこで、PBS あるいは LL-37 を投与した CLP マウスの腹腔浸出液から調製した細胞外小胞 (microvesicle: MV) の抗菌作用について検討した。すなわち、細胞外小胞 (タンパク量 1, 2.5, 5 μg) と、マウス盲腸から単離した大腸菌 (5×10^3 、対数増殖期) をインキュベーションして、細胞外小胞の抗菌活性を評価した。その結果、PBS 投与した CLP マウス由来の細胞外小胞 (PBS-CLP-MV) と LL-37 投与した CLP マウス由来の細胞外小胞 (LL-37-CLP-MV) は、ともに用量依存的に抗菌活性を示したが、LL-37-CLP-MV は PBS-CLP-MV よりも有意に高い抗菌活性を有することがわかった (図 3A)。さらに、エクソソームには好中球由来の抗菌分子が含まれるので^{4,5)}、細胞外小胞に含まれる抗菌タンパク質・ペプチドをウェスタンブロット法で検出した。その結果、LL-37-CLP-MV は PBS-CLP-MV に比べて、抗菌分子であるラクトフェリン、ミエロペルオキシダーゼ、CRAMP (cathelicidin-related antimicrobial peptide、LL-37 のマウス相同分子) をより多く含むことがわかった (図 3B)。

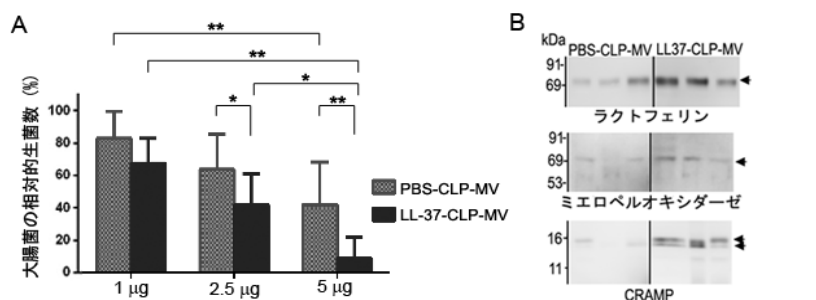


図3 CLPマウスから調製した細胞外小胞画分の抗菌活性 (A) と抗菌タンパク質・ペプチド (B)

A. 大腸菌をPBSとインキュベーションしたときの生菌数を100として、細胞外小胞とインキュベーションしたときの生菌数を相対値で示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

B. ラクトフェリン、ミエロペルオキシダーゼ、CRAMPをウェスタンブロット法で検出した。

(3) LL-37 刺激による好中球からのエクソソーム放出

以上の結果から、LL-37 が CLP マウスにおいてエクソソームの放出を誘導することがわかったので、つぎに LL-37 が好中球に直接作用してエクソソームを放出させるかどうかを調べた。そのために、マウス骨髄から単離した好中球を fMLF あるいは LL-37 で刺激した。その後、上清を回収してエクソソームをフローサイトメーターにより定量した。

その結果、fMLF 刺激によりエクソソームの放出が誘導さ

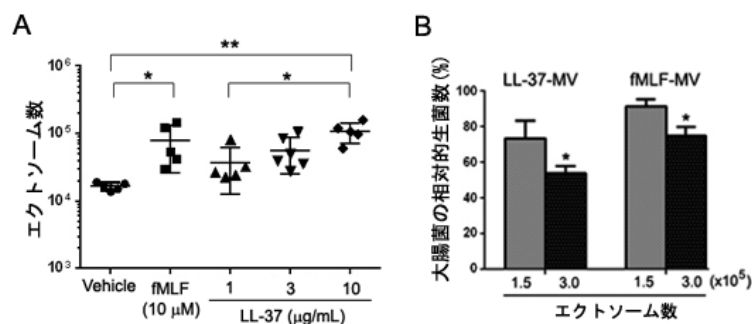


図4 LL-37による好中球からのエクソソーム放出 (A) とエクソソーム含有細胞外小胞画分の抗菌活性 (B)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

れたが、LL-37 もエクソソームの放出を濃度依存的に誘導することがわかった (図 4A)。また、エクソソームを含む画分を大腸菌とインキュベーションしたところ、fMLF で放出された細胞外小胞 (fMLF-MV) と同様に LL-37 で放出された細胞外小胞 (LL-37-MV) も生菌数を減少させたことから、LL-37 刺激によって好中球から放出されたエクソソームに抗菌作用があることが確認された (図 4B)。

(4) LL-37 刺激により好中球から放出されたエクソソームの敗血症マウスに対する効果

最後に、LL-37 刺激により好中球から放出されたエクソソーム (LL-37-MV) が敗血症に対して保護的に作用するかどうかを評価した。その結果、LL-37-MV を投与した CLP マウスでは、PBS を投与した CLP マウスに比べて、生菌数が有意に低下した (図 5A)。さらに、LL-37-MV を投与した CLP マウスでは生存率も有意に上昇した (図 5B)。一方、PBS あるいは LL-37-MV を投与した Sham マウスでは、腹腔浸出液や血液中に生菌は検出されず (data not shown)、また、生存率も 100% であった (図 5B)。

(5) 考察

我々は今まで、抗菌ペプチド LL-37 を CLP 敗血症マウスに投与すると、生存率を向上させることを報告してきた^{2,3}。さらに本研究では、LL-37 を投与すると CLP マウスの腹腔浸出液および血液中における生菌数が減少すると同時に、エクソソーム数が増加することがわかった。さらに、LL-37 投与マウスから単離した細胞外小胞は、PBS 投与マウスから単離した細胞外小胞に比べて、好中球由来の抗菌活性物質 (ラクtofフェリン、ミエロペルオキシダーゼ、CRAMP) を多く含み、高い抗菌活性を有することがわかった。したがって、LL-37 は、CLP マウスにおいて抗菌活性を有するエクソソーム数を増加させることで腹腔浸出液や血液中の生菌数を減少させ、その結果、マウスの生存率を改善する可能性が考えられる。また、LL-37 はマウス骨髄から調製した好中球に直接作用して、エクソソーム放出を誘導することが明らかになった。さらに、LL-37 刺激により好中球から放出されたエクソソームにも抗菌活性があり、また、このエクソソームを CLP マウスに投与すると、腹腔浸出液や血液中の生菌数が減少し、生存率が改善することがわかった。これらのことから、LL-37 は、好中球に作用して抗菌活性を有するエクソソームを放出することで、敗血症に対して保護的に作用することが示唆された⁸。

今まで我々は、LL-37 が敗血症において多様な作用を発揮することを示している。すなわち、LL-37 は好中球に作用して、抗菌作用を有する NETs (neutrophil extracellular traps) の放出を誘導すること²、また、IL-1 β などの炎症性サイトカインを放出して炎症を増悪させる、マクロファージのピロトーシスを抑制することで敗血症に対して保護的に作用することを明らかにしている^{3,9}。したがって本研究の成果は、生体内抗菌ペプチドである LL-37 が、好中球から抗菌活性を有するエクソソームを放出することで敗血症に対して保護的に作用するという、新たな作用機序を明らかにするとともに、将来、生体内抗菌ペプチドを用いた安全かつ有効な敗血症治療法を開発するために有用な情報を提供するものと考えられる。

<引用文献>

- 1) Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock. *Lancet* 392: 75-87, 2018.
- 2) Hosoda H, Nakamura K, Hu Z, et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 induces NET formation and suppresses the inflammatory response in a mouse septic model. *Mol Med Rep* 16: 5618-5626, 2017.
- 3) Hu Z, Murakami T, Suzuki K, et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the pyroptosis of macrophages and improves the survival of polybacterial septic mice. *Int Immunol* 28: 245-253, 2016.
- 4) Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci* 17: 170, 2016.
- 5) Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* 15: 602-611, 2016.
- 6) Dalli J, Norling LV, Montero-Melendez T, et al. Microparticle alpha-2-macroglobulin enhances pro-resolving responses and promotes survival in sepsis. *EMBO Mol Med* 6: 27-42, 2014.

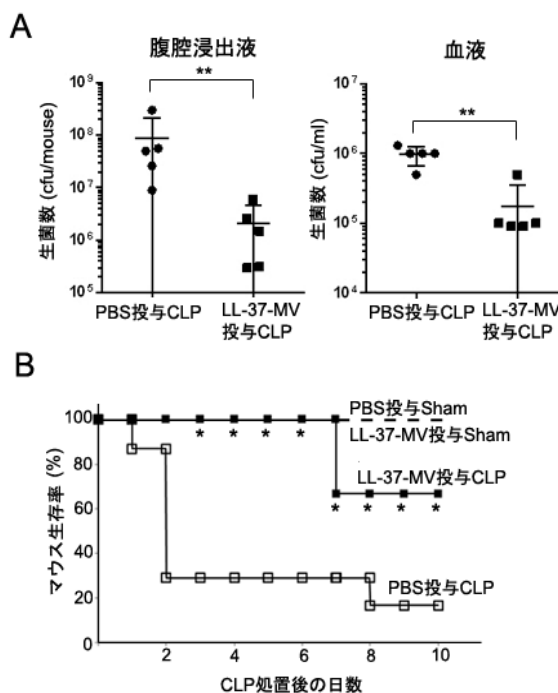


図5 LL-37で刺激した好中球から放出された細胞外小胞のマウス敗血症に対する保護効果
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

- 7) Lashin HMS, Nadkarni S, Oggero S, et al. Microvesicle subsets in sepsis due to community acquired pneumonia compared to faecal peritonitis. *Shock* 49: 393-401, 2018.
- 8) Kumagai Y, Murakami T, Kuwahara-Arai K, et al. Antimicrobial peptide LL-37 ameliorates a murine sepsis model via the induction of microvesicle release from neutrophils. *Innate Immun* 26: 565-579, 2020.
- 9) Hu Z, Murakami T, Tamura H, et al. Neutrophil extracellular traps induce IL-1 β production by macrophages in combination with lipopolysaccharide. *Int J Mol Med* 39: 549-558, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計28件（うち査読付論文 28件/うち国際共著 11件/うちオープンアクセス 28件）

1. 著者名 Yamaguchi K, Yamazaki S, Kumakura S, Someya A, Iseki M, Inada E, Nagaoka I	4. 巻 20
2. 論文標題 Yokukansan, a Japanese herbal medicine, suppresses substance P-induced production of interleukin-6 and interleukin-8 by human U373 MG glioblastoma astrocytoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocr Metab Immune Disord Drug Targets	6. 最初と最後の頁 1073-1080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1871530320666200131103733.	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 Yamagishi Y, Someya A, Nagaoka I	4. 巻 13
2. 論文標題 Citrulline cooperatively exerts an anti-inflammatory effect on synovial cells with glucosamine and N-acetylglucosamine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomed Rep	6. 最初と最後の頁 37-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2020.1304	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 Kumagai Y, Murakami T, Kuwahara-Arai, 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 Immun	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, Tamura H, Reich J	4. 巻 21
2. 論文標題 Therapeutic potential of cathelicidin peptide LL-37, an antimicrobial agent, in a murine sepsis model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 5973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21175973	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 Iba T, Levy JH, Aihara K, Kadota K, Tanaka H, Sato K, Nagaoka I	4. 巻 22
2. 論文標題 Newly developed recombinant antithrombin protects the endothelial glycocalyx in an endotoxin-induced rat model of sepsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22010176	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 Med J	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) 10.14789/jmj.2020.66.JMJ20-R08	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 Abe Y, Sakuyama N, Sato T, Kishine K, Nagayasu K, Nakatani A, Kitajima M, Watanabe T, Nishimura K, Ochiai T, Nagaoka I	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of the 5-fluorouracil Plasma Level in Patients With Colorectal Cancer Undergoing Continuous Infusion Chemotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol ,	6. 最初と最後の頁 289-295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2019.1893	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, Nagaoka I	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 Int J Mol Med	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 Santa K, Kumazawa Y, Nagaoka I	4. 巻 19
2. 論文標題 The Potential Use of Grape Phytochemicals for Preventing the Development of Intestine-Related and Subsequent Inflammatory Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocr Metab Immune Disord Drug Targets	6. 最初と最後の頁 794-802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1871530319666190529105226	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 Sugiyama Y, Naito K, Goto K, Kojima Y, Furuhashi A, Igarashi M, Nagaoka I, Kaneko K	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of Aging on the Tendon Structure and Tendon-Associated Gene Expression in Mouse Foot Flexor Tendon	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed Rep	6. 最初と最後の頁 238-244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2019.1200	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 Nagaoka I, Tsuruta A, Yoshimura M	4. 巻 132
2. 論文標題 Chondroprotective Action of Glucosamine, a Chitosan Monomer, on the Joint Health of Athletes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Biol Macromol	6. 最初と最後の頁 795-800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.234	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 Nagaoka I	4. 巻 65
2. 論文標題 Cartilage metabolism in endurance athletes and chondroprotective action of glucosamine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Juntendo Med J	6. 最初と最後の頁 184-193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14789/jmj.2019.65.JMJ19-LN01	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 Nagaoka I, Tsuruta A, Yoshimura M	4. 巻 132
2. 論文標題 Chondroprotective action of glucosamine, a chitosan monomer, on the joint health of athletes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Biol Macromol	6. 最初と最後の頁 795-800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.234	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 Reich J, Weyer FA, Tamura H, Nagaoka I, Motschmann H	4. 巻 20
2. 論文標題 Low Endotoxin Recovery-Masking of Naturally Occurring Endotoxin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20040838	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 Ochiai T, Nishimura K, Watanabe T, Kitajima M, Nakatani A, Nagayasu K, Sakuyama N, Sato T, Kishine K, Abe Y, Nagaoka I	4. 巻 17
2. 論文標題 Impact of primary tumor location as a predictive factor in patients suffering from colorectal cancer treated with cytotoxic anticancer agents based on the collagen gel droplet-embedded drug sensitivity test.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 1842-1850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.9805	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 Murakami T, Suzuki K, Niyonsaba F, Tada H, Reich J, Tamura H, Nagaoka I	4. 巻 18
2. 論文標題 MrgX2-mediated internalization of LL-37 and degranulation of human LAD2 mast cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 4951-4959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2018.9532	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 Iba T, Levy JH, Hirota T, Hiki M, Sato K, Murakami T, Nagaoka I	4. 巻 176
2. 論文標題 Protection of the endothelial glycocalyx by antithrombin in an endotoxin-induced rat model of sepsis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thromb Res	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2018.09.042	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 Tsuruta A, Horiike T, Yoshimura M, Nagaoka I	4. 巻 18
2. 論文標題 Evaluation of the effect of the administration of a glucosamine-containing supplement on biomarkers for cartilage metabolism in soccer players: A randomized double-blind placebo-controlled study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 3941-3948.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2018.9396	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 Reich J, Tamura H, Nagaoka I, Motschmann H	4. 巻 53
2. 論文標題 Investigation of the kinetics and mechanism of low endotoxin recovery in a matrix for biopharmaceutical drug products.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biologicals	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biologicals.2018.04.001	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 Yoshikawa T, Miyamoto M, Aoyama T, Soyama H, Goto T, Hirata J, Suzuki A, Nagaoka I, Tsuda H, Furuya K, Takano M	4. 巻 15
2. 論文標題 JAK2/STAT3 pathway as a therapeutic target in ovarian cancers.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 5772-5780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.8028	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 Iba Toshiaki, Hirota Tatsuhiko, Sato Koichi, Nagaoka Isao	4. 巻 -
2. 論文標題 Protective effect of a newly developed fucose-deficient recombinant antithrombin against histone-induced endothelial damage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Hematol	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) 10.1007/s12185-018-2402-x	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 Takehara Kazuhiro, Murakami Taisuke, Kuwahara-Arai Kyoko, Iba Toshiaki, Nagaoka Isao, Sakamoto Kazuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Evaluation of the effect of recombinant thrombomodulin on a lipopolysaccharide-induced murine sepsis model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Exp Ther Med	6. 最初と最後の頁 2969 ~ 2974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2017.4308	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 Hu Zhongshuang, Murakami Taisuke, Tamura Hiroshi, Reich Johannes, Kuwahara-Arai Kyoko, Iba Toshiaki, Tabe Yoko, Nagaoka Isao	4. 巻 39
2. 論文標題 Neutrophil extracellular traps induce IL-1 production by macrophages in combination with lipopolysaccharide	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Med	6. 最初と最後の頁 549 ~ 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijmm.2017.2870	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 Hosoda Hiroshi, Nakamura Kaho, Hu Zhongshuang, Tamura Hiroshi, Reich Johannes, Kuwahara-Arai Kyoko, Iba Toshiaki, Tabe Yoko, Nagaoka Isao	4. 巻 16
2. 論文標題 Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 induces NET formation and suppresses the inflammatory response in a mouse septic model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 5618 ~ 5626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2017.7267	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 Iba T, Sasaki T, Ohshima K, Sato K, Nagaoka I, Thachil J	4. 巻 1
2. 論文標題 The Comparison of the Protective Effects of - and -Antithrombin against Vascular Endothelial Cell Damage Induced by Histone in Vitro	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 TH Open	6. 最初と最後の頁 e3-e10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0037-1603926	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 Iba T, Levy JH, Aihara K, Kadota K, Tanaka H, Sato K, Nagaoka I	4. 巻 22
2. 論文標題 Newly developed recombinant antithrombin protects the endothelial glycocalyx in an endotoxin-induced rat model of sepsis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22010176	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 Mijiti N, Someya A, Nagaoka I	4. 巻 22
2. 論文標題 Effects of isoflavone derivatives on the production of inflammatory cytokines by synovial cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Ther Med	6. 最初と最後の頁 1300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2021.10735	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 LL-37 induces cell death in autophagy-dysfunctional cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Immunol	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 -

〔学会発表〕 計39件（うち招待講演 16件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Nagaoka I
2. 発表標題 Recent findings of chondroprotective and antiinflammatory actions of glucosamine, a chitosan monomer
3. 学会等名 The 30th Annual Meeting and International Symposium, The Korean Society of Chitin and Chitosan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長岡 功
2. 発表標題 キチン・キトサンからグルコサミンまで
3. 学会等名 食のミライ技術フェア2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長岡 功
2. 発表標題 グルコサミンの抗炎症作用
3. 学会等名 食品開発展2020 (招待講演)
4. 発表年 2020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 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 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 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
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kumagai Y, Murakami T, Kuwahara 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 ISEV (International Society of Extracellular Vesicles) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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 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 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 93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長岡 功
2. 発表標題 グルコサミンと健康 - グルコサミンの軟骨保護作用と抗炎症作用
3. 学会等名 第14回ファンクショナルフード学会・研修会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagaoka I
2. 発表標題 Recent aspects of the chondroprotective and antiinflammatory actions of glucosamine, a chitosan monomer.
3. 学会等名 The 29th Annual Meeting & International Symposium, The Korean Society for Chitin and Chitosan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長岡 功
2. 発表標題 アスリートの軟骨代謝に及ぼす機能性食品の効果
3. 学会等名 第24回ifia JAPAN 2019 (国際食品素材/添加物展・会議)・第17回HFE JAPAN 2019 (ヘルスフードエキスポ) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長岡 功, 鶴田暁史, 堀池 巧, 吉村雅文
2. 発表標題 機能性食品の軟骨代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度(平成31年度)大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 香, 大熊真理, 長岡 功
2. 発表標題 老化血管内皮細胞におけるLPS応答の増強効果
3. 学会等名 第25回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2019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 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 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

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, 桑原京子, 長岡 功
2. 発表標題 Antimicrobial peptide LL-37 ameliorates mouse sepsis through microparticle release from neutrophils
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 香, 長岡 功
2. 発表標題 老化血管内皮細胞におけるLPS炎症応答の増幅効果
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上泰介, 鈴木 香, 長岡 功
2. 発表標題 MrgX2 を介した抗菌ペプチドLL-37 のマスト細胞内への移行と脱顆粒
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長岡 功
2. 発表標題 宿主細胞の細胞死に注目した、抗菌ペプチドLL-37の敗血症マウスモデルに対する効果.
3. 学会等名 第33回日本Shock学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagaoka I
2. 発表標題 Chondroprotective action of glucosamine, a chitosan monomer, on the joint health of athletes.
3. 学会等名 14th ICCG/12th APCCS/32nd JSCCC (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷由美, 村上泰介, 栗原京子, Reich Johannes, 田村弘志, 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小胞(エクソソーム)の産生を介したマウス敗血症の病態改善.
3. 学会等名 第24回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷由美, 村上泰介, 栗原京子, 射場敏明, 長岡 功
2. 発表標題 好中球細胞外小胞の産生を介したLL-37によるマウス敗血症の病態改善.
3. 学会等名 第101回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kumagai Y, Murakami T, Reich J, Tamura H, Nagaoka I
2. 発表標題 Human cathelicidin peptide LL-37 ameliorates sepsis in a mouse model through induction of microparticles with antibacterial potential from neutrophils.
3. 学会等名 Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology & the International Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Murakami T, Suzuki K, Niyonsaba F, Reich J, Tamura H, Nagaoka I
2. 発表標題 MrgX2-mediated internalization of LL-37 and degranulation of human LAD2 mast cells.
3. 学会等名 oint Meeting of the Society for Leukocyte Biology & the International Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4. 発表年 2018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による血管内皮細胞のオートファジーと細胞死に対する作用.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上泰介, 森林叔子, 鈴木 香, 長岡 功
2. 発表標題 Mas-related gene X2を介した、マスト細胞への抗菌ペプチドLL-37細胞内移行と脱顆粒応答.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷由美, Li Yan, 村上泰介, 田村弘志, 長岡 功
2. 発表標題 Antimicrobial peptide LL-37 induces microparticle release from neutrophils in a mouse sepsis model.
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Li Yan, 熊谷由美, 鈴木 香, 長岡 功
2. 発表標題 Analysis of the components of neutrophil-derived microparticles with antibacterial activity.
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018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 による血管内皮細胞のオートファジー誘導.
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細田浩司, 中村果歩, 胡 忠双, 田村弘志, 長岡 功
2. 発表標題 抗菌ペプチドLL-37はNET形成を誘導して敗血症マウスモデルの生存率を改善する.
3. 学会等名 第64回トキシシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長岡 功, 細田浩司, 中村果歩, 胡 忠双, 村上泰介, 鈴木 香, 田村弘志
2. 発表標題 NETs形成に注目した、抗菌ペプチドLL-37の敗血症マウスモデルに対する効果の検討.
3. 学会等名 第23回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nagaoka Isao, Hosoda Hiroshi, Hu Zhongshuang, Nakamura Kaho, Murakami Taisuke, Tamura Hiroshi, Johannes
2. 発表標題 Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 protects septic mice by modulating macrophage pyroptosis and neutrophil NETosis.
3. 学会等名 Society for Leukocyte Biology 50th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nagaoka I
2. 発表標題 Therapeutic potential of cathelicidin peptide LL-37, an antimicrobial agent, in a murine sepsis model.
3. 学会等名 2021 11th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB 2021) (招待講演) (国際学会)
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回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊谷由美, 呉林なごみ, 長岡 功, 洲崎悦生
2. 発表標題 抗菌活性を持つ好中球由来エクトソームはマウス敗血症病態を改善する。
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計12件

1. 著者名 鈴木 香, 長岡 功	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学図書出版株式会社	5. 総ページ数 86
3. 書名 エンドトキシン・自然免疫研究23 -エンドトキシン研究の基礎から臨床へ、新しい時代へのアプローチ	

1. 著者名 田村弘志, Johannes Reich, 長岡 功	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学図書出版株式会社	5. 総ページ数 86
3. 書名 エンドトキシン・自然免疫研究23 -エンドトキシン研究の基礎から臨床へ、新しい時代へのアプローチ	

1. 著者名 長岡 功	4. 発行年 2020年
2. 出版社 インフォノーツパブリッシング	5. 総ページ数 137
3. 書名 Functional Food Research 16 機能性食品とスクラム形成	

1. 著者名 Kracklauer M, Tamura H, Nagaoka I, Reich J	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	

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	

1. 著者名 長岡 功	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 241
3. 書名 分子栄養学 -科学的根拠に基づく食理学	

1. 著者名 長岡 功, 細田浩司, 中村果歩, 胡 忠双, 村上泰介, 鈴木 香, 田村弘志	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学図書出版株式会社	5. 総ページ数 69
3. 書名 エンドトキシン・自然免疫研究21- エンドトキシン・自然免疫研究のフロンティアをめざして	

1. 著者名 長岡功	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 231
3. 書名 血流改善成分の開発と応用	

1. 著者名 長岡 功	4. 発行年 2017年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 239
3. 書名 抗菌ペプチドの機能解明と技術利用	

1. 著者名 田村弘志, Reich Johannes, 長岡 功	4. 発行年 2017年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 239
3. 書名 抗菌ペプチドの機能解明と技術利用	

1. 著者名 鈴木 香, 長岡 功	4. 発行年 2017年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 239
3. 書名 抗菌ペプチドの機能解明と技術利用	

1. 著者名 長岡 功	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 352
3. 書名 理学療法NAVI リスクに備えて臨床に活かす 理学療法にすぐに役立つ薬の知識.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>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 http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/seikagaku_seitai bogyo/html/index_j.html</p>
--

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	桑原 京子 (Kuwahara Kyoko) (10167976)	順天堂大学・医学部・非常勤講師 (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