

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08397

研究課題名（和文）内毒素や抗菌ペプチドなどの生物間の攻撃と防御の物質を利用した感染症創薬シーズ研究

研究課題名（英文）Infectious disease drug discovery research using substances that attack and defend between organisms such as endotoxins and antimicrobial peptides

研究代表者

川崎 清史（Kawasaki, Kiyoshi）

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60270641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：自然免疫の認識応答の調節により炎症応答の制御と獲得免疫の誘導がされて、疾病の治療や予防がなされることが期待されている。本研究では一部の抗菌ペプチドが微生物成分である非メチル化 CpG DNAによる自然免疫認識応答を増強する可能性があることをマウスマクロファージ様培養細胞株を用いた実験により明らかにした。さらに、ヒトマクロファージ様培養細胞株を用いた研究により微粒子の貪食がリポ多糖をはじめとする炎症応答を増強することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然免疫の認識応答は獲得免疫の誘導に必要である。従ってその調節によりワクチンの有効性を高めるなどの疾病の予防がなされることが期待できる。本研究は抗菌ペプチドをワクチンのアジュバントとして利用する可能性を示す点で初回の意義が大きい。また、微粒子が炎症応答を増悪することが示唆されている。本研究では微粒子の貪食に炎症応答増強作用があることを示した。炎症の制御にとって重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：It is expected that regulation of the recognition response of innate immunity will control inflammatory response and induce adaptive immunity, thereby treating and preventing diseases. In this study, we clarified that some antimicrobial peptides may enhance the innate immune recognition response by unmethylated CpG DNA, which is a microbial component, by experiments using mouse macrophage-like cultured cell lines. In addition, studies using human macrophage-like cultured cell lines revealed that phagocytosis of microparticles enhances inflammatory response including lipopolysaccharide.

研究分野：薬学、生化学

キーワード：自然免疫 リポ多糖 マクロファージ 抗菌ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

自然界では生物(微生物・動物・植物)の間で、攻撃と防御、あるいは助け合いが、生物から放出される物質を介して行われている。生物毒素はその典型例である。一般にこれらの物質は自己には作用せずに相手に一撃を加える魅力的な特性がある。生物は他の生物と相互に影響しあって進化を遂げてきた。その長い進化の過程で、他の生物を攻撃する物質、他の生物からの攻撃を防御する物質、お互いの生存を助け合う物質は、高い生物活性と特異性を獲得することにより発達を遂げてきた。これらは自然が長い時間をかけて作りあげてきた貴重な創薬資源として捉えることができる。このうち、微生物と動物との間で攻撃と防御に関わる物質から免疫・感染症の有用な創薬シーズを作り出す研究を提案する。

## 2. 研究の目的

高齢化社会の進行に伴い、我が国では感染症リスクが増大している。また報道等で感染症関連の話題がよく取り上げられるが、感染症に対する拒否感・不安感も増している。従って、その予防や治療を志向する研究は時代の要請に合致している。本研究では申請者の研究バックグラウンドを生かして、 )内毒素(エンドトキシン)やアミノ酸含有脂質などの細菌に由来する免疫刺激物質、 )動物(特に昆虫)の生体防御物質である抗菌ペプチド、に焦点を当てる。

## 3. 研究の方法

マクロファージ様培養細胞株の微生物成分に対する応答を変化させる物質に着目して、その物質の特徴や作用機序を明らかにする。

## 4. 研究成果

抗菌ペプチドによる非メチル化 CpG DNA のマクロファージ認識応答に対する増強効果に関する研究

非メチル化シトシン - グアニンモチーフを含む DNA (CpG DNA) は、マクロファージからのサイトカインの分泌などの自然免疫応答を開始します。一部の抗菌ペプチドは CpG DNA に対する応答を調節しますが、このプロセスの分子機構は不明のままです。この研究では、CpG DNA によって誘導される免疫応答に対する 4 つのヘリックス抗菌ペプチドの効果を調べました。Kn2-7 として知られる抗菌ペプチド FIKRIARLLRKIF は、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞からの CpG DNA 依存性のインターロイキン 10 (IL-10) および腫瘍壊死因子の分泌を増加させました。同時に Kn2-7 は CpG DNA の細胞取り込みを強化しました。これらの効果は、アルギニン残基をアラニン残基に置換すると減少し、リジン残基をアルギニン残基に置換すると増加しました。これらのペプチドが CpG DNA の細胞取り込みを強化する程度は、CpG DNA 依存性の IL-10 分泌を増加させる能力とよく相関していました。一方、D アミノ酸で合成された Kn2-7 は、CpG DNA 依存性の IL-10 分泌を増加させませんでした。D 型 Kn2-7 の CpG DNA の細胞取り込みを増強する能力は、L 型 Kn2-7 と比べて減少しませんでした。

CpG DNA 依存性の免疫応答を増強するには、CpG DNA の細胞取り込みの強化が必要であるが、それだけでは不十分であることを示しています。

#### Kn2-7 の CpG DNA 細胞内取り込み能と CpG DNA 結合能の相関研究

Kn2-7 の CpG DNA に対する親和性と、Kn2-7 の DNA の細胞取り込みを促進する能力との関係を明らかにしました。ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動移動度分析により、Kn2-7 は、Kn2-7 のアルギニン残基をアラニン残基に置換した Kn2-7RA よりも効果的に CpG DNA に結合することが明らかになりましたが、Kn2-7 の CpG DNA への結合効果は Kn2-7 よりも低いことがわかりました。Kn2-7 のリジン残基をアルギニン残基に置換した Kn2-7KR。Kn2-7、Kn2-7RA、および Kn2-7KR の DNA 結合能力は、CpG DNA の細胞取り込みを増強する能力とよく相関していました。対照的に、Kn2-7 のロイシン残基をアラニン残基に置換した Kn2-7LA は、Kn2-7 と同様の DNA 結合能を示しましたが、CpG DNA の細胞への取り込みは増強しませんでした。従って、Kn2-7 が CpG DNA の細胞取り込みを促進するには DNA への親和性が必要であるが、細胞取り込みの促進には Kn2-7 の疎水性も必要であることがわかりました。

#### マクロファージの微粒子食作用が炎症応答に及ぼす影響に関する研究

細菌感染後、マクロファージはリポ多糖 (LPS) やリポペプチドなどの細菌細胞成分に反応して炎症誘発性サイトカインを産生し、同時に侵入した細菌を貪食して消化します。炎症促進性反応に対する食作用の影響を研究するために、直径約 1  $\mu\text{m}$  のポリスチレンラテックス ビーズの食作用が、LPS で刺激されたヒトマクロファージ様 U937 および THP-1 細胞による炎症促進性サイトカインの発現を増加させるかどうかを解析しました。Fc 受容体媒介性の食作用を促進するためにマクロファージ様細胞を IgG でコーティングしたビーズで処理すると、腫瘍壊死因子、インターロイキン 1、インターロイキン 6 などの炎症誘発性サイトカインの LPS 誘発性発現が増加しました。Fc 受容体非依存性の食作用を促進するためにポリ-L-リジンでコーティングされたビーズで処理しても、LPS 誘導性サイトカイン発現も増加しました。この結果は、取り込み機構に関係なく、LPS 誘発炎症促進反応がビーズの貪食によって増強されることを示しています。さらに、食作用は LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 活性化を増強したので、Toll 様受容体 (TLR) 4 シグナル伝達が食作用によって増強されることを示唆しています。さらに、ビーズ貪食は、TLR2/TLR6 ヘテロ二量体受容体のリガンドであるリポペプチドで刺激された U937 細胞における炎症促進反応を増強しました。以上の結果から、マクロファージ様 U937 細胞および THP-1 細胞による微粒子の食作用は、細菌成分によって誘導される自然免疫応答を強化することがわかりました。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishihara Saeka, Kawasaki Kiyoshi	4. 巻 530
2. 論文標題 Enhanced cellular uptake of CpG DNA by $\alpha$ -helical antimicrobial peptide Kn2-7: Effects on macrophage responsiveness to CpG DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 100 ~ 106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.07.013	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 Nishihara Saeka, Wakita Mayu, Kawasaki Kiyoshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Relationship Between Affinity of Kn2-7 to CpG DNA and the Ability of Kn2-7 to Enhance Cellular Uptake of CpG DNA by RAW264.7 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 55 ~ 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpbreports.4.2_55	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 Ueno Takayuki, Yamamoto Yumi, Kawasaki Kiyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Phagocytosis of microparticles increases responsiveness of macrophage-like cell lines U937 and THP-1 to bacterial lipopolysaccharide and lipopeptide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86202-5	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 Shiori Nakagawa, Takayuki Ueno, Takayuki Manabe, and Kiyoshi Kawasaki	4. 巻 96
2. 論文標題 Imidazolines increase the levels of the autophagosomal marker LC3-II in macrophage-like RAW264.7 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Can. J. Physiol. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 845 ~ 849
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1139/cjpp-2018-0021	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------