

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460538

研究課題名(和文)敗血症の病態形成における好中球NETsと危険信号分子alarminの役割

研究課題名(英文)Roles of NETs and alarmins in the pathogenesis of sepsis

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：好中球が活性化されると、neutrophil extracellular traps (NETs)を放出する。本研究では、マウス敗血症モデルにおける炎症性サイトカイン、DAMPs、NETs、細菌数に及ぼすalarmin分子LL-37の効果を評価した。その結果、LL-37の投与によって、IL-1、TNF- α 、DAMPsおよび細菌数が低下した。一方、LL-37の投与によってNETsが増加した。以上の結果から、alarminであるLL-37は、抗菌作用を有するNETsを放出することによって、炎症性サイトカイン産生、宿主細胞死および細菌増殖を抑制し、敗血症マウスの生存を改善する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：LL-37 is an alarmin with antimicrobial activity. In addition to its broad spectrum of antimicrobial activities, LL-37 can modulate inflammatory reactions. In the present study, we elucidated the mechanism for the action of LL-37 on the septic mice, focusing on the release of neutrophil extracellular traps (NETs). The results indicated that the administration of LL-37 suppressed the increase of DAMPs (such as histone-DNA complex and HMGB1) as well as IL-1, TNF- α and the bacterial burdens. Notably, LL-37 increased the level of NETs. In addition, we confirmed that LL-37 induces the release of NETs from neutrophils, and NETs possess the bactericidal activity. Together, these observations suggest that LL-37 improves the survival of septic mice by suppressing the inflammatory responses as evidenced by the inhibition of the increase of cytokines and DAMPs (host cell death), and the bacterial growth via the release of NETs with the bactericidal activity.

研究分野：生体防御学

キーワード：NETs alarmin 敗血症 抗菌ペプチド サイトカイン DAMPs 細胞死

1. 研究開始当初の背景

LL-37はヒト cathelicidin ファミリーに属する抗菌ペプチドであり、抗菌作用の他に、炎症反応を調節する作用を有している。一方、好中球が活性化されると、DNA、ヒストン、顆粒タンパク質から成る網状構造物である NETs (neutrophil extracellular traps) を放出するが、NETs も抗菌作用と炎症反応調節作用を有している。我々は以前、LL-37 を盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) による敗血症モデルのマウスに静脈内投与すると、生存率が改善することを報告している。

2. 研究の目的

そこで本研究では、LL-37 の CLP モデルに対する作用メカニズムを解明するために、CLP モデルの腹腔浸出液および血液における炎症性サイトカイン、DAMPs (damage-associated molecular patterns)、NETs、細菌数に及ぼす LL-37 の効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) CLP 誘発敗血症モデルの作成

雄性の BALB/c マウスを用いて CLP モデルを作成した (CLP 群)。LL-37 投与群では、CLP の直前に LL-37 (2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) を尾静脈投与した。また、Sham 群では開腹手術のみを行い、CLP を行わなかった。

(2) 腹腔浸出液と血液の採取

CLP 施行 20 時間後に、PBS (phosphate-buffered saline) 4 ml を腹腔内に注射して腹腔浸出液を回収した。また、心臓からヘパリン採血を行い、血漿を調製した。

(3) 炎症性サイトカイン、TREM-1 の測定
腹腔浸出液と血漿における炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-1 β (eBioscience) および炎症反応増強分子 TREM-1 (triggering receptors expressed on myeloid cells) (R&D) の定量を、ELISA キットを用いて行った。

(4) DAMPs の測定

腹腔浸出液と血漿における HMGB1 (high mobility group box protein 1) (Shino-Test) とヒストン-DNA 複合体 (Cell Death Detection ELISA, Roche) を DAMPs として ELISA キットを用いて定量した。

(5) 白血球の測定

腹腔浸出液と血液における白血球の数と種類は、白血球を Türk 染色し、血球算定盤を用いて単核細胞と多形核白血球を算定した。

(6) 細菌数の測定

腹腔浸出液と血液における細菌数を、トリプトソーヤ寒天培地を用いたコロニー形成法で定量した。すなわち、腹腔浸出液と血液を PBS で希釈し、寒天培地に塗布し、37°C、20 時間培養した後にコロニー数をカウントし

た。

(7) NETs の測定

腹腔浸出液と血漿における NETs を myeloperoxidase (MPO)-DNA 複合体として ELISA 法で定量した。すなわち、キャプチャー抗体として抗 MPO 抗体 (R&D)、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識した抗 DNA 抗体 (Roche) を用いて MPO-DNA 複合体を検出した。

(8) *in vitro* における NETs の放出誘導と NETs の抗菌作用の測定

好中球をマウスの骨髓細胞から Percoll 密度勾配遠心法により調製し、100 nM PMA あるいは 5 μM LL-37 で 37°C、4 時間刺激して、NETs を放出させた。その後、NETs の DNA を DNase I 処理によって限定分解し、NETs を上清として回収し、前述の方法で定量した。また、回収された NETs を LB 培地中で E. coli (10^7 細胞) と室温で 15 分間培養し、トリプトソーヤ寒天培地を用いてコロニーを形成させ、NETs の抗菌作用を定量した。

(9) 統計解析

データは平均 \pm 標準偏差で示した。解析は ANOVA で行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 炎症性サイトカインと TREM-1 に及ぼす LL-37 の効果

CLP 誘発敗血症マウスの血漿と腹腔浸出液における、炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-1 β と炎症反応増強分子 TREM-1 に及ぼす LL-37 投与の効果を検討した。

その結果、CLP によって、血漿 (図 1A, C, E)

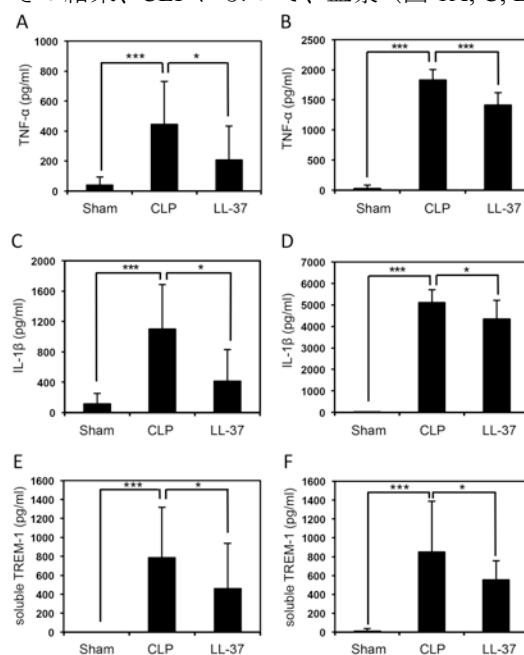


図 1: サイトカインと TREM-1 に及ぼす LL-37 投与の効果 * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

と腹腔浸出液 (図 1B, D, F) において TNF- α 、IL-1 β 、TREM-1 の濃度が Sham 群に比べて有意に増加したが、LL-37 の投与によって、それらの増加が有意に抑制された。

2. DAMPs に及ぼす LL-37 の効果

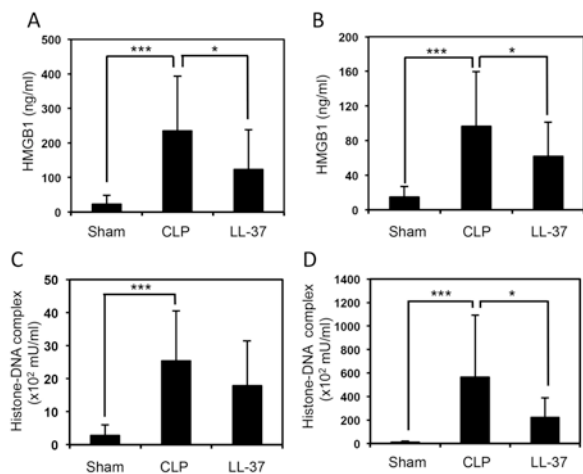


図 2: DAMPs に及ぼす LL-37 投与の効果
*P<0.05, ***P<0.001

CLP 敗血症マウスの血漿と腹腔浸出液における、HMGB1 とヒストン-DNA 複合体に及ぼす LL-37 投与の効果を検討した。その結果、CLP によって血漿 (図 2A, C) と腹腔浸出液 (図 2B, D) において DAMPs である HMGB1 とヒストン-DNA 複合体の濃度が Sham 群に比べて有意に増加したが、LL-37 の投与によって、それらの増加が有意あるいは顕著に抑制された。

3. 白血球に及ぼす LL-37 の効果

CLP 誘発敗血症マウスの血液と腹腔浸出液

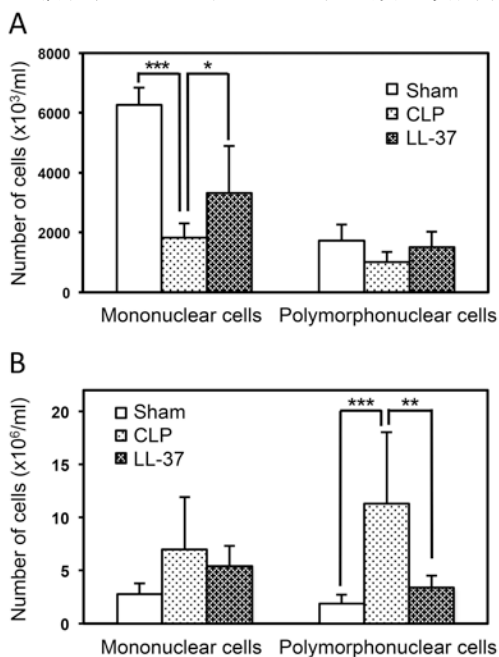


図 3: 白血球に及ぼす LL-37 投与の効果
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

における白血球の数と種類に及ぼす LL-37 投与の効果を検討した。

その結果、CLP によって血液中の単核細胞 (主にリンパ球) が Sham 群に比べて有意に減少したが、LL-37 の投与によって、その減少が有意に抑制された (図 3A)。一方、CLP によって腹腔浸出液中の多形核白血球 (主に好中球) が Sham 群に比べて有意に増加したが、LL-37 の投与によって、その増加が有意に抑制された (図 3B)。

4. 細菌数に及ぼす LL-37 の効果

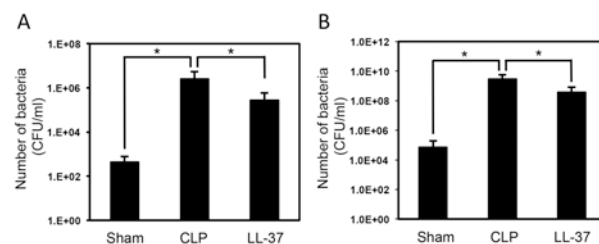


図 4: 細菌数に及ぼす LL-37 投与の効果 *P<0.05

CLP 誘発敗血症マウスの血液と腹腔浸出液における細菌数に及ぼす LL-37 投与の効果を検討した。

その結果、CLP によって血液 (図 4A) と腹腔浸出液 (図 4B) において細菌数が Sham 群に比べて有意に増加したが、LL-37 の投与によって、それらの増加が有意に抑制された。

5. NETs におよぼす LL-37 の効果

CLP 誘発敗血症マウスの血漿と腹腔浸出液における NETs に対する LL-37 投与の効果を検討した。

その結果、興味深いことに、Sham 群の血漿中に恒常的に NETs が検出され、CLP によってそのレベルが有意に低下したが、LL-37 を投与することによってそのレベルが有意に上昇した (図 5A)。一方、腹腔浸出液については、Sham 群に比べて、CLP によって NETs のレベルが有意に上昇し、さらに LL-37 投与によってそのレベルが有意に上昇した (図 5B)。

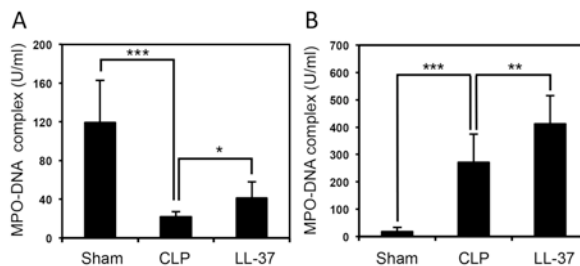


図 5: NETs に及ぼす LL-37 投与の効果
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

6. LL-37 による NETs の放出と NETs の抗菌作用

好中球は種々の刺激に反応して NETs を放出する。そこで、L-37 刺激によって好中球が NETs を放出するかどうかをマウス骨髄細胞から調製した好中球を用いて検討した。その結果、ポジティブコントロールの刺激として用いた PMA と同様に LL-37 によって、好中球から NETs が、未刺激細胞に比べて有意に多く放出されることがわかった (図 6A)。さらに、NETs の抗菌作用を、PMA 刺激によって得られた好中球上清と大腸菌を培養して検討したところ、未刺激好中球の上清に比べて、NETs を含む PMA 刺激好中球の上清の方が、大腸菌の増殖を有意に抑制することがわかった (図 6B)。

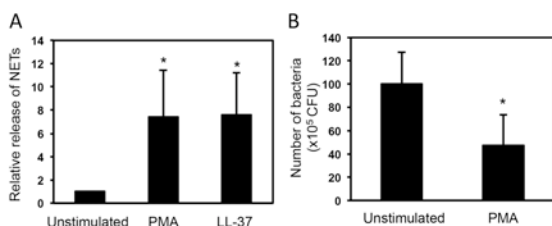


図 6: 刺激による好中球からの NETs 放出と NETs を含む好中球上清の抗菌作用
*P<0.05

【考察】

LL-37 はヒトにおける唯一の cathelicidin ファミリーの抗菌ペプチドであるが、幅広い抗菌作用の他に炎症反応を調節する作用を有する (1-4)。我々は、以前、LL-37 が CLP 敗血症マウスの生存率を向上することを報告している (7)。そこで、本研究では、LL-37 の CLP 敗血症マウスに対する作用メカニズムを解明するために、マウスの腹腔浸出液および血液における炎症性サイトカイン、DAMPs、NETs、細菌数に対する LL-37 の効果を評価した。その結果、LL-37 の投与によって、腹腔浸出液および血漿中の IL-1 β および TNF- α などの炎症性サイトカイン、炎症反応増強分子である TREM-1 の CLP による増加が抑制された。さらに、LL-37 の投与によって、HMGB1 やヒストン-DNA 複合体のような DAMPs、および細菌数の CLP による増加が抑制された。また、LL-37 の投与によって、CLP による白血球の変化 (数と種類) が抑制された。さらに興味深いことに、LL-37 の投与によって、腹腔浸出液および血漿中の NETs レベルが増加した。また、既に報告されているように、LL-37 が好中球からの NETs の放出を誘導すること、および NETs を含む好中球の培養上清が抗菌作用を有することが確認された。IL-1 β および TNF- α などの炎症性サイトカインは敗血症の病態を反映するマーカーとして知られている。また、TREM-1 は好中球や単球・マクロファージの細胞膜に存在し、炎症反応の増強にかかわる分子として知られており、膜型の TREM-1 が metalloproteinase によって切断された可溶性 (soluble) TREM-1 は敗血症のマーカーになるとされている。さ

らに、HMGB1 やヒストン-DNA 複合体のような DAMPs は宿主細胞の細胞死にともなって細胞外に放出され、敗血症の病態に深く関わっている。本研究において、LL-37 を敗血症マウスに投与すると、細菌数とともに、上記の敗血症関連分子の増加が抑制されることがわかった。

一方、NETs は DNA、ヒストン、顆粒タンパク質から成る網状構造物であり、細菌を DNA の網状構造で捉え、さらに、ヒストン、顆粒タンパク質の抗菌作用によって細菌を死滅させる。興味深いことに本研究において、LL-37 を敗血症マウスに投与すると、NETs がさらに増加することがわかった。

以上の結果から、CLP 誘発敗血症マウスにおいて、LL-37 はそれ自身の抗菌作用とともに、抗菌作用を有する NETs の放出を誘導することによって、細菌増殖を抑制し、炎症性サイトカイン、TEM-1、DAMPs などの敗血症関連分子の増加を抑制し、敗血症の病態を改善し、生存率を向上させるという可能性が、作用機序の一つとして考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

①Hosoda H, Nakamura K, Hu Z, Tamura H, Reich J, Kuwahara-Arai K, Iba T, Tabé Y, Nagaoka I: Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 induces NET formation and suppresses the inflammatory responses in a mouse septic model. *Mol Med Reports* 2017 (in press)

②Hu Z, Murakami T, Tamura H, Reich J, Kuwahara-Arai K, Iba T, Tabé Y, Nagaoka I: Neutrophil extracellular traps (NETs) induces the IL-1 β production by macrophages in combination with lipopolysaccharide. *Int J Mol Med* 査読有 39: 549-558, 2017. doi: 10.3892/ijmm.2017.2870

③Iba T, Hamakubo T, Nagaoka I, Sato K, Thachil J: Physiological levels of pentraxin 3 and albumin attenuate vascular endothelial cell damage Induced by histone H3 *in vitro*. *Microcirculation* 査読有 23: 240-247, 2016. doi: 10.1111/micc.12269

④Hu Z, Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Reich J, Kuwahara-Arai K, Iba T, Nagaoka I: Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the pyroptosis of macrophages and improves the survival of polybacterial septic mice. *Int Immunol* 査読有 28: 245-253, 2016. doi: 10.1093/intimm/dxv113

⑤Hu 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 査読有 9(1): e85765. doi:10.1371/journal.pone.0085765, 2014.

〔学会発表〕(計 15 件)

①細田浩司, 中村果歩, 胡 忠双, 李 燕, 田村弘志, 長岡 功: 抗菌ペプチド LL-37 は NET 形成を増加させマウス CLP 敗血症モデルの生存期間を延長する. 日本細菌学雑誌 72: 148, 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台, Mar 19-20, 2017.

②長岡 功, 胡 忠双, 鈴木 香: 敗血症の基礎研究の最前線 - 生体防御ペプチドの働きと敗血症治療への応用. 第 42 回日本熱傷学会総会・学術集会・教育講演, プログラム・抄録集 48, 浦安, Jul 3, 2016.

③Hu Z, Suzuki K, Murakami T, Reich J, Tamura H, Nagaoka I: Neutrophil extracellular traps (NETs) induces the IL-1 β production by macrophages in combination with lipopolysaccharide. 14th Biennial Meeting International Endotoxin and Innate Immunity Society, Abstract book PO 17, Hamburg, Sept 23, 2016.

④Hu Zhongshuang, 鈴木 香, 田村 弘志, 長岡 功: Neutrophil extracellular traps (NETs) induces the IL-1 β production by macrophages. 日本細菌学雑誌 71: 150, 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪, Mar 2016.

⑤Nagaoka I, Hu Z, Suzuki K, Tamura H: Potential effects of human antimicrobial peptide LL-37 on macrophage pyroptosis and sepsis 第 88 回日本薬理学会年会, プログラム S1F-15-4, 名古屋, Mar 2015.

〔図書〕(計 8 件)

①田村弘志, Johannes Reich, 長岡 功: エンドトキシン測定法と抗菌ペプチド. 抗菌ペプチドの機能解明と技術利用. 長岡 功 監修, シーエムシー出版, 東京, 134-147, 2017.

②鈴木 香, 長岡 功: Cathelicidin ファミリーの抗菌ペプチド LL-37 によるエンドトキシン除去作用. エンドトキシン・自然免疫研究 18 - 自然免疫における生体防御ペプチドの多様性. 長岡 功, 谷 徹, 横地高志 編集, 医学図書出版, 東京, 1-6, 2015.

③胡 忠双, 村上泰介, 鈴木 香, 田村弘志, 長岡 功: ピロトーシスに対する抗菌ペプチド LL-37 の作用. エンドトキシン・自然免疫研究 18 - 自然免疫における生体防御ペプチドの多様性. 長岡 功, 谷 徹, 横地高志 編集, 医学図書出版, 東京, 86-88, 2015.

④多田浩之, 松下健二, 松山考司, 長岡 功, 高田春比古: Porphyromonas gingivalis ジンジ

パインによるヒト歯肉上皮細胞の IL-33 誘導を介した CAP18/LL-37 ダウンレギュレーション機構. エンドトキシン・自然免疫研究 18 - 自然免疫における生体防御ペプチドの多様性. 長岡 功, 谷 徹, 横地高志 編集, 医学図書出版, 東京, 93-97, 2015.

⑤胡 忠双, 村上泰介, 鈴木 香, 田村弘志, 長岡 功: 抗菌ペプチド LL-37 によるマクロファージ系細胞のピロトーシスの制御. エンドトキシン・自然免疫研究 17 - エンドトキシン・自然免疫の展開: 新しい機序, 診断, 応用. 谷 徹, 横地高志 編集, 医学図書出版, 東京, 73-75, 2014.

〔その他〕

ホームページ等

https://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(新井) 京子 (KUWAHARA-ARAI, Kyoko)
順天堂大学・医学部・准教授
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

田部 陽子 (TABE, Yoko)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 70306968

(4) 研究協力者

胡 忠双 (HU, Zhongshuang)