

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462755

研究課題名(和文)可溶性ULBP2制御による新しい敗血症治療法の開発

研究課題名(英文)A novel therapy for sepsis by regulating soluble ULBP2

研究代表者

千酌 浩樹 (CHIKUMI, HIROKI)

鳥取大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90283994

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)：死亡率が高い敗血症へのNK細胞の関与についてはこれまでほとんど報告されていない。そこで我々は、NK細胞機能抑制分子として検討してきた可溶性ULBP2の敗血症への関与を検討した。その結果、臨床的敗血症患者において、血清中可溶性ULBP2が上昇する患者が有ること、重症感染症時に宿主細胞上に発現誘導される細胞表面ULBP2は、メタロプロテアーゼADAM17によってsheddingされ、可溶性ULBP2となること、クラリスロマイシンは、ADAM17活性抑制により、可溶性ULBP2の産生を押さえることなどを初めて明らかにした。本成果により、新規作用機序による敗血症治療薬開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sepsis is a leading cause of death in infectious disease patients in the world. One of the potential mechanism of sepsis is dysregulated host immune response to infectious agents. To date, the role of natural killer (NK) cells, an essential component of the innate immune system, in sepsis are scarcely studied. Therefore, we investigated the mechanism of functional dysregulation of NK cells in sepsis in connection with an inhibitory molecule of NK cells, soluble ULBP2 (sULBP2). We found that sULBP2 is elevated in a portion of septic patients. As a mechanism, we uncovered that cell surface ULBP2 is shed into serum as sULBP2 by ADAM17, but not by ADAM10 protease. Finally, we found that clarithromycin, a macrolide antibiotic, can reduce the amount of sULBP2 by inhibiting the ADAM17 activities. These findings might be the cue to develop new agents for sepsis by modulating the NK cell function.

研究分野：感染症内科学

キーワード：敗血症 NK細胞 ULBP2 可溶性ULBP2

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、感染症のなかでも最も重篤な疾患であり、その死亡率は高く、これに対する対応は現在の医学上の大きな課題である。このため、これまでに多くの治療方法が試みられてきたが、現在のところ成功したものは全身性支持療法以外に認められない。このため、敗血症の発症機序のさらなる解明と、それに基づく原因療法の開発は喫緊の課題となっている。

敗血症の病態は、感染によって発症した全身性の炎症反応症候群とそれに基づく全身性の臓器障害であり、その発症要因として病原細菌に対する過剰あるいは抑制された免疫反応が重要であることがこれまでも数多く報告されている。その際に関与する免疫細胞としてはマクロファージ、好中球、樹状細胞などがこれまで多く検討されてきた。しかしながら、これらと同様に自然免疫を司るNK細胞に関しては、その敗血症への関与はほとんど報告されていない。

数少ないNK細胞の敗血症への関与についての研究においては、その数と機能が、敗血症時に低下、あるいは抑制されること¹⁾、NK細胞機能が抑制されている敗血症患者では、そうでない患者に比べて生存率が低いこと²⁾などが報告されている。これらのことから、敗血症時には、何らかの機序によりNK細胞機能が抑制されており、このことが生存率の低下に関連していると推定される。従って、敗血症時のNK細胞機能調節(とくにNK細胞機能抑制)機序の解明は、新たな敗血症治療の開発に結びつく可能性がある。

NK細胞機能調節分子として、これまで感染時・腫瘍化等の生体ストレス時に、宿主細胞上に発現誘導されるNKG2Dリガンドと呼ばれる分子群の存在が報告されてきた。NKG2DリガンドにはMIC(MICA, MICB)とULBP(ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, RAET1G, RAET1L)が知られ、これらNKG2Dリガンドが宿主細胞上に発現すると、これをNK細胞上の受容体であるNKG2Dが認識し、NK細胞を活性化することも明らかになっている。したがって宿主細胞上のNKG2Dリガンド-NK細胞上のNKG2D受容体の相互作用は、NK細胞の重要な機能調節機序であると考えられている。

我々は、これまで腫瘍化あるいは感染時に、宿主細胞上に発現誘導されるNKG2Dリガンド分子であるULBP2に関する研究を遂行してきた。この過程でULBP2は細胞表面上に有る限りはNK細胞を活性化するが、これが何らかの機序で宿主細胞表面からsheddingされて生じた可溶性ULBP2(sULBP2)は、逆にNK細胞を抑制することを明らかにした³⁾(図1)。このことは、宿主細胞表面からsheddingされた、可溶性ULBP2が、敗血症時においてもNK細胞の重要な機能抑制因子となる可能性を示している。したがって、細胞表面ULBP2→可溶

性ULBP2となる可溶化(shedding)機序の解明とこの制御は、NK細胞機能を調節する新しい敗血症治療方法の開発に結びつく可能性がある。

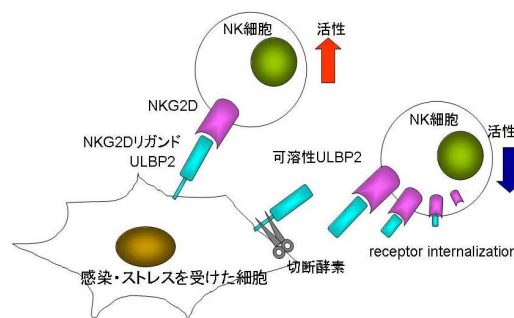


図1. 宿主細胞表面ULBP2はNK細胞を活性化する。一方で申請者らは、細胞表面から切断され、可溶化したULBP2は、NK細胞機能を逆に抑制することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究は、(1)敗血症病態におけるNK細胞の関与の解明、(2)敗血症時の可溶性ULBP2の関与の解明、(3)宿主細胞表面上のULBP2がsheddingされ、可溶性ULBP2となる機序の解明、(4)可溶性ULBP2の制御方法の開発、を目的としている。

3. 研究の方法

使用細胞:A549細胞はRIKEN cell bankより、LCSC #1, LCSC #2細胞はCell Resource center (Tohoku University)より入手した。

末梢血単核球・NK細胞の分離:

ヒト末梢血単核球(PBMC)はFicoll-Paque (GEヘルスケア・ジャパン)による沈降分離法で分離した。PBMC中のNK細胞はCD56マイクロビーズ(Milteny Biotec)でラベルし、MACS®法(Milteny Biotec)により磁気細胞分離を行った。

RNA抽出と次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析:

NK細胞からのRNA抽出はRNeasy Mini Kit(QIAGEN)により行った。抽出したRNAはバイオアナライザ(Agilent Technologies)で品質評価後、TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2(illumina)によりライブラリ作成を行い、HiSeq2500(illumina)でリード長100bp, paired-endのシーケンスを行った。サンプルあたり50万リード前後の有効なリード(転写物)を得た。クラスタリング解析にはcummeRbundを用いた。

可溶性ULBP2量の測定:

ヒトおよびマウス血清中可溶性ULBP2量はキャプチャー抗体としてanti-human ULBP2 monoclonal antibody BUM01 (BAMOMAB, Munich, Germany)、検出一次抗体として monoclonal

anti-human ULBP2 antibody (R&D Systems, MN, USA)、検出二次抗体として goat anti mouse IgG2a, human ads-HRP (Southern Biotech, AL, USA)を使用したサンドイッチ ELISA 法を独自に構築して測定した。培養上清中可溶性 ULBP2 量は Human ULBP-2 DuoSet ELISA (R&D Systems)により行った。

細胞表面 ULBP2 の測定:

培養細胞を回収後、anti-ULBP2 抗体 (clone 165903: R&D Systems) ならびにアイソタイプコントロールとインキュベートした。細胞を洗浄後、細胞表面 ULBP2 量を、フローサイトメトリー (FACSCalibur: BD Biosciences)にて測定した。定量評価においては 10000 個の細胞をカウントし、geometric mean fluorescence intensity (MFI)を CELLQuest software (BD Biosciences)にて計測した。

TACE 活性測定:

ADAM17 (TACE) 活性測定は Sensolyte 520 TACE Activity Assay Kit (AnaSpec) によって行った。本キットを使用し、5-FAM ラベルの FRET ペプチド基質が TACE により切断され、5-FAM が遊離する時の蛍光量変化を蛍光プレートリーダー (TECAN) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 敗血症病態における NK 細胞の関与の検討

細菌感染症が原因となる敗血症病態における NK 細胞の関与は明らかではない。そこでまず、敗血症病態における NK 細胞機能の関与を *in vitro* で検討した。ヒト PBMC を分離し、試験管内で LPS 刺激を 12 時間行った。刺激後の PBMC から、磁気ビーズ法により NK 細胞を分離し、RNA を抽出した。次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析により LPS 刺激前後の NK 細胞における mRNA の種類と量の変化を検討した。LPS 刺激前後の mRNA 量(リード数)の変化をクラスター解析したところ、発現量変化の様式は 5 つのクラスターに分類された(図 2)。その中でクラスター 2 に分類される LPS 刺激後発現量が著明に増加する分子群の内、最も発現誘導されたのは NK 細胞表面分子であり、活性化マーカーでもある CD56(発現比 6.90)であった。このことから、エンドトキシンが関与する敗血症時において NK 細胞機能の関与が急激に高まる可能性が示唆された。

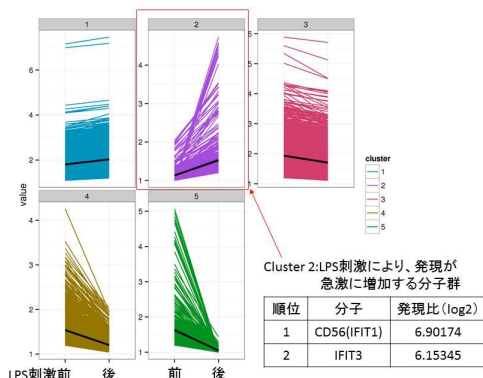


図2. PBMCをLPS刺激した時にNK細胞でみられる遺伝子発現変化(RNA-seq)

(2) 敗血症時の可溶性 ULBP2 の関与の検討

我々は、これまで肺癌患者において、NK 細胞機能調節分子である血清中可溶性 ULBP2 が増加していることを報告している。その研究過程において、良性肺疾患の一部においても、血清中可溶性 ULBP2 の増加がみられた。そこで、良性肺疾患患者の症例数を増やし、患者血清中可溶性 ULBP2 を測定した。その結果、呼吸器感染症患者において、他の良性疾患に比べて、特に高い可溶性 ULBP2 値を示す患者群が存在することが明らかになった。この群の患者の臨床的背景を精査したところ、全身性炎症性反応症候群(SIRS)スコア 2 項目以上、または全身性臓器障害 qSOFA スコア 2 項目以上を満たす臨床的敗血症と考えられる患者が存在することが明らかになった(図 3)。Xenograft モデルにおいて、我々は ULBP2 を過剰発現させた細胞をマウス皮下に移植すると、マウス血清中可溶性 ULBP2 量が増加すること、即ち宿主細胞に発現誘導された細胞表面上 ULBP2 量と血清中可溶性 ULBP2 量に正の相関関係があることを明らかにしている(図 4)このことから、敗血症患者においても、感染部位の細胞で細胞表面 ULBP2 量が発現増加しており、それに伴って患者血清中可溶性 ULBP2 量も増加していることが示唆された。

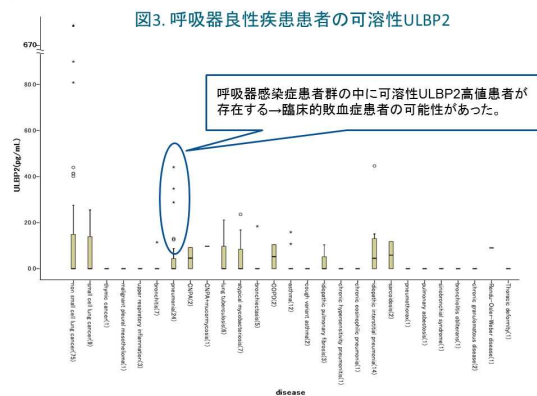


図3. 呼吸器良性疾患患者の可溶性ULBP2

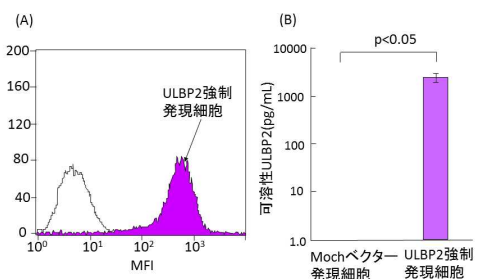


図4. ULBP2強制発現細胞のマウスXenograftモデルにおける、血清中可溶性 ULBP2量

ULBP2を過剰発現させた細胞(A549細胞)(A)を、マウスの皮下に移植すると、発現量に応じた血清中可溶性ULBP2の増加(B)が観察される

(3) 宿主細胞表面上の ULBP2 が shedding され、可溶性 ULBP2 となる機序の検討

これまでの我々の検討から、細胞表面上 ULBP2 が可溶性 ULBP2 になる過程 (shedding) には、ある種のメタロプロテアーゼが関与していることが示唆されていた。また、先行論 shedding を起こすメタロプロテアーゼ候補

として ADAM10 および ADAM17 (TACE) をあげている⁴⁾。しかしながらそれ以上の詳細な検討は行われていなかった。

そこで、我々はこれらメタロプロテアーゼ特異的な発現誘導刺激物質を用いて、*in vitro* でどちらのメタロプロテアーゼが ULBP2 の shedding を起こす主体であるかを検討した。ULBP2 強発現細胞 (LCSC#1) を用いて、ADAM10 発現誘導刺激物質であるイオノマイシンと、ADAM17 発現誘導刺激物質である PMA が、細胞培養上清中の可能性 ULBP2 量におよぼす影響について検討した。その結果、図 5 に示すように、ADAM17 発現刺激物質である PMA は可溶性 ULBP2 量を優位に増加させ、この増加は、メタロプロテアーゼ阻害剤である TIMP-3 により阻害された。一方で、ADAM10 発現誘導刺激物質であるイオノマイシンは、可溶性 ULBP2 量に影響を与えなかった。これらのことから、細胞表面 ULBP2 の shedding は ADAM10 ではなく、ADAM17 (TACE) により行われることが初めて明らかになった。

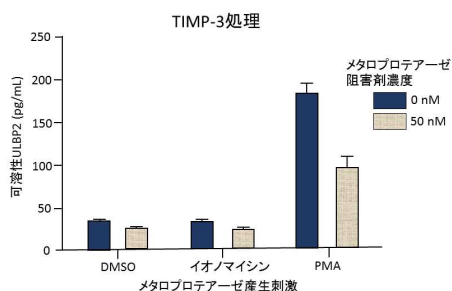


図5. メタロプロテアーゼ産生刺激とメタロプロテアーゼ阻害剤が可溶性ULBP2に与える影響
ADAM17発現刺激物質であるPMAは可溶性ULBP2量を優位に増加させ、この増加は、メタロプロテアーゼ阻害剤であるTIMP-3により阻害される。一方で、ADAM10発現誘導刺激物質であるイオノマイシンは、可溶性ULBP2量に影響を与えない。

(4) 可溶性 ULBP2 の制御方法の開発

次に、我々は ADAM17 及や、細胞表面 ULBP2 発現を制御し、可溶性 ULBP2 量を制御する方法を検討した。

本検討において我々は、実用化へ要する時間を短縮するために、既に市販されている薬剤の中に、本目的を達成する効果が無いかどうか探索し、14員環マクロライドであるクラリスロマイシンに注目した。

クラリスロマイシンは本来の抗菌作用の他に、抗炎症、免疫調節作用が知られた、抗生物質である。我々は A549, LCSC#2 培養細胞系とその上清を用いて、本剤が ADAM17 活性と可溶性 ULBP2 量に与える影響を検討した。その結果図 6 に示すように、クラリスロマイシンは ADAM17 活性を抑制することで、可溶性 ULBP2 量を有意に抑制することが明らかになった。このことはクラリスロマイシンが ADAM17 活性制御を通じて可溶性 ULBP2 産生抑制剤として使用できる可能性、もしくはそのような作用機序による新しい敗血症治療薬の創薬シーズとして有望であることを示している。

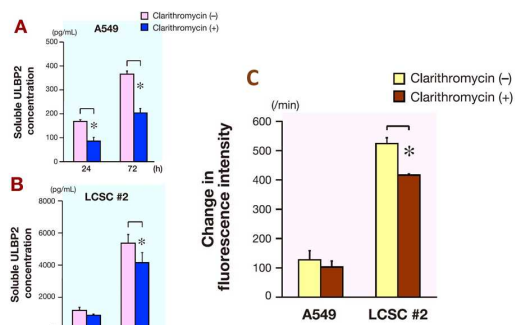


図6. クラリスロマイシンによる、可溶性ULBP2の抑制(A, B)とADAM17活性の抑制(C)
クラリスロマイシンはADAM17活性抑制を通じて、可溶性ULBP2産生を抑制する

【参考文献】

- Guo Y, Patil NK, Luan L, Bohannon JK, Sherwood ER: The biology of natural killer cells during sepsis. *Immunology*, 2017
- Giannikopoulos G, Antonopoulou A, Kalpakou G, Makaritsis K, Panou C, Papadomichelakis E, Sinapidis D, Theodotou A, Tzagkaraki A, Giamarellos-Bourboulis EJ: The functional role of natural killer cells early in clinical sepsis. *APMIS* 121: 329-336, 2013
- Yamaguchi K, Chikumi H, Shimizu A, Takata M, Kinoshita N, Hashimoto K, Nakamoto M, Matsunaga S, Kurai J, Miyake N, Matsumoto S, Watanabe M, Yamasaki A, Igishi T, Burioka N, Shimizu E: Diagnostic and prognostic impact of serum-soluble UL16-binding protein 2 in lung cancer patients. *Cancer Sci* 103: 1405-1413, 2012
- Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, Stevanovic S, Rammensee HG, Steinle A: Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 68: 6368-6376, 2008
- 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 9件)

- Fukushima T, Yamasaki A, Harada T, Chikumi H, Watanabe M, Okazaki R, Takata M, Hasegawa Y, Kurai J, Yanai M, Yamamoto A, Sueda Y, Halayko AJ, Shimizu E. γ -Tocotrienol Inhibits TGF- β 1-Induced Contractile Phenotype Expression of Human Airway Smooth Muscle Cells. *Yonago Acta Med.* 2018 60(1):16-23. 査読有

<http://repository.lib.tottori-u.ac.jp/Repository/metadata/5352>

2. Akamatsu Y, Morishita S, Chikumi H, Okamoto R, Okada K, Kitaura T, Miyake N, Yamaguchi K, Nakamoto M, Shimohiro H, Takata M, Yamasaki A, Burioka N, Shimizu E. Evaluation of antigen-positive toxin-negative enzyme immunoassay results for the diagnosis of toxigenic *Clostridium difficile* infection. *J Med Invest*. 2018;65(1.2):131-135. 査読有 DOI: 10.2152/jmi.65.131. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29593183>

3. Nakamoto S, Goda N, Hayabuchi T, Tamaki H, Ishida A, Suzuki A, Nakano K, Yui S, Katsumata Y, Yamagami Y, Burioka N, Chikumi H, Shimizu E: Properties of *Achromobacter xylosoxidans* highly resistant to aminoglycoside antibiotics. *Jpn J Antibiot* 2016 69: 113-118. 査読有 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27544979>

4. Okada K, Chikumi H, Takata M, Yamaguchi K, Makino H, Kitaura T, Nakamoto M, Yamasaki A, Igishi T, Burioka N, Shimizu E. Effect of Clarithromycin on the Expression of UL16-Binding Protein 2 in Human Cells. *Yonago Acta Med*. 2015 58(1): 31-38. 査読有 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26190895>

5. Takata M, Chikumi H, Matsunami K, Kodani M, Sakamoto T, Hashimoto K, Nakamoto M, Okada K, Kitaura T, Matsumoto S, Kurai J, Yamasaki A, Igishi T, Burioka N, Shimizu E: A new rapid method for detecting epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2015 33: 1040-1048. DOI: 10.3892/or.2015.3716 査読有 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25591975>

6. Sakamoto T, Kodani M, Takata M, Chikumi H, Nakamoto M, Nishii-Ito S, Ueda Y, Izumi H, Makino H, Touge H, Takeda K, Yamasaki A, Yanai M, Tanaka N, Igishi T, Shimizu E: A novel point-of-care system for high-speed real-time polymerase chain reaction testing for epidermal growth factor receptor mutations in bronchial lavage fluids after transbronchial biopsy in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2015 46: 1473-1480 DOI: 10.3892/ijo.2015.2875 査読有 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2565>

[1992](#)

7. Prasetyo AA, Desyardi MN, Tanamas J, Suradi, Reviono, Harsini, Kageyama S, Chikumi H, Shimizu E: Respiratory viruses and torque teno virus in adults with acute respiratory infections. *Intervirology* 2015 58: 57-68 DOI: 10.1159/000369211 査読有 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25890989>

8. Harada T, Yamasaki A, Chikumi H, Hashimoto K, Okazaki R, Takata M, Fukushima T, Watanabe M, Kurai J, Halayko AJ, Shimizu E: gamma-Tocotrienol reduces human airway smooth muscle cell proliferation and migration. *Pulm Pharmacol Ther* 2015 32: 45-52 DOI: 10.1016/j.pupt.2015.04.003 査読有 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25956071>

9. Kitaura T, Chikumi H, Fujiwara H, Okada K, Hayabuchi T, Nakamoto M, Takata M, Yamasaki A, Igishi T, Burioka N, Shimizu E: Positive Predictive Value of True Bacteremia according to the Number of Positive Culture Sets in Adult Patients. *Yonago Acta Med* 2014 57: 159-165 査読有 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25901103>

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 千酌 浩樹. 薬剤耐性対策を考慮した感染症診療の実際

平成 29 年度日本内科学会生涯教育講演会
東京都 2018 年 6 月 11 日
米子市 2018 年 10 月 29 日

2. 千酌 浩樹. 血液培養検査を再考する
第 32 回日本環境感染学会総会・学術集会
神戸市 2017 年 2 月 24 日

3. 千酌 浩樹. 高齢者感染症の pitfall
第 86 回 日本感染症学会西日本地方会学術集会・第 64 回 日本化学療法学会西日本支部会総会 那覇市 2016 年 11 月 25 日

4. 石野 亮、高田 美也子、千酌 浩樹、三宅 直美、中本 成紀、木下 直樹、山崎 章、福嶋 健人、原田 智也、小谷 昌広、牧野 晴彦、倉井 淳、鯛岡 直人、井岸 正、清水 英治. ULBP2 の肺癌における浸潤機構との関係. 第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会. 2016 年 7 月 21 日 米子

5. 三宅 直美、千酌 浩樹、木下 直樹、高田 美也子、中本 成紀、牧野 晴彦、倉

井 淳、渡部 正成、山崎 章、井岸 正、
清水 英治、非小細胞肺癌細胞における
mTOR の役割：mTOR 発現量抑制によるセツキ
シマブの抗腫瘍効果. 第 25 回日本がん転移
学会学術集会・総会. 2016 年 7 月 21 日 米
子

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千酌 浩樹 (CHIKUMI, Hiroki)
鳥取大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：90283994

(2) 研究分担者

清水 英治 (SHIMIZU, Eiji)
鳥取大学・医学部医学科・教授
研究者番号：50187449

高田 美也子 (TAKATA, Miyako)
鳥取大学・医学部・プロジェクト研究員
研究者番号：50523643

(3) 連携研究者

山口 耕介 (YAMAGUCHI, Kousuke)
鳥取大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60529402

三宅 直美 (MIYAKE, Naomi)
鳥取大学・医学部・特任教員
研究者番号：90747205

木下 直紀 (KINOSHITA, Naoki)
鳥取大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40750336