

ヒト生体防御ペプチド LL-37 の血管内皮細胞に対する作用 ～エンドトキシンとの相互作用について～

鈴木 香

順天堂大学医学部生化学・生体防御学

はじめに

平成 28 年 12 月に鹿児島大学で開催された第 22 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会において、奨励賞「最優秀賞」を受賞することができた。著者の所属する順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座では、当初は好中球の殺菌メカニズム（とくに、活性酸素生成）、さらに近年では、好中球顆粒内に存在する抗菌ペプチド（とくに、cathelicidin と defensin）のクローニングや機能解析を行ってきた。

私の研究対象であるヒト cathelicidin ペプチドの LL-37 は、エンドトキシンに直接結合してその活性を中和する。このため、敗血症の病態でみられるエンドトキシンによる諸症状に対し、LL-37 の保護効果が期待され、実際にわれわれの研究室において、ラットやマウスのエンドトキシンショックモデルに LL-37 を投与することで生存率が改善することを明らかにしてきた。さらに最近、われわれは、LL-37 がエンドトキシンに結合して中和したのち、中和した状態を保ちながら肝臓の類洞内皮細胞に速やかに取り込まれることを見いだした。肝臓は血液中のエンドトキシンを取り除く「血液浄化機能」を備えており、とくに、肝特有の毛細血管を構成する類洞内皮細胞はエンドトキシンの細胞内取り込みや消化のメカニズムが発達している。したがって、LL-37 を利用して肝臓の血液浄化機能を活性化することが可能となれば、LPS の除去に着目した新たな敗血症治療法の開発が期待される。今回の私の研究内容は細胞培養系での検討にとどまっておらず、生体内における LL-37 のエンドトキシン除去効果の立証に向けて、さらなる検討が必要である。このたびの受賞では、敗血症治療への応用に向けた LL-37 ペプチドの将来性を評価していただいたものと思い、当番世話人の隅田泰生先生、理事長の谷徹先生（当時）、選考委員の諸先生に改めて御礼を申し上げる。

1. cathelicidin ペプチドの構造

cathelicidin はヒトを含む多くの哺乳類のほか、魚類、爬虫類、鳥類に存在する抗菌ペプチドファミリーである。図 1 に示すように、cathelicidin の構造は N 末端の

シグナルペプチド、続いて cathelin 様ドメインと呼ばれる高度に保存された前駆体配列、そして C 末端に位置し抗菌活性を有する成熟ペプチドドメインの 3 領域から成る。cathelicidin は主に好中球や皮膚、歯肉といった外環境に接する上皮細胞で産生されるのだが、好中球においては前駆体の形で顆粒内に蓄えられており、放出されると同時に酵素的切断を受けて成熟ペプチド（抗菌ペプチド）となる。成熟ペプチドの大きさは 12~100 アミノ酸残基と幅広く、また、立体構造は α -helix 型、 β -sheet 型、extended (proline/arginine rich) 型と多様である（図 1）。今日、cathelicidin はさまざまな生物から数多く単離されていて、例えばブタの cathelicidin は 10 種類以上存在する。さらに最近も、新たな cathelicidin 発見の報告は相次いでいる。しかしながら興味深いことに、ヒトでは、前駆体である human cationic antibacterial polypeptide of 18-kDa (hCAP18) から切り出される成熟ペプチドの LL-37 が唯一、同定されているのみである¹⁾。LL-37 は名前が示すとおり、2つのロイシン (L) から始まる 37 アミノ酸残基から成り、 α -helix 型をとる陽イオン性ペプチドである²⁾。

2. 血管内皮細胞のアポトーシスに対する LL-37 の抑制作用

LL-37 を含めて、 α -helix 型の cathelicidin ペプチドはグラム陰性菌から遊離したエンドトキシン（リポ多糖=LPS）に結合してその活性を中和する³⁾。このため、敗血症の病態でみられるような LPS による過剰炎症に対して、LL-37 が保護効果を示すことが期待された。実際にわれわれのグループも、ラットやマウスのエンドトキシンショックモデルに LL-37 を投与することで生存率が改善することを示している⁴⁾。また、LL-37 による LPS 中和のメカニズムも明らかになっている。LL-37 は LPS の lipid A 部位との直接結合によって、単球・マクロファージの LPS 受容体 (CD14 と TLR4) への LPS の結合を阻害し、さらに、この結果として IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカイン産生を低下させるのである⁴⁾。

敗血症の初期においては、炎症性細胞から過剰に産生されるサイトカインが治療標的となるのに対して、



Classification of cathelicidin peptides

α-helical structure

- Human: hCAP18/LL-37
- Rabbit: CAP18, p15s
- Guinea pig: CAP11
- Mouse: mCRAMP
- Rat: rCRAMP
- Bovine: BMAP-27, BMAP-28, BMAP-34
- Sheep: OaMAP-34, SMAP-29
- Pig: PMAP-23, PMAP-36, PMAP-37
- Horse: eCATH-1, eCATH-2, eCATH-3

β-sheet structure

- Bovine: Indolicidin, Dodecapeptide
- Sheep: OaDode
- Pig: Protegrin-1, Protegrin-2, Protegrin-3, Protegrin-4, Protegrin-5

Pro-, Arg-rich peptides (extended structure)

- Bovine: Bac4, Bac5, Bac7
- Sheep: OaBac5, OaBac6, OaBac7.5, OaBac11
- Goat: ChBac5
- Pig: PR-39, Prophenin-1, Prophenin-2

図 1 cathelicidin の構造と分類

cathelicidin は N 末端側からシグナルペプチド, cathelin 様ドメイン, 抗菌ペプチドドメインの 3 つの領域で構成され, 細胞から放出される過程においてシグナルペプチドと cathelin 様ドメインが酵素的に切除されて成熟ペプチドとなる。cathelin 様ドメインは種を超えて高度に保存されている一方, 抗菌ペプチドドメインは可変性を示す。

増悪過程においては, 血管内皮細胞のダメージがもととなって起こる微小循環障害や臓器障害が注目される。われわれは, LL-37 が血管内皮細胞を標的とした敗血症治療にも役立つのではないかと考え, ヒト肺由来微小血管内皮細胞 (human lung microvascular endothelial cell: HMVEC-L) を用いて LPS で誘導されるアポトーシスに対する LL-37 の効果を調べた。HMVEC-L に LPS (100 ng/mL) とタンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX, 10 μg/mL) を添加したところ, 40% 程度の細胞でアポトーシスが誘導された。これに対し, LL-37 (1 μg/mL) を添加することでアポトーシスは有意に抑制された (図 2A~C)。次に, LPS の HMVEC-L への結合に対する LL-37 (0.1, 1 μg/mL) の効果を調べたところ, LL-37 は LPS の結合を低下させることがわかった (図 2D)。また, LPS/CHX によるアポトーシスが LPS 受容体 (CD14, TLR4) を介していることはこれら受容体の中和抗体を用いて確認した。以上の結果から, LL-37 は血管内皮細胞において, LPS の受容体への結合を阻害することによってアポトーシスを抑制すると考えられた⁵⁾。すなわち, LL-37 は単球

系細胞のみならず, 血管内皮細胞においても LPS の結合を抑制し, LPS 応答を制御することで敗血症に対して保護的にはたらく可能性が示唆された。

Galanos らによって確立された D-galactosamine 負荷マウスエンドトキシンショックモデルは, 肝障害が原因となり死に至る⁶⁾。われわれは LL-37 のアポトーシス抑制効果を *in vivo* で検証するため, このモデルに LL-37 (50 μg/mouse) を投与して肝臓のアポトーシスを調べた。図 3A~C は LPS 投与 5 時間後の肝臓の切片において, アポトーシス細胞の検出のために TUNEL 染色を行った際の顕微鏡写真である。B が示すように, このエンドトキシンショックモデルの肝臓では TUNEL 陽性のアポトーシス細胞が広範囲に多数検出された。また, 血管内皮細胞マーカー CD31 と TUNEL の二重染色の結果, TUNEL のシグナルは血管内皮細胞においても確認された (血管内皮細胞のうち約 30% が TUNEL 陽性であった。図 3D)。このことから, アポトーシスは肝細胞だけでなく血管内皮細胞にも起きていることがわかった。一方, 興味深いことに LL-37 を投与することで肝臓のアポトーシス細胞は顕著に減少し (図 3C), さらに重要なことに, 血管内皮細胞においてもアポトーシスの減少が確認された (10% 以下, 図 3D)。このことから, LL-37 はエンドトキシンショックモデルマウスの肝臓において, 肝細胞や血管内皮細胞のアポトーシスに抑制効果を発揮することが明らかになった⁵⁾。敗血症の病態形成において, 血管内皮細胞のダメージと臓器障害には密接な因果関係があると考えられる。敗血症モデルラットを用いた研究では, 増殖因子投与による血管内皮細胞のアポトーシス抑制が, 肝臓の保護につながることも報告されている⁷⁾。こうしたことから, われわれの研究において, LL-37 による血管内皮細胞のアポトーシス抑制が肝障害の軽減に結びついたことが示唆される。したがって, LL-37 は血管内皮細胞に作用することで敗血症の進行した病態に対しても保護効果を発揮するのではないかと考えられる。

3. 肝類洞内皮細胞の LPS の取り込みに対する LL-37 の活性化作用

肝臓は異物除去を担う中心的な臓器である。門脈から肝臓へ流入する血液は消化管由来の異物を含んでいるが, 肝臓において, 特有の毛細血管系である類洞を通過する間に異物の除去が行われ, 浄化されて全身へと送られる。このとき, 類洞を構成する類洞内皮細胞 (liver sinusoidal endothelial cell: LSEC) と類洞の常在マクロファージであるクッパー細胞は, 血液から LPS などの異物を直接取り込み, 消化する⁸⁾。

先に述べたように, LL-37 は LPS と結合 (中和) することでエンドトキシンショックモデルに保護作用を発揮する。しかしこのとき, LL-37 と結合した LPS が (た

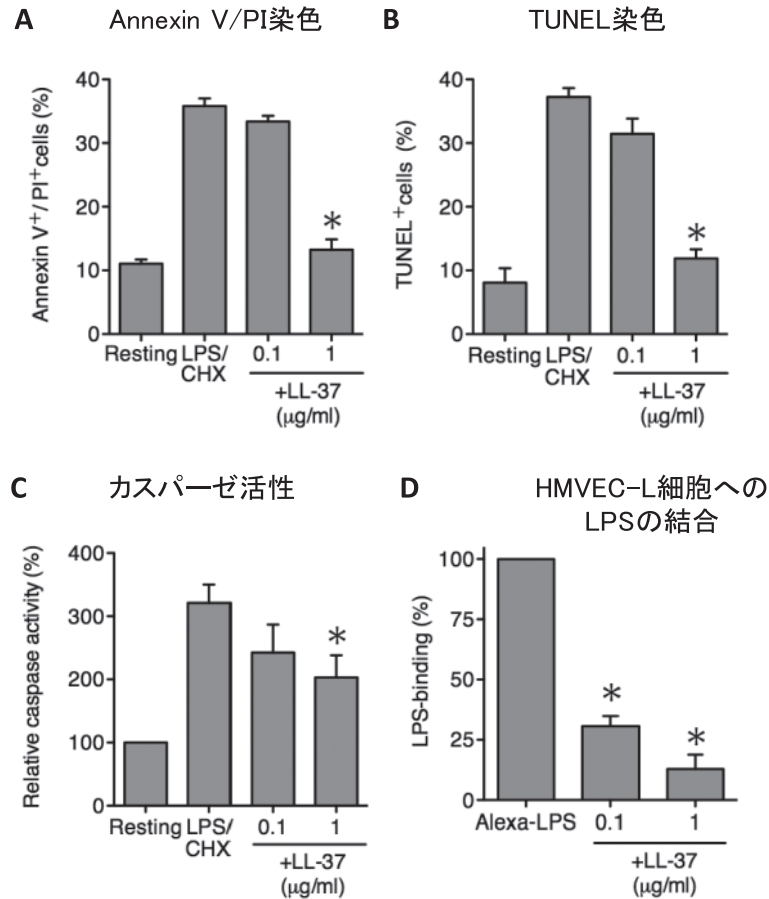


図2 LPS/CHXで誘導されるアポトーシスに対するLL-37の効果
 A-C: HMVEC-LにLPS (100 ng/mL)とCHXを(10 μg/mL)を作用させ、24時間後にAnnexin V/PI染色(A)、TUNEL染色(B)、カスパーゼ活性測定(C)を行った。また、ここにLL-37 (0.1, 1 μg/mL)を添加してアポトーシスに対する効果をみた(A-C)。(*: p<0.05)
 D: 蛍光標識したLPS (1 μg/mL)をLL-37 (0.1, 1 μg/mL)の存在下あるいは非存在下でHMVEC-Lに作用させ、2時間後、LPSの取り込みをフローサイロメトリーで測定した。LL-37非存在時のLPSの取り込みを100%として表示した。(*: p<0.05)

とえ中和されたとしても)体内に留まっている状態は好ましくないのではないだろうか。そこでわれわれは、LL-37がLPSを中和した後、さらに、血中からのLPSの除去を活性化すると予想し、human LSECによるLPSの取り込みに対するLL-37の効果を検討した。図4Aは、蛍光標識したLPS (100 ng/mL)をhLSECに2時間作用させた後の顕微鏡写真である。この細胞のLPS取り込み能により、LPSの蛍光シグナルが細胞内に観察される(図4A左)。一方、LPSとともにLL-37 (5 μg/mL)を作用させた場合、細胞内の蛍光シグナルは顕著に増加した(図4A右)。さらに、フローサイトメトリーでLPSの取り込みを定量的に解析した結果、LL-37 (5 μg/mL)はLPSの取り込みを約8倍にも増加さ

せることがわかった(図4B)。興味深いことに、LPSとの結合能をもたないスクランブルペプチド(LL-37のアミノ酸組成はそのままに順序を改変したもの)はLPSの取り込みを促進しなかった(図4B)。これらの結果から、LL-37によるLPSの取り込み促進にはLL-37とLPSとの結合が必要であると考えられ、このことからLL-37とLPSは複合体を形成して取り込まれるのではないかと予想された。共焦点蛍光顕微鏡を用いてLL-37とLPSの局在を確認したところ、両者は細胞内で共局在することがわかった(データ掲載せず)。

次に、今度はLL-37を標識してその取り込みをフローサイトメトリーで解析した結果、興味深いことにLL-37はLPSの存在下において数分後からhLSECに

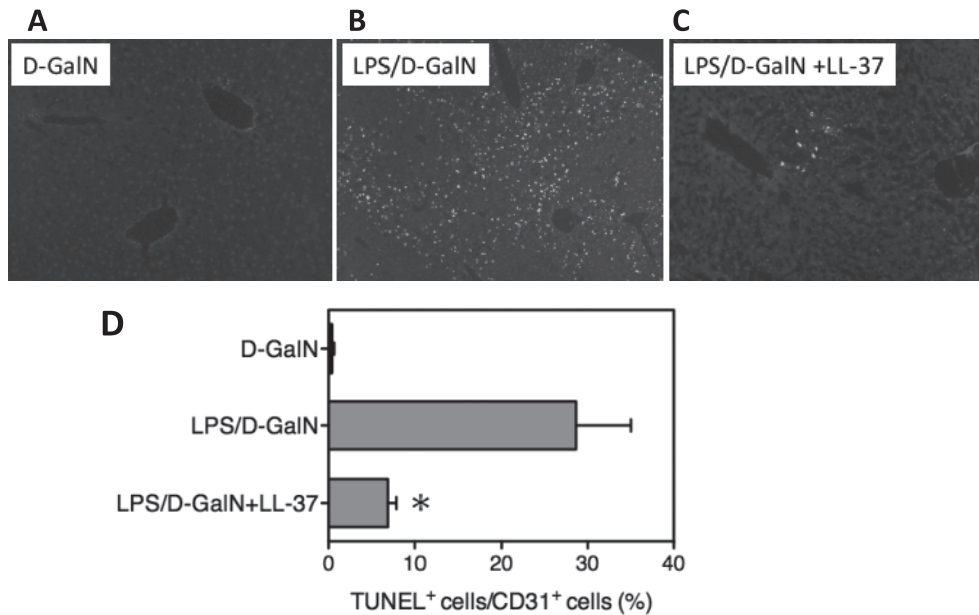


図 3 D-galactosamine 負荷エンドトキシンショックモデルにおける肝臓のアポトーシスに対する LL-37 の効果

A-C: C57BL/6 マウスに D-galactosamine (D-GalN, 18 mg) と LPS (100 ng) を腹腔投与してエンドトキシンショックモデルマウスを作製した。陰性コントロールとして D-GalN のみを、また、LL-37 投与群として LPS/D-GalN に続いて LL-37 (50 μ g) を投与した。投与 5 時間後の肝臓凍結切片を用いて TUNEL 染色を行った (A: D-GalN のみ, B: LPS/D-GalN, C: LPS/D-GalN + LL-37 投与)。

D: 上記の切片を用いて抗 CD31 抗体による免疫染色と TUNEL 染色の二重染色を行い、CD31 陽性の血管内皮細胞における TUNEL 陽性細胞の割合を算出した。(*: $p < 0.05$)

取り込まれたが、LPS が存在しない条件でも同じように取り込まれた (図 5)。すなわち、LL-37 自身が LPS の有無にかかわらずに hLSEC に取り込まれることが明らかとなった。以上の結果から、LL-37 は LPS と結合し (LL-37-LPS の複合体を形成し)、LL-37 自身が hLSEC に速やかに取り込まれる性質に基づいて LPS の取り込みを促進すると考えられた⁹⁾。

続いて LL-37-LPS の複合体の認識にかかわる細胞メカニズムを解明するため、まず、取り込みの受容体について検討した。中和抗体やアンタゴニストを用いた結果、LPS 受容体である CD14 と TLR4、あるいは LL-37 受容体として報告のある formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) は LL-37-LPS 複合体の取り込みにかかわらないことがわかった。そこで、両親媒性ペプチドの細胞内移行とのかかわりが示唆されている細胞膜プロテオグリカン¹⁰⁾を検討した。代表的なグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸を取り込みアッセイの系に添加したところ、興味深いことにヘパラン硫酸の一種であるヘパリンの添加によって LL-37-LPS 複合体の取り込みが低下した (図 6A, B)。一方、コンドロイチン硫酸の添加によっては低下がみられなかった (図 6A, B)。そこでさらに、グリコサミ

ノグリカンの分解酵素であるヘパリナーゼあるいはコンドロイチナーゼで細胞を処理したところ、ヘパリナーゼ処理によって LL-37-LPS 複合体の取り込みが低下したが (図 6C, D)、コンドロイチナーゼでは低下しなかった (図 6C, D)。これらの結果から、LL-37-LPS の複合体の取り込みに類洞内皮細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンが受容体として関与していることが示された⁹⁾。

LPS の取り込みが血管内皮細胞を活性化するという報告がある¹¹⁾。そこで、LL-37 を介した LPS の取り込みが類洞内皮細胞を活性化するか調べるため、TLR4 の下流に位置する 2 つの炎症応答経路、すなわち、アダプター分子 myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) に依存する経路と依存しない経路の両者の活性化について検討することにした。hLSEC に LPS (100 ng/mL) を作用させると、MyD88 依存的応答である intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現が上昇する (図 7A)。しかしながら、LL-37 (1~5 μ g/mL) を添加することで LPS 刺激による ICAM-1 発現は抑制されることがわかった (図 7A)。同様に、LPS は MyD88 非依存的応答である IFN- β の発現を上昇させたが、LL-37 は濃度依存的に抑制した (図 7B)。ここ

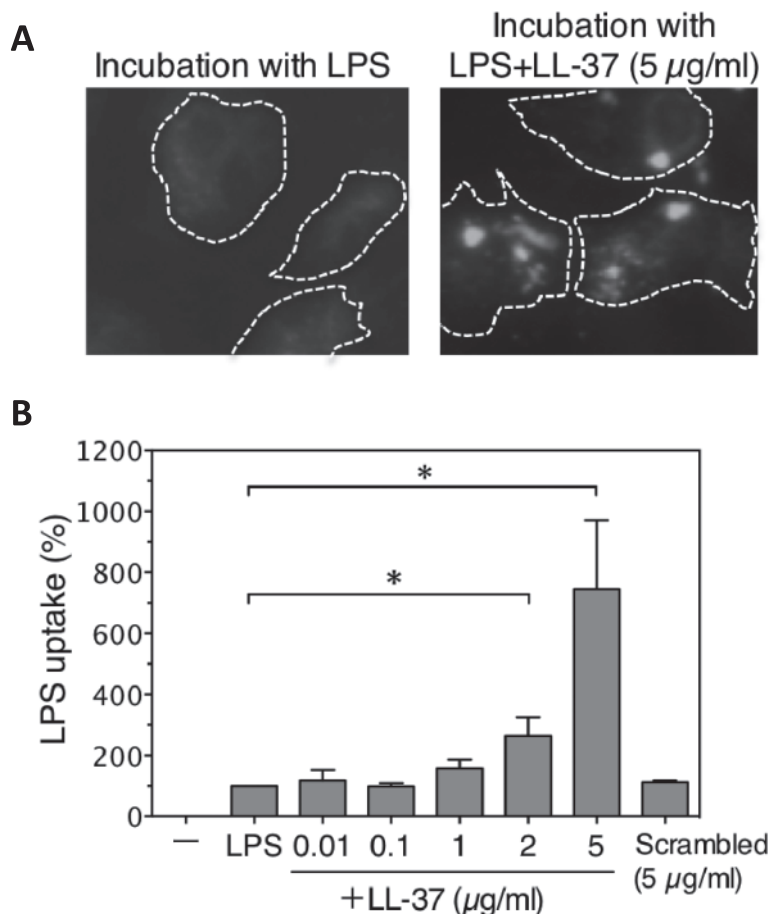


図4 肝類洞内皮細胞のLPSの取り込みに対するLL-37の効果
 A: LSECに蛍光標識したLPS (1 µg/mL)とLL-37 (5 µg/mL)を作用させて、LPSの取り込みを蛍光顕微鏡観察によって解析した。点線は細胞の輪郭を示す。
 B: 蛍光標識したLPS (100 ng/mL)をLL-37 (0.01~5 µg/mL)の存在下あるいは非存在下でLSECに作用させ、2時間後、LPSの取り込みをフローサイトメトリーで測定した。LL-37非存在下における取り込みを100%として表示した。(*: p<0.05)

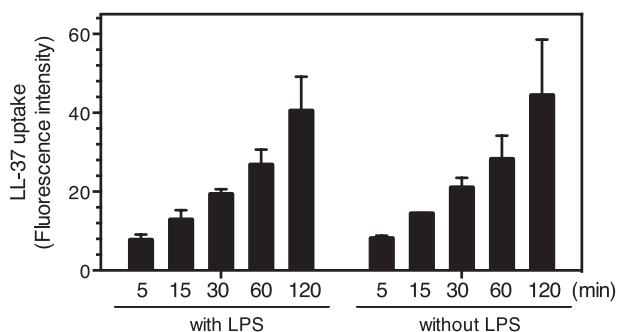


図5 肝類洞内皮細胞におけるLL-37の取り込み
 ビオチン標識したLL-37 (1 µg/mL)をLPS (100 ng/mL)の存在下あるいは非存在下でLSECに作用させ、表示時間後に細胞を回収、固定し、蛍光標識ストレプトアビジンで染色してフローサイトメトリーで測定した。LL-37の取り込みは蛍光強度で示した。

で、LPSの取り込みおよび炎症応答制御に効果を示すLL-37の濃度を比較してみると、重要なことに、LL-37がLPSの取り込みを促進する濃度において(図4)、LPS応答は抑制された(図7)。このことから、LL-37がLPSの取り込みを促進しても類洞内皮細胞におけるTLR4下流の炎症応答は活性化されないことがわかった⁹⁾。したがって、LL-37を介したLPSの取り込みは類洞内皮細胞を活性化することなく、LPS除去の促進に寄与すると考えられた。

最後に、取り込まれたLL-37-LPS複合体の細胞内輸送を明らかにするため、異物除去を担うリソソームのマーカであるlysosomal-associated membrane protein-1 (LAMP-1)とLPS、あるいはLL-37との共染色を行った。その結果、LPSはLAMP-1抗体で染まるリソソーム内に検出され、また、LL-37も大部分がリソ

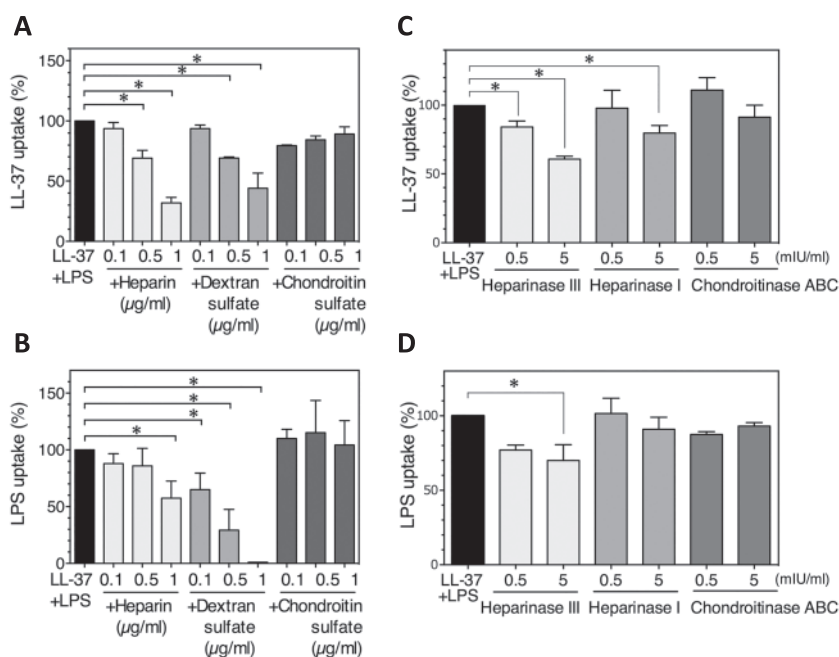


図 6 LL-37 と LPS の取り込みに対するグリコサミノグリカンの関与
 A-B: ヘパリン, デキストラン硫酸, コンドロイチン硫酸 (各 0.1, 0.5, 1 µg/mL) を添加して LL-37 (A) あるいは LPS (B) の取り込みに対する効果を調べた。取り込みはフローサイトメトリーで測定し、グリコサミノグリカン非存在下における取り込みを 100% として表示した。(* : p<0.05)
 C-D: LSEC をグリコサミノグリカン分解酵素であるヘパリナーゼ I, III あるいはコンドロイチナーゼ ABC (各 0.5, 5 mIU/mL) で処理して、LL-37 (C) あるいは LPS (D) の取り込みに対する効果を調べた。取り込みはフローサイトメトリーで測定し、酵素未処理細胞における取り込みを 100% として表示した。(* : p<0.05)

ソーム内に検出された (データ掲載せず)。これらの結果から、LL-37-LPS の複合体は類洞内皮細胞に取り込まれた後、リソソームに運ばれて分解される可能性が示された⁹⁾。

おわりに

本稿では、ヒト cathelicidin ペプチド LL-37 の血管内皮細胞に対する作用を紹介した。前半では、LPS で誘導される血管内皮細胞のアポトーシスに対し、LL-37 が抑制効果を表すことを示した。血管内皮細胞における LPS 受容体の発現は単球系細胞に比べ顕著に弱く¹²⁾、血管内皮細胞が LPS 応答細胞として注目されることは多くない。しかしながら、血管内皮細胞における LPS-TLR4 応答が敗血症の病態形成に大きくかかわるとして、近年、再認識されている¹³⁾。また、後半では肝臓特有の血液浄化機能に着目して、LL-37 が肝臓の類洞内皮細胞による LPS の取り込みを促進することを示した。このとき、類洞内皮細胞において TLR4 シグナルの活性化は起こらず、さらに、取り込まれた LPS が細胞内消化を担うリソソームに局在したことから、

LL-37 の作用は宿主細胞の活性化をすることなくエンドトキシン除去の促進に寄与すると考えられる。

謝 辞

日頃よりご指導いただき、また、この度の奨励賞にご推奨いただきました順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座の長岡功教授に厚く御礼申し上げます。本研究は JSPS 科研費 (16K08789, 20590456) および私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (S1201013) の支援を受けて行われました。

文 献

- 1) Larrick JW, Hirata M, Balint RF, et al. : Human CAP18 : a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 63 : 1291-1297, 1995
- 2) Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, et al. : Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J Biol Chem* 273 : 3718-3724, 1998
- 3) Larrick JW, Morgan JG, Palings I, et al. : Complementary DNA sequence of rabbit CAP18—a unique lipopoly-

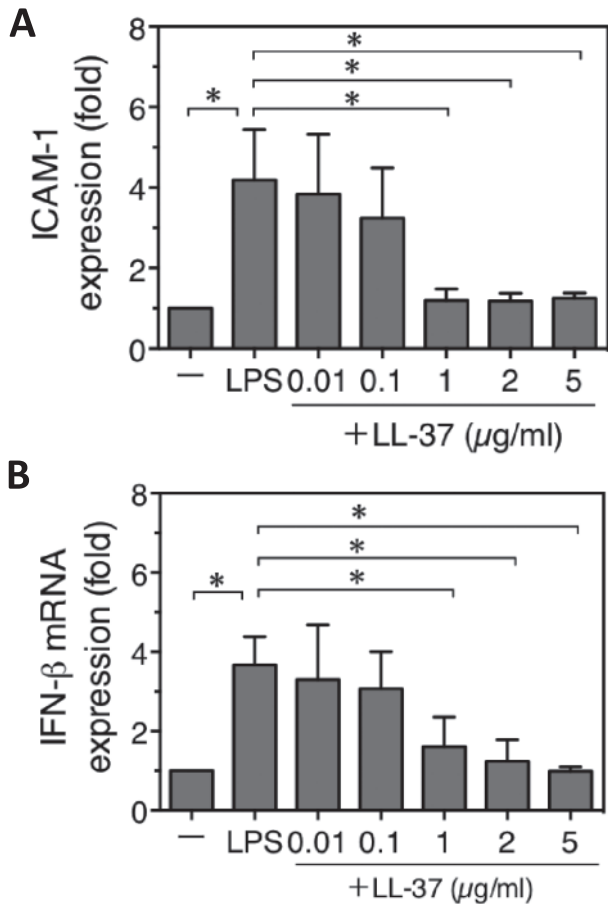


図7 TLR4の下流応答の活性化に対するLPSの取り込みの効果

A: LSECにLPS (100 ng/mL)をLL-37 (0.01~5 μg/mL)の存在下あるいは非存在下で作用させ、24時間後、ICAM-1の発現をウェスタンブロット法により定量した。結果は未刺激時の発現に対する比で表示した。(*: p<0.05)

B: LSECにLL-37 (0.01~5 μg/mL)の存在下あるいは非存在下でLPS (100 ng/mL)を作用させ、4時間後、IFN-βのmRNA発現をRT-PCR法により定量した。結果は未刺激時の発現に対する比で表示した。(*: p<0.05)

saccharide binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 179 : 170-175, 1991

- 4) Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, et al. : Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF- α by blocking the binding of LPS to CD14⁺ cells. *J Immunol* 167 : 3329-3338, 2001
- 5) Suzuki K, Murakami T, Kuwahara-Arai K, et al. : Human anti-microbial cathelicidin peptide LL-37 suppresses the LPS-induced apoptosis of endothelial cells. *Int Immunol* 23 : 185-193, 2011
- 6) Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W : Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 5939-5943, 1979
- 7) Namisaki T, Yoshiji H, Kojima H, et al. : Salvage effect of the vascular endothelial growth factor on chemically induced acute severe liver injury in rats. *J Hepatol* 44 : 568-575, 2006
- 8) Kamimoto M, Rung-Ruangkijkrui T, Iwanaga T : Uptake ability of hepatic sinusoidal endothelial cells and enhancement by lipopolysaccharide. *Biomed Res* 26 : 99-107, 2005
- 9) Suzuki K, Murakami T, Hu Z, et al. : Human host defense cathelicidin peptide LL-37 enhances the lipopolysaccharide uptake by liver sinusoidal endothelial cells without cell activation. *J Immunol* 196 : 1138-1147, 2016
- 10) Kaneider NC, Djanani A, Wiedermann CJ : Heparan sulfate proteoglycan-involving immunomodulation by cathelicidin antimicrobial peptides LL-37 and PR-39. *ScientificWorldJournal* 7 : 1832-1838, 2007
- 11) Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, et al. : Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells : roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *FASEB J* 18 : 1117-1119, 2004
- 12) Lloyd-Jones KL, Kelly MM, Kubes P : Varying importance of soluble and membrane CD14 in endothelial detection of lipopolysaccharide. *J Immunol* 181 : 1446-1453, 2008
- 13) Khakpour S, Wilhelmssen K, Hellman J : Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun* 21 : 827-846, 2015