

宿主細胞の細胞死の調節を介した, cathelicidin ファミリーの 抗菌ペプチド LL-37 の敗血症マウスモデルに対する効果

長岡 功¹⁾, 細田 浩司¹⁾, 中村 果歩¹⁾, 胡 忠双¹⁾, 村上 泰介¹⁾,
鈴木 香¹⁾, 田村 弘志²⁾

¹⁾順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座, ²⁾LPS コンサルティング事務所

Effect of antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 on septic mouse model via the modulation host cell death

Isao Nagaoka¹⁾, Hiroshi Hosoda¹⁾, Kaho Nakamura¹⁾, Zhongshuang Hu¹⁾,
Taisuke Murakami¹⁾, Kaori Suzuki¹⁾, Hiroshi Tamura²⁾

¹⁾Department of Host Defense and Biochemical Research, Juntendo University School of Medicine

²⁾Laboratory Program Support (LPS) Consulting Office

Abstract

LL-37 is the only known member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides in humans. In addition to its broad spectrum of antimicrobial activities, LL-37 can modulate various inflammatory reactions. We previously revealed that LL-37 improves the survival of a murine cecal ligation and puncture (CLP) sepsis model. In the present study, we elucidated the mechanism for the protective action of LL-37 using the CLP model, focusing on the effect of LL-37 on the release of neutrophil extracellular traps (NETs). The results indicated that the intravenous administration of LL-37 suppressed the increase of damage-associated molecular patterns, DAMPs (such as histone-DNA complex and HMGB1) as well as IL-1 β , TNF- α and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in plasma and peritoneal fluids. Interestingly, LL-37 significantly suppressed the decrease of mononuclear cell number in blood, and the increase of polymorphonuclear cell (neutrophil) number in the peritoneal cavity during sepsis. Moreover, LL-37 reduced the bacterial burdens in blood and peritoneal fluids. Notably, LL-37 increased the level of NETs (myeloperoxidase-DNA complex) in plasma and peritoneal fluids. 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 CLP septic mice by possibly suppressing the inflammatory responses as evidenced by the inhibition of the increase of cytokines, soluble TREM-1 and DAMPs (host cell death) and the alteration of inflammatory cell numbers, and the bacterial growth via the release of NETs with the bactericidal activity.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 56~61, 2018

Key words : NETs, 敗血症, 抗菌ペプチド, 好中球, 細胞死

はじめに

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^{1~4)}。一方, 好中球が活性化されると, NETosis という細胞死を介して, 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^{5,6)}。われわれは以前, 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⁷⁾。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, NETs に注目して, 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 pat-

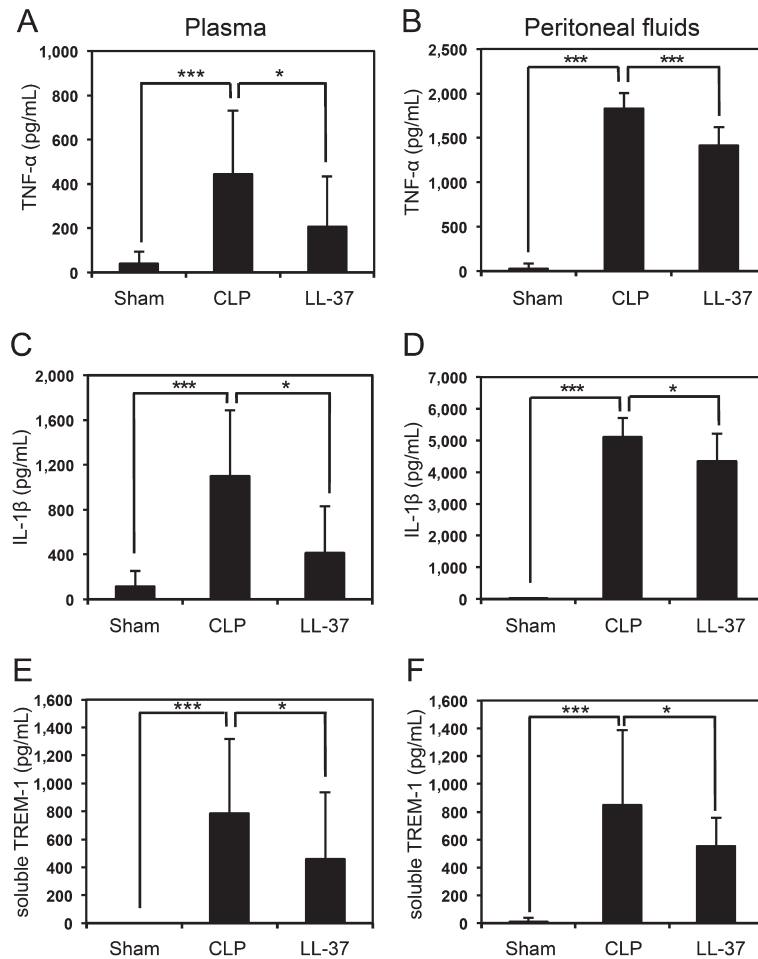


図 1 サイトカインと TREM-1 に及ぼす LL-37 投与の効果
*P<0.05, ***P<0.001

terns), 細菌数に及ぼす LL-37 の効果を検討した。

1. 炎症性サイトカインと TREM-1 に及ぼす LL-37 の効果

雄性の BALB/c マウスを用いて CLP モデルを作成した (CLP 群)^{7,8)}。LL-37 投与群では, CLP の直前に LL-37 (2 μg/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。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。腹腔浸出液と血漿における炎症性サイトカイン TNF-α, IL-1β (eBioscience) および炎症反応増強分子 TREM-1 (triggering receptors expressed on myeloid cells)⁹⁾ (R & D) の定量を, ELISA キットを用いて行った。

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-1β 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) と腹腔浸出液 (図 1B, D, F) において TNF-α, IL-1β,

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

腹腔浸出液と血漿における HMGB1 (high mobility group box protein¹⁾ (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。

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

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

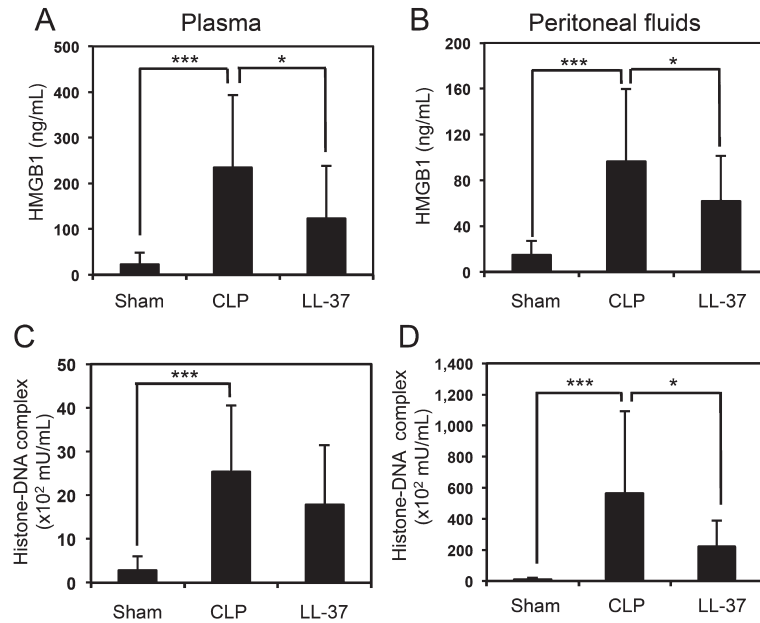


図 2 DAMPs に及ぼす LL-37 投与の効果

*P<0.05, ***P<0.001

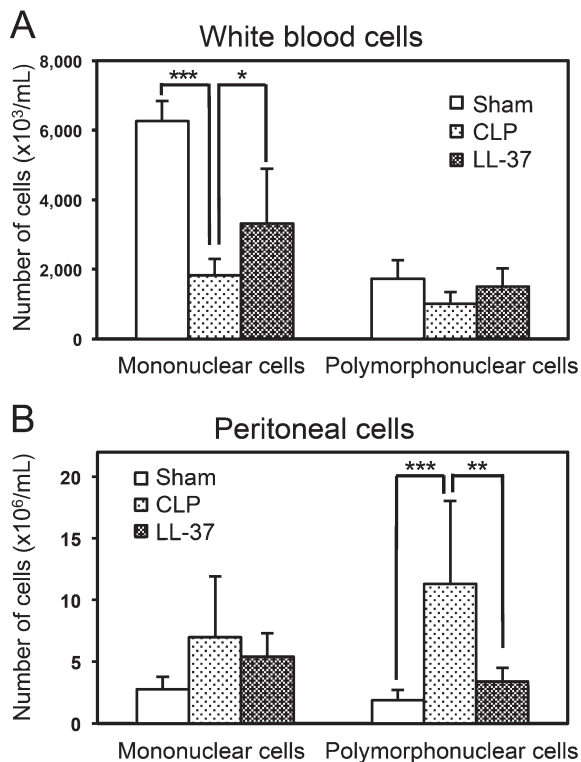


図 3 白血球に及ぼす LL-37 投与の効果

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

形核白血球を算定した。

CLP 誘発敗血症マウスの血液と腹腔浸出液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

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。

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 に及ぼす LL-37 の効果

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。

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

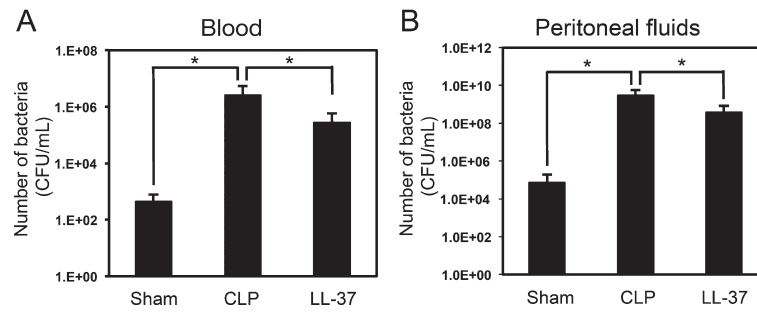


図 4 細菌数に及ぼす LL-37 投与の効果

*P<0.05

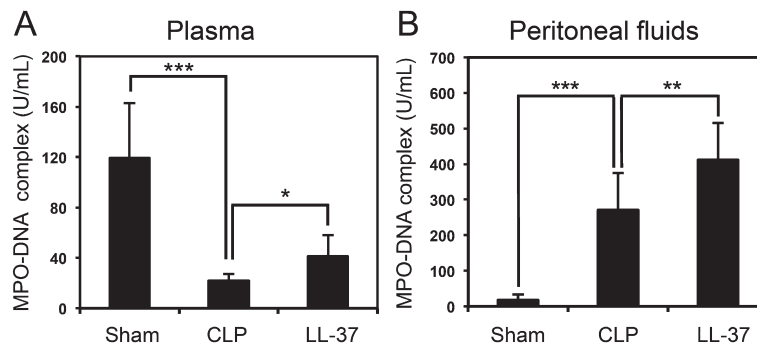


図 5 NETs に及ぼす LL-37 投与の効果

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

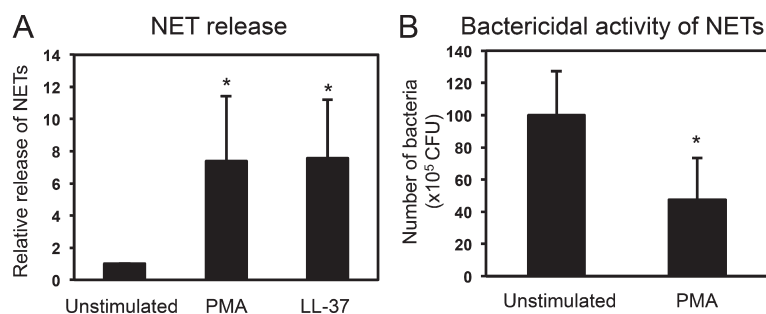


図 6 刺激による好中球からの NETs 放出と NETs を含む好中球上清の抗菌作用

*P<0.05

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)。

6. LL-37 による NETs の放出と NETs の抗菌作用

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 (phorbol myristate acetate) あるいは 5 μ M 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¹⁰⁾, 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* (10⁷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。

好中球は種々の刺激に反応して NETs を放出するので, LL-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髓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,

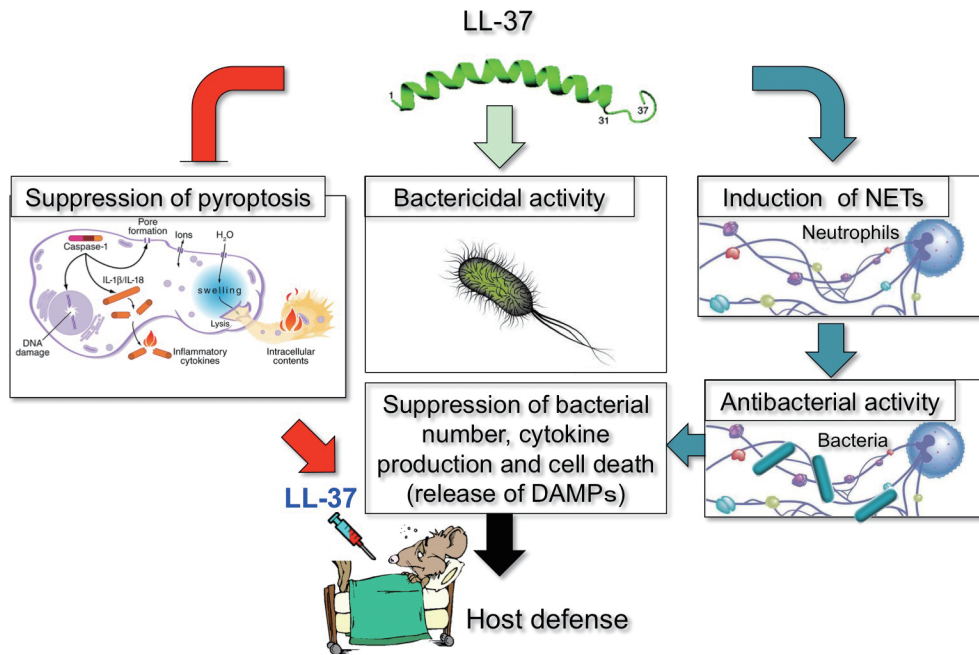


図 7 LL-37の好中球 NETsの誘導とマクロファージピロトーシスの抑制を介した、CLP敗血症モデルに対する効果

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)。

おわりに

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)。われわれは、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、NETsに注目して、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、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、すでに報告されているように^{5,11})、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¹²)。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⁹)。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かかわっている¹³)。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⁵)。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の放出を誘導し、細菌増殖を抑制し、炎症性サイトカイン、TREM-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することによって、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¹⁴) (図7)。

一方、敗血症の病態では、さまざまな細胞死がかかわっており、われわれは、IL-1 β などの炎症性サイトカインを放出して炎症を増強する細胞死である、マクロファージのピロトーシスをLL-37がCLPモデルにお

いて抑制することをすでに報告している⁷⁾。したがって, LL-37 は CLP 敗血症モデルにおいて, 好中球の NETs の放出を誘導する一方で, マクロファージのピロトーシスを抑制するという, 少なくとも2つのメカニズムによって, 敗血症モデルにおいて防御的に働く可能性が考えられる (図7)。

文 献

- 1) Dürr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A : LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochem Biophys Acta* 1758 : 1408-1425, 2006
- 2) Nagaoka I, Kuwahara-Arai K, Tamura H, et al. : Augmentation of the bactericidal activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by amino acid substitutions. *Inflamm Res* 54 : 66-73, 2005
- 3) Nagaoka I, Tamura H, Hirata M : An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X₇. *J Immunol* 176 : 3044-3052, 2006
- 4) 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 : 1338-1347, 2016
- 5) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. : Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303 : 1532-1535, 2004
- 6) Papayannopoulos V, Zychlinsky A : NETs : a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 30 : 513-521, 2009
- 7) 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
- 8) Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. : Cecal ligation and puncture. *Shock* 24 (Suppl. 1) : 52-57, 2005
- 9) Charles PE, Noel R, Massin F, et al. : Significance of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 elevation in patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *BMC Infect Dis* 16 : 559, 2016
- 10) Yoo DG, Floyd M, Winn M, et al. : NET formation induced by *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates measured as release of myeloperoxidase-DNA and neutrophil elastase-DNA complexes. *Immunol Lett* 160 : 186-194, 2014
- 11) Neumann A, Berends ET, Nerlich A, et al. : The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *Biochem J* 464 : 3-11, 2014
- 12) Pinsky MR : Dysregulation of the immune response in severe sepsis. *Am J Med Sci* 328 : 220-229, 2004
- 13) Kang JW, Kim SJ, Cho HI, et al. : DAMPs activating innate immune responses in sepsis. *Ageing Res Rev* 24 (Pt A) : 54-65, 2015
- 14) 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