

抗菌ペプチド LL-37 による好中球細胞外小胞 (エクトソーム) の放出を介したマウス敗血症の病態改善

熊谷 由美¹⁾, 村上 泰介¹⁾, 栗原 京子²⁾, Johannes Reich³⁾, 田村 弘志⁴⁾, 長岡 功¹⁾

¹⁾順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座, ²⁾同 微生物学講座, ³⁾Microcoat Biotechnologie GmbH,

⁴⁾LPS コンサルティング事務所

Antimicrobial peptide LL-37 ameliorates murine sepsis through the induction of microvesicle (ectosome) release from neutrophils

Yumi Kumagai¹⁾, Taisuke Murakami¹⁾, Kyoko Kuwahara²⁾, Johannes Reich³⁾, Hiroshi Tamura⁴⁾, Isao Nagaoka¹⁾

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

²⁾Department of Bacteriology, Juntendo University, School of Medicine

³⁾Microcoat Biotechnologie GmbH

⁴⁾Laboratory Program Support (LPS) Consulting Office

Abstract

Neutrophils release microvesicles (ectosomes) upon stimulation. Interestingly, ectosome level is elevated in sepsis survivors. Previously, we revealed that LL-37, a human cathelicidin antimicrobial peptide, improves the survival of a murine cecal ligation and puncture (CLP) sepsis model. Thus, in the present study, we elucidated the action of LL-37 on sepsis, by focusing on the effect of LL-37 on ectosome release in the CLP model. The results demonstrated that the ectosome level was elevated in CLP mice, and the level was further enhanced by the LL-37-administration, accompanied with the reduced bacterial load. Importantly, ectosome-containing microvesicles isolated from LL-37-injected CLP mice contained higher amounts of antimicrobial proteins/peptides (such as lactoferrin and murine cathelicidin-related antimicrobial peptide), and exhibited higher antibacterial activity, compared with those from PBS-injected CLP mice, suggesting that LL-37 induces the release of ectosomes with antibacterial potential *in vivo*. In fact, LL-37 stimulated mouse bone marrow neutrophils to release ectosomes *ex vivo*, and the LL-37-induced ectosomes possessed the antibacterial activity. Furthermore, the administration of LL-37-induced ectosomes reduced the bacterial load and improved the survival of CLP mice. Together these observations suggest that LL-37 induces the release of ectosome-containing antimicrobial microvesicles in CLP mice, thereby reducing the bacterial load and protecting mice from lethal septic condition.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 67~71, 2019

Key words : エクトソーム, 抗菌ペプチド, 好中球, 敗血症

はじめに

敗血症は、感染に対する過剰な生体反応によって引き起こされ、多臓器不全や致死性のショックをとともう¹⁾。敗血症に対して有効な治療法はいまだ確立されておらず、先進国においても致死率が25~50%と高い、重篤な疾患である¹⁾。われわれは、敗血症に対する有効な治療法を探索する過程において、ヒト抗菌ペプチド LL-37 が、盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture : CLP)

によるマウス敗血症モデルの症状を軽減し、生存率を改善させることを報告してきた^{2,3)}。

一方、好中球をホルミルペプチド fMLF などで刺激すると、エクトソームと呼ばれる 0.1~1 μm の細胞外小胞が放出される^{4,5)}。エクトソームは、好中球の顆粒に由来する分子 (抗菌タンパク質など) を含み、また表面には好中球の細胞膜に存在する分子 (Ly6G, phosphatidylserine [PS] など) を発現している^{4,5)}。興味深いことに、敗血症の生存患者では、血中のエクトソーム数が上

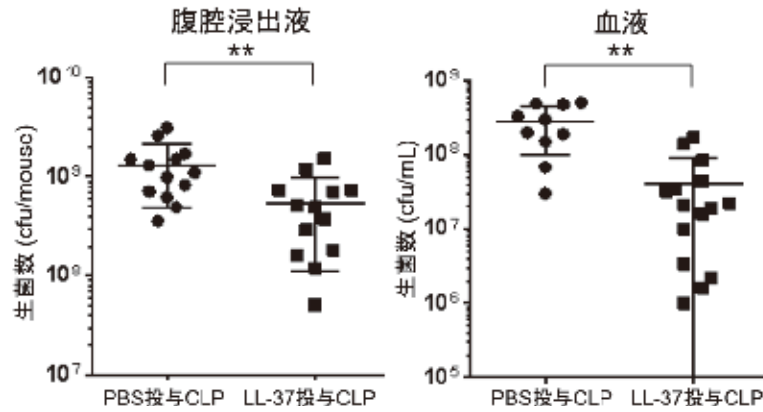


図 1 CLP マウスの生菌数に及ぼす LL-37 投与の効果

** $P < 0.01$

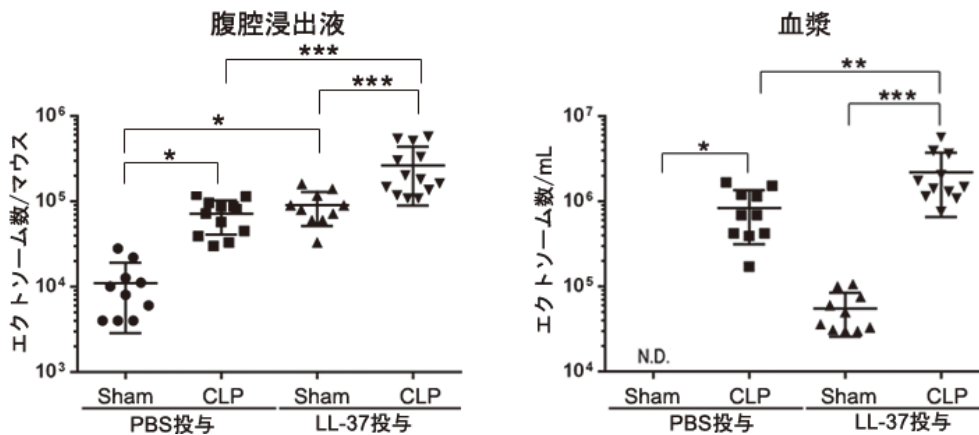


図 2 CLP マウスにおけるエクソソーム数に及ぼす LL-37 投与の効果

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, N. D.: 検出されず

昇することから^{6,7)}, エクソソームの敗血症病態へのかかわりが示唆されている。そこで本研究では, LL-37 の好中球からのエクソソーム放出作用に注目して, LL-37 のマウス敗血症モデルに対する効果を検討した。

1. LL-37 を投与した CLP マウスにおける生菌数の減少およびエクソソームレベルの上昇

BALB/c マウス (メス, 7~8 週齢) に LL-37 ($3 \mu\text{g}/\text{mouse}$) あるいはコントロールの PBS (phosphate-buffered saline) を尾静脈注射し, CLP 処置³⁾を施した。Sham マウスは, 開腹手術のみを行い, 結紮穿刺は行わなかった。CLP 施行 14~18 時間後に, 生理的食塩水あるいは HBSS⁻ (Hanks balanced salt solution, Ca^{2+} および Mg^{2+} 非含有) を腹腔内に注射して腹腔浸出液を回収し, また心臓からヘパリン採血をし, 腹腔浸出液と血液中の生菌数をコロニー形成法で調べた。その結果, LL-37 を投与した CLP マウスでは, PBS を投与した CLP マウスと比較して生菌数が有意に低下していた (図 1)。一方, Sham マウスの腹腔浸出液と血液には生菌が検出されな

かった (data not shown)。さらに, エクソソーム数を測定するために, 腹腔浸出液については $400 \times g$ で 5 分遠心し, その上清を $10,000 \times g$ で 10 分, さらにその上清を $100,000 \times g$ で 1 時間遠心し, その沈殿 (細胞外小胞画分) を PBS に懸濁した。また, 血液については $5,000 \times g$ で 20 分遠心して血小板を除いた血漿を調製した。これらの画分に含まれるエクソソームを, PE (Phycoerythrin)-Ly6G および FITC-Annexin V (PS に特異的に結合) で蛍光標識して, その数をフローサイトメーターで測定した。その結果, 腹腔内および血漿中のエクソソーム数は, PBS 投与マウスでも LL-37 投与マウスでも, CLP により有意に増加した (図 2, PBS 投与 Sham vs. PBS 投与 CLP; LL-37 投与 Sham vs. LL-37 投与 CLP)。興味深いことに, CLP 処置したマウスのエクソソーム数は, LL-37 の投与によりさらに増加した (図 2, PBS 投与 CLP vs. LL-37 投与 CLP)。また, Sham マウスにおいても, LL-37 投与によってエクソソーム数が有意に増加した (図 2, PBS 投与 Sham vs. LL-37 投与 Sham)。

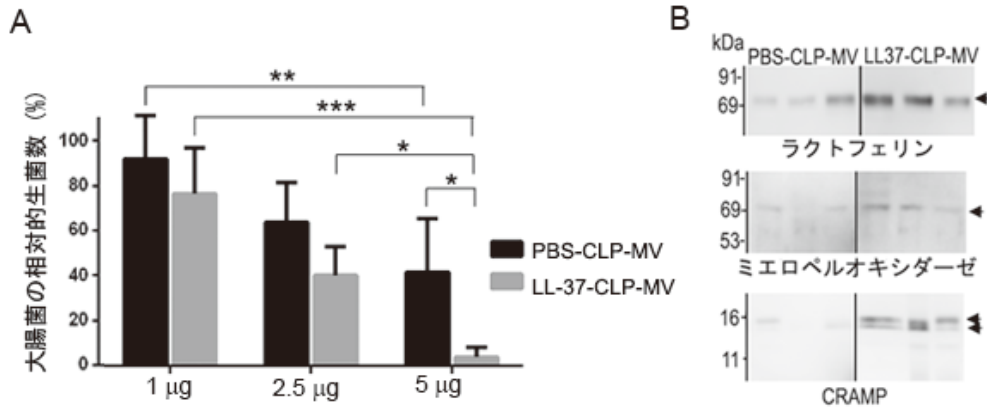


図 3 CLP マウスから調製した細胞外小胞画分の抗菌活性 (A) と抗菌タンパク質・ペプチド (B)
 A: 大腸菌を PBS とインキュベーションしたときの生菌数を 100 として, 細胞外小胞とインキュベーションしたときの生菌数を相対値で示す。
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$
 B: ラクトフェリン, ミエロペルオキシダーゼ, CRAMP をウェスタンブロット法で検出した。

2. LL-37 を投与した CLP マウスから単離した細胞外小胞 (エクソソーム) の抗菌活性

上記のように, LL-37 を投与した CLP マウスでは, PBS 投与 CLP マウスと比較して, エクソソーム数の増加がみられたと同時に, 生菌数の減少が観察されたので, LL-37 投与によって抗菌活性をもつエクソソームが放出される可能性が考えられた。そこで, PBS あるいは LL-37 を投与した CLP マウスの腹腔浸出液から調製した細胞外小胞 (microvesicle: MV) (1, 2.5, 5 µg) を, マウス盲腸から単離した大腸菌 (5×10^3 , 対数期) とインキュベーションして, これら細胞外小胞の抗菌活性を評価した。その結果, PBS 投与 CLP マウス由来の細胞外小胞 (PBS-CLP-MV) と LL-37 投与 CLP マウス由来の細胞外小胞 (LL-37-CLP-MV) は, ともに用量依存的に抗菌活性を示すこと, また LL-37-CLP-MV は PBS-CLP-MV よりも有意に高い抗菌活性を有することが明らかとなった (図 3A)。さらに, エクソソームには好中球由来の分子が含まれるので^{4,5)}, 細胞外小胞に含まれる抗菌タンパク質・ペプチドをウェスタンブロット法で調べたところ, LL-37-CLP-MV は PBS-CLP-MV と比較して, ラクトフェリン, ミエロペルオキシダーゼ, CRAMP (cathelicidin-related antimicrobial peptide, LL-37 のマウス ortholog) の含有量が多いことがわかった (図 3B)。

3. LL-37 による好中球からのエクソソーム放出

LL-37 は CLP マウスにおいてエクソソームの放出を誘導することが明らかとなったので, 次に LL-37 が好中球に直接作用してエクソソームを放出させるかどうかを

調べた。そのために, マウス骨髄から Percoll を用いた密度勾配遠心法⁸⁾により単離した好中球 (2×10^6) を HBSS⁺ (Hanks balanced salt solution, Ca^{2+} および Mg^{2+} 含有) 中で, fMLF あるいは LL-37 により 37°C で 30 分間刺激した。その後, 上清を $500 \times g$ で 5 分, その上清を $3,000 \times g$ で 5 分遠心し, その上清中のエクソソーム数をフローサイトメーターにより測定した。

その結果, fMLF 刺激によりエクソソームの放出が誘導され, また LL-37 によってもエクソソームの放出が濃度依存的に誘導された (図 4A)。また, エクソソームを含む細胞外小胞画分を大腸菌とインキュベーションしたところ, fMLF で放出された細胞外小胞 (fMLF-MV), LL-37 で放出された細胞外小胞 (LL-37-MV) とともに生菌数を減少させたことから (図 4B), 好中球から放出されたエクソソームを含む細胞外小胞に抗菌作用があることが確認された。

4. LL-37 で刺激した好中球から放出された細胞外小胞 (エクソソーム) の敗血症マウスに対する保護効果

最後に, LL-37-MV が敗血症に対して保護的に作用するかどうかを評価した。マウスに CLP 処置を施した 2 時間後に, 3×10^5 のエクソソームを含む LL-37-MV を腹腔内投与して, 24 時間後のマウス腹腔内および血液中の生菌数を測定し, またマウスの生存を 10 日間にわたってモニターした。その結果, LL-37-MV を投与した CLP マウスでは, PBS を投与した CLP マウスに比べて, 生菌数が有意に低下しており (図 5A), また生存率も有意に上昇した (図 5B)。一方, PBS あるいは LL-37-MV を投与した Sham マウスでは, 腹腔浸出液や血液中に生菌は検出されず, また生存率も 100% であった (図 5B)。

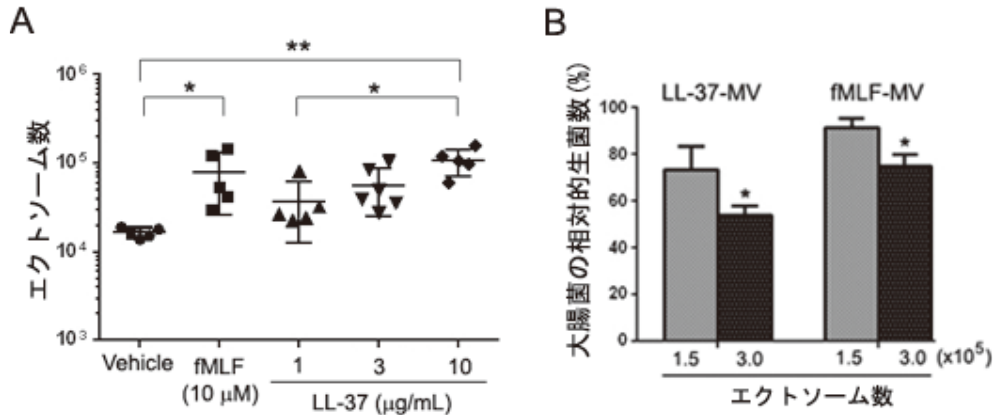


図 4 LL-37 による好中球からのエクソソーム放出 (A) とエクソソーム含有細胞外小胞画分の抗菌活性 (B)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

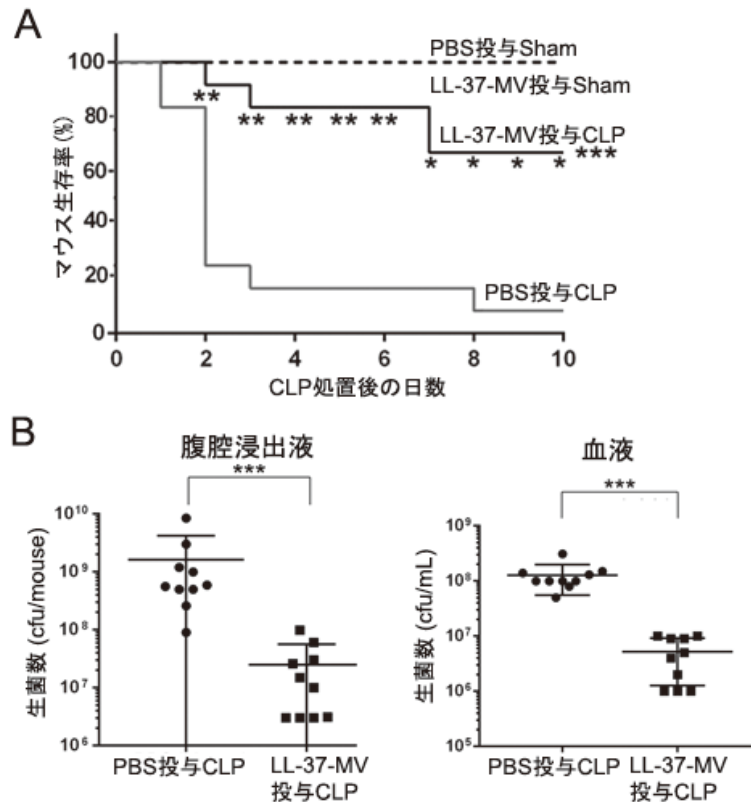


図 5 LL-37 で刺激した好中球から放出された細胞外小胞の Maus 敗血症に対する保護効果
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

おわりに

われわれは以前、抗菌ペプチド LL-37 が CLP 敗血症マウスの生存率を向上させることを報告してきたが^{2,3)}、本研究では、LL-37 が CLP マウスの腹腔および血液における生菌数を減少させると同時に、エクソソーム数を増加させることを明らかにした。さらに、LL-37 投与マウスから単離した細胞外小胞は、PBS 投与マウスの細胞

外小胞と比較して、好中球に由来する抗菌活性分子（ラクトフェリン、ミエロペルオキシダーゼ、CRAMP）を多く含み、高い抗菌活性を有することがわかった。したがって、LL-37 は CLP マウスにおいて、抗菌活性を有するエクソソーム数を増加させることで、腹腔や血液中の生菌数を減少させ、結果としてマウス生存率を改善する可能性が考えられる。また、LL-37 はマウス骨髄から調製した好中球に直接作用して、エクソソーム放出を誘導

することも明らかになった。さらに、LL-37 刺激の好中球から放出されたエクソソームにも抗菌活性があり、またこのエクソソームを CLP マウスに投与すると、腹腔や血液中の生菌数が減少し、生存率が改善した。これらのことから、LL-37 は抗菌活性を有するエクソソームの放出を促進することで、敗血症に対して保護的に作用することが示唆された。

LL-37 は敗血症において多面的な作用を示すことがわかっている。われわれはすでに、LL-37 が好中球に作用して、抗菌作用を有する NETs (neutrophil extracellular traps) の放出を誘導すること²⁾、また IL-1 β などの炎症性サイトカインを放出して炎症を増悪させる、マクロファージのピロトーシスを抑制することを示している³⁾。したがって、LL-37 のように、敗血症において多面的な作用を発揮する物質を探索し、その作用機構を解明することは、敗血症に対する有効な治療法を開発するために重要な情報を与えるものと考えられる。

文 献

- 1) Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. : Sepsis and septic shock. *Lancet* 392 : 75-87, 2018
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S : Focus on Extracellular Vesicles : Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci* 17 : 170, 2016
- 5) Nauseef WM, Borregaard N : Neutrophils at work. *Nat Immunol* 15 : 602-611, 2014
- 6) Dalli J, Norling LV, Montero-Melendez T, et al. : Micro-particle alpha-2-macroglobulin enhances pro-resolving responses and promotes survival in sepsis. *EMBO Mol Med* 6 : 27-42, 2014
- 7) Lashin HMS, Nadkarni S, Oggero S, et al. : Microvesicle subsets in sepsis due to community acquired pneumonia compared to faecal peritonitis. *Shock* 49 : 393-401, 2018
- 8) Hu Z, Murakami T, Tamura H, et al. : Neutrophil extracellular traps induce IL-1 β production by macrophages in combination with lipopolysaccharide. *Int J Mol Med* 39 : 549-558, 2017