

ハチ毒由来 PLA2 の皮膚角化細胞における免疫応答への影響

高村 (赤司) 祥子

愛知医科大学医学部感染・免疫学講座

An effect of immunological response in keratinocyte by bee venom PLA2

Sachiko Akashi-Takamura

Microbiology and Immunology, Aichi Medical University, School of Medicine

Abstract

Bee venom (BV) induces skin inflammation, characterized by erythema, blisters, edemas, pain, and itching. Although BV has been found to have an inhibitory effect on toll-like receptors (TLRs), we here show that BV enhances keratinocyte responses to polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I : C)), a ligand for TLR3. Our results revealed that the enhanced TLR activity was primarily induced by secretory phospholipase A2 (sPLA2), a component of BV (BV-sPLA2). PLA2 mediates the hydrolysis of membrane phospholipids into lysophospholipids and free fatty acids. We demonstrated that BV-sPLA2 increased the intracellular uptake of poly (I : C), phosphorylation of the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and poly (I : C)-mediated interleukin 8 (IL-8) production in human keratinocytes. We further showed that the enzymatic activity of BV-sPLA2 was essential for the increased uptake of poly (I : C). These findings suggest that BV-sPLA2 may induce a modification of the cell membrane structure, leading to enhanced poly (I : C) uptake in keratinocytes. BV-sPLA2 might be able to promote wound healing by enhancing TLR3 responses.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 34~38, 2020

Key words : ハチ毒, PLA2 (phospholipase A2), IL-8 (Interleukin 8), TLR (Toll-like receptor)

はじめに

ハチ毒は紅斑, 水膨れ, 浮腫, 痛み, かゆみなどの皮膚の炎症を誘導する一方, 抗炎症作用, 抗ガン作用などももちさまざまな民間療法に利用されてきた。しかし病原体認識受容体の一種である TLR を介した免疫応答との関係については, 抑制性作用の報告があるもののまだ定かではない。われわれはハチ毒が, 合成二本鎖 RNA・poly (I : C) に対するヒト皮膚角化細胞の TLR3 を介する免疫応答を増強することを見出した。またこの増強作用は, ハチ毒構成成分の一つである分泌型 PLA2 によるものであることが分かった。PLA2 は細胞膜グリセロリン脂質をリゾリン脂質と遊離脂肪酸とに加水分解する酵素である。われわれはハチ毒 PLA2 がヒト皮膚角化細胞での poly (I : C) の細胞内取り込みを増強させ, NF- κ B や MAPKs のリン酸化を増強し, その結果角化細胞による IL-8 産生量を増加させることを示した。さらにわれわれはハチ毒 PLA2 の酵素活性が poly (I : C) の細胞内

取り込み増強に必要であることを明らかにした。これらの結果から PLA2 が角化細胞の細胞膜の構造を修飾し角化細胞への poly (I : C) 取り込みを増強させたことが考えられた¹⁾。本稿では以上の結果を紹介し PLA2 による角化細胞の免疫応答増強機構や臨床応用に関して考察する。

1. Poly (I : C) による皮膚免疫活性化機構

皮膚は, さまざまな外敵から体を守る重要な器官である。皮膚の外層は主に角化細胞から成り立っている。角化細胞は外壁バリアとして機能するだけでなく TLR など介するサイトカイン産生など, 皮膚の免疫応答にも積極的に参加している。サイトカインのなかでも IL-8 は好中球を炎症部位に遊走させる CXC ケモカインファミリーに属し, 自然免疫応答の誘導や調整を中心的に行う。IL-8 産生量の増減は角化細胞活性化の鋭敏なセンサーにもなりうる。

Poly (I : C) は合成二本鎖 RNA で, TLR3 や retinoic

acid inducible gene-I-like receptors (RLRs) などの受容体を介して宿主細胞に認識される。TLR3 はエンドソームに局在しエンドライソソームで二本鎖 RNA を認識する。一方で RLRs は retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) や melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) などの受容体から成る細胞質局在センサーである。これら TLR および RLRs の下流では NF- κ B や MAPKs, Interferon regulatory factor (IRF) 3/7 などのシグナルが活性化され、IL-8 や I 型インターフェロンなどの炎症性サイトカインが誘導される。Poly (I : C) は IL-8 産生を誘導し創傷治癒を促進することが最近報告されている²⁾。また TLR3 や poly (I : C) の創傷治癒促進作用も報告されている³⁾。

2. ハチ毒の構成成分と作用について

ハチ毒はメリチンやアパミンといったペプチドや、PLA2、ヒアルロニダーゼなどの酵素や、ヒスタミン、エピネフリン、アミンなどのさまざまな構成成分から成る。ヒスタミンはアレルギー反応誘導物質として知られている。メリチンは26個のアミノ酸から成る抗菌ペプチドで、ハチ毒の40~50%を占める主要な溶血毒成分であり、抗細菌作用や抗炎症作用のような多彩な作用をもつ。

PLA2 は生体膜主要成分であるグリセロリン脂質を加水分解し、遊離脂肪酸とリゾリン脂質を産生する酵素群の総称である。PLA2 はハチ毒のみならずわれわれ哺乳類も産生し、30種類以上の分子種が認められ構造や局在、進化などから細胞質型、細胞外分泌型など複数のグループに大別される。最大の PLA2 サブグループである分泌性 PLA2 (sPLA2) には細胞分布や基質リン脂質に対する選択性の違いから哺乳類では10種類の活性型分子種が存在する。ハチ毒 PLA2 は分泌型 PLA2 のグループⅢに分類され、ハチ毒の10~12%を占める主要なアレルゲンとされている。PLA2 酵素で誘導される加水分解反応は細胞膜の構築を修飾し、細胞膜の形や脂質含有量や結合タンパクの量を変えることによって膜の機能に影響を与える。

3. ヒト皮膚角化細胞株 HaCaT 細胞におけるハチ毒の作用

皮膚での TLR を介する免疫応答へのハチ毒の影響を明らかにするため、まずはヒト皮膚角化細胞株 HaCaT 細胞にハチ毒を添加し、同時に TLR リガンドを加えて刺激し産生される細胞上清中の IL-8 の量を ELISA で測定した (図 1A)。ハチ毒のみでわずかに IL-8 産生が誘導されたが、TLR4 (LipidA) および TLR7 リガンド (Gardiquimod) のみによる IL-8 産生はほとんど認めず、これらは以前の報告と同様 HaCaT 細胞においては TLR4 や TLR7 が発現していない可能性が考えられた。TLR9 リガンド (CpGDNA) 刺激では IL-8 産生はわずかに認

めるものの明らかなハチ毒添加による産生増強は認めなかった¹⁾。いっぽう TLR1/2 リガンド (Pam3CSK4) および TLR2/6 リガンド (FSL-1) 刺激による IL-8 産生に関してはハチ毒添加で少し増強することが分かった。さらに TLR3 リガンド (poly (I : C)) 刺激ではハチ毒添加により2倍以上の IL-8 産生増強を認め最も高い増強作用が認められた (図 1A)。ハチ毒添加量を増やすと増強作用も強まることから、ハチ毒は明らかに poly (I : C) 刺激による HaCaT 細胞の IL-8 産生量を増やすことが分かった。

4. IL-8 産生増強にかかわるハチ毒構成成分の検討

次にわれわれは、ハチ毒のどの成分が poly (I : C) 刺激の増強効果を生じたのか調べることにした。ハチ毒成分からメリチンやヒスタミン、PLA2 がその候補と考え、それぞれを HaCaT 細胞に添加し poly (I : C) 刺激に対する増強効果が生じるかどうか IL-8 産生量で調べたところ、PLA2 で最も高くなることが分かった¹⁾。この作用は HaCaT 以外のヒト皮膚角化細胞でも認められたが、ヒト末梢血単核球 (PBMC) では認めなかったため皮膚角化細胞特有であることが考えられた。さらに poly (I : C) 以外の TLR リガンド刺激においても、ハチ毒添加時同様 PLA2 添加で TLR1/2 および TLR2/6 リガンド刺激で軽度の、TLR3 リガンドである poly (I : C) 刺激で最も強い増強作用が示された (図 1B)。以上の結果から、IL-8 産生増強作用はハチ毒内の PLA2 によるものであることが考えられた。さらに PLA2 の酵素活性がこの増強作用に関係するかどうか調べるため、PLA2 の代わりに熱処理して酵素機能を失わせた PLA2 を添加したり、PLA2 の活性部位を直接阻害する PLA2 インヒビター (MJ33) を PLA2 と混合して加えたりして poly (I : C) 刺激を行ったところ (図 1C)、いずれも IL-8 産生増強作用は消失あるいは低下したことが分かった。以上より PLA2 の酵素活性が poly (I : C) 刺激による IL-8 産生の増強作用に必要であることが判明した。

5. PLA2 が増強させる poly (I : C) 刺激経路の検討

前述のように poly (I : C) はエンドソームに局在する TLR3 や細胞質内に局在する RIG-I や MDA5 などの RLR に結合する。RIG-I は短い種類の poly (I : C) に結合し、MDA5 は長い種類の poly (I : C) に結合する。今回使用した poly (I : C) は長い種類の poly (I : C) であったため MDA5 および TLR3 に対する抗体を用いて蛍光顕微鏡でどちらの受容体と標識 poly (I : C) とが共局在するか検討した。まず MDA5 と poly (I : C) との共局在は検出できなかった。また TLR3 に関しては抗体による TLR3 の局在が明らかにできずそのため共局在も検出で

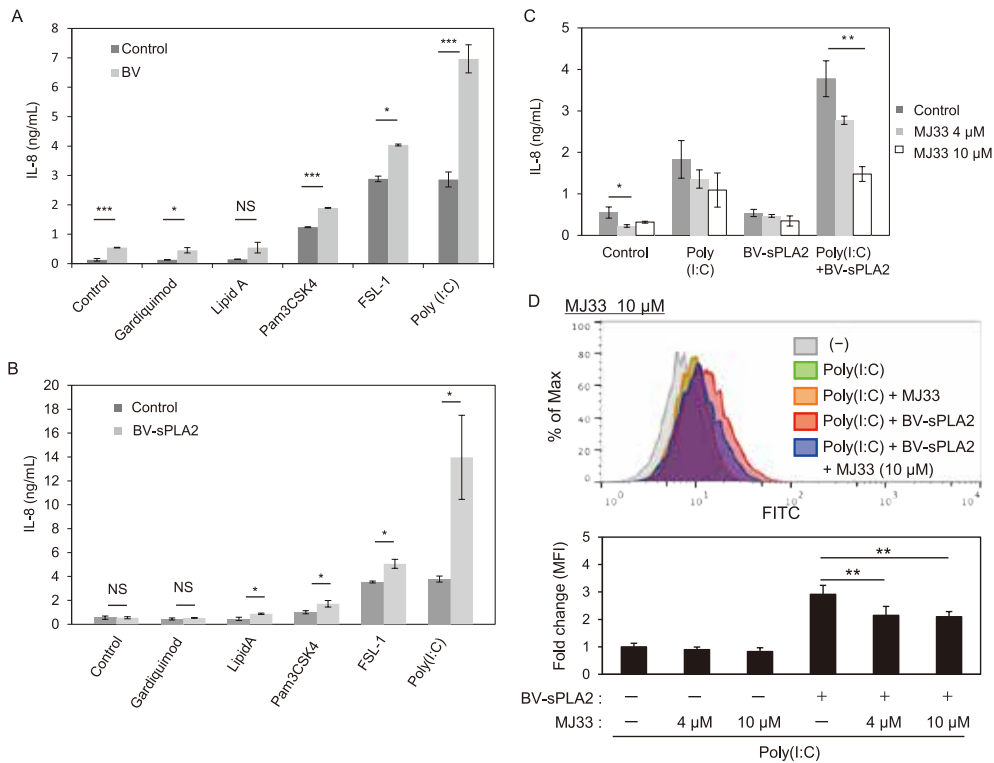


図 1 ハチ毒 (BV) およびハチ毒 PLA2 (BV-sPLA2) 添加による角化細胞での免疫応答への影響
 角化細胞に各種 TLR リガンドおよびハチ毒 (A) あるいはハチ毒 PLA2 (B) を添加し、産生される IL-8 の量を ELISA で測定した。ハチ毒あるいはハチ毒 PLA2 添加によりとくに Poly (I : C) 刺激による IL-8 産生が増加した。さらに Poly (I : C) 添加と同時に、PLA2 インヒビターを PLA2 と混合後角化細胞に添加し、IL-8 産生量を ELISA で測定したり (C) 標識 Poly (I : C) の角化細胞取り込みをフローサイトメトリーで測定したりした (D)。Poly (I : C) による IL-8 産生量は PLA2 添加により増強するが、PLA2 インヒビター添加検体では PLA2 による増強作用が抑制された。標識 Poly (I : C) の角化細胞取り込みも PLA2 添加により増強するが、PLA2 インヒビター添加検体では PLA2 による取り込み増強作用が抑制された。以上より Poly (I : C) の角化細胞への取り込みや IL-8 産生の増加には PLA2 の酵素活性が必要であることが分かった。(NS : $P \geq 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$) (文献¹⁾を引用, Oxford University Press より使用許諾取得済み)

きなかった。しかしライソソームマーカーである Lyso Tracker と標識 poly (I : C) との共局在は認められ、ハチ毒 PLA2 によりその共局在が経時的に増強したことから、少なくとも poly (I : C) の一部はエンドライソソーム認識受容体である TLR3 に認識されることが考えられた¹⁾。

また PLA2 がどのような活性化シグナルを増強させるのか調べたところ、PLA2 および poly (I : C) 刺激では poly (I : C) 単独よりも Erk, JNK, Ikk α/β , I κ B α の増強が認められたため、PLA2 添加により poly (I : C) 刺激で誘導される MAPK や NF- κ B の活性化シグナルが増強されることが分かった¹⁾。

6. Poly (I : C) 刺激増強における PLA2 酵素作用の必要性

標識 poly (I : C) は PLA2 添加により細胞内に経時的に取り込まれていくことが分かったため、熱処理した PLA2 や前述の PLA2 インヒビターを用いて PLA2 の酵素作用が poly (I : C) 取り込み増強に必要などうかを共焦点顕微鏡やフローサイトメトリーにて調べたところ、いずれも PLA2 酵素作用が必要である結果を示した (図 2A, 図 1D)。さらにハチ毒 PLA2 添加により細胞膜から細胞上清に分泌される脂肪酸 (C18 : 1, オレイン酸) の量を LC/MS で測定比較したところ、PLA2 添加で増加し、熱処理後の PLA2 では増加しないことが分かった (図 2B)。以上よりハチ毒 PLA2 添加により細胞膜のリン脂質が分解され、それに伴い同時添加した poly (I : C)

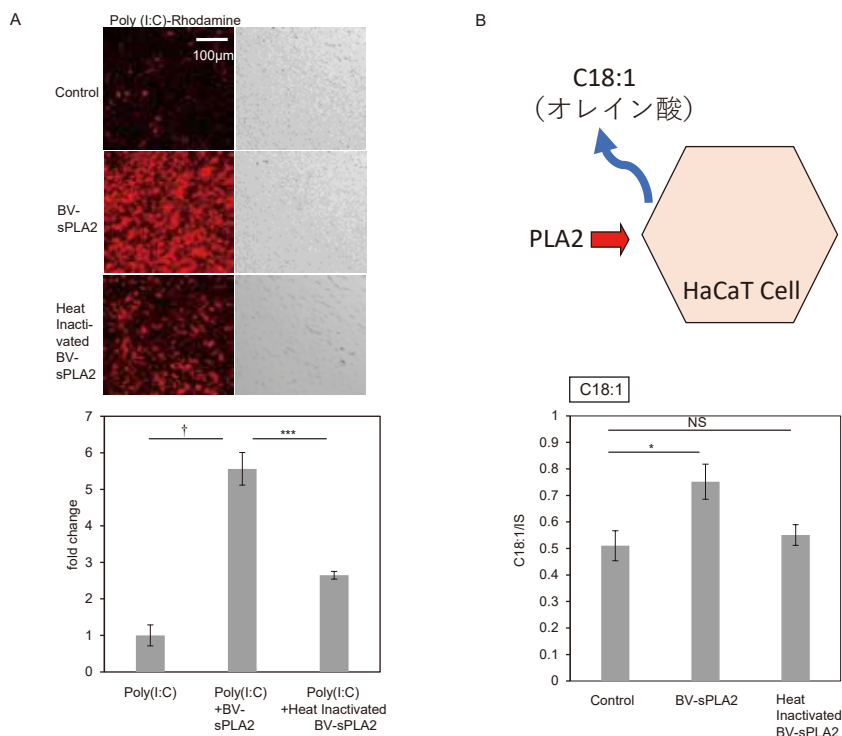


図 2 ハチ毒 PLA2 添加による細胞上清への脂肪酸（オレイン酸・C18:1）分泌促進と Poly (I : C) 細胞内取り込み上昇との関連

A : 角化細胞に PLA2 あるいは熱処理して活性を失った PLA2 を加え、標識 Poly (I : C) の角化細胞取り込みを共焦点顕微鏡で調べた。酵素活性がある PLA2 添加の場合で最も取り込みが上昇し、それに対して熱処理後の PLA2 では取り込みが大きく減少していた。B : 角化細胞に PLA2 あるいは熱処理して活性を失った PLA2 を加え、細胞上清に分泌されるオレイン酸量を調べた。酵素活性がある PLA2 添加の場合のみオレイン酸分泌上昇がみられた。以上よりハチ毒 PLA2 添加による角化細胞の細胞膜の変化が³, Poly (I : C) 細胞内取り込みを誘導し活性化シグナル上昇や IL-8 産生増加を来したことが考えられた。(NS : $P \geq 0.05$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.005$, † $P < 0.001$) (文献¹) を引用, Oxford University Press より使用許諾取得済み)

の細胞内取り込みが上昇し、エンドライソソームに局在する TLR3 により認識されて活性化シグナルが上昇し IL-8 産生が上昇したことが分かった。

7. PLA2 酵素によるヒト皮膚角化細胞での免疫応答増強機構

われわれは熱処理した PLA2 や PLA2 特異的インヒビターを用いて、poly (I : C) 刺激による免疫応答活性化にハチ毒 PLA2 の酵素作用が必要であることを示した。PLA2 酵素は細胞膜のグリセリン脂質の sn-2 位置を切断することで細胞膜の形態や構成脂質の量や質、あるいは結合タンパクを変え細胞膜機能に影響を及ぼす。ハチ毒 PLA2 は角化細胞上清中の脂肪酸の中のオレイン酸 (C18:1) を増やしたがこれは細胞膜が加水分解されたことを示唆している。この細胞膜の変化が poly (I : C) の角化細胞内取り込みを促進させた可能性がある。オレイン酸分泌レベル上昇とハチ毒 PLA2 による poly (I :

C) の角化細胞内取り込み上昇とは相関し、熱処理後の PLA2 ではこのレベルは減少していた。これは PLA2 酵素が触媒する加水分解反応が細胞膜構築修飾を誘導したことを示唆している。以前の報告によれば、ホスホリパーゼの一種であるスフィンゴミエリナーゼが細胞膜のスフィンゴミエリンの加水分解を誘導し素早いエンドサイトーシスを誘導したことが示されている⁴)。さらなる調査が必要ではあるが、PLA2 による加水分解反応もエンドサイトーシスを誘導した可能性が考えられる。さらにはほかの報告によれば、細胞膜内膜側に素早く侵入できる C6-リン脂質添加により内膜側に脂質量が増加するような膜の非対称が生じ、これがエンドサイトーシスを誘導したという報告がある⁵)。この報告では内膜側の脂質量増加ではエンドサイトーシスが促進され、いっぽう外膜側の脂質量増加によりエンドサイトーシスが抑制されることが示されている。これらの報告から考えると、PLA2 添加で分泌された細胞上清中のオレイン酸濃度上

昇からは角化細胞外膜側の脂質量減少が考えられ、内膜側脂質量の相対的な増加となり poly (I : C) のエンドサイトーシスを誘導したと考えられる。リゾリン脂質添加では内膜側へ侵入できないためエンドサイトーシスを誘導できず、poly (I : C) 刺激増強作用もみられなかった¹⁾。

さらに PLA2 による lipid raft 形成促進を介した増強作用も考えられる。豚の膵臓の分泌型 PLA2 は脂質の構成を変えたり lipid raft 形成を促進したりすることが以前報告されている⁶⁾。また Raftlin という細胞内 lipid raft タンパクはヒト樹状細胞や上皮細胞における poly (I : C) 細胞内取り込みに必要であることも報告されている⁷⁾。これらの報告を勘案すると、PLA2 による細胞膜の脂質構成要素の変化が lipid raft 形成を促進し Raftlin 依存性のエンドサイトーシスを介して poly (I : C) 刺激による活性化を増強させた可能性も考えられる。

PLA2 による増強作用は TLR1/2 や TLR2/6 リガンド応答においても認められた。最近の報告によれば TLR2 はマクロファージの lipid raft で TLR1 や TLR6 と共局在する。ハチ毒 PLA2 は lipid raft の総量を増やすことで細胞表面 TLR を介した活性化に影響を及ぼしているかもしれない。総合するとハチ毒 PLA2 はその酵素活性により細胞膜の修飾に影響を及ぼし、TLR を介した免疫応答に影響している可能性がある。

われわれの研究は潜在的な臨床応用の可能性を含んでいる。TLR3 欠失マウスでは創傷治癒が著しく遅れることや³⁾、poly (I : C) がヒトおよびマウスの皮膚で IL-8 産生により白血球の集積を強め創傷治癒を促進することなどが近年報告されてきている²⁾。IL-8 は生体レベルでも創傷治癒を増強させるような角化細胞の遊走を誘導するので、ハチ毒 PLA2 はさまざまな皮膚の状況に対する治療に有効である可能性が考えられる。ハチ毒 PLA2 と poly (I : C) との相乗効果を介して角化細胞での IL-8 産生を増加させることで創傷治癒を促進することが考えられる。

おわりに

われわれはハチ毒 PLA2 が TLR リガンドで誘導され

るヒト皮膚角化細胞活性化反応を増強させることを示した。この過程は PLA2 により触媒される加水分解反応による膜の修飾がエンドサイトーシス頻度や lipid raft 形成を促進することを示唆している。これらの結果は将来的に皮膚の創傷に対する新しい治療方法開発に有用である可能性が考えられた。

文 献

- 1) Nakashima A, Tomono S, Yamazaki T, et al. : Phospholipase A2 from Bee Venom Increases Poly (I : C)-induced Activation in Human Keratinocytes. *Int Immunol* 32 : 371-383, 2020 (Oxford University Press より Abstract, Figure 1, 2, 6, 7, 8 使用の許諾取得済み)
- 2) Lin Q, Wang L, Lin Y, et al. : Toll-like receptor 3 ligand polyinosinic : polycytidylic acid promotes wound healing in human and murine skin. *J Invest Dermatol* 132 : 2085-2092, 2012
- 3) Lin Q, Fang D, Fang J, et al. : Impaired wound healing with defective expression of chemokines and recruitment of myeloid cells in TLR3-deficient mice. *J Immunol* 186 : 3710-3717, 2011
- 4) Zha X, Pierini LM, Leopold PL, et al. : Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis. *J Cell Biol* 140, 39-47, 1998
- 5) Farge E, Ojcius DM, Subtil A, et al. : Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane of living cells. *Am J Physiol* 276 : C725-733, 1999
- 6) Simonsen AC : Activation of phospholipase A2 by ternary model membranes. *Biophys J* 94 : 3966-3975, 2008
- 7) Watanabe A, Tatematsu M, Saeki K, et al. : Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly (I : C)-mediated TLR3 activation. *J Biol Chem* 286 : 10702-10711, 2011