

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08393

研究課題名(和文)血小板由来「エンドトキシンショック緩和因子」とマクロファージ安定化作用

研究課題名(英文)Protection against endotoxin shock through stabilization of macrophages by platelet-derived factors

研究代表者

辻 勉(Tsuji, Tsutomu)

城西大学・薬学部・客員教授

研究者番号：00143503

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)：細菌性エンドトキシンに対するマクロファージの感受性は、血小板あるいは血小板由来の可溶性画分の添加により低下し、一酸化窒素(NO)および炎症性サイトカインの産生が減少した。このようなマクロファージ機能の抑制にはNF- $\kappa$ Bシグナル経路の負の制御、特にNO産生低下には一酸化窒素合成酵素の発現抑制及びアルギナーゼの発現増強の関与が示された。また、エンドトキシンに対する感受性の高感度測定法の開発を試みた。分化型単球様細胞株を利用する方法及びNF- $\kappa$ B応答配列の導入細胞を利用したレポーターアッセイ法を開発した。これらにより高感度及び短時間での測定が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌感染に伴うエンドトキシン(内毒素)ショックは、しばしば多臓器障害などの重篤な結果を招く。この過程にはマクロファージの過剰な活性化により産生されるサイトカインや炎症性メディエーターが深く関与する。本研究の成果は、血小板または血小板由来の物質によってマクロファージ機能の活性化が抑制されることを見出し、エンドトキシンショックの緩和及び重篤化予防などに貢献するものと思われる。また、本研究で開発したエンドトキシン感受性の高感度、短時間測定法は、創薬研究などの薬学的応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Susceptibility of macrophages to bacterial endotoxin was reduced in the presence of platelets or proteins derived from platelets, and these cells produced lowered levels of nitric oxide (NO) and inflammatory cytokines. The suppression of these macrophage functions was found to involve the negative regulation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway; especially increased expression of nitric oxide synthase and decreased expression of arginase in relation to the suppression of NO synthesis. Furthermore, we attempted to develop novel sensitive methods for the evaluation of macrophage susceptibility to endotoxin. We have developed two methods, in which we utilized differentiated human monocytic cells or a reporter cell line containing NF- $\kappa$ B-responsive elements.

研究分野：免疫学，生物系薬学

キーワード：マクロファージ 血小板 エンドトキシン 炎症性サイトカイン 一酸化窒素 NF- $\kappa$ B 免疫調節

## 1. 研究開始当初の背景

細菌性内毒素(エンドトキシン)は、グラム陰性細菌外膜の構成成分であるリポ多糖 (LPS) が活性の本体であり、サイトカインストームと言われる宿主免疫反応の異常亢進(免疫暴走)をもたらす。重篤な場合にはショック症状を引き起こし、致死的な多臓器不全が誘発される。抗生物質や抗菌薬により感染症の起原菌が殺滅されても、菌体由来の内毒素が体内に拡散することによりショックが誘発され得るので感染症治療における重要な課題となっている。

最近の研究から、血液中の血小板数が低下するとエンドトキシンショックが増悪化し、また血小板存在下ではLPSに対するマクロファージのサイトカイン産生応答が抑制されることが明らかとなった [1, 2]。私たちは、血小板由来の細胞接着促進タンパク質を探索している過程で、内毒素によるマクロファージ応答性を強く抑制する因子の存在を確認し、「エンドトキシンショック緩和因子」と仮に命名し研究に着手した。

## 2. 研究の目的

細菌性エンドトキシンショック発現にきわめて重要なマクロファージ機能亢進の制御を目指した研究を進める。最近の研究で、マウスにおいて血小板がマクロファージ機能に対して抑制的な作用を示すことが明らかにされたことから、本研究においては、炎症性メディエーター産生抑制を指標として、血小板あるいは血小板由来の物質のマクロファージ活性化抑制作用(安定化作用)に注目し、その性状解析及び薬学的応用を図り、感染症の重篤化予防と治療に繋げるための基礎的な知見を得ることを目的とした。以下のような具体的な目標を掲げ研究を進めた。

- 1) 血小板または血小板由来因子のマクロファージ安定化作用の特性の解析
- 2) 血小板から放出される液性因子の生化学的性状の解析
- 3) エンドトキシンショック緩和作用および薬学的応用

## 3. 研究の方法

### (1) マウス骨髄由来マクロファージの血小板培養上清との共培養

BALB/c マウスの骨髄細胞を L929 細胞培養上清 (10%) を含む RPMI1640 培地で 6 日間培養したのち、粘着細胞を集め、さらに L929 細胞培養上清を含まない RPMI1640 培地でさらに 24 時間培養した(骨髄由来マクロファージ)。一方、マウス血小板 ( $10^8/\text{mL}$ ) をトロンビン ( $0.5 \text{ U/mL}$ ) で 15 分間刺激し、遠心分離 ( $800 \text{ g}$ , 15 分) 後、得られた上清をメンブレンフィルター ( $0.22 \mu\text{m}$ ) でろ過した (PLT-sup)。骨髄由来マクロファージを PLT-sup 存在下、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養した。一酸化窒素 (NO) は Griess 法によって定量した。アルギナーゼ活性は、L-アルギニンの加水分解によって遊離する尿素を  $\alpha$ -イソニトロソプロピオフェノン法によって測定した。

### (2) RT-qPCR 法

TRIzol 試薬により単離した RNA から PrimeScript RT 試薬キットにより cDNA を調製した。qPCR は KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix および Applied Biosystems StepOne system を用いて行った。Gapdh 遺伝子を内部標準として用いた。

### (3) MM6 細胞を用いたサイトカイン産生能

ヒト単球・マクロファージ様細胞株である Mono-Mac-6 (MM6) 細胞を用いてサイトカイン産生能を調べた。MM6 細胞を活性型ビタミン D3 ( $10 \text{ ng/mL}$ ) の存在下で 72 時間培養することにより細胞をプライミングした後、ヒト血小板抽出物を加え、さらに 24 時間培養を継続した。その後、*E. coli* 由来の LPS ( $1 \text{ EU/mL}$ ) を加え、3 時間あるいは 24 時間後までに培養上清に放出された腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) およびインターロイキン (IL)-6 を ELISA 法によって定量した。

### (4) MM6 細胞への NK- $\alpha\text{B}$ 応答配列の導入

トゲオキヒオドシエビ (*Oplophorus gracilirostris*) のルシフェラーゼ遺伝子上流に NF- $\alpha\text{B}$  応答配列を配置したレポータープラスミドを MM6 細胞に導入した細胞株 MM6/NF- $\alpha\text{B}$ -NL を作製した。この細胞と血小板抽出物を混合し、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間保温したのち、LPS ( $1 \text{ EU/mL}$ ) を加え  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間培養した。細胞を溶解後にルシフェラーゼ活性を発光法により測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 活性化血小板の放出物によるマクロファージ細胞内でのアルギニン代謝変化

マウス骨髄由来マクロファージは、血小板の存在下で細菌性エンドトキシン (リポ多糖, LPS) に対する感受性が低下し、一酸化窒素 (NO) および腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) やインターロイキン-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインの産生が減弱することが明らかになっている。このようなマクロファージ機能の抑制効果が血小板の上清によっても誘導されるか解析した。トロンビンで活性化された血小板の培養上清 (PLT-sup) 存在下でマクロファージを培養し、NO 合成酵素 (iNOS) およびアルギナーゼ-1 の発現を調べると、iNOS の発現が抑制され、アルギナーゼ-1 の発現が増加することが判明した (図 1)。両酵素は、いずれもアルギニンの代謝に関わる酵素であり、これらの酵素の細胞内発現バランスにより NO 産生が制御されている可能性が考えられた。次に、PLT-sup で処理したマクロファージにおける NF- $\alpha\text{B}$  シグナル伝達系について調べたところ、LPS 刺激に伴う I $\alpha\text{B}\alpha$  リン酸化の抑制および NF- $\alpha\text{B}$  p65 発現の減少が観察された。

これらの結果から、PLT-sup が NF- $\kappa$ B シグナル経路を負に制御し、iNOS の発現抑制およびアルギナーゼ-1 の発現増強を介してマクロファージの炎症性反応を抑制するものと考えられた。

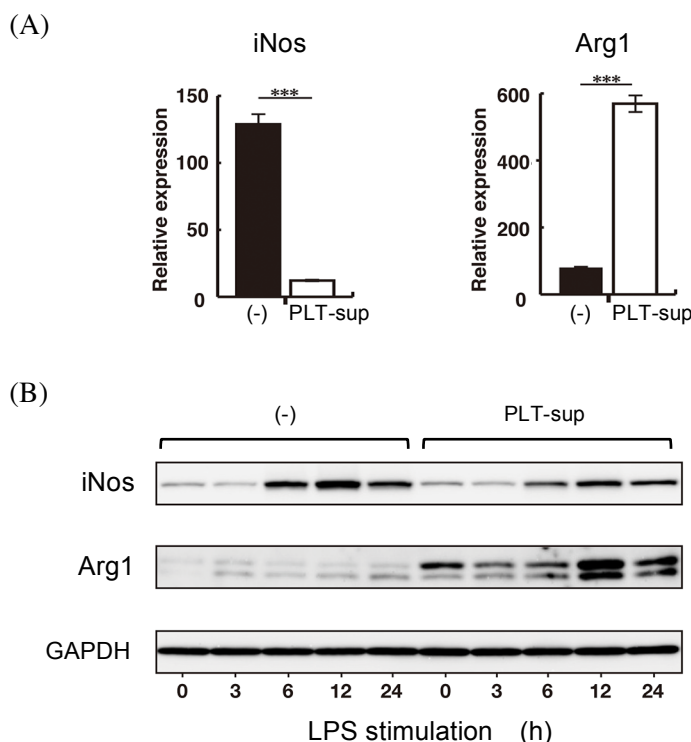


図 1 LPS 刺激後の骨髄由来マクロファージにおける一酸化窒素合成酵素 (iNOS) およびアルギナーゼ-1 (Arg1) の発現. 血小板培養上清の添加による iNOS および Arg1 の発現変化を RT-qPCR (A) およびウエスタンブロット法 (B) で測定した.

(2) ヒト血小板抽出物によるマクロファージ細胞株の LPS 感受性の低下

これまでに細菌性エンドトキシン (LPS) に対するマウス骨髄由来マクロファージの反応に血小板が抑制的に働くことを見出した. ヒト単球・マクロファージ様細胞株である MM6 細胞を用いて, ヒト血小板由来成分のマクロファージ安定化作用について検討を加えた. MM6 細胞は LPS に対して感受性が高く, 低濃度の LPS に応答しサイトカイン産生能を有する. 一方, ヒト末梢血から血小板を分離し, 凍結融解, 超音波処理を施した後, 遠心分離によって可溶性画分を取得し, この画分のマクロファージに対する効果を調べた. まず, LPS に高感受性の MM6 細胞を活性型ビタミン D3 (10 ng/mL) の存在下で 72 時間培養することによりプライミングしたのち, ヒト血小板可溶性画分を加え, さらに 24 時間培養を継続した. その後, *E. coli* 由来の LPS (1 EU/mL) を加え, 3 時間あるいは 24 時間後までに培養上清に放出された TNF- $\alpha$  および IL-6 を ELISA 法によって定量した. その結果, ヒト血小板画分は, TNF- $\alpha$  および IL-6 の産生を顕著に抑制した (図 2). 血小板由来成分のマクロファージ安定化作用がマウス骨髄由来マクロファージばかりでなく, ヒトの単球・マクロファージ系の細胞においても同様に観察されることが判明した.

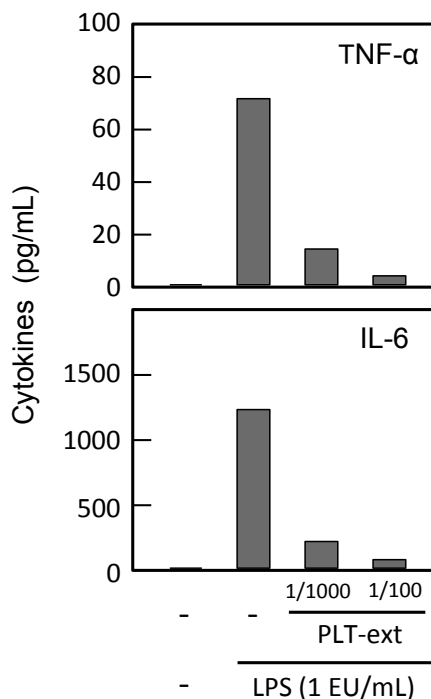


図 2 MM6 細胞のサイトカイン産生に及ぼす血小板可溶性画分の影響

(3) NF- $\kappa$ B 応答配列を含むレポータープラスミド導入細胞を用いた解析

マウス骨髄由来マクロファージおよびヒト単球系細胞株 MM6 の LPS 刺激により誘導される TNF- $\alpha$  や IL-6 などのサイトカイン産生が血小板あるいはその可溶性抽出物によって抑制されることが明らかになった. 次に, アッセイ系の効率化を目指した改良法の開発および血小板由来

の物質による単球・マクロファージの安定化作用の解析を行った。LPS は、宿主免疫細胞に発現する Toll 様受容体 4 (TLR4) 刺激および引き続き NF- $\kappa$ B の活性化を介して TNF- $\alpha$  や IL-6 の産生を促進することが知られているので、NF- $\kappa$ B 応答配列を利用したレポーターアッセイの開発を検討した。具体的には、ルシフェラーゼ遺伝子の upstream に NF- $\kappa$ B 応答配列を配置したレポータープラスミドを MM6 細胞に導入した細胞株 MM6/NF- $\kappa$ B-NL を作製した。この細胞を用いることにより、これまで 2 日間かかっていた LPS に対する細胞応答の測定が約 3 時間で可能になり、大幅な所要時間の短縮が達成された。また、血小板抽出液の LPS に対する応答性抑制効果を調べる際に、これまでは単球・マクロファージと 24 時間培養していたが、これを 1 時間に短縮しても、十分な抑制効果が観察された (図 3)。次いで、この抑制反応に関与する分子についての情報を得るために、特異抗体を用いて血小板抽出画分の吸収実験を行った。使用した抗血小板膜タンパク質抗体のうち、抗 CD42b 抗体で吸収した場合に抑制効果の減弱が認められた (図 4)。この結果より、血小板膜タンパク質 CD42b あるいは CD42b を含む複合体が単球・マクロファージの安定化作用に寄与している可能性が示された。

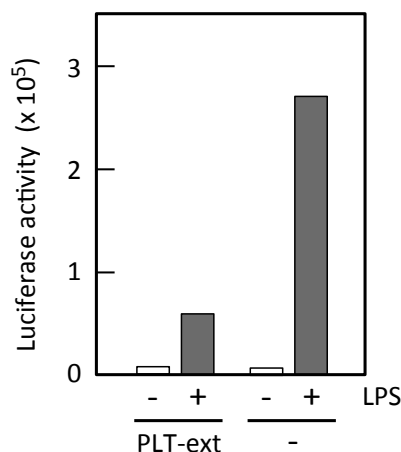


図 3 NF- $\kappa$ B 応答配列を含むレポータープラスミド導入 MM6 細胞の LPS 応答

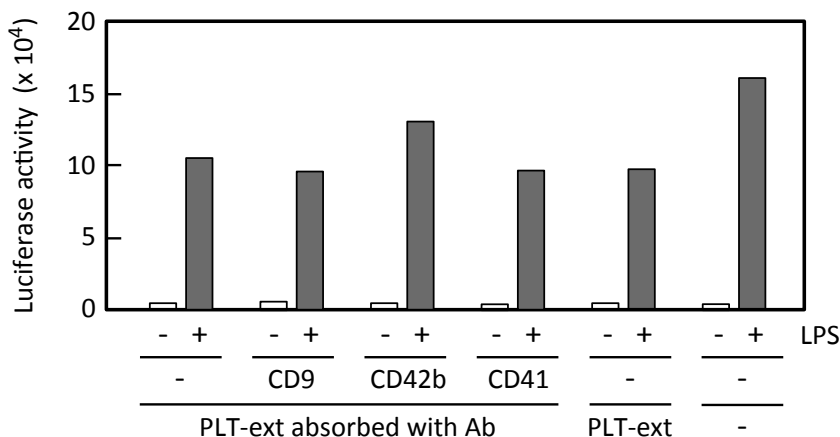


図 4 血小板可溶性画分のマクロファージ安定化作用。血小板膜タンパク質に対する抗体により吸収処理した血小板可溶性画分についてレポーター細胞の LPS 応答性への影響を調べた。

<引用文献>

[1] Xiang B, Zhang G, Guo L, Li XA, Morris AJ, Daugherty A, Whiteheart SW, Smyth SS, Li Z. *Nat Commun* 4: 2657 (2013)  
 [2] Ando Y, Oku T, Tsuji T. *Platelets* 27: 344-350 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oku T, Soma H, Kurisaka C, Tsuji T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Generation of a monoclonal antibody against staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5) that discriminates SSL5 from other SSL proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 212-217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2018.0016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oku T, Shimada K, Kenmotsu H, Ando Y, Kurisaka C, Sano R, Tsuiji M, Hasegawa S, Fukui T, Tsuji T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Stimulation of peritoneal mesothelial cells to secrete matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by TNF- $\alpha$ : A role in the invasion of gastric carcinoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3961-3961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19123961	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurisaka C, Oku T, Itoh S, Tsuji T.	4. 巻 62
2. 論文標題 Role of sialic acid-containing glycans of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the interaction between MMP-9 and staphylococcal superantigen-like protein 5	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 168-175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/1348-0421.12573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kodaka A, Hayakawa Y, AlSayegh RJ, Yasuhara T, Tomoda H, Oku T, Dan S, Tsuiji M, Tsuji T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Stereoisomer-specific induction of G2/M phase arrest and apoptosis by 9-(E,Z)hydroxyoctadecadienoic acid in mouse lymphoma cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 937-943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuiji M, Shiohara K, Takei Y, Shinohara Y, Nemoto S, Yamaguchi S, Kanto M, Itoh S, Oku T, Miyashita M, Seyama Y, Kurihara M, Tsuji T	4. 巻 42
2. 論文標題 Selective cytotoxicity of staphylococcal $\alpha$ -hemolysin ( $\alpha$ -toxin) against human leukocyte populations.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 982-988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-01024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 栗坂知里, 奥 輝明, 辻 勉
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌由来SSL5とMMP-9の結合における糖鎖の関与とその特性
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥 輝明, 相馬光里, 栗坂知里, 辻 勉
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌SSL5に対する抗体産生ハイブリドーマの樹立とその性質
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗坂 知里, 奥 輝明, 辻 勉
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌から分泌される SSL11 と白血球 MMP-9 の糖鎖依存的相互作用
3. 学会等名 第19回 Pharmaco-Hematology シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥 輝明, 栗坂 知里, 安藤 祐介, 辻 勉
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌Staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5) はヒト血漿C1インヒビターに結合する
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤祐介, 奥 輝明, 千葉義彦, 辻 勉, 亀井淳三
2. 発表標題 血小板によるマクロファージの機能調節機構の解析
3. 学会等名 第20回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥 輝明, 栗坂知里, 安藤祐介, 人見祐基, 築地 信, 伊藤佐生智, 辻 勉
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌Staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5) の宿主免疫系に与える影響
3. 学会等名 第20回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子 豊, 安藤祐介, 人見祐基, 築地 信, 奥 輝明, 辻 勉
2. 発表標題 マウス血小板におけるCoronin-1のリン酸化の解析
3. 学会等名 第20回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥 輝明, 栗坂知里, 人見祐基, 築地 信, 辻 勉
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌SSL5およびSSL11の白血球MMP-9に与える影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥 輝明, 安藤祐介, 人見祐基, 築地 信, 亀井淳三, 林 克彦, 菊池 裕, 伊豆津健一, 工藤由紀子, 辻 勉
2. 発表標題 ヒト由来細胞を利用した新規発熱性物質試験法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	奥 輝明  (Oku Teruaki)  (20409361)	星薬科大学・薬学部・講師   (32676)	
連携 研究者	築地 信  (Tsuiji Makoto)  (90302611)	星薬科大学・薬学部・准教授   (32676)	