Cathelicidinファミリーの殺菌ペプチド LL-37, CAP11のLPS中和作用

長岡 功・廣田聡子・François Niyonsaba^{*1)},
田村弘志・田中重則^{*2)}, 平田陸正^{*3)}

mini review

INFLAMMATION AND REGENERATION

LPS-neutralizing activities of cathelicidin family of antibacterial polypeptides LL-37 and CAP 11

Mammalian myeloid and epithelial cells express several kinds of antibacterial peptides (α -/ β -defensins and cathelicidins), which contribute to the innate host defense by killing invaded microorganisms. Recently, we have evaluated the lipopolysaccharide (LPS)-neutralizing activities of cathelicidin peptides human LL-37 and guinea pig CAP 11, using CD 14⁺ murine macrophage cell line RAW 264.7 and murine endotoxin shock model. LL-37 and CAP 11 inhibited the binding of LPS to RAW 264.7 cells, and suppressed the LPS-induced TNF- α mRNA and protein expression by RAW 264.7 cells. Interestingly, LL-37 and CAP 11 possessed the LPS-binding activities, and they strongly suppressed the interaction of LPS with LPS-binding protein (LBP) that mediates the transport of LPS to CD 14. Moreover, LL-37 and CAP 11 bound to the cell surface CD 14 and inhibited LPS-binding to the cells. Furthermore, in murine endotoxin shock model, LL-37-or CAP 11 -administration inhibited the binding of LPS to CD 14⁺ cells (peritoneal macrophages) and suppressed the LPS-induced TNF- α expression by these cells. Together these observations indicate that cathelicidin peptides LL-37 and CAP 11 likely exert the protective actions in endotoxin shock by blocking the binding of LPS to CD 14⁺ cells, thereby suppressing the production of cytokines by these cells via their potent binding activities for LPS and CD 14.

Rec. 10/26/2001, Acc. 11/26/2001, pp 131~138

Isao Nagaoka・Satoko Hirota・François Niyonsaba^{*1)},
Hiroshi Tamura・Shigenori Tanaka^{*2)}, Michimasa Hirata^{*3)}

key words : cathelicidins, antibacterial peptides, LPS, endotoxin shock, CD14

真核細胞が発現している殺菌ペプチドは、生体を微生物感染から守るために重要な働きをしている。いままでに、デフェンシンや cathelicidin に代表される殺菌ペプチドが、ヒトをはじめ、種々の動物の好中球や、腸管、気道、皮膚などの上皮組織から単離されている^{1~5)}。

デフェンシンは、システイン同士をつなぐジスルフィド (S-S) 結合を分子内に三つ持ち β -シート構造をとる。そして、S-S 結合の配置の違いによって α -デフェンシンと β -デフェンシンに分類される^{1,2)}(図1)。一方、cathelicidin ファミリーの殺菌ペプチドは、前駆体のプロペプチド領域のアミノ酸配列が、ブタ好中球から単離された cathelin 蛋白質に相同性を示すという特徴があり、それにちなんで cathelicidin という名前がつけられた³⁾。そして、殺菌作用を持つ成熟ペプチドは前駆

^{*1)} Department of Biochemistry, Juntendo University School of Medicine 順天堂大学医学部生化学教室

^{*2)} Central Research Laboratories, Seikagaku Corporation 生化学工業中央研究所

^{*3)} Research Division of Innate Immunity, Matsuzono Pharmacy まつぞの薬局自然免疫研究部門

Defensins

Cathelicidins

図1 デフェンシンファミリーと cathelicidin ファミリーの殺菌ペプチドの構造
アミノ酸配列を一字で表記した。デフェンシンの各サブファミリーに保存されているシステイン残基(C)を四角で囲み、ジスルフィド(S-S)結合を形成するもの同士を線で結んだ。モルモット CAP 11 は43個のアミノ酸からなるペプチドがジスルフィド結合でつながれたホモダイマーである。

体のC末端にあり、それらの相同性は必ずしも高くない。いままでに、ヒト、ウサギ、モルモット、ウシ、ブタの好中球や上皮組織から cathelicidin の仲間が単離されている³⁻⁵⁾。

ヒト LL-37 は18 kDa の前駆体蛋白質 CAP-18(cationic antibacterial protein of 18 kDa)のC末端から得られた殺菌ペプチドであり、すなわちロイシン L, L からはじまるアミノ酸37個のペプチドである⁶⁾。また、モルモット CAP 11 はアミノ酸43個の成熟ペプチドがS-S結合でつながれたホモダイマーであり、大きさが11 kDaであることからCAP 11(cationic antibacterial polypeptide of 11 kDa)とよばれている⁷⁾。cathelicidin のなかで、LL-37 とCAP 11 はアミノ酸配列が比較的類似したホモログの関係にあり、また、これら cathelicidin はデフェンシンと異なり α -ヘリックス構造をとる。

デフェンシンや cathelicidin のような殺菌ペプチドは、一般に塩基性アミノ酸(アルギニン R やリシン K)を含む親水性ドメインと、疎水性アミノ酸を含む疎水性ドメインを持つ両親媒性分子で

ある。そして、その作用メカニズムとして、殺菌ペプチドのプラスに荷電した親水性ドメインをマイナス荷電の細菌膜に結合させたあとに、疎水性ドメインを細菌膜に挿入し、膜透過性を亢進することによって殺菌作用を発揮すると考えられている^{1,2)}。そして、デフェンシンや cathelicidin などの殺菌ペプチドは、グラム陽性菌、陰性菌のみならず真菌にも抗微生物作用を発揮する^{1,2,5)}。

筆者らは最近、cathelicidin ファミリーの殺菌ペプチドである LL-37 とCAP 11 が、殺菌作用に加えてLPS(lipopolysaccharide)中和作用を有することを見いだした^{8,9)}。そこで、本稿では、その知見をもとにLL-37 とCAP 11 のLPS中和作用とその作用メカニズムについて概説する。

LPS によるシグナル伝達経路

現在、LPS のシグナル伝達経路として、LPS がLPS 輸送蛋白であるLBP(LPS-binding protein)と複合体を形成して、これが主に単球/マクロファージ系細胞に発現しているLPS受容体の

図2 エンドトキシンショックにおけるシグナル伝達経路と LL-37, CAP 11 の作用
菌体から放出された LPS は LPS 輸送蛋白 LBP と複合体を形成して, LPS 受容体の CD 14 に運搬され, さらに, それがシグナル伝達分子の toll-like receptor (TLR) と反応し, 転写因子 NF(nuclear factor)- κ B の活性化を介して, サイトカインや NO の生成を誘導し, エンドトキシンショックの病態を引き起こすと考えられている. LL-37 と CAP 11 は細胞外での殺菌作用に加えて, LPS の作用を中和して, サイトカイン生成を抑えて, エンドトキシンショックに対して防御的に働く. その機序として, ペプチドが LPS に結合して LBP との複合体形成を阻害し CD 14 に LPS を運搬するのを抑制すること, CD 14 の LPS 結合部位に結合して LPS の CD 14 への結合を阻害することが考えられる.

CD 14 に運搬され, さらに, それが LPS のシグナル伝達分子である Toll-like receptor (TLR) と反応し, 転写因子である NF(nuclear factor)- κ B の活性化を介して, TNF(tumor necrosis factor)- α , IL(interleukin)-1 β などのサイトカインや NO(nitric oxide) の生成を誘導し, エンドトキシンショックの病態を引き起こすと考えられている^{10~17)}(図 2).

In vitro における LL-37 と CAP 11 の LPS 中和作用の検討

FITC(fluorescein isothiocyanate) 標識した大腸菌の LPS を CD 14 陽性細胞であるマクロファージ様細胞 RAW 264.7 と血清存在下でインキュベーションし, LPS の結合に対するペプチドの影響をフローサイトメーターで解析した. その結果, LPS は血清存在下で細胞に結合し, その結

合が, 抗 LBP 抗体によって阻害されたことから, LPS は血清 LBP を介して細胞に結合していることがわかった(図 3A). さらに, LL-37 と CAP 11 の効果を調べてみると, 両ペプチドは LPS の細胞への結合を著明に抑制した(図 3B).

この結果から, LL-37 と CAP 11 は LBP を介した LPS の CD 14 陽性細胞への結合を阻害すると考えられる. また, FITC 標識した LPS の RAW 264.7 細胞への結合に及ぼす LL-37 と CAP 11 の濃度依存性を調べたところ, CAP 11(IC₅₀=0.05 μ g/ml) のほうが LL-37(IC₅₀=0.25 μ g/ml) よりも抑制効果が強いことがわかった⁹⁾.

また, LL-37 と CAP 11 を作用させたときの, RAW 264.7 細胞の TNF- α 発現をノザンブロットとウエスタンブロットで検討したところ, 両ペプチドは, LPS 刺激による TNF- α の mRNA と蛋白質の発現を著明に抑制することがわかった

図3 FITC標識したLPSのRAW 264.7細胞への結合に及ぼすLL-37とCAP 11の影響

RAW 264.7細胞とFITC標識LPS(FITC-LPS)を血清非存在下(-serum)あるいは存在下で、抗LBP抗体(anti-LBP mAb)(A)、LL-37、CAP 11(B)とインキュベーションし、洗浄後、FITC-LPSの細胞への結合をフローサイトメーターで調べた。BG(background)はFITC-LPSを添加しなかった細胞を示す。

(図4)。

さらに、LL-37とCAP 11の作用メカニズムを明らかにするために、LPSを固定化したマイクロプレートを用いて両ペプチドのLPS結合能を調べた。その結果、LL-37とCAP 11は、ともに固定化LPSに結合し、その反応系に遊離のLPSを加えると、固定化LPSへのペプチドの結合がLPSによって競合的に阻害されることがわかった。また、CAP 11はLL-37よりも低濃度の遊離LPSによって固定化LPSへの結合が阻害されたことから、CAP 11のほうがLL-37よりもLPSを認識する作用が強いと考えられた(図5A)。

図4 LPS刺激によるTNF- α 発現に及ぼすLL-37とCAP 11の影響

RAW 264.7細胞をLL-37、CAP 11(それぞれ10 μ g/ml)存在下あるいは非存在下でLPS(100 ng/ml)とインキュベーションしたあとに、TNF- α のmRNAと蛋白質の発現をノザンブロット(A)とウェスタンブロット(B)で検討した。

さらに、LPS輸送蛋白質であるLBPとLPSの結合に及ぼすペプチドの効果を調べた。その結果、LPS固定化マイクロプレートに予めLL-37とCAP 11を結合させておくと、LBPとLPSの結合がペプチドによって抑制されることがわかった(図5B)。

これらの結果から、LL-37とCAP 11は、LPSに結合することによって、LPS輸送蛋白質であるLBPとLPSの反応を阻害し、LPSがCD 14へ運搬されるのを抑制するという可能性が考えられた。

一方、筆者らは、RAW 264.7細胞をペプチドとブレインキュベーションすると、洗浄後もLPSの細胞への結合が阻害されることを見いだしてい

図5 LL-37とCAP11のLPS結合能とLPS/LBP複合体形成に及ぼす影響

- A: LPS(100 ng)を固定化したマイクロプレートに100 ngのペプチドを加え、遊離のLPS(0.05~2.5 μg)存在下あるいは非存在下でインキュベーションしてペプチドをLPSに結合させた。反応後、抗LL-37抗体あるいは抗CAP11抗体を用いてペプチドの固定化LPSへの結合を検出した。
- B: LPS固定化マイクロプレートに0.025~0.2 μgのペプチドを予め結合させたあとに血清を加えてLBPをLPSに結合させた。反応後、抗LBP抗体を用いてLBPの固定化LPSへの結合を検出した。

る⁸⁾。そこで、LL-37とCAP11がCD14分子に直接結合してLPSとCD14との結合を抑制しているのではないかと考え、その可能性について検討した。そのためにFITC標識した抗CD14中和抗体¹⁸⁾のRAW264.7細胞への結合に及ぼすペプチドの影響をフローサイトメーターで解析した。

その結果、LL-37とCAP11はLPSと同様に抗CD14中和抗体の細胞への抗体を阻害することがわかった(図6A, B)。したがって、LL-37とCAP11はCD14分子のLPS結合部位近傍に結合することによって、LPSのCD14への結合を阻害するという可能性も考えられる。

In vivoにおけるLL-37とCAP11のLPS中和作用の検討

LL-37とCAP11の作用を*in vivo*で調べるために、マウスのエンドトキシンショックモデルを用いて検討した¹⁹⁾。LPS100 ngをマウスの腹腔内投与すると、90%のマウスが24時間以内に死亡したが、この条件下で、LL-37あるいはCAP11を10 μg投与すると、生存率がそれぞれ80%と100%に上昇することがわかった(図7A)。また、

このとき、LL-37とCAP11は、LPS投与による血清TNF-αレベルの上昇を著明に低下させた(図7B)。

さらに、CD14陽性細胞である腹腔マクロファージへのFITC標識LPSの結合をフローサイトメーターで調べたところ、LL-37あるいはCAP11の投与によって腹腔マクロファージへのLPSの結合が*in vivo*で著明に抑制されることがわかった(図8A, B)。また図には示さないが、LPS刺激による腹腔マクロファージのTNF-α発現がLL-37あるいはCAP11の投与によって著明に抑制されていた⁸⁾。

まとめ

グラム陰性菌感染の際に、細胞壁破壊作用の強い抗生剤を投与すると、LPSが遊離され、エンドトキシンショックを誘発することがある^{20,21)}。しかし、今回の結果から、cathelicidinペプチドであるLL-37とCAP11は殺菌作用に加えて、LPSの作用を中和して、サイトカインの生成などを抑えて、エンドトキシンショックに対して防御的に働く可能性が考えられた。そして、LPS中和作用

図6 LL-37とCAP11のCD14分子への結合の検討

RAW 264.7細胞をFITC標識した抗CD14抗体4C1¹⁸⁾とLPS(A)、LL-37、CAP11(B)存在下あるいは非存在下でインキュベーションし、洗浄後、抗CD14抗体の細胞への結合をフローサイトメーターで調べた。BG(background)はFITC標識したコントロール抗体を添加した細胞を示す。

のメカニズムとして、ペプチドがLPSに結合して、LPS輸送蛋白質であるLBPとの反応(LPS/LBP複合体生成)を阻害し、LPS受容体であるCD14へのLPS運搬を抑制するという可能性と、CD14分子に直接結合して、LPSのCD14への結合を阻害するという可能性の二つが考えられた(図2)。

LPSは脂肪酸鎖と糖鎖からなる両親媒性物質であり、特にリン酸基やケト-デオキシ-オクトン酸(KDO)によるマイナス荷電が、その生物活性に重要であるといわれている²²⁾。

今回の結果から、プラスに荷電した両親媒性分子であるLL-37とCAP11がともにLPS中和能

図7 エンドトキシンショックに及ぼすLL-37とCAP11の効果

ガラクトサミン負荷したC57BL/6マウス¹⁹⁾にLPS(100 ng)をLL-37あるいはCAP11(それぞれ10 μ g)とともに腹腔内投与し、マウスの生存率を6日間にわたって調べた(A)。また、LPS投与後(約1時間)、心臓採血を行い血清TNF- α をELISAで定量した(B)。

を有しており、よりプラスに荷電したCAP11(pI=12.31)のほうがLL-37(pI=11.21)よりも強いLPS中和作用を示すことがわかった。また、筆者らは、デフェンシンのHNP-1、hBD-1、hBD-2のLPS中和能について検討し、これらの殺菌ペプチドがLL-37、CAP11にくらべて非常に弱いLPS中和作用しか示さないことを観察している⁸⁾。これらデフェンシンのpIが8.28~9.25であることを考えると、マイナスに荷電した両親媒性分子であるLPSの作用を中和するには、殺菌ペプチド

図 8 FITC 標識した LPS の腹腔マクロファージへの結合に及ぼす LL-37 と CAP 11 の影響

FITC 標識した LPS (100 ng) を単独 (A), あるいは LL-37, CAP 11 (それぞれ 10 μ g) とともに (B) マウスに腹腔内投与し, 約 1 時間後, 腹腔マクロファージを回収し, FITC-LPS のマクロファージへの結合をフローサイトメトリーで解析した。コントロールは FITC-LPS を投与しなかったマウスのマクロファージを示す。

のプラス荷電の程度が重要な働きをしていると考えられる。

なお, 筆者らは LL-37, CAP 11 が CD 14 分子に結合して, LPS の CD 14 への結合を阻害する可能性を示したが, LPS 結合部位としてマイナスに荷電した LPS 結合ドメインが最近同定されている^{23,24)}。したがって, LL-37, CAP 11 は CD 14 分子中のマイナス荷電の LPS 結合ドメインに結合して, LPS と CD 14 分子の相互作用を阻害する可能性が予想される。

殺菌ペプチドファミリーとしてデフェンシンと cathelicidin が知られているが, 筆者らは以前, デフェンシンと cathelicidin (LL-37 と CAP 11) の殺菌作用に対する塩の効果について検討した²⁵⁾。その結果, LL-37 と CAP 11 は細胞外液の塩濃度

と等しい 150 mM NaCl 存在下でも大腸菌とブドウ球菌に対して殺菌能を保持していたが, デフェンシンは反応系に NaCl を加えると殺菌作用がほとんど失われてしまうことを見いだした。したがって, 細胞外液中で LL-37 と CAP 11 は殺菌作用を発揮できるが, デフェンシンは殺菌作用を発揮できないものと思われる。

これらの結果と今回の結果を考え合わせると, LL-37 と CAP 11 は細胞外での殺菌作用に加えて, LPS の作用を中和しサイトカインの生成などを抑制して敗血症に伴うエンドトキシンショックに対して防御的に働く可能性が考えられる。なお, 今回筆者らは LL-37 が *in vitro* において LPS の CD 14⁺細胞への結合を抑制することを示したが ($IC_{50}=0.25 \mu$ g/ml), ヒトの血漿中には 1.18 μ g/ml の CAP 18 ペプチドが存在することが報告されている²⁶⁾。したがって, このような殺菌ペプチドがヒトの体内において防御的に作用している可能性が予想される。

抗生剤の濫用によって耐性菌の出現が問題になっている現在, LL-37 や CAP 11 などの本来生体内に存在する殺菌ペプチドの作用を見直し, それらの構造を修飾(アミノ酸置換などにより抗菌活性や LPS 中和能を強くしたり, ペプチドの安定性を高めて体内で分解されにくくする)することによって, 臨床的に感染症や敗血症の治療に使用することのできる新たな抗菌物質の開発が期待される。

文 献

- 1) 長岡 功, 石井(堤)裕子, Niyonsaba F: Defensin の感染防御と免疫応答における役割. 臨床免疫 33: 557-565, 2000.
- 2) 長岡 功: デフェンシンと innate immunity. 現代医療 33: 925-933, 2001.
- 3) Zanetti M, Gennaro R, Romeo D: Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. FEBS Lett 374: 1-5, 1995.
- 4) 平田陸正: 哺乳類がつくる抗菌蛋白質 (CAP 18) のリポ多糖中と活性と生体防御. 蛋白質質核酸酵素 46: 575-581, 2001.
- 5) 石井(堤)裕子, Niyonsaba F, 長岡 功: 殺菌ペプチド defensin と cathelicidin の生体防御における役割. 感染炎症免疫 31: 62-65, 2001.
- 6) Gudmundsson GH, Agerberth B: Neutrophil

- antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J Immunol Methods* 232 : 45-54, 1999.
- 7) Yomogida S, Nagaoka I, Yamashita T : Purification of the 11- and 5-kDa antibacterial polypeptides from guinea pig neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 328 : 219-226, 1996.
 - 8) Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Heumann D : Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP 18 and CAP 11 inhibit the expression of TNF- α by blocking the binding of LPS to CD 14⁺ cells. *J Immunol* 167 : 3329-3338, 2001.
 - 9) 平田陸正, 田村弘志, 田中重則, 小熊恵二, 長岡 功 : CAP 18 ペプチドによるエンドトキシンショックの防御. エンドトキシン研究 3 新しい局面. 山本俊輔, 小玉正智, 中野正康編, 菜根出版, 東京, 2000, p 141-148.
 - 10) Cerami A, Beutler B : The role of cathectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. *Immunol Today* 9 : 28-31, 1988.
 - 11) Kopp E, Medzhitov R : The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11 : 13-18, 1999.
 - 12) Ulevitch RJ, Tobias PS : Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 11 : 19-22, 1999.
 - 13) Aderem A, Ulevitch RJ : Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406 : 782-787, 2000.
 - 14) Brightbill HD, Modlin RL : Toll-like receptors : molecular mechanisms of the mammalian immune response. *Immunology* 101 : 1-10, 2000.
 - 15) Fenton MJ, Golenbock DT : LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 64 : 25-32, 1998.
 - 16) Schumann RR, Latz E : Lipopolysaccharide-binding protein. *Chem Immunol* 74 : 42-60, 2000.
 - 17) Kitchens RL : Role of CD 14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem Immunol* 74 : 61-82, 2000.
 - 18) Adachi Y, Satokawa C, Ohno N, Tamura H, Yadomae T : Inhibition by a CD 14 monoclonal antibody of lipopolysaccharide binding to murine macrophages. *J Endotoxin Res* 5 : 139-146, 1999.
 - 19) Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W : Galactosamine-induced sensitization of the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 5939-5943, 1979.
 - 20) Shenep JL, Barton RP, Mogan KA : Role of antibiotic class in the rate of liberation of endotoxin during therapy for experimental gram-negative bacterial sepsis. *J Infect Dis* 151 : 1012-1018, 1985.
 - 21) Kirikae T, Nakano M, Morrison DC : Antibiotic-induced endotoxin release from bacteria and its clinical significance. *Microbiol Immunol* 41 : 285-294, 1997.
 - 22) Seydel U, Schromm AB, Blunck R, Brandenburg K : Chemical structure, molecular conformation, and bioactivity of endotoxins. *Chem Immunol* 74 : 5-24, 2000.
 - 23) Juan TSC, Hailman E, Kelley MJ, Busse LA, Davy L, Empig CJ, Narhi LO, Wright SD, Lichenstein HS : Identification of a lipopolysaccharide binding domain in CD 14 between amino acids 57 and 64. *J Biol Chem* 270 : 5219-5224, 1995.
 - 24) Stelter F : Structure/function relationships of CD 14. *Chem Immunol* 74 : 25-41, 2000.
 - 25) Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M : Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm Res* 49 : 73-79, 2000.
 - 26) Sorensen O, Cowland JB, Askaa J, Borregaard N : An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J Immunol Methods* 206 : 53-59, 1997.