

報告

好中球におけるプレセプシンの産生メカニズムに関する検討

溝越 祐志¹⁾ 加藤 健吾¹⁾ 澤村 暢¹⁾ 澁谷 雪子¹⁾ 野村 秀明^{1), 2)}**Neutrophils can produce presepsin
in phagocytosis-independent pathways.**Yuji MIZOKOSHI¹⁾, Kengo KATO¹⁾, Toru SAWAMURA¹⁾
Yukiko SHIBUYA¹⁾, and Hideaki NOMURA^{1), 2)}

要 旨

プレセプシンは敗血症マーカーの一つで、単球において貪食により産生されることが知られているが、単球以外からの産生の報告はない。本研究では好中球からのプレセプシン産生の可能性、及びその産生機序を探索するため、好中球を用いたプレセプシン産生実験及び、貪食、プロテアーゼ阻害実験を行った。好中球を大腸菌で刺激することによりプレセプシン産生が認められた。次にアクチン重合阻害薬による貪食阻害を行ったが、プレセプシン濃度の有意な減少は認められなかった。また、セリンプロテアーゼ阻害薬添加によりプレセプシン濃度は有意に減少したが、一方で好中球エラスターゼ阻害剤の添加ではプレセプシン産生に有意な減少は認められなかった。以上からプレセプシンは単球と同様に好中球からも産生されるが、その産生経路は貪食以外のものであることが示唆された。さらに、エラスターゼ以外のセリンプロテアーゼも産生に関与する可能性が推測された。

キーワード：敗血症、プレセプシン、好中球、貪食、好中球エラスターゼ

Summary

Presepsin, which is produced in monocytes via its phagocytosis, is one of the biomarker proteins for sepsis, but it is unknown whether other cells secrete presepsin besides monocytes. To clarify the mechanism of presepsin production, we studied presepsin production from neutrophils and effects of inhibitors of phagocytosis and serine protease. We confirmed that presepsin levels increased significantly when neutrophils were stimulated by *Escherichia coli* (*E. coli*). In phagocytosis blocking assay, no presepsin changes were observed nevertheless phagocytosis were weakened in the cells treated

1) 保健科学部医療検査学科 2) 教育イノベーション機構

cytochalasin D for blocking actin polymerization. In addition, presepsin production of the cells treated with serine protease inhibitor were significantly decreased, on the other hand in cells treated neutrophil elastase inhibitor, presepsin production were a little suppressed. These results indicate that neutrophils as well as monocytes produce presepsin but different pathways from the phagocytosis, and furthermore serine proteases other than elastase may be involved in presepsin production.

Key words : sepsis, presepsin, neutrophil, phagocytosis, neutrophil elastase

緒言

プレセプシンは敗血症時に血中濃度が上昇する蛋白質で、敗血症マーカーとして臨床応用されている。単球など一部の免疫細胞膜上には CD14 が発現しており、その CD14 が切断されて生じる N 末端側フラグメントタンパクがプレセプシンであるということが知られている¹⁾。CD14 はグラム染色陰性菌の成分であるリポポリサッカライドと結合し、TLR4 を介して細胞を活性化させる働きをもつが²⁾、一方でプレセプシンはグラム陽性菌、陰性菌のどちらの感染においても産生が惹起されることが報告されている³⁾。また、菌体成分であるリポポリサッカライドやペプチドグリカンだけでは産生が惹起されないという特徴を持つことから⁴⁾、CD14 の機能とはまた別の機構がプレセプシン産生のトリガーとなることが考えられ、そのメカニズムの解明が進められている。

近年、単球が菌を貪食する際に、細胞膜上に発現する CD14 がリソソーム内に取り込まれ、消化酵素

であるエラスターゼによって分解されることでプレセプシンが分泌されることが報告されたが(図1)⁴⁾、単球以外からのプレセプシン産生についてはわかっていない。

そこで、我々は単球と同様に CD14 が発現し、かつ貪食機能を持つ好中球からもプレセプシンが産生されると仮説をたて、好中球からのプレセプシン産生及びその機序を解明する目的で検討を行った。

材料および方法

1. ヒト末梢血好中球の分離

健康人からの採血は本学研究倫理委員会で承認を得たうえで、健康人ボランティアに本実験を説明し、同意を得たうえで末梢血採血を行った。血液にヘパリンを最終濃度 10U/mL 添加後、等量の 2% デキストラン 500 (SIGMA) と混和し、室温で 30 分静置することで赤血球を沈降させた。その後比重 1.090 に調製した Percoll PLUS (GE Health care Life Sciences) を 20,000G、20 分遠心したものに、赤沈後の上清を重層し、450~500G、25 分室温で遠心し、好中球を回収した。回収した好中球は phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、自動血球分析装置 Xs 800-i (Sysmex 社) で細胞数及び好中球の割合を測定し、94% 以上のものを使用した。

2. *E. coli* 添加実験

培地は 56°C で 30 分間非働化した 10% Fetal bovine serum (FBS: SIGMA) を含む RPMI-1640 (SIGMA) を使用した。細胞数を 5.0×10^6 cells/mL に調製し、蛍光大腸菌である pHrodo® Green *E.*

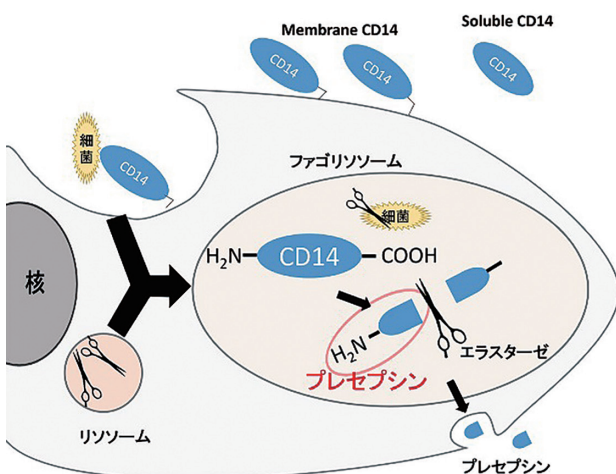


図1 単球におけるプレセプシン産生機序

coli BioParticles® (*E. coli*; Life technologies) を最終濃度0.5mg/mL 添加し、96well plate に200 μ L/well 播種した。37°C、5% CO₂存在下で3時間培養後、培養後上清及び細胞を回収し、上清中のプレセプシン濃度またはエラスターゼ活性の測定、及び細胞を用いたフローサイトメトリー解析を行った。プレセプシン濃度は PATHFAST™ Presepsin⁵⁾ により測定した。

3. 阻害薬添加実験

食食を阻害するためサイトカラシンD (Cyt D, 10 μ M; SIGMA) とコントロールとしてジメチルスルホキシド (DMSO) を、プロテアーゼ阻害のため4-(2-アミノエチル) ベンゼンスルホンフルオリド塩酸塩 (AEBSF, 0.5 mM; Wako) またはシベレスタットナトリウム (100 μ M; SIGMA) とコントロールとして滅菌水を用いた。細胞懸濁液に阻害薬を *E. coli* 添加前に加え、37°C、5% CO₂存在下でサイトカラシンD添加の場合は15分、AEBSF またはシベレスタットナトリウム添加の場合は30分静置した。

4. 食食能の評価

食食能は細胞内に取り込まれた *E. coli* 量を蛍光強度として測定することにより計測した。*E. coli* と共培養した細胞をPBSで2回洗浄後、500 μ LのPBSで再懸濁したのちフローサイトメトリーにより蛍光強度を測定した。フローサイトメトリーはFACS Calibur (BD biosciences) を、解析にはCell Quest pro (BD biosciences) を用いた。

5. 好中球エラスターゼ活性

エラスターゼ活性測定緩衝液 (0.1 M HEPES, 0.5 M NaCl, pH 7.5) に基質である1mM メトキシスクシニル -Ala-Ala-Pro-Val-p ニトロアニリド (SIGMA) を加えエラスターゼ活性測定反応液とした。反応液150 μ L に培養上清50 μ L を加え37°C 6時間静置後、遊離されたp ニトロアニリド量を405nmの吸光度により測定した。検量線は既知の

濃度のp- ニトロアニリン (Wako) を用いて作成した⁶⁾。

6. 統計解析

Student の T 検定または Welch の T 検定をおこない、危険率を5%で設定した。

P < 0.05の場合を有意差があると判定し、*P < 0.05、**P < 0.01で示した。

結果

1. *E. coli* 添加実験

好中球からのレセプシン産生を検討する目的で、好中球への *E. coli* 添加群と未添加群の上清中のプレセプシン濃度の比較を行った。検討に使用した3検体は全て好中球の割合が94%以上であった。*E. coli* 未添加群の上清中のプレセプシン値が8.24 \pm 2.17 pg/mL (平均 \pm 標準偏差)、添加群では74.1 \pm 24.4 pg/mL であり、*E. coli* を添加した群で有意にプレセプシン値が上昇した (図2)。

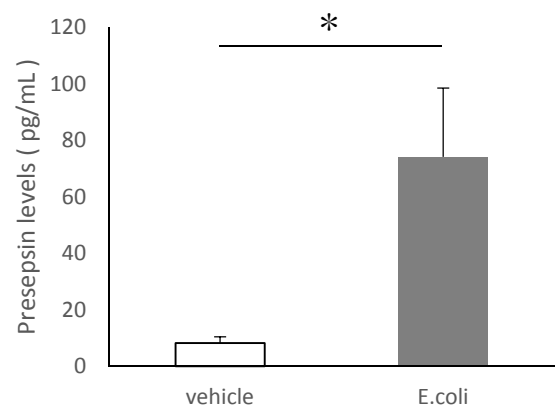


図2 *E. coli* 添加によるプレセプシン産生

実験は異なる3人の健常者から分離した好中球で実施、エラーバー=標準偏差、* P < 0.05

2. 食食阻害剤のプレセプシン値への影響

好中球にアクチン重合阻害剤であるサイトカラシンDを処理することで、食食を阻害した際のプレセプシン濃度の測定を行った。まず、食食が抑制されているかを確認するため、サイトカラシンD (10 μ M) 処理群と、未処理群の *E. coli* の食食の程度をフローサイトメトリーで測定した (図3-A, B)。

食食した *E. coli* 数が増加するほど細胞数のピークは右方向に移行し、より食食能が強いことを示す。サイトカラシンD処理好中球（赤）は未処理好中球（黒）と比較して、ピークが左に移行しており、食食が抑制されていた（図3-A）。同様の結果が異なる2人のドナー検体からも得られ、3検体の平均蛍光強度はサイトカラシンD処理により有意に減少していた（図3-B）。上清中のプレセプシン濃度は、*E. coli* 未添加群で 2.10 ± 3.64 pg/mL、サイトカラシンD未処理群で 49.9 ± 18.08 pg/mL、及び処理群で 60.0 ± 25.7 pg/mL であり、未処理群と比較して処理群で有意な減少は認められなかった（図3-C）。

3. プロテアーゼ阻害剤のプレセプシン産生への影響

シベレスタットナトリウム（ $100 \mu\text{M}$ ）処理群と、未処理群の上清中のエラスターゼ活性測定結果を図4-Aに示す。基質の生成物である p-ニトロアニリン濃度はシベレスタット未添加群で $373 \pm 84.8 \mu\text{M}$ 、添加群で $12.7 \pm 4.18 \mu\text{M}$ であり、エラスターゼ阻害率は96.6%であった。上清中のプレセプシン濃度は阻害薬未添加群で 47.7 ± 21.2 pg/mL、AEBSF 処理群で 7.20 ± 1.28 pg/mL、及びシベレスタットナトリウム処理群で 30.7 ± 15.1 pg/mL となり、阻害薬未処理群と比較して AEBSF 処理群で有意に減少したが、シベレスタットナトリウム処理群では有意な減少は認められなかった（図4-B）。

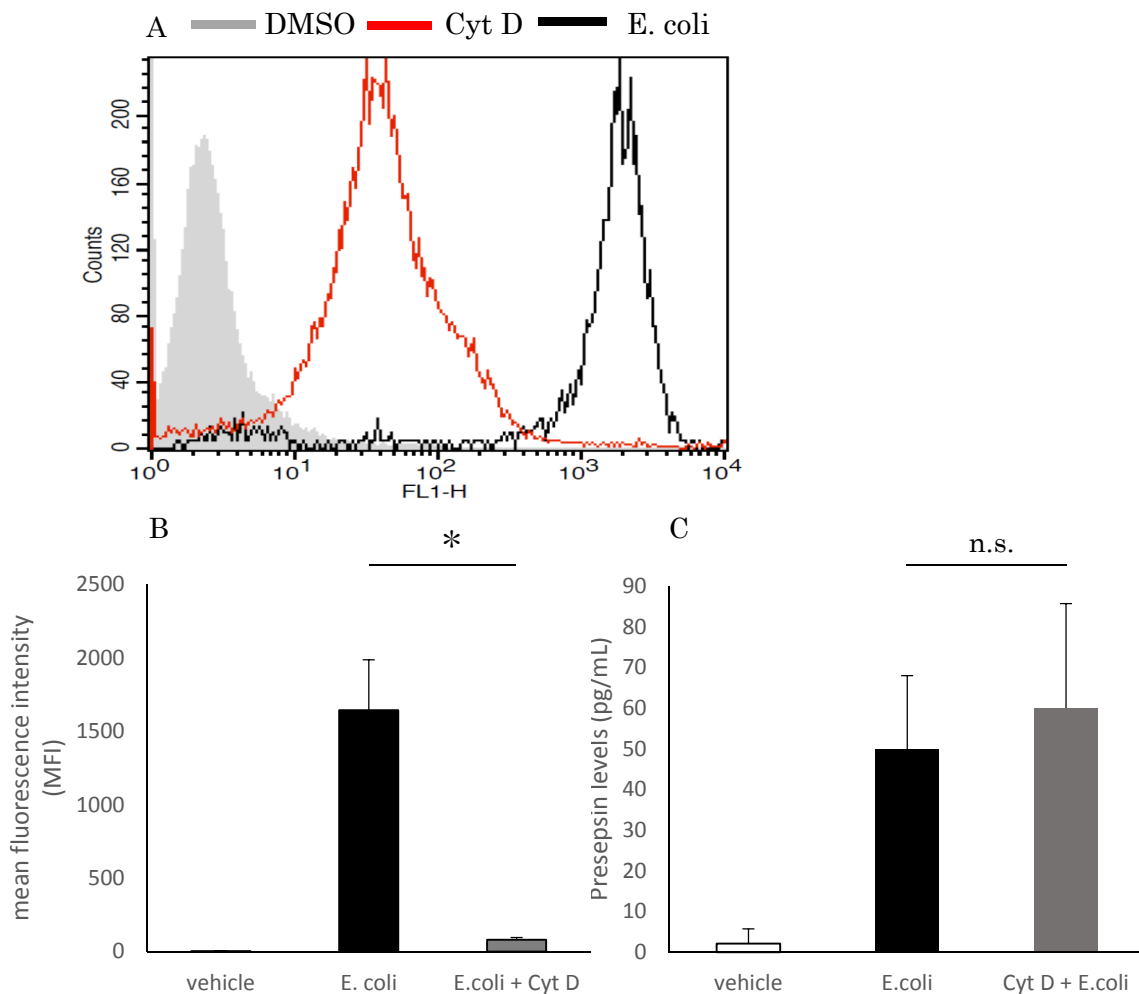


図3 食食阻害のプレセプシンへの影響

- A. vehicle (gray, filled)、Cytchalsin D + *E. coli* (red) 及び *E. coli* (black) 条件下での各々の蛍光強度のヒストグラムデータ
- B. 実験は異なる3人の健常者から分離した好中球で実施、エラーバー＝標準偏差、* P < 0.05
- C. 培養上清中のプレセプシン濃度、実験は異なる3人の健常者から分離した好中球で実施、エラーバー＝標準偏差、n.s = not significant

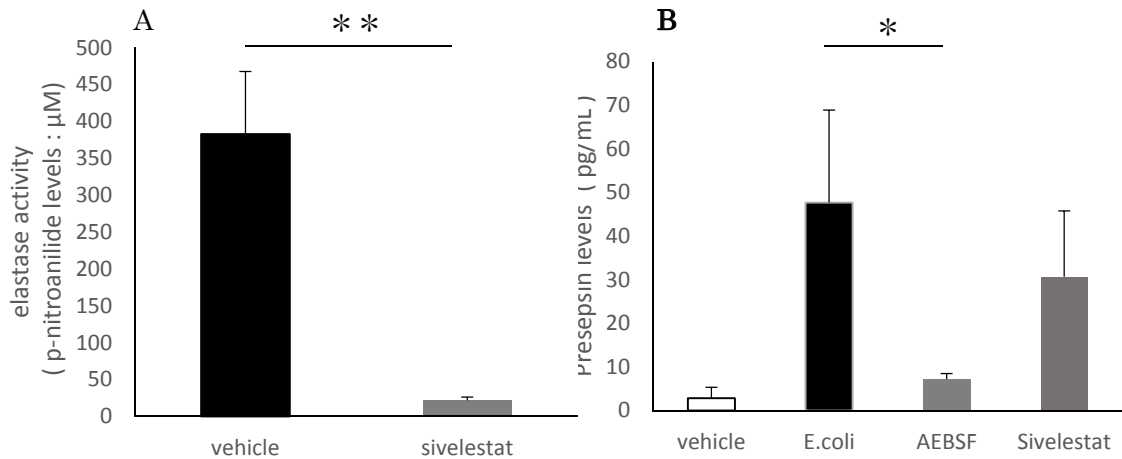


図4 セリンプロテアーゼ阻害のプレセプシンへの影響

- A. 培養上清中のエラスターゼ活性 (p- ニトロアニリン濃度)、実験は異なる4人の健常者から分離した好中球で実施、エラーバー=標準偏差、** P < 0.01
 B. 実験は異なる4人の健常者から分離した好中球で実施、エラーバー=標準偏差、* P < 0.05

考 察

単球と大腸菌の共培養によりプレセプシンが増加することが報告されているが⁴⁾、好中球においても同様の結果が得られた (図2)。今回の我々の検討では、大腸菌で刺激した際の好中球から産生されるプレセプシン値は約60pg/mLであったが、一方単球からのプレセプシン産生は約600pg/mLと報告されている⁴⁾。好中球からの産生量が単球からの産生量よりも少ないことから、ヒトの体内におけるプレセプシン産生量も単球優位である可能性が高いと考えられる。また、フローサイトメトリーによる末梢血細胞表面のCD14発現量解析では、好中球と比較して単球で10倍以上CD14の発現量が多いことが示された。以上の結果から、CD14の発現量が要因で、プレセプシン産生量の差が生じている可能性が考えられる。

単球においては貪食がプレセプシン産生の主な経路であり、膜に結合している membrane CD14 (mCD14) が細胞内に取り込まれた後、切断されてプレセプシンが産生されることが報告されているが⁴⁾、サイトカラシンD処理による貪食阻害条件下での好中球のプレセプシン産生量に有意な抑制は認められなかった (図3)。サイトカラシンDは貪食の他に、微粒子を取り込むマイクロピノサイトーシスも阻害することが知られており、取り込む粒子、

小胞のサイズに関わらずエンドサイトーシスを阻害する。これらのことから、mCD14も細胞内への取り込みが抑制されていると推測され、好中球においては貪食が関与せず、mCD14の細胞内への取り込みを必要としない産生機序が存在することが示唆された。

また、単球においてはセリンプロテアーゼに属する好中球エラスターゼによって、CD14が切断されることでプレセプシンが生じることも報告されている⁴⁾。我々はセリンプロテアーゼ及び好中球エラスターゼを阻害した際のプレセプシン濃度の測定を行った (図4)。セリンプロテアーゼ阻害剤であるAEBSFを処理することで、プレセプシン産生が有意に減少したことから、好中球においても単球と同様セリンプロテアーゼがCD14を切断しプレセプシンを産生していると考えられた。しかし、シベレスタットナトリウム処理により、エラスターゼを阻害した検討では、プレセプシン産生の有意な減少は認められず、産生にはエラスターゼ以外のセリンプロテアーゼが関わっている可能性が考えられた。

好中球から産生されるセリンプロテアーゼは菌感染を防ぐために大きな役割を果たしており、抗菌性のセリンプロテアーゼは好中球エラスターゼの他にも、プロティナーゼ3、カテプシンG、及び好中球セリンプロテアーゼ4などが顆粒内に存在することが知られている⁷⁾。また、これらのプロテアーゼ

が働く機構も、貪食だけでなく、ネクロシスなど細胞の破裂にともなうプロテアーゼの流出、脱顆粒による細胞外への放出、DNA や顆粒内タンパクを能動的に放出し細菌をトラップする Neutrophil Extracellular Traps (NETs) 等が存在し⁷⁾⁸⁾、プレセプシン産生経路を特定するうえで考慮する必要がある。また、単球においては mCD14 が切断されてプレセプシンが産生されると考えられているが、プロテアーゼを細胞外に放出する好中球においては血中に存在する可溶性 CD14 (soluble CD14 : sCD14) が分解されている可能性も否定できない。今回の我々の in vitro の条件では培養上清から sCD14 は検出されず、単球と同様に mCD14 が産生に関与していると考えられた。しかし、in vivo においては、健常人のプレセプシン濃度は約 300 pg/mL 存在する一方で⁹⁾、sCD14 は血中に約 2 μg/mL 存在し¹⁰⁾、プレセプシン濃度と比較して約 1 万倍多いことが示されている。そのため、sCD14 からプレセプシンが産生される経路が存在する場合、少量の sCD14 の分解でもプレセプシンの上昇が認められる可能性が考えられ、sCD14 に依存するプレセプシン産生経路の存在を精査することは敗血症マーカーとしてのプレセプシンの特徴を考察する上でも重要であり、今後の課題といえる。

結 語

本研究によりプレセプシンは単球だけでなく、好中球からも産生されることが実証された。また、好中球では貪食以外の産生経路でプレセプシンが産生されること、及びエラスターゼ以外のセリンプロテアーゼも産生に関与する可能性が示唆された。今後は、プレセプシン産生に必要なプロテアーゼの特定及び、そのプロテアーゼがどのような機序で、mCD14 または sCD14 を切断するかを解明する必要がある。

なお、本研究は、平成26年度神戸常盤大学テーマ別研究「新規敗血症マーカープレセプシンの産生メ

カニズム」 として研究助成を受けました。

文献

- 1) Shirakawa, K.; Naitou, K.; Hirose, J.; Takahashi, T.; Furusako, S. Presepsin (sCD14-ST): development and evaluation of one-step ELISA with a new standard that is similar to the form of presepsin in septic patients. *Clin Chem Lab Med.* 2011 May 49, 5, 937-939.
- 2) Miyake, K.; Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int Immunopharmacol.* 2003. Jan 3. 1. 119-128.
- 3) Endo, S.; Suzuki, Y.; Takahashi, G.; Shozushima, T.; Ishikura, H.; Murai, A.; Nishida, T.; Irie, Y.; Miura, M.; Iguchi, H.; Fukui, Y.; Tanaka, K.; Nojima, T.; Okamura, Y. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *J Infect Chemother.* 2012 Dec 18. 6. 891-897.
- 4) Arai, Y.; Mizugishi, K.; Nonomura, K.; Naitoh, K.; Takaori-Kondo, A.; Yamashita, K. Phagocytosis by human monocytes is required for the secretion of presepsin. *J Infect Chemother.* 2015. Aug 21. 8. 564-569.
- 5) Okamura, Y.; Yokoi, H.; Development of a point-of-care assay system for measurement of presepsin (sCD14-ST). *Clin Chim Acta.* 2011. Nov 20. 412. 23-24. 2157-2161..
- 6) Theresa, C. Barnes.; Andy, Cross.; Marina, E.; Anderson, Steven; W, Edwards.; Robert, J. Moots.; Relative α 1-anti-tryptase deficiency in systemic sclerosis. *Rheumatology.* 2011. 50. 1373-1378.
- 7) Stapels, DA.; Geisbrecht, BV.; Rooijackers, SH. Neutrophil serine proteases in

- antibacterial defense. *Curr Opin Microbiol.* 2015. Feb. 23. 42-48.
- 8) Brinkmann, V; Reichard, U; Goosmann, C; Fauler, B; Uhlemann, Y; Weiss, DS; Weinrauch, Y; Zychlinsky, A; Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004. Mar 5. 1532-1535.
- 9) Shozushima, T.; Takahashi, G.; Matsumoto, N.; Kojika, M.; Okamura, Y.; Endo, S.; Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Chemother.* 2011. Dec 17. 6. 764-769.
- 10) Nocker, WA.; Bergmann, L.; Scherberich JE.; Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients, *Clin Exp Immunol.* 1994. Dec 98. 3. 369-374.