Identification of organs of origin of macrophages that produce presepsin via neutrophil extracellulart trap phagocytosis

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2025-09-22 キーワード (Ja): キーワード (En): presepsin, macrophage, neutrophil, extracellular traps, sepsis, biomarker 作成者: Kondo, Akihiro メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.50850/0002000064

第５号様式（第７・８条関係）

博 士 論 文 要 旨

所　　属　臨床検査学専攻博士後期課程

学籍番号	222DS01	氏　名	近藤 明宏

（博士論文題目）
好中球細胞外トラップ貪食を介したプレセプシン産生マクロファージの由来臓器の特定
（Identification of organs of origin of macrophages that produce presepsin via neutrophil extracellular trap phagocytosis）

キーワード：presepsin, macrophage, neutrophil extracellular traps, sepsis, biomarker

（目的）
プレセプシン (P-SEP) として知られる可溶性 CD14 サブタイプは、リポ多糖の受容体である CD14 の N 末端断片で、敗血症のバイオマーカーとして臨床現場で用いられている。我々は、P-SEP 産生機序の解明を目的とした研究を進める中で、好中球から細胞外に放出された好中球細胞外トラップ (NETs) を単球が貪食するために P-SEP が産生されることを報告した。しかしながら、単球は末梢血中の白血球に占める割合が低く、末梢血での滞留時間も短いことから、組織中で異物の貪食を行う M1 マクロファージ (M1 MΦ) が主な P-SEP 産生細胞であると考えた。本研究では、健常者の単球から分化させた M1 MΦ を用いて、M1 MΦ が NETs 貪食後に P-SEP を産生するという仮説を検証し、敗血症モデルマウスを用いて、P-SEP を産生する M1 MΦ の由来臓器を特定することを目的に研究を行った。
（方法）

1. *in vitro* 実験

1) 好中球の単離と好中球細胞外トラップの誘導

研究について同意が得られた健常者から EDTA-2K 採血管に末梢血を採血した。血球分離溶液を用いて健常者末梢血から好中球を回収し、細胞培養用 24 well plate に播種した (2.0×10^6 細胞/well)。NETs 誘導試薬 PMA を 50 nM となるように好中球に添加し、37℃で 2 時間刺激して NETs を誘導した。また、光学濃度 (OD) 1.0 に調整したホルマリン固定 *E. coli* DH5α (DH5α) 菌液を好中球に添加し、37℃で 4 時間刺激して NETs を誘導した。

2) 単球の単離と M1 MΦ への分化誘導

血球分離溶液を用いて健常者末梢血から単核細胞を回収し、単球単離試薬によって単球を単離した。単離単球は、GM-CSF を含む専用培地で培養することで M1 MΦ に分化させた。

3) M1 MΦ の NETs 貪食像と P-SEP 産生像の観察

誘導した NETs を回収し、NETs を含む好中球懸濁液を作製した。24 well plate の底に丸形カバーガラスを置き、好中球懸濁液と同一被験者の M1 MΦ (5.0×10^5 細胞/well) を播種

して37℃で180分間共培養した。共培養後、細胞をメイギムザ染色し、生物顕微鏡下でM1 MΦのNETs貪食像を観察した。

また、共培養後、細胞を固定し、抗シトルリン化ヒストンH3 (Cit-H3) 抗体、抗CD68抗体、抗P-SEP抗体を用いて免疫蛍光染色した。カバーガラスを80%グリセロールで封入し、共焦点顕微鏡下でNETs貪食M1 MΦのP-SEP産生像を観察した。

4) PATHFASTによるNETs貪食M1 MΦが産生したP-SEPの測定

NETsを含む好中球懸濁液と同一被験者のM1 MΦを180分間共培養後、自動免疫分析装置PATHFASTを用いて培養液上清のP-SEP値を測定した。対照には同一被験者のM1 MΦと未刺激の好中球を共培養したものを使用した。

5) フローサイトメトリー法によるNETs貪食M1 MΦ内に産生されたP-SEPの測定

M1 MΦとNETsを共培養後、細胞膜透過処理を行った細胞に抗CD45抗体、抗CD14抗体、抗P-SEP抗体を添加し、フローサイトメーターを用いて、CD14陽性M1 MΦの細胞内P-SEP産生量を測定した。

6) ウェスタンブロッティング法によるNETs貪食M1 MΦが産生したP-SEPの検出

M1 MΦとNETsを共培養後、細胞浮遊液を全量回収し、ウェスタンブロッティング法によってP-SEPとβ-actinを検出した。各蛋白のバンドの解析にはImage Jソフトウェアを使用し、P-SEPのバンドの強度を内部コントロールであるβ-actinのバンドの強度で補正することにより、P-SEP蛋白量を定量化した。

7) M1 MΦのP-SEP産生における阻害剤の影響

M1 MΦに貪食させるNETsの形成阻害にはDPIを使用した。好中球を10 μMのDPIで30分間処理後、50 nMのPMAを添加した。NETs形成阻害後の好中球とM1 MΦを180分間共培養し、培養液上清のP-SEP値を測定した。

M1 MΦの食食阻害にCytochalasin Dを使用し、蛋白分解酵素Cathepsin Dの阻害にPepstatin Aを使用した。NETsと共培養前に、M1 MΦを50 μMのCytochalasin Dまたは50 μMのPepstatin Aで30分間処理した。NETsと阻害剤処理後のM1 MΦを180分間共培養し、培養液上清のP-SEP値を測定した。

また、各阻害剤添加後のM1 MΦとNETsを共培養15分後に回収し、ウェスタンブロッティング法によってP-SEPを検出した。

2. *in vivo* 実験

1) ELISA法を用いた敗血症モデルマウス血漿中のNETs比率とP-SEP値の評価

7-9週齢の雄のC57BL/6JJclマウスに対して、麻酔下で盲腸結紮穿刺 (CLP) を行い、マウスに敗血症を誘発させた。CLP 12時間後、心臓採血を行い、血漿を回収した。

ELISA法を用いてNETsに含まれるDNA-ヒストン複合体を検出し、マウス血漿中に放出されたDNA-ヒストン複合体濃度をNETs比率として評価した。マウス血漿P-SEP値についても同様にELISA法を用いて測定した。

2) フローサイトメトリー法を用いたマウスMΦ内P-SEPの測定

CLP 12時間後、麻酔下でマウスを開腹し、肺、肝臓、脾臓、腎臓を摘出した。未固定の臓器から細胞を回収し、抗Ly6C抗体、抗P-SEP抗体を添加して細胞を染色後、フローサイトメトリーを用いて、マウスMΦの細胞内P-SEP産生量を測定した。

3) 免疫蛍光染色によるP-SEP産生MΦの局在化

CLP 12時間後、マウスから摘出した肺、肝臓、脾臓、腎臓を20%ホルマリンで24時間

固定し、パラフィンに包埋した。薄切した切片を120℃で15分間オートクレーブ処理し、抗原を賦活化した。ブロッキング後、抗Ly6C抗体、抗マウスP-SEP抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡下でLy6C陽性のMΦと細胞内P-SEPの局在を観察した。

3. 統計分析

Student's *t*-検定を用いて2群間の平均値を比較し、$p < 0.05$ を統計的に有意であるとした。

（結果）

1. NETsを貪食したM1 MΦは細胞内でP-SEPを産生し、細胞外にP-SEPを放出する

生物顕微鏡下で細胞像を観察すると、M1 MΦとNETsの共培養後には、M1 MΦによるNETsや死細胞の貪食像を認めた。共焦点顕微鏡下でもCD68陽性のM1 MΦがCit-H3陽性のNETsを貪食して、細胞内でP-SEPを産生する細胞像を確認した。

NETsを貪食したM1 MΦの経時的な細胞内P-SEP産生量解析を行うと、フローサイトメーターで測定したP-SEPの平均蛍光強度は共培養15分後にピークとなり、その後は緩やかに低下した。これに対して、培養液上清のP-SEP値は共培養30分後から緩やかに増加して180分後にピークとなった。また、NETsと共培養後に細胞を回収し、ウェスタンブロット法によってP-SEPを検出すると、共培養15分後に最も高値となり、M1 MΦにおけるNETs貪食後のP-SEP産生動態が明らかになった。

2. 好中球のNETs形成阻害と、M1 MΦの貪食阻害によってP-SEP産生が抑制される

M1 MΦとNETsの共培養後の培養液上清のP-SEP値は119.7±10.8 pg/mLであったが、DPIによるNETs形成を阻害した好中球との共培養後には56.8±2.5 pg/mLとP-SEP値が有意に低下した。また、Cytochalasin DによってM1 MΦの貪食を阻害すると、NETsと共培養後であっても48.9±3.1 pg/mLとP-SEP値が有意に低下した。同様に、Pepstatin AによってM1 MΦの蛋白分解酵素Cathepsin Dを阻害しても68.6±1.6 pg/mLとP-SEP値が有意に低下した。さらに、ウェスタンブロット法でP-SEPを検出すると、NETsの形成阻害、M1 MΦの貪食能阻害、およびCathepsin D阻害後のいずれもP-SEP蛋白量は有意に低下していた。

3. 敗血症モデルマウスでは血漿中のNETs比率が増加するためにP-SEP値が高値を示す

ELISA法によって各群のマウス血漿からDNA-ヒストン複合体を検出し、NETs比率として評価すると、CLP群のNETs比率はSham群と比較して著明に高値であった。また、Sham群では血漿P-SEP値が24.4±3.7 pg/mLであるのに対して、CLP群では123.9±11.0 pg/mLと有意に高値を示した。

4. 敗血症モデルマウスでは肺、肝臓、腎臓のMΦによってP-SEPが産生される

フローサイトメトリー法によって、マウスの肺、肝臓、脾臓、腎臓に含まれるLy6C陽性MΦを解析すると、Sham群では、MΦが最も多く存在する臓器は肺であり、肝臓、脾臓、腎臓のMΦは少数であった。CLP群では、Sham群よりも各臓器に含まれるMΦが有意に増加し、特に肺と肝臓で著明に増加していた。また、CLP群では肺、肝臓、腎臓のMΦがP-SEPを顕著に産生していたが、脾臓のP-SEP産生量は、肺、肝臓、腎臓に比べて少量であった。

各臓器の免疫蛍光染色の結果も同様に、Sham群ではP-SEP陽性のMΦは少数であるが、CLP群の肺、肝臓、腎臓のMΦはP-SEPが著明に陽性を示した。これらのことから、主なP-SEPの産生臓器は肺、肝臓、腎臓であることを特定した。

（考察）

敗血症のバイオマーカーであるP-SEPの産生機序を解明することは、敗血症の迅速診断のために重要である。本研究では、健常者のM1 MΦと、同一人物の好中球から誘導したNETsを

共培養することにより、M1 MΦ が NETs を貪食して P-SEP を産生することを明らかにした。

in vitro 実験では、M1 MΦ が NETs 貪食後 15 分で細胞内に P-SEP を産生し、細胞外への P-SEP 放出は 180 分後にピークに達した。この結果は、敗血症患者における血漿 P-SEP 値が上昇する時間と一致しており、我々の実験結果が臨床における P-SEP 産生を反映していることを示している。以上より、我々は M1 MΦ の NETs 貪食を介した詳細な P-SEP 産生動態を初めて報告する。さらに P-SEP の半減期が 240 分と短い上に、M1 MΦ における P-SEP 産生が短時間で行われることから、P-SEP が敗血症の早期診断に有用であることを証明した。

M1 MΦ と NETs の共培養後には、培養液上清の P-SEP 値が高値を示した。また、NETs 比率と P-SEP 値には統計学的に有意な相関を認めたことから、P-SEP 産生には NETs の貪食が大きく関与していることが証明された。さらに、M1 MΦ が NETs を貪食して P-SEP を産生することを確認するため、NETs 形成阻害試験、M1 MΦ の貪食阻害試験と蛋白分解酵素 Cathepsin D 阻害試験を実施した。いずれも阻害試験後に P-SEP 産生量が減少したことから、M1 MΦ が CD14 を多く含む NETs を貪食後、細胞内に取り込んだ CD14 を Cathepsin D によって分解し、P-SEP を産生すると結論付けた。

生体内の MΦ の機能は存在する臓器によって異なることが報告されており、我々は特に死細胞の除去に関与している肺、肝臓、脾臓の MΦ に注目した。また、慢性腎不全患者では尿中 P-SEP 濃度が上昇するという報告から、腎臓の M1 MΦ も P-SEP 産生に関与している可能性が示唆されている。よって本研究では、敗血症モデルマウスの肺、肝臓、脾臓、腎臓における MΦ の P-SEP 産生量を比較して、P-SEP 産生 M1 MΦ の由来臓器を探索した。*in vivo* 実験では、敗血症を発症した CLP 群のマウスの血漿中 NETs 比率と P-SEP 値は、Sham 群のマウスよりも有意に高値であり、*in vivo* においても NETs 比率と P-SEP 値に相関を認めた。フローサイトメトリー法を用いた細胞内 P-SEP 産生評価では、CLP 群では敗血症の発症に伴い、各臓器に MΦ が増加し、P-SEP 産生量も増加した。CLP 群の臓器ごとに P-SEP 産生量を比較すると、肺、肝臓、腎臓で顕著に増加しており、敗血症時には、末梢血から肺、肝臓、腎臓内に移行した単球が M1 MΦ に分化して、NETs を貪食するために P-SEP が産生されることを *in vivo* で明らかにした。CLP 群でも脾臓の P-SEP 産生量は、肺、肝臓、腎臓に比べて少ないことから、P-SEP 産生 M1 MΦ の由来臓器が、肺、肝臓、腎臓であることを特定した。好中球から放出された NETs は自然免疫において中心的な役割を果たしているが、増加した NETs は組織損傷や臓器機能障害を引き起こすほか、組織 MΦ を M1 MΦ に転換するために、炎症を促進して臓器障害を悪化させることが報告されている。これらの報告から、敗血症患者の体内で形成された NETs が、肺、肝臓、腎臓の M1 MΦ を増加させていることが考えられる。P-SEP 産生 M1 MΦ の由来臓器を特定したことは、P-SEP 測定が敗血症時の肺、肝臓、腎臓における臓器障害の評価、および治療効果判定に有用である可能性を示している。

（結論）

我々は、M1 MΦ が NETs を貪食するために P-SEP が産生される細胞内動態を初めて明らかにした。さらに、敗血症モデルマウスの血漿中 NETs 比率と P-SEP 値が有意に高値を示し、肺、肝臓、腎臓の MΦ が、P-SEP を顕著に産生していたことから、敗血症で P-SEP を産生する M1 MΦ の由来臓器が、肺、肝臓、腎臓であることを特定した。本研究で解明した P-SEP 産生の詳細な細胞学的メカニズムは、P-SEP 値が NETs の動向を反映することを示しており、P-SEP をモニタリング測定することで、敗血症時の肺、肝臓、腎臓における NETs 由来の臓器障害の評価や、治療効果判定に応用できる可能性が示唆された。