神戸常盤大学紀要　Vol.11, pp.97－106, 2018　　　　神戸常盤大学紀要　　第11号　2018

原著

貪食を介さないプレセプシン産生機序に関する検討

溝越　祐志[1)]　澤村　暢[1)]　鈴木　高史[1)]

Mechanism of presepsin production through a phagocytosis - independent pathway

Yuji MIZOKOSHI[1)], Toru SAWAMURA[1)], and Takashi SUZUKI[1)]

要旨

プレセプシンは敗血症のバイオマーカーであり、単球膜上のCD14が貪食時に分解され産生される。しかし、プレセプシンは健常人にも存在しており、その産生機序についての報告はない。本研究では健常人からのプレセプシン産生機序を探索するため、単球系に分化させたHL-60および、CD14を発現させた293T細胞における病原体関連分子パターン(PAMPs)刺激によるプレセプシン産生を検討した。

HL-60、293T細胞ともに、*Escherichia coli (E. coli)* 刺激がない状態においてもプレセプシン産生が認められた。しかし *E. coli* 刺激により産生が増強されたのはHL-60のみであった。これらの結果から健常人の体内においても *E. coli* などのPAMPs刺激を必要としないプレセプシン産生経路が存在し、敗血症時に免疫細胞内で起こる経路とは異なることが示唆された。

キーワード：敗血症、プレセプシン、貪食、CD14

Summary

Presepsin, produced by CD14 degradation in monocytes, is one of the biomarker proteins for sepsis. Moreover, healthy people also have presepsin ; however, no studies have elucidated the mechanism of presepsin production in healthy bodies. To clarify the mechanism of presepsin production in healthy individuals, we studied whether HL-60 induced to differentiate in monocyte and human embryonic kidney (HEK) 293 T cells expressing CD14 can produce presepsin by the stimulation of pathogen - associated molecular patterns (PAMPs). We observed presepsin production in both HL-60 and HEK 293T cells, not only in the presence of *E. coli* but also in its absence. We also observed that *E. coli* stimulation enhanced the presepsin production in HL-60, but did not enhance it in HEK293T cells. These results suggest that there is a presepsin production pathway requiring no stimulation of PAMPs such as *E. coli* in a healthy person, and that this pathway is different from presepsin production in immune cells during sepsis.

1)　保健科学部医療検査学科

Key words：sepsis, presepsin, phagocytosis, CD14

緒言

プレセプシンは単球、好中球に発現しているCD14が切断され生じるN末端側フラグメントタンパクであり、敗血症などの重篤な感染症時に血中濃度が上昇することが知られている敗血症マーカーである[1)-3)]。敗血症時のプレセプシン上昇は、病原菌に対する宿主の免疫反応が関係しており、特に免疫細胞が貪食を行うことでプセプシンが分泌されることが報告されている[2)]。しかし、一方で敗血症や感染症に罹患していない健常人にもプレセプシンは存在しており[4)]、その産生機序についての報告はない。免疫機構として働く貪食作用により生じるとされるプレセプシンであるが、健常人の血清中に存在することから、菌の貪食が関与しない産生経路が存在することも考えられ、この機序を解明しプレセプシンの性状について新しい知見を得ることは、臨床マーカーとして利用されるうえで重要と思われる。そこで我々は、貪食能を持つ細胞株と持たない細胞株でのプレセプシン産生モデル系を構築し、貪食が関与しない環境下でプレセプシンが産生されるか検討を行った。

材料および方法

細胞培養、分化誘導

ヒト前骨髄球性白血病細胞株HL-60 (国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB0085) の培養には、56 ℃で 30 分間非働化した 10 % Fetal bovine serum (FBS；Biowest) を含む RPMI-1640 (ナカライテスク) を用い、ヒト胚性腎臓細胞株 293T（HEK 293T; 理研 BRC-Cell Bank RBRC-RCB2202）の培養には非働化 10 % FBS を含む DMEM (ナカライテスク) を用い、37℃、5% CO_2 存在下で培養した。HL-60 の分化には 1 α ,25-DihydroxyVitamin D（Vit. D3；Cayman Chemical）を用いた。 細胞数を 1. 0 × 10^5 /mL に調整後、終濃度 100 nM となるように Vit. D3 溶液を添加した。

フローサイトメトリー (FCM) による CD14発現の測定

細胞を遠心後、100 μL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加え細胞懸濁液を作成した。FITC anti- human CD14 antibody (BD Bioscience) 、PE anti-human CD14 antibody (Biolegend) 、または mouse IgG-PE (Cell Lab) 10 µL 添加後、4℃ 30 分間静置した。PBS で 2 回洗浄後 、FACS Calibur (BD Bioscience) により測定した。解析には Cell Quest pro (BD Bioscience) を用いた。

貪食能の評価

貪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。細胞を 5.0 × 10^6 / mL に調整後、96 穴 プレートに 100 μL 播種し、終濃度 0.5 mg/mL の pHrodo® Green *E. coli* BioParticles® (Life Technologies) を添加後、37° C、5% CO_2 存在下で 3 時間培養した。続いて細胞を PBS で 2 回洗浄し、500 µL の PBS で再懸濁後、FACS Calibur により蛍光強度を測定した。また、同細胞を DAPI による核染色を行った後、共焦点顕微鏡 LSM710（Carl Zeiss）により測定した。解析にはそれぞれ Cell Quest pro、および ZEN 2009（Carl Zeiss）を用いた。

プレセプシン産生実験

細胞数を 5. 0 × 10^6 cells/mL に調整後、*E. coli* (C41 株)、Zymosan (Sigma) またはリポポリサッ

カライド（LPS-EK；Invitrogen）をそれぞれ終濃度5. 0 × 10^7 cfu/mL、5 μg/mL、1 μ g/mLになるように添加し、96 穴プレート に100 μL / well播種した。37° C、5% CO_2 存在下で3時間培養後、培養上清を回収し、PATHFAST^{TM} Presepsin（LSI Medience）によりプレセプシン濃度を測定した。

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 μM ; Sigma) とコントロールとしてジメチルスルホキシド (DMSO) を細胞懸濁液に添加し、37° C、5% CO_2 存在下で15 分静置した。

CD14 安定発現 HEK 293T 細胞の作製

使用したプライマーおよび、一本鎖オリゴ (ssODN) を Table 1 に示す。ベクターとして pIRES-EGFP-puro は Michael McVoy から寄贈されたもの (Addgene plasmid # 45567) を、pX333 は Andrea Ventura から寄贈されたもの (Addgene plasmid # 64073) を使用した [5]。ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞から RNeasy Mini Kit（Qiagen）を用い RNA を抽出し、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit（Takara Bio） を使用して total RNA から cDNA を合成した。プライマーとして CD14-F および CD14-R を用いて cDNA から CD14 遺伝子を増幅し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics) により精製した後、Zero Blunt PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) で CD14 クローニングベクターを構築した。その後、pIRES-EGFP-puro のマルチクローニングサイト（MCS）に Mlu I および Xba I 認識配列を導入したベクターと、クローニングベクターを Mlu I と Xba I で処理後、ライゲーションすることで pIRES-CD14-EGFP-puro を構築した。gRNA1 と AAVS1 gRNA を挿入した pX333 と pIRES-CD14-EGFP-puro ベクターおよび ssODN を用いた 2Hit2Oligo 法により HEK 293T 細胞ゲノム内に CD14 遺伝子を挿入した [6]。トランスフェクションには Lipofectamine® 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用い、24 穴プレート に 500 μ L medium で培養した細胞に対し、ドナーベクターおよび pX333 を共に 0.5 μ g、ssODN-1、2 を各 20 pmol 用いた。トランスフェクションした HEK 293T 細胞は、2 日後から 1.0 μ g/mL ピューロマシンを含む選択培地で培養し、3-4 日ごとにメディウムを変え、1 カ月後の細胞を CD14 安定発現株 (HEK 293T-CD14) として用いた。なお、本実験は神戸常盤大学遺伝子組換え実験安全委員会に承認されており、同委員会規程に則って実験をおこなった。

PCR

HEK 293T-CD14　から QIAamp Blood Mini (Qiagen) を用いてゲノムを抽出した後、KOD FX neo (TOYOBO lifescience) を用いて PCR をおこなった。PCR は 94℃ 変性 2 分後、98℃ 変性 10 秒、68℃ アニーリング・伸長反応 5 分を 35 サイクルの条件でおこなった。

統計解析

Student 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

Vit. D3処理による HL-60 の単球系分化の確認

細胞株を用いたプレセプシン産生系を構築するため、Vit. D3 処理による HL-60 の単球系への分化誘導を行った。敗血症時のプレセプシン産生には CD14 発現および貪食能の獲得が必要なため FCM と共焦点顕微鏡により CD14 発現と貪食能の評価を行った。FCM による CD14 発現測定では、Vit. D3 処理により CD14 発現の上昇が認められた（Fig. 1 A)。

FCM による貪食能測定では、Vit. D3 処理によ

Table 1

CD14-F	5'- ACGCGTCTTATCGACCATGGAGCGCGCGTCC -3'
CD14-R	5'- TCTAGAGCAAAGCCCCGGGCCCCTTG -3'
gRNA1 sense	5'- CACCAGCGGATAACAATTTCACAC -3'
gRNA1 antisense	5'- AAACGTGTGAAATTGTTATCCGCT -3'
AAVS1 gRNA sense	5'- CACCGGGGCCACTAGGGACAGGAT -3'
AAVS1 gRNA antisense	5'- AAACATCCTGTCCCTAGTGGCCCC -3'
ssODN-1	5'- ATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGGGGCCACTAGGGACAG CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGGA -3'
ssODN-2	5'- CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA GATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTTAGGCCTCCTCCTT -3'
Forward primer	5'- TCGACTTCCCCTCTTCCGATG - 3'
Reverse primer	5' - CTCAGGTTCTGGGAGAGGGTAG - 3'

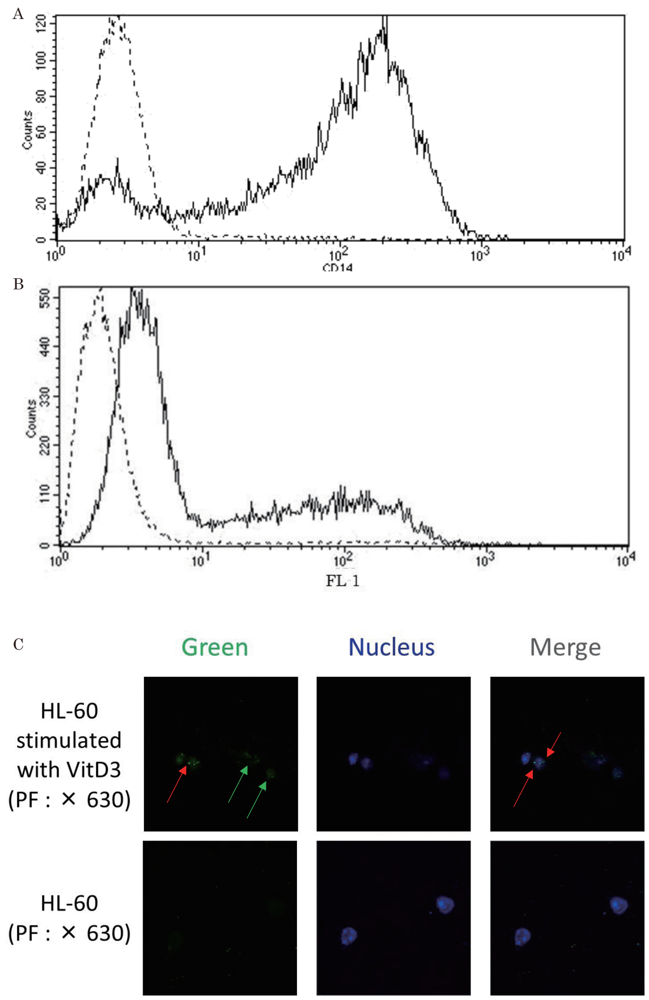

Figure 1　1α ,25-DihydroxyVitamin D (Vit. D3) による HL-60の単球系細胞への分化
(A) HL-60の CD14発現強度を FCM で測定した。実線（—）が Vit. D3 により分化誘導した HL-60を、点線（- -）が分化誘導していない HL-60の CD14発現強度を示す。
(B) HL-60の貪食能として pHrodo® Green E. coli BioParticles® の細胞内への取り込みを FCM で測定した。実線（—）が Vit. D3 により分化誘導した HL-60を、点線（- -）が分化誘導していない HL-60の結果を示す。分化誘導した HL-60 では蛍光強度が全体的に右側にシフトしており、貪食能が増強していた。
(C) HL-60の貪食能を共焦点顕微鏡で測定した。緑が pHrodo® Green E. coli BioParticles® の細胞へのとりこみを、青が核を示す。pHrodo® Green E. coli BioParticles® は pH が低い状況下で蛍光強度が強くなるため、分化誘導した HL-60では、細胞への取り込みが細胞質全体に広がる弱い蛍光強度として検出された（緑色矢印）。また、リソソームに取り込まれた pHrodo では点状に強い蛍光強度として検出され（赤色矢印）、貪食能の増強が観察された。

り細胞内への菌の取り込みが観察された (Fig. 1 B)。また、共焦点顕微鏡観察においても同様に Vit. D3 処理により貪食能が観察された (Fig. 1 C)。

HL-60 を用いたプレセプシン産生の確認

E. coli を添加後の、HL-60 培養上清中のプレセプシン値は Vit. D3 未処理群で 3. 92 ± 2. 50 pg/mL（平均±標準偏差)、Vit. D3 処理群で 302 ± 6. 36 pg/mL であり、Vit. D3 処理により有意に上昇した (Fig. 2 A)。Vit. D3 処理後の HL-60 では、*E. coli* 未添加群でプレセプシン値が 112 ± 4. 95 pg/mL、添加群で 302 ± 6. 36 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が、*E. coli* 未添加群においても培養上清中のプレセプシン濃度の上昇が認められた (Fig. 2 A)。また、*E. coli* の細胞壁外膜の構成成分である LPS および、貪食を引き起こす PAMPs である Zymosan による刺激によってもプレセプシン産生は有意に促進された（Fig. 2 B)。

次に、HL-60 の *E. coli* 添加によるプレセプシン産生に対する貪食の影響を確認するため、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D 処理により貪食を阻害した時のプレセプシン値への影響を検討した。FCM による測定ではサイトカラシン D 処理 HL-60 の貪食陽性細胞は 0.65% に対し、未処理の HL-60 の貪食陽性細胞は 31.8 % と、サイトカラシン D 処理より、蛍光 *E. coli* の細胞内への取り込みが抑制されていた（Fig. 2 C)。また、*E. coli* 添

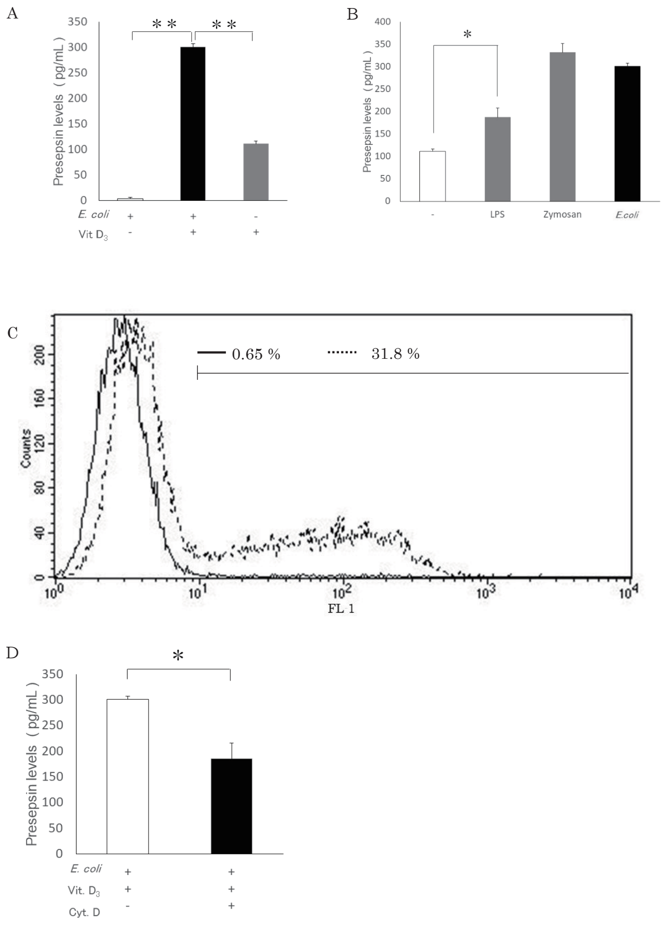

Figure 2　HL-60におけるプレセプシン産生と貪食の影響
(A)、(B) PAMPs 刺激による HL-60 培養上清中のプレセプシン濃度を測定した。n = 2、エラーバー は 標準偏差を示し、有意差を ＊ P < 0. 05、＊＊ P < 0. 01 で示した。
(C) サイトカラシン（Cyt. D）処理単球系 HL-60の貪食能を FCM で測定した。点線（- -）が Cyt. D 未処理を、黒線（—）が10 μ M Cyt. D 処理 HL-60の pHrodo® Green E. coli BioParticles® の細胞内への取り込みを示す。蛍光強度がサイトグラム中のバー以上の細胞を陽性細胞とカウントし、割合を示した。10 μ M Cyt. D 処理 HL-60 では蛍光強度が全体的に左側にシフトしており、貪食能が抑制されていた。
(D) Cyt. D 処理 HL-60培養上清中のプレセプシン濃度を測定した（n = 2)。

加時の上清中のプレセプシン値はサイトカラシンD処理により有意に減少しており、貪食阻害によりプレセプシン産生が抑制されていた（Fig. 2 D）。

293T-CD14安定発現株の作製

次に貪食能を持たない細胞株でのプレセプシン産生を検討するため、HEK 293T 細胞への CD14 遺伝子導入をおこなった。HEK 293T 細胞に、Cas9、sgRNA、ドナーベクターを導入し（Fig. 3 A)、得られた安定発現細胞から DNA を抽出後、AAVS1 locus の PCR 解析をおこなった (Fig. 3 B レーン 2)。AAVS1 locus に挿入が認められない場合に検出される 1393 bp バンドに加えて、AAVS1 locus へのドナーベクターの挿入を示す 8,337 bp のバンドを検出し、ゲノムレベルでの遺伝子挿入を確認した。また、FCM を用いて HEK

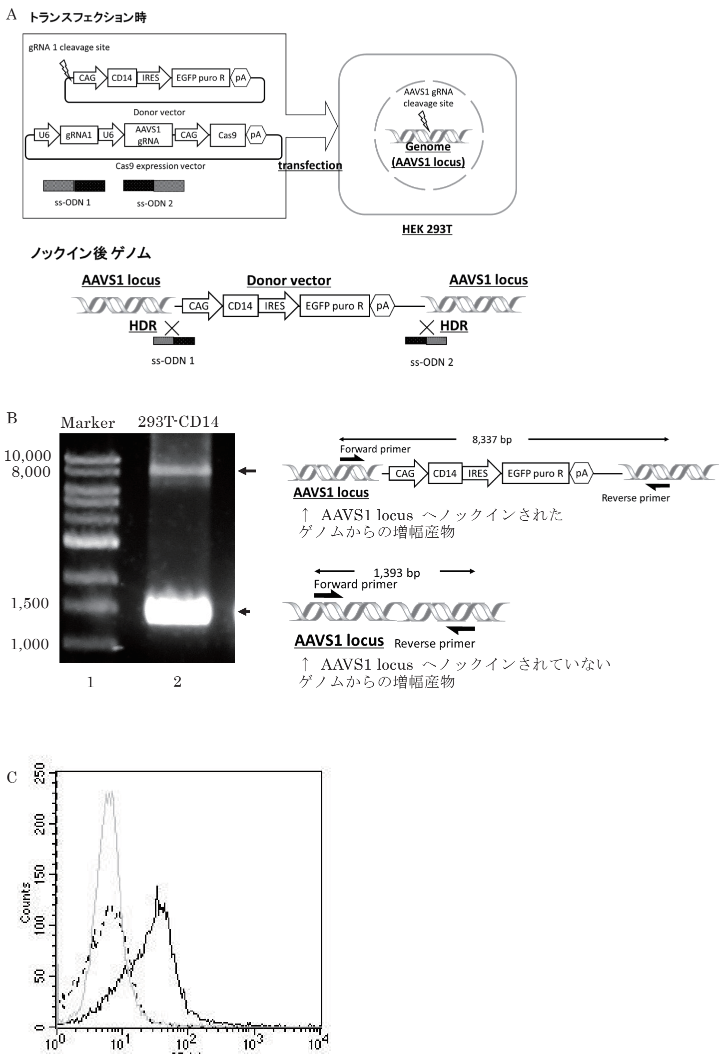

Figure 3　HEK 293T 細胞への CD14遺伝子の導入
(A) HEK 293T 細胞への CD14遺伝子の導入概略図。遺伝子に組み込むドナーベクターとして、CD14遺伝子および EGFP puromycin 耐性遺伝子発現ベクターを使用し、Cas9 蛋白発現ベクターとコトランスフェクションした。トランスフェクション後、ドナーベクターは Cas9 と gRNA 1 複合体により gRNA 1 cleavage site で切断され鎖状となる。また、HEK 293T 細胞のゲノム内 AAVS1 locus は Cas 9 と AAVS1 gRNA 複合体に切断され、ss-ODN 1, 2 を介した相同組換え型修復（HDR）により、ドナーベクターが AAVS1 locus 内に組み込まれる。
(B) CD14安定発現細胞の PCR 増幅産物電気泳動
(C) HEK 293T-CD14の CD14発現強度を FCM で測定した。黒実線（—）が PE anti-human CD14 antibody により染色した HEK 293T-CD14を、灰色実線（—）が PE anti-human CD14 antibody により染色した HEK 293T を、点線（- -）が mouse IgG1-PE (isotype control) で染色した HEK 293T-CD14の蛍光強度を示す。

293T-CD14 を検討した結果、細胞膜上での CD14 発現が認められ、CD14 発現をタンパクレベルで確認した。(Fig. 3 C)。

HEK 293T-CD14安定発現株を用いたプレセプシン産生

HEK 293T-CD14 細胞培養上清中のプレセプシン値測定では、*E. coli* 未添加群のプレセプシン値は 138 ± 12. 2 pg/mL であり、メディウムのみの場合と比較して、上清中のプレセプシン値の上昇が認められた（Fig. 4)。一方で *E. coli* 添加群のプレセプシン値は 126 ± 24. 5 pg/mL と *E. coli* 未添加群と比べ有意な上昇は認められなかった（Fig. 4）

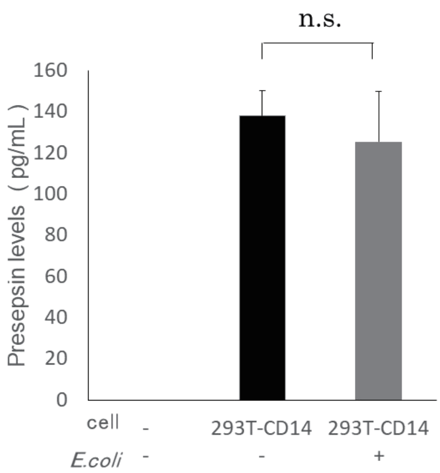

Figure 4　HEK 293T-CD14 におけるプレセプシン産生
PAMPs 刺激による HEK 293T-CD14上清中のプレセプシン濃度を測定した。n = 3、エラーバー は 標準偏差を示し、n. s. (not significant ; p>0. 05) は有意差がないことを示す。

考察

貪食は病原体に対する免疫機構として広く知られているが、健常者においてもホメオスタシス維持のためにアポトーシス細胞を排除する目的で行われている。ホメオスタシス維持のために行われる貪食は、CD14 発現細胞が行うものに限っても、肺胞、筋肉、消化管内に存在する組織マクロファージや肝臓のクッパー細胞および中枢神経中のミクログリアなどにより各組織で行われている[8]。そのため、これらの細胞による貪食が健常人の体内でのプレセプシン産生に影響していることも考えられる。そこでこの影響を除くため、我々は *in vitro* における HL-60 を用いたプレセプシン産生系を評価し、貪食が誘導される *E. coli* および Zymosan 等の PAMPs 刺激でプレセプシンが産生されることを示した（Fig. 2 B)。また興味深いことに、PAMPs 刺激により産生が促進されるプレセプシンだが、PAMPs 刺激がない状態においても産生されることを見出した (Fig. 2 A)。このことから、健常人の体内においても PAMPs 刺激なしにプレセプシンが産生されている可能性が考えられる。

次に健常人体内におけるプレセプシン産生が貪食と異なる経路でも産生されうるかを明らかにするために、貪食能を持たない HEK 293T 細胞にプレセプシン前駆体である CD14 を安定発現させた。CD14 発現 HEK 293T 細胞では、PAMPs 刺激なしにプレセプシン産生が認められ (Fig. 4)、貪食能がなくても CD14 が発現していればプレセプシンが産生されることが明らかとなった。さらに、CD14 を発現させた HEK 293T 細胞では PAMPs 刺激によるプレセプシン産生の促進が認められなかったことから、PAMPs により惹起されるプレセプシン産生は単球などの免疫細胞のみが独自に持つ経路により生じると考えられる。

しかし、プレセプシンの前駆体である CD14 の可溶型 (sCD14) は、初代培養細胞ではプロテアーゼ依存性および非依存性の二つの経路で産生されるのに対し、HL-60 などの細胞株ではプロテアーゼ非依存性の経路でのみ産生されるという報告がなされている[9]。また、ヒト単球を用いた実験ではプレセプシンは LPS 刺激で上昇しないと報告されているが[2]、本実験では HL-60 を LPS で刺激することによりプレセプシンの有意な上昇が認められている (Fig. 2 B)。これらの例を踏まえ、本研究によって得られた知見も初代培養細胞での事象を反映してい

ない可能性が考えられるため、初代培養細胞で同様の挙動を示すか確認の検討を進める必要がある。しかし一方で、HEK 293T 細胞や HL-60 等の培養細胞を用いた実験系は、初代培養細胞を用いた系と比べ、データの再現性が高いことやゲノム編集をおこないやすい点で、健常人および敗血症時のプレセプシン産生機序の解明のために有用な実験系として活用できると期待される。今後は培養細胞株を用いて健常人におけるプレセプシン産生に関与する因子を特定すると同時に、初代培養細胞での確認実験を行う必要があると考えられる。

「開示すべき COI はない」

謝辞

本研究は、平成 28 年度神戸常盤大学テーマ別研究「単球と好中球におけるプレセプシン産生機序の比較検討」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) 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.

3) Mizokoshi, Y. ; Kato, K. ; Sawamura, T. ; Shibuya, Y. ; Nomura, H. Neutrophils can produce presepsin in phagocytosis-independent pathways. Bulletin of Kobe Tokiwa University. 2016, 9, 113-119.

4) 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.

5) Maddalo, D. ; Manchado, E. ; Concepcion, CP. ; Bonetti, C. ; Vidigal, JA. ; Han, YC. ; Ogrodowski, P. ; Crippa, A. ; Rekhtman, N. ; de, Stanchina, E. ; Lowe, SW. ; Ventura, A. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. Nature. 2014 Dec, 18, 516, 423-427.

6) Yoshimi, K. ; Kunihiro, Y. ; Kaneko, T. ; Nagahora, H. : Voigt, B. ; Mashimo, T. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. Nat Commun. 2016 Jan, 20, 7, 10431.

7) Oceguera,-Yanez, F. ; Kim, SI. ; Matsumoto, T. ; Tan, GW. ; Xiang, L. ; Hatani, T. ; Kondo, T. ; Ikeya, M. ; Yoshida, Y. ; Inoue, H. ; Woltjen, K. Engineering the AAVS1 locus for consistent and scalable transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives. Methods. 2016 May 15, 101, 43-55.

8) Arandjelovic, S. ; Ravichandran, KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. Nat Immunol. 2015 Sep 16, 9, 907-917.

9) Bufler, P. ; Stiegler, G. ; Schuchmann, M. ; Hess, S. ; Krüger, C. ; Stelter, F. ; Eckerskorn, C. ; Schütt, C. ; Engelmann, H. Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from

human monocytes and CD14 transfectants.
Eur J Immunol. 1995 Feb, 25, 2, 604-610.