

学位論文（博士）

血小板によるマクロファージの機能抑制機構の解析

Mechanisms for suppression of macrophage inflammatory  
responses by platelets

2016年9月

星薬科大学大学院 薬学研究科  
総合薬科学専攻 環境保健学領域  
微生物学分野

D351 安藤 祐介

## 目次

論文目録.....	1
発表目録.....	2
略語リスト.....	6
第一章 緒論.....	7
第二章 血小板によるマクロファージの LPS 応答の抑制.....	10
第三章 血小板によるマクロファージの NO 産生抑制のメカニズム解析.....	32
第四章 総括および結論.....	51
謝辞.....	54
参考文献.....	55

## 論文目録

本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

### 主論文

- 1) Ando, Y., Oku, T. and Tsuji, T.

Platelets attenuate production of cytokines and nitric oxide by macrophages in response to bacterial endotoxin, *Platelets*, in press, published online Nov. 20 doi: 10.3109/09537104.2015.1103369 (2015)

- 2) Ando, Y., Oku, T. and Tsuji, T.

Platelet supernatant suppresses LPS-induced nitric oxide production from macrophages accompanied by inhibition of NF- $\kappa$ B signaling and increased arginase-1 expression, submitted

論文 1 を第 2 章に、論文 2 を第 3 章に使用した。

### 参考論文

- 1) Oku, T., Nakano, M., Kaneko, Y., Ando, Y., Kenmotsu, H., Itoh, S., Tsuji, M., Seyama, Y., Toyoshima, S. and Tsuji, T.

Constitutive turnover of phosphorylation at Thr-412 of human p57/coronin-1 regulates the interaction with actin, *J. Biol. Chem.*, **287**, 42910-42920 (2012)

- 2) Oku, T., Ando, Y., Ogura, M. and Tsuji, T.

Development of Splice Variant-Specific Monoclonal Antibodies Against  $\alpha$ 3 Integrin, *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, **35**, 12-17 (2016)

## 発表目録

- 1) Ando Y, Oku T, Tsuiji M and Tsuji T  
Analysis of ligands for CD83, a marker of activated immune cells  
Experimental Biology 2013 (2013 年, ボストン)
  
- 2) Oku T, Ando Y, Tsuiji M, Toyoshima S and Tsuji T  
Phosphorylation of p57/coronin-1 regulates phagocytosis through the modulation of actin-binding activity  
Experimental Biology 2013 (2013 年, ボストン)
  
- 3) 安藤祐介, 栗坂知里, 奥輝明, 築地信, 辻勉  
免疫細胞活性化マーカー活性化マーカーCD83 のリガンド探索  
第 14 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム (2013 年, 東京)
  
- 4) Tsuiji M, Ando Y, Oku T, Tsubata T, Tsuji T  
Analysis of the immune response against capsular polysaccharides of Streptococcus pneumonia and the ligand of activation marker CD83  
78th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology: Immunity & Tolerance (2013 年, ニューヨーク)

- 5) 奥輝明, 安藤祐介, 築地信, 豊島聡, 辻勉  
Regulation of actin-binding activity of p57/coronin-1 via its phosphorylation  
at Thr-412 during phagocytosis  
第 86 回日本生化学会大会 (2013 年, 横浜)
- 6) 安藤祐介, 奥輝明, 築地信, 辻勉  
腹腔内 B 細胞亜集団に発現する CD83 リガンドの解析  
日本薬学会 第 134 年会 (2014 年, 熊本)
- 7) 築地信, 雨宮美穂, 小倉若菜, 矢島義正, 河合琴美, 安藤祐介, 奥輝明,  
長坂淳子, 辻勉  
黒穂菌菌糸体の免疫応答調節作用の解析  
第 15 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム (2014 年, 名古屋)
- 8) 安藤祐介, 奥輝明, 辻勉  
血小板由来可溶性因子はマクロファージの LPS に対する対する応答を抑  
制する  
日本薬学会 第 135 年会 (2015 年, 神戸)

9) 矢島義正, 築地信, 雨宮美穂, 小倉若菜, 河合琴美, 安藤祐介, 奥輝明,  
長坂淳子, 辻勉

黒穂菌菌糸体の免疫応答調節作用の解析

日本薬学会 第 135 年会 (2015 年, 神戸)

1 0) 安藤祐介, 奥輝明, 辻勉

血小板由来可溶性因子はマクロファージの LPS に対する応答を抑制  
する

第 16 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム (2015 年, 東京)

1 1) Ando Y, Oku T and Tsuji T

Platelets attenuate production of cytokines and nitric oxide by  
macrophages in response to bacterial endotoxin

ISCA-Japan Hoshi University-RCSI Workshop (2015 年, 東京)

1 2) 安藤祐介, 奥輝明, 辻勉

血小板はマクロファージのエンドトキシン応答を抑制する

第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大  
会 (2015 年, 神戸)

1 3) 奥輝明, 安藤祐介, 辻勉

肥満細胞における Coronin-1 の役割

第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (2015 年, 神戸)

1 4) 安藤祐介, 奥輝明, 辻勉

微生物成分に対するマクロファージの応答に及ぼす血小板由来因子の影響

日本薬学会 第 136 年会 (2016 年, 横浜)

## 略語リスト

本論文では，以下の略号を用いた．

ADP	Adenosine triphosphate, アデノシン三リン酸
ATP	Adenosine diphosphate, アデノシン二リン酸
BMDM	Bone marrow-derived macrophage, 骨髄由来マクロファージ
CM	Conditioned medium
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum, ウシ胎児血清
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HRP	Horseradish peroxidase
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor, マクロファージコロニー刺激因子
NOS	Nitric oxide synthase, 一酸化窒素合成酵素
LPS	Lipopolysaccharide, リポ多糖
PBS	Phosphate-buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水
PE	Phycoerythrin
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
TLR	Toll-like receptor, Toll 様受容体
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane



## 第一章 緒論

血小板は、赤血球や白血球などとともに血液中に含まれる細胞であり、止血や血液凝固において中心的役割を演じている(1)。血小板の前駆細胞である巨核球は骨髄中に存在しており、洞様血管壁の小孔から細胞突起を伸ばし、血流によって断片化されることによって直径 1~4  $\mu\text{m}$  の核を持たない円盤形の血小板を生成する(2)。末梢血中に含まれる血小板数は、ヒトにおいて  $1.5 \sim 4 \times 10^8$  cells/mL, マウスにおいて  $3 \sim 10 \times 10^8$  cells/mL 程度であり、全身の血小板の 3 分の 2 が血液中に、残りの 3 分の 1 は脾臓に貯蔵されている。血小板は細胞内に特有の顆粒を有しており、フィブリノーゲンおよび von Willebrand factor (vWF)、血液凝固因子などを含む  $\alpha$  顆粒、ADP や ATP, セロトニン,  $\text{Ca}^{2+}$  などを含む  $\delta$  顆粒 (濃染顆粒)、タンパク質分解酵素やグリコシダーゼなどを含む  $\lambda$  顆粒が知られている (Figure 1-1) (3)。血液中において血小板は、血管内皮由来のプロスタグランジン  $\text{I}_2$  ( $\text{PGI}_2$ ) により常に活性化を抑制されている。血管壁の損傷などにより露出したコラーゲンは血中の vWF と結合することで、血小板表面の GPIb を介した血小板の粘着および活性化を促進し、円盤状の形態から長い擬足を伴う中央部が隆起した目玉焼き状へと変化させる。それに伴い、開放小管系を介する  $\text{Ca}^{2+}$  流入や、貯蔵  $\text{Ca}^{2+}$  の放出が起こり、血小板表面への P-セレクチン (CD62P) の発現や GPIIb/IIIa の活性化、様々な生理活性物質の細胞外への放出反応 (脱顆粒) が引き起こされる。GPIIb/IIIa の活性化した血小板は、vWF やフィブリノーゲンを介して他の血小板と結合する。また、脱顆粒により放出された ADP やセロトニン

は、周囲の血小板を活性化することで血小板同士の凝集を促進する。血小板の機能的な異常は、血小板無力症や Bernard-Soulier 症候群で見られるような止血・凝固系の異常を引き起こすだけでなく、心筋梗塞や脳梗塞の病因となる動脈硬化病変の形成などの血管内の恒常性の崩壊へとつながることが知られている(4)。

血小板は止血や血栓形成の過程で重要な役割を演じているが、免疫系とも密に関連しており、近年、炎症応答を調節していることが数多く報告されている(5-9)。血小板は、免疫細胞に働きかける生理活性物質を $\alpha$ 顆粒内に有しており、活性化に伴い放出される CXCL8/IL-8, CXCL7/NAP2, CCL5/RANTES, CXCL12/SDF-1, CCL3/MIP1- $\alpha$ , CXCL4/PF4 などのケモカインは、単球やリンパ球の炎症部位への遊走を促す(10,11)。また、活性化された血小板表面に発現する P-セレクトインは P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) を介して好中球の活性化を、CD40 は CD154 を介して T 細胞の活性化を促すことも明らかにされている(12-15)。さらに、血小板は病原体関連分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) として知られる病原体の構造を識別する Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) を発現していることから、感染症からの防御にも関係していることが示唆されている(16,17)。本研究では、血小板がマクロファージの免疫応答に与える影響に着目し、免疫細胞としての血小板の新たな役割を探索した。

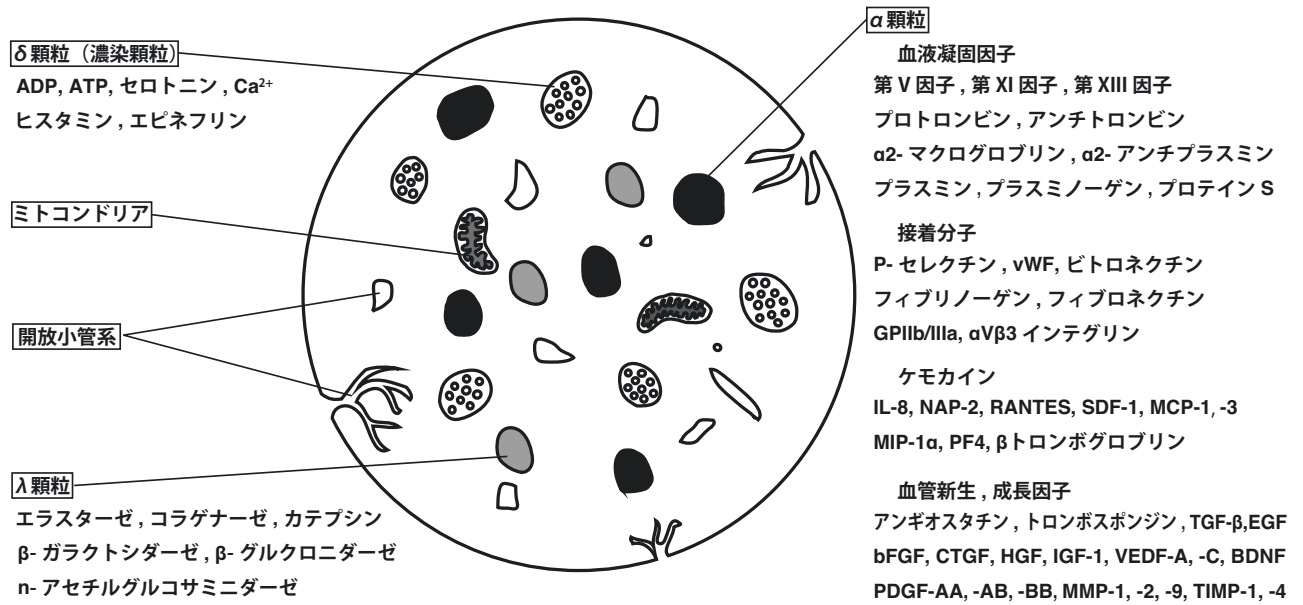


Figure 1-1 血小板の模式図と各顆粒に含まれる生理活性物質

## 第二章 血小板によるマクロファージの LPS 応答の抑制

### 第一節 緒言

エンドトキシンショックは、全身性の重度のグラム陰性菌感染により引き起こされる症状である。グラム陰性菌の細胞壁の主要な構成成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide : LPS) は、マクロファージをはじめ多くの免疫細胞の活性化を促す(18,19)。活性化されたマクロファージから産生される腫瘍壊死因子  $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$  : TNF- $\alpha$ ) やインターロイキン-1 (Interleukin-1 : IL-1), IL-6 などの炎症性メディエーターが過剰に分泌されると、全身性炎症反応症候群 (Systemic inflammatory response syndrome : SIRS) や播種性血管内凝固 (Disseminated intravascular coagulation : DIC) を引き起こし、多臓器不全 (Multiple organ failure : MOF) をもたらすことに加え(20,21)、敗血症ショックの病因ともなる(22)。また、誘導型一酸化窒素合成酵素 (Inducible nitric oxide synthase : iNOS) により生成される一酸化窒素 (NO) も血圧低下や組織損傷に関連する重要な炎症性メディエーターの 1 つである(23-27)。

近年、抗血小板抗体をマウス腹腔内に投与することにより誘導される実験的血小板減少症モデルマウスを用いた実験が行われ、LPS によるエンドトキシンショック症状が対照マウスと比較して重篤化し、致死率の上昇や臓器不全の悪化などが観察された(28)。この結果は、血小板がエンドトキシンショックを緩和する役割をもつことを示唆した。

本章では，血小板とマクロファージの相互作用に着目し，この相互作用が微生物成分に対するマクロファージの応答に与える影響について検討した．

## 第二節 試薬および方法

### ・試薬

LPS (*Escherichia coli* O-111 由来), 2-メルカプトエタノール, カナマイシン硫酸塩, スルファニルアミド, *N*-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩, NaNO<sub>2</sub>, MEM non-essential amino acids solution (x100) は和光純薬 (大阪) より購入した. RPMI-1640 培地, HEPES, ザイモザン, トロンビンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した. ボイデントランスウェルチャンバーシステムに用いるセルカルチャーインサート (Pore size : 1.0 μm) は, BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA) より購入した. ウシ胎児血清 (FBS) は Biosera (Boussens, France) より購入した. ASF104 無血清培地は Ajinomoto (東京) より購入した. TRIzol 試薬は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) より購入した. PrimeScript RT Reagent Kit はタカラバイオ (滋賀) より購入した. KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2×) は KAPA Biosystems (Boston, MA, USA) より購入した. ゲルろ過用標準タンパク質は Bio-Rad (Hercules, CA, USA) より購入した.

### ・マウス

BALB/c マウス (5-8 週齢) は, 日本 SLC 株式会社より購入した. 全ての実験は, 星薬科大学動物実験指針に基づき行った.

- ・マウス骨髄由来マクロファージの調製

L929 細胞は理研細胞バンク（筑波）から購入し、10%非働化 FBS, 50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール, 100  $\mu$ g/mL カナマイシン硫酸塩を含む RPMI-1640 培地（Complete medium）にて、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。必要に応じて、MEM non-essential amino acids solution を Complete medium に加えた。L929 細胞培養上清（L929-CM）は、2,000 x g, 20 分の条件で遠心分離した後、上清を 0.22  $\mu$ m のフィルターに通し調製した。

マウス骨髄由来マクロファージ（Bone marrow-derived macrophage : BMDM）は Weischenfeldt と Porse の方法を一部改変し調製した(29)。BALB/c マウスの大腿骨および脛骨より骨髄細胞を回収し、マクロファージコロニー刺激因子（Macrophage colony-stimulating factor : M-CSF）の供給源として 10% L929-CM を含む Complete medium にて  $4 \times 10^7$  cells/20 mL に調整後、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 3 日間培養した（15 cm シャーレ）。非接着細胞および培地を除去した後、新しい培地を加え培養した。3 日後、接着細胞を RPMI-1640 培地で洗浄した後、Complete medium でさらに 24 時間培養することで M-CSF の飢餓を行った。

- ・マウス洗浄血小板

ジエチルエーテル麻酔下のマウスより心採血にて全血を回収し、100 x g, 25°C, 15 分の条件で遠心分離を行った。抗凝固剤として 1/6 容の ACD buffer（19 mM クエン酸, 75 mM クエン酸ナトリウム, 135 mM グルコース, pH 7.4）を用いた。得られた上清（Platelet-rich plasma）は等量の HEPES buffer（140 mM

NaCl, 2.7 mM KCl, 3.8 mM HEPES, 5 mM EGTA, pH7.4) にて希釈した後, 100 x g, 25°C, 15 分間の遠心分離を行った. 得られた上清は新しい遠沈チューブに移し, 800 x g, 25°C, 15 分の条件で遠心分離後, 沈殿を Platelet wash buffer (10 mM クエン酸ナトリウム, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% グルコース, pH 7.4) で洗浄した (洗浄血小板). 洗浄血小板は, Complete medium または ASF104 無血清培地で懸濁し, 血球計算盤を用いて細胞数を計測した.

- ・ サントカイン産生

BMDM の培養上清を 20,000 x g, 4°C, 5 分の条件で遠心分離し, 得られた上清に含まれる TNF- $\alpha$  および IL-6 の濃度は, ELISA MAX Standard sets (Biolegend, San Diego, CA, USA) を用いて測定した.

- ・ NO 産生

NO 産生は, 培養上清中に含まれる NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を Griess 法により計測した. BMDM の培養上清を 20,000 x g, 4°C, 5 分の条件で遠心分離を行った. 得られた上清 100  $\mu$ L と Griess 試薬 (1% スルファニルアミド, 0.1% *N*-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩, 2.5% リン酸) 100  $\mu$ L を 96 穴プレートで混和し, 室温で 10 分間静置した後, 570 nm の吸光度を MTP-450 (コロナ電気株式会社, 茨城) にて計測した. NaNO<sub>2</sub> の検量線を用いて, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の濃度を算出した.



- ・ RT-qPCR

BMDM より TRIzol 試薬で全 RNA を抽出後, PrimeScript RT Reagent Kit を用いて cDNA を合成した. qPCR 反応は, KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2×) および StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies) を使用した. 全てのサンプルは検量線を用いた相対的定量法により解析し, *Gapdh* の発現量で各サンプル間の補正を行った. 使用したプライマーは Table 1 に示した.

- ・ データ処理

各実験は Triplicate で行い, 統計処理は Student の *t* 検定を用いて  $p < 0.05$  を有意差ありとした. 図中のグラフデータは, 平均値  $\pm$  SEM で示し, \*は  $p < 0.05$ , \*\*は  $p < 0.01$ , \*\*\*は  $p < 0.005$ , N.D.は検出限界以下 (Not detected), n.s.は有意差なし (Not significant) を示す.

- ・ ゲルろ過クロマトグラフィー

血小板の培養上清は Amicon Ultra-2 mL 10K (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) で濃縮後, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて平衡化した Superose 6 10/300 column (GE Helthcare, Little Chalfont, UK) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより分画した. 溶出は 0.5 mL/分, 室温にて行い, 0.5 mL ずつ分取した. 分子量マーカーはゲルろ過用標準タンパク質 (サイログロブリン: 670 kDa, IgG : 158 kDa, オボアルブミン : 44 kDa, ミオグロビン : 17 kDa, ビタミン B12 : 1.35 kDa) を使用した.

Table 1 RT-qPCR で用いたプライマー

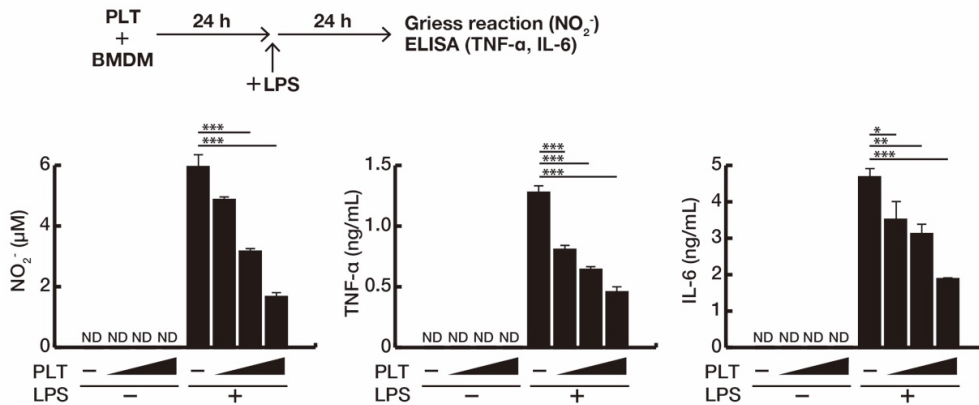
プライマー		配列							
		5'							3'
<i>Gapdh</i>	Forward	TGA	AGC	AGG	CAT	CTG	AGG	G	
	Reverse	CGA	AGG	TGG	AAG	AGT	GGG	AG	
<i>Tnf</i>	Forward	CAG	GCG	GTG	CCT	ATG	TCT	C	
	Reverse	ATG	AGA	GGG	AGG	CCA	TTT	GG	
<i>Il6</i>	Forward	ATA	CCA	CTC	CCA	ACA	GAC	CTG	TC
	Reverse	TTT	CTG	CAA	GTG	CAT	CAT	CGT	TG
<i>Nos2</i>	Forward	TCC	AGG	GAT	TCT	GGA	ACA	TT	
	Reverse	GAA	GAA	AAC	CCC	TTG	TGC	TG	



### 第三節 実験結果

初めに、血小板とマクロファージの共培養が、マクロファージの LPS に対する炎症応答に与える影響について調べた。調製したマウス BMDM と心採血により得られた洗浄血小板を 24 時間共培養した後、LPS を添加し、さらに 24 時間培養した。回収した培養上清中に含まれる NO は Griess 法により、TNF- $\alpha$  および IL-6 は ELISA 法によりそれぞれ定量した。その結果、血小板と共培養した BMDM は、単独で培養した BMDM (コントロール) と比較し、血小板濃度依存的に NO 産生が低下した。また、TNF- $\alpha$  および IL-6 の産生も同様に血小板濃度依存的に低下した (Figure 2-1A)。血小板存在下 ( $5 \times 10^7$  cells) で培養した BMDM の産生する NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 は、コントロールと比較して NO では 28%, TNF- $\alpha$  は 35%, IL-6 は 40%まで減少した。次に、この現象に血小板の存在が必須であるかを調べるため、この共培養系から血小板を除き洗浄した BMDM へ LPS を添加し、産生される NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 について解析した。その結果、共培養後に血小板を除いた BMDM においても同様に NO 産生や、TNF- $\alpha$  および IL-6 の産生の低下が認められた (Figure 2-1B)。以上より、マクロファージの LPS に対する応答は血小板により抑制されること、またこの抑制のために血小板との共培養が LPS 刺激時には必ずしも必要でないことが明らかになった。

A



B

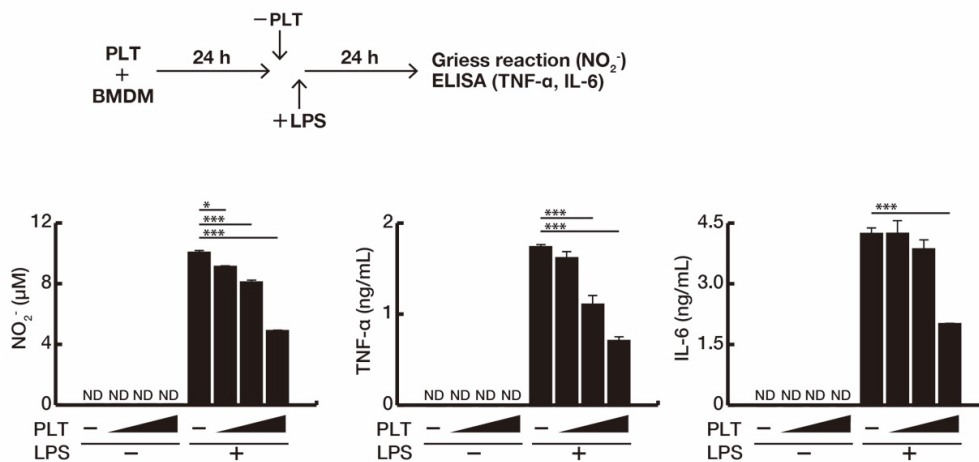


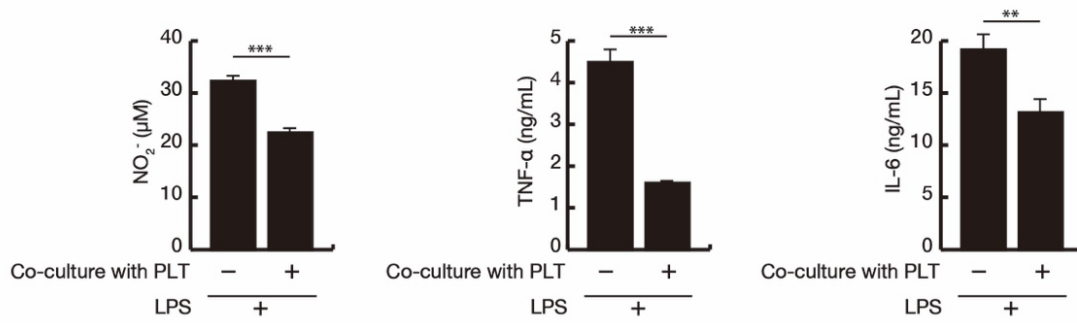
Figure 2-1 血小板との共培養によるマクロファージの LPS に対する応答の抑制

(A) BMDM ( $4 \times 10^5$  cells) と洗浄血小板 ( $5 \times 10^6$ または $1.25 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  cells) を, 0.5 mLのComplete medium中で24穴プレートにて24時間共培養した。その後, LPS (終濃度50 ng/mL) を加え, さらに24時間培養した。培養上清中に含まれるNO<sub>2</sub><sup>-</sup>はGriess法により, TNF-αおよびIL-6はELISA法により測定した。

(B) BMDMを (A) と同様に血小板と共培養した後, 血小板を含む培地を除き, 残ったBMDMをRPMI-1640培地で穏やかに2回洗浄した。50 ng/mL LPSを含むComplete mediumでBMDMを24時間培養後, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, TNF-α, IL-6を上述の方法で測定した。

血小板によるマクロファージの抑制効果が、血小板由来の可溶性因子に依存しているかを明らかにする目的で、血小板とマクロファージのボイデントランスウェルチャンバーシステムを用いた共培養実験を行った。上室にBMDMを、下室に血小板を加え24時間培養した後、上室のBMDMをLPSで刺激した。その結果、血小板と共培養したBMDMではNOは67%、TNF- $\alpha$ は35%、IL-6は69%にまで産生が減少した (Figure 2-2A)。さらに、血小板を24時間培養して得られた上清 (Platelet conditioned medium : PLT-CM) を用いてBMDMを24時間培養した場合においても、NOは41%、TNF- $\alpha$ は39%、IL-6は38%にまで産生が減少した (Figure 2-2B)。これらの結果より、血小板との共培養によるマクロファージのLPSへの感受性の低下には、血小板との直接の接触は必ずしも必要ではなく、血小板由来の可溶性因子が主に関与していることが示唆された。

A



B

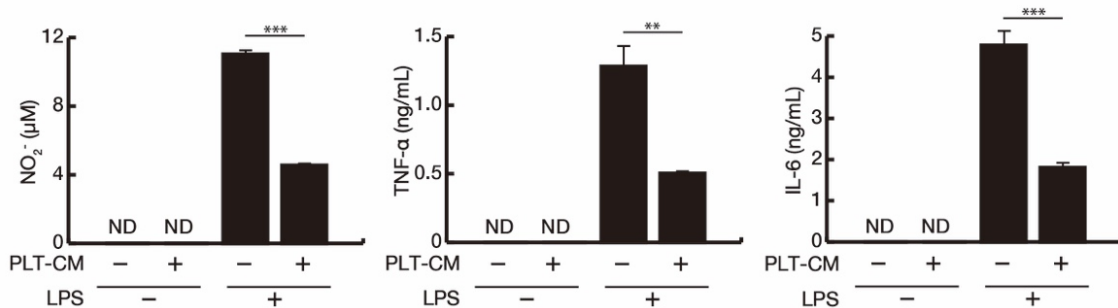


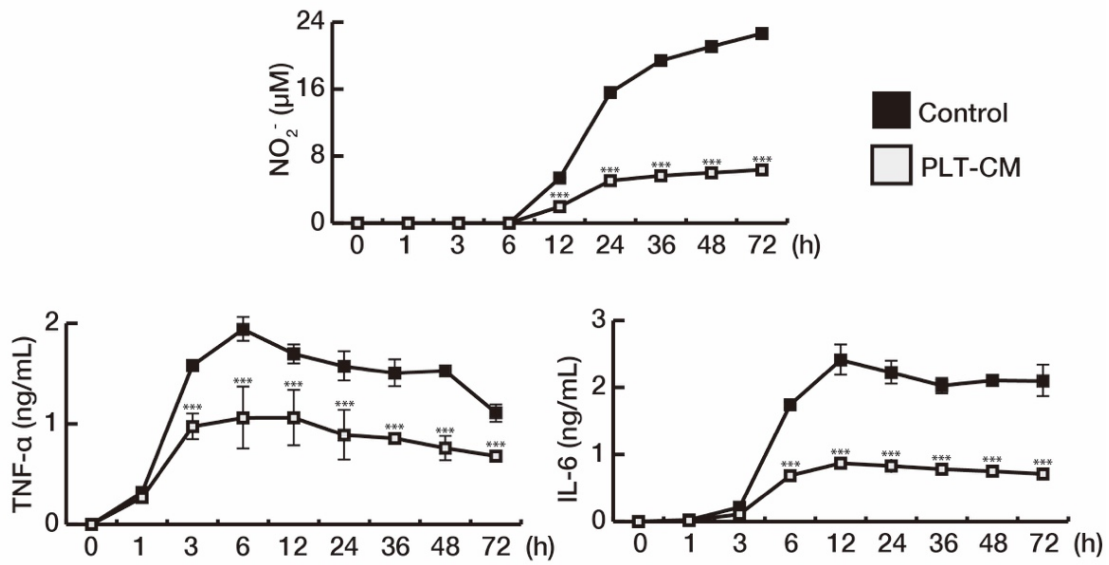
Figure 2-2 PLT-CM によるマクロファージの LPS に対する応答の抑制

(A) トランスウェルの上室に BMDM ( $3 \times 10^4$  cells, 0.1 mL), 下室に洗浄血小板 ( $1 \times 10^8$  cells, 0.6 mL) を加え, 24 穴プレートで 24 時間培養した. その後, 上室 (BMDM) を新しい 24 穴プレートに移し, 上室および下室を 50 ng/mL LPS を含む Complete medium に交換した. 24 時間後の上室の培養上清中に含まれる NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, TNF-α および IL-6 を測定した. (B) 洗浄血小板を ASF104 無血清培地で懸濁 ( $1 \times 10^8$  cells/mL) し, 24 穴プレートにて 24 時間培養した (0.5 mL). 培養上清を回収後, 0.22 μm フィルターでろ過した (血小板培養上清: PLT-CM). BMDM を PLT-CM 中で 24 時間培養後, 50 ng/mL LPS を含む Complete medium に交換し, さらに 24 時間培養した. 培養上清中に含まれる NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, TNF-α および IL-6 を測定した.

次に、PLT-CM で 24 時間培養した BMDM を LPS で刺激後、継時的 (0, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 時間後) に培養上清を回収し、マクロファージの NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 の産生に対する PLT-CM の抑制効果について解析した。その結果、NO 産生の抑制効果は LPS 刺激 12 時間後からみられ、72 時間後においても観察された (Figure 2-3A)。一方、TNF- $\alpha$  の産生抑制は 3 時間後から持続的に、また、IL-6 の産生抑制は 6 時間後から持続的に観察された。続いて、PLT-CM で 24 時間培養した BMDM を LPS で 3 時間刺激し、iNOS (NOS2), TNF- $\alpha$ , IL-6 の mRNA の発現量を RT-qPCR を用いて解析した。その結果、PLT-CM で培養した BMDM は、コントロール BMDM と比較して、*Nos2* および *Tnf*, *Il6* の発現が減少していた (Figure 2-3B)。これらの結果から、PLT-CM は LPS 刺激で誘導されるマクロファージの *Nos2* および *Tnf*, *Il6* の遺伝子発現を抑制し、その効果は 72 時間以上持続することが明らかになった。



A



B

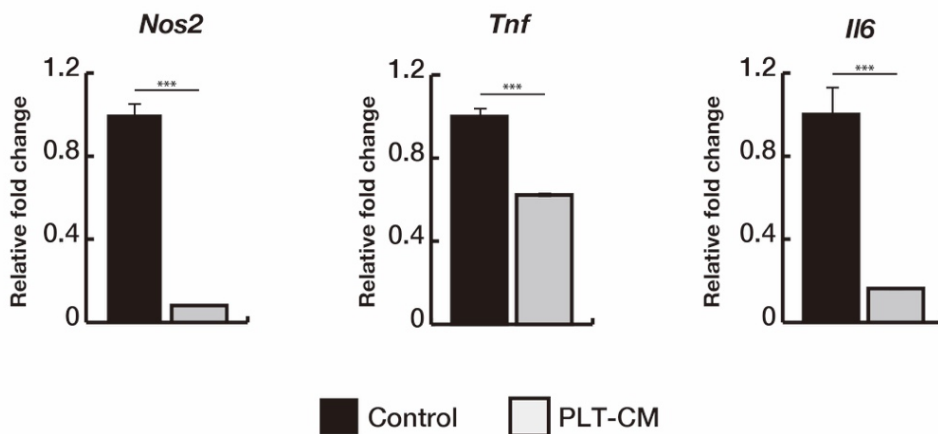


Figure 2-3 PLT-CM の抑制効果の継時変化と RT-qPCR を用いた解析

(A) BMDM ( $1 \times 10^7$  cells) を PLT-CM (10 mL, 10 cm シャーレ) で 24 時間培養後、50 ng/mL LPS を含む Complete medium に交換し、継時的 (0, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 時間後) に培養上清を回収した。その後、培養上清中に含まれる  $\text{NO}_2^-$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 を測定した。(B) BMDM ( $1.5 \times 10^6$  cells) を PLT-CM (2 mL) で 24 時間培養後、50 ng/mL LPS を含む Complete medium に交換し、3 時間培養した。その後、*Nos2* および *Tnf*, *Il6* の遺伝子発現変化を RT-qPCR を用いて解析した。

LPS はマクロファージに発現する受容体 TLR4 によって認識されることが知られており(30), 血小板がマクロファージの LPS に対する応答を抑制することを本節において明らかにした. 次に, マクロファージに発現する TLR2 および Dectin-1 により認識される真菌の細胞壁成分であるザイモザンに対する応答における, PLT-CM の効果について解析した. その結果, ザイモザンに対する応答においても, PLT-CM で培養した BMDM は, コントロール BMDM と比較して, NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 の産生の減少が観察された (Figure 2-4). この結果より, PLT-CM によって培養されたマクロファージは, グラム陰性菌由来の LPS だけでなく, 他の受容体により認識される微生物由来成分による活性化が抑制されることが示唆された.

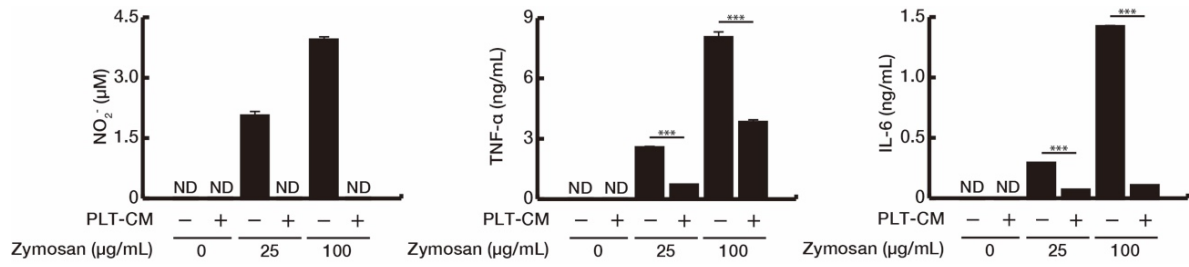


Figure 2-4 PLT-CM によるマクロファージのザイモザンに対する応答の抑制

BMDM ( $4 \times 10^5$  cells) を PLT-CM 中で 24 時間培養後、25  $\mu\text{g/mL}$  または 100  $\mu\text{g/mL}$  ザイモザン (Zymosan) を含む Complete medium に交換し、さらに 24 時間培養した。培養上清中に含まれる  $\text{NO}_2^-$  および  $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 を測定した。

血小板は多数の顆粒を有しており、顆粒内には様々な生理活性物質が蓄えられている (Figure 1-1)。そこで、血小板の脱顆粒により放出される可溶性因子のマクロファージ活性化抑制効果について検討した。血小板をトロンビンで刺激した上清 (Thrombin-stimulated platelet supernatant : Thr-PLT-sup) にて BMDM を 24 時間培養した後、LPS により刺激した。その結果、Thr-PLT-sup は PLT-CM と同様に NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 の産生抑制効果を示した (Figure 2-5)。この結果から、トロンビンによる血小板の活性化に伴い放出された可溶性因子が、マクロファージの応答を抑制している可能性が示唆された。今回、トロンビンを加えていない血小板の上清 (PLT-sup) についても、LPS に対する BMDM の応答を抑制した。血小板刺激物質を加えなくとも、長時間 (24 時間) の培養中に自発的な脱顆粒が起こる可能性、あるいは洗浄血小板を調製する際に弱いながら血小板が活性化された可能性が考えられた。

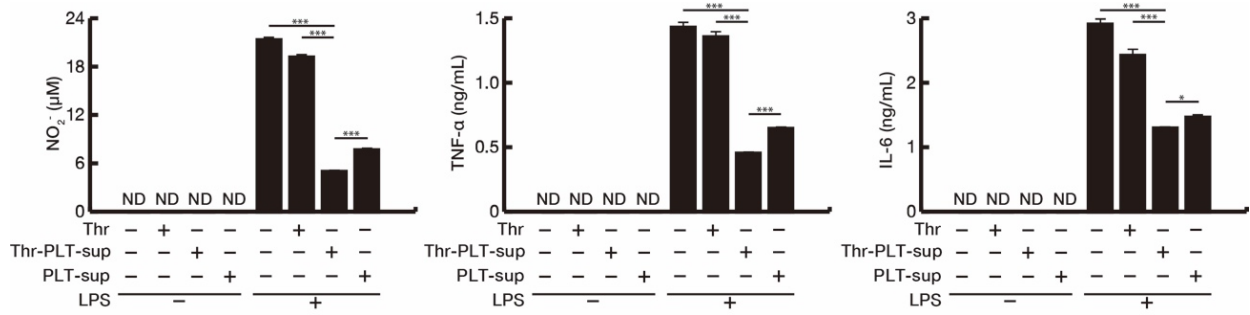


Figure 2-5 マクロファージの LPS 応答の Thr-PLT-sup による抑制

洗浄血小板を ASF104 無血清培地で懸濁 ( $1 \times 10^8$  cells/mL) 後, 0.5 U/mL トロンビンで刺激した (37°C, 15 分). 遠心分離 (800 x g, 4°C, 20 分) 後の上清を回収後, 0.22 µm フィルターにてろ過した (Thrombin-stimulated platelet supernatant : Thr-PLT-sup). BMDM を Thr-PLT-sup にて 24 時間培養した後, 50 ng/mL LPS を含む Complete medium に交換し, さらに 24 時間培養した. 培養上清中に含まれる NO<sub>2</sub><sup>-</sup> および TNF-α, IL-6 を測定した. コントロールとして, トロンビンのみ (Thr) および無刺激の血小板の上清 (PLT-sup) を用いた.

次に、PLT-CM に含まれるマクロファージ応答の抑制成分の性状を解析するために、限外ろ過法により $>10$  kDa と $<10$  kDa に分画した。これらの画分を用いて BMDM を 24 時間培養し、LPS 刺激による NO 産生を測定した。その結果、 $>10$  kDa の画分に NO 産生の抑制効果が観察された (Figure 2-6A)。活性を有する $>10$  kDa の画分について、 $100^{\circ}\text{C}$ 、30 分間の熱処理を行ったところ、NO 産生の抑制活性は消失した (Figure 2-6B)。これらの結果から、マクロファージの NO 産生応答の抑制活性を有する血小板由来因子は、 $10$  kDa 以上の熱に不安定な物質であることが示唆された。次いで、Superose 6 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、 $>10$  kDa の画分を更に細かく分画したところ、マクロファージの NO 産生に対しての抑制活性は $>670$  kDa の広い範囲の画分より観察された (Figure 2-6C)。

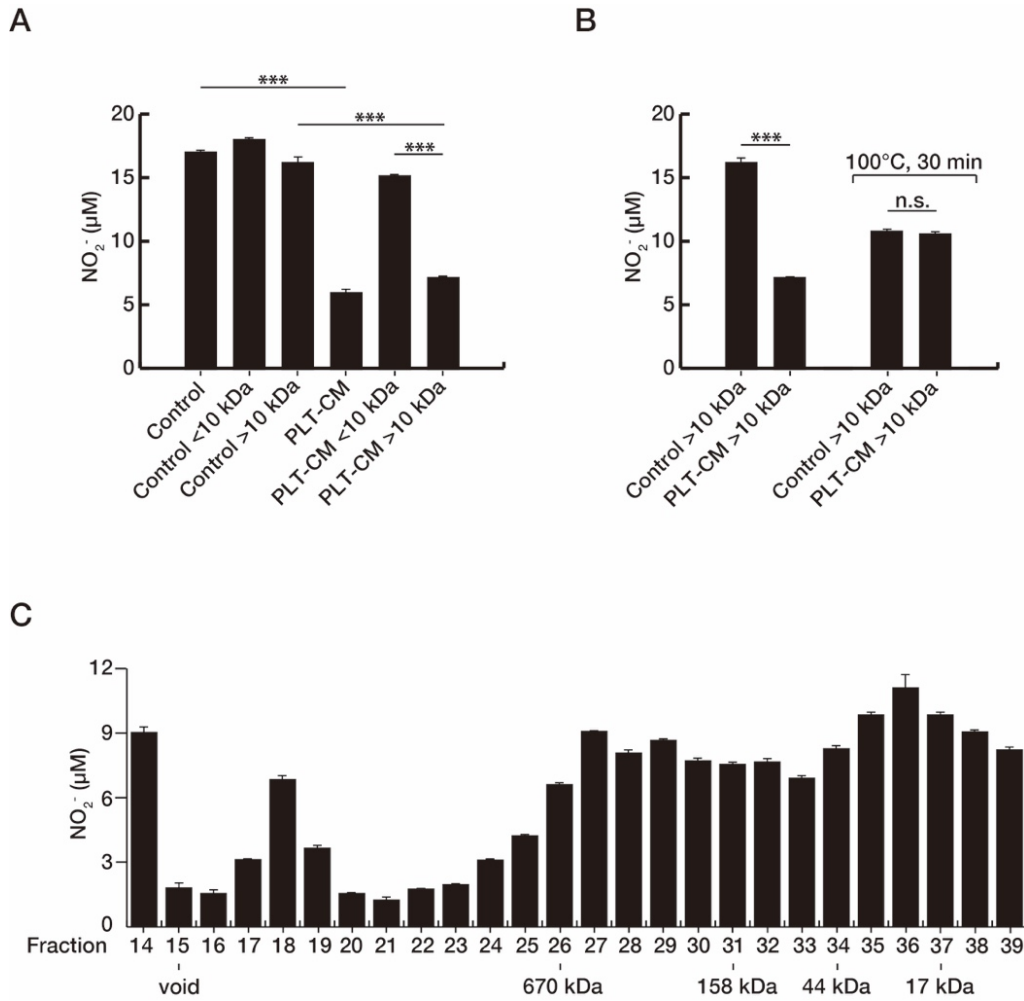


Figure 2-6 血小板由来の NO 産生抑制因子の性状

(A) Amicon Ultra-2mL 10K にて調製した PLT-CM の>10 kDa と<10 kDa の画分を用いて、BMDM ( $4 \times 10^5$  cells) を 24 時間培養した後、LPS で 24 時間刺激し、培養上清中に含まれる NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を測定した。コントロールとして、ASF104 無血清培地についても同様の分画を行った。(B) PLT-CM の>10 kDa の画分を 100°C、30 分の条件で熱処理を行い、(A) と同様の方法で NO 産生を評価した。(C) PLT-CM の>10 kDa の画分を Superose 6 10/300 カラムに供し、得られた画分を 15% 含む ASF104 無血清培地で BMDM ( $4 \times 10^5$  cells) を 24 時間培養した。その後 LPS で 24 時間刺激し、培養上清中に含まれる NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を測定した。

#### 第四節 考察

本章では、血小板と共培養したマクロファージは LPS への感受性が低下し、NO や TNF- $\alpha$ , IL-6 の産生量が減少することを明らかにした (Figure 2-1). またそれらの産生の減少は、ザイモザンに対しての応答においても同様に観察され (Figure 2-4), 血小板によるマクロファージの炎症応答の抑制は、微生物成分による様々な受容体からの刺激に対して効果があることが示された. また、マクロファージ応答の抑制に血小板とマクロファージとの直接の接触は必ずしも必要ではなく (Figure 2-2), 血小板由来の可溶性因子が担っていることが明らかになった. その因子は、熱に不安定な高分子、おそらくタンパク質もしくはタンパク質複合体であると推測された (Figure 2-6). また、この血小板由来可溶性因子は血小板の顆粒中に含まれ、トロンビン刺激により放出されることを示した (Figure 2-5).

実験的血小板減少モデルマウスを用いた近年の研究により、LPS により誘導されるエンドトキシン血症が重篤化することが明らかにされており、その分子機構として LPS により活性化された血小板から放出されるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) が、マクロファージの LPS に対する炎症応答を抑制していることが報告された(28). そこで、我々の実験系においても PGE<sub>2</sub> の関与を検討した. シクロオキシゲナーゼ-1 (Cyclooxygenase-1 : COX-1) 阻害剤であるアスピリンで処理した血小板を用いて解析を行ったが、LPS に対するマクロファージの炎症性応答の血小板依存的な抑制に影響はみられなかった (未発表データ). 血小板由来可溶性因子という点では類似しているが、我々の実験系では LPS 刺激以降に血小板は存在しておらず、血小板が LPS によって活



性化されるステップは存在しない。また、抑制活性を有する因子がゲルろ過クロマトグラフィーにより高分子画分より回収されたことや (Figure 2-6C), PGE<sub>2</sub> の生物学的半減期を考慮すると, PGE<sub>2</sub> 以外の因子の関与が示唆された。また, BMDM の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-6) の産生を抑制する因子は, ゲルろ過クロマトグラフィーにより NO 産生を抑制する画分より低分子の画分に回収された (未発表データ)。これらの結果から, 血小板は複数の可溶性因子により, マクロファージ応答を制御していることが考えられた。

### 第三章 血小板によるマクロファージの NO 産生抑制のメカニズム解析

#### 第一節 緒言

活性化したマクロファージから産生される NO は、殺菌や腫瘍細胞傷害性、ウイルスの不活化などにおいて重要な役割を担っている(31-33)。また、活性酸素 (Reactive oxygen species : ROS) との反応により生成される亜硝酸過酸化物 (Peroxynitrite) は、酸化力がきわめて強く、NO と同様に生理現象と密接に関係している(34)。しかしながら、敗血症などに伴う過剰な NO 産生は組織障害や全身性の血管拡張、低血圧を引き起こし、機能障害や低灌流を招く(24,35-38)。NO の生合成は、L-アルギニンを L-シトルリンと NO に変換する酵素である一酸化窒素合成酵素 (NOS) によって触媒され、また NOS には神経型 NOS (Neuronal NOS : nNOS, NOS1) , 誘導型 NOS (Inducible NOS : iNOS, NOS2) , 内皮型 NOS (Endothelial NOS : eNOS, NOS3) の三種類のアイソフォームが存在し、nNOS と eNOS はそれぞれ脳と血管内皮において恒常的に発現しているのに対し、iNOS はマクロファージなどにおいて、主にサイトカインや LPS などの微生物由来成分により発現が誘導される(24)。アルギナーゼは、アルギニン代謝に関係するもう一つの酵素であり、L-アルギニンを L-オルニチンと尿素に変換する。哺乳類においては、主に肝臓において発現するアルギナーゼ 1 と、腎臓において発現するアルギナーゼ 2 の二つのアイソフォームが存在しており、両者は尿素回路で働く酵素として体内の L-アルギニン/L-オルニチンの濃度を制御している(39,40)。マクロファージにおいてアルギナーゼ 1 は、L-アルギニンを iNOS と競合することにより NO

産生の調節を行っており、iNOS/アルギナーゼ 1 の発現バランスはアルギニン代謝を通して、マクロファージの炎症応答に大きな影響を与えることが示唆されている(39,41-43). また、アルギナーゼ 1 の発現は、IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインにより誘導されることが知られている(44).

マクロファージにおける iNOS やアルギナーゼ 1 の発現は、マクロファージの機能的な分類にも利用されている(42,45). マクロファージは、M1-マクロファージ (Classically activated macrophage : CAM としても知られる) と M2-マクロファージ (Alternatively activated macrophage : AAM としても知られる) とに大別される. M1-マクロファージは、iNOS や TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 の発現により特徴づけられており、Th1 サイトカインや微生物由来成分により誘導される(46). 一方、M2-マクロファージは、アルギナーゼ 1 や IL-10, トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$  : TGF- $\beta$ ) などの発現をはじめとする抗炎症性の表現系を示し、免疫寛容や組織修復、創傷治癒、繊維化において重要な役割を担っている(47).

本章では、活性化血小板由来の可溶性因子によって誘導されるマクロファージの形質変化を精査し、微生物由来成分に対する応答に際して、アルギニン代謝に関与する二つの酵素である iNOS ならびにアルギナーゼ 1 の発現が影響を受けていることを明らかにした. また、iNOS の発現に重要な NF- $\kappa$ B シグナル経路が血小板由来因子により変調されていることを示した.

## 第二節 試薬及び方法

### ・試薬

LPS (*Escherichia coli* O-111), MEM non-essential amino acids solution (x100), 2-メルカプトエタノール, カナマイシン硫酸塩, RPMI-1640 培地, ザイモザン, Triton X-100, ASF104 無血清培地, FBS は第 2 章に記した.  $\alpha$ -イソニトロソプロピオフェノンおよびプロテアーゼインヒビターカクテルは, Sigma-Aldrich より購入した. オリゴヌクレオチドは FASMAC CO., Ltd. (神奈川県) より購入した. BCA Protein Assay Kit は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) より購入した.

抗マウス TLR4/MD-2 複合体抗体 (MTS510) および抗マウス CD16/32 抗体 (93) は Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) より購入した. ビオチン標識抗マウス CD14 抗体 (Sa14-2) および PE 標識ストレプトアビジンは, Biolegend (San Diego, CA, USA) より購入した. 抗マウス iNOS 抗体 (54/iNOS) は BD Biosciences より購入した. 抗アルギナーゼ 1 抗体 (EPR6671(B)) は Abcam (Cambridge Science Park, Cambridge, UK) より購入した. 抗 GAPDH 抗体 (6C5) は EMD Millipore (Billerica, MA, USA) より購入した. I $\kappa$ B $\alpha$  (L35A5) およびリン酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32) (14D4), NF- $\kappa$ B p65 (D14E12), リン酸化 NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (93H1), p38 MAMK (D13E1), リン酸化 p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9), SAPK/JNK (#9252), リン酸化 SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11), ERK1/2 (137F5), リン酸化 ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) に対する抗体, HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体ならびに HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗

体は, Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA) より購入した. Alexa Fluor 647 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体は Thermo Fisher Scientific より購入した.

- ・ マウス

BALB/c マウス (5-8 週齢) は, 日本 SLC 株式会社より購入した. 全ての実験は, 星薬科大学動物実験指針に基づき行った.

- ・ マウス骨髄由来マクロファージの調製

マウス骨髄由来マクロファージ (Bone marrow-derived macrophage : BMDM) は, 第二章と同様の方法で調製した.

- ・ PLT-sup によるマクロファージの培養

洗浄血小板は, 第二章と同様の方法を用いて調製した. 洗浄血小板を ASF104 無血清培地で懸濁 ( $1 \times 10^8$  cells/mL) した後, 0.5 U/mL トロンビンにて 37°C, 15 分間の刺激を行った. 遠心分離 (800 x g, 15 分, 4°C) 後, 得られた上清は 0.22  $\mu$ m フィルターにてろ過した (PLT-sup). その後, BMDM を PLT-sup で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養した (PLT-BMDM). また, 対照として, 0.5 U/mL トロンビンを添加した培地による BMDM の培養を行った (Control BMDM).

- ・ NO 産生

NO 産生は, 第二章と同様の方法で計測した.

- ・アルギナーゼ活性測定

アルギナーゼ活性は Chandra らの方法を一部改変した(48). BMDM ( $4 \times 10^5$  cells) に 100  $\mu$ L のプロテアーゼインヒビターカクテルを含む 0.1% Triton X-100 を加え, 室温で 10 分間静置した. 遠心分離 (20,000 x g, 20 分, 4°C) 後, 得られた上清(18  $\mu$ L)に 1  $\mu$ L の 0.5 M Tris-HCl (pH7.5) および 0.1 M  $MnCl_2$  を加え, 56°C で 10 分間静置した. 20  $\mu$ L の 0.5 M L-アルギニン-HCl (pH 9.7) を加え 37°C で 60 分間加温後, 160  $\mu$ L の停止液 ( $H_2SO_4/H_3PO_4/H_2O$ , 1:3:7) を加え, L-アルギニンの加水分解反応を停止した. 反応液中の生成した尿素は, 8  $\mu$ L の 9%  $\alpha$ -イソニトロソプロピオフェノンを加えた後, 100°C で 60 分間加熱し呈色した. 室温暗所で 10 分間静置後, 570 nm の吸光度を MTP-450 (コロナ電気株式会社) で計測した. アルギナーゼ活性は, BCA Protein Assay Kit を用いて細胞溶解液中のタンパク質濃度を計測し, サンプル間の補正を行い, 一分間に生成する尿素の量 (nmol/min/mg protein) で示した.

- ・ RT-qPCR

RT-qPCR は, 第二章と同様の方法で行った. 使用したプライマーを Table 2 に示した.

- ・ ウェスタンブロット

BMDM を 1  $\times$  SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl, 1% SDS, 5% グリセロール, 0.01% ブロモフェノールブルー, pH6.8) で溶解した. 得られた細胞溶解

液は、超音波処理をした後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) のサンプルとした。SDS-PAGE およびウエスタンブロットは前報に従った(49)。

- ・ データ処理

各実験は Triplicate で行い、統計処理は Student の  $t$  検定を用いて  $p < 0.05$  を有意差ありとした。図中のグラフデータは、平均値  $\pm$  SEM で示し、\*\*\*は  $p < 0.005$  を示す。

Table 2 RT-qPCR で用いたプライマー

プライマー		配列									
		5'									3'
<i>Gapdh</i>	Forward	TGA	AGC	AGG	CAT	CTG	AGG	G			
	Reverse	CGA	AGG	TGG	AAG	AGT	GGG	AG			
<i>Tnf</i>	Forward	CAG	GCG	GTG	CCT	ATG	TCT	C			
	Reverse	ATG	AGA	GGG	AGG	CCA	TTT	GG			
<i>Il6</i>	Forward	ATA	CCA	CTC	CCA	ACA	GAC	CTG	TC		
	Reverse	TTT	CTG	CAA	GTG	CAT	CAT	CGT	TG		
<i>Il1b</i>	Forward	CAA	CCA	ACA	AGT	GAT	ATT	CTC	CAT	G	
	Reverse	GAT	CCA	CAC	TCT	CCA	GCT	GCA			
<i>Nos2</i>	Forward	TCC	AGG	GAT	TCT	GGA	ACA	TT			
	Reverse	GAA	GAA	AAC	CCC	TTG	TGC	TG			
<i>Arg1</i>	Forward	CAT	GAG	CTC	CAA	GCC	AAA	GT			
	Reverse	TTT	TTC	CAG	CAG	ACC	AGC	TT			
<i>Fizz1</i>	Forward	ACT	GCC	TGT	GCT	TAC	TCG	TTG	ACT		
	Reverse	AAA	GCT	GGG	TTC	TCC	ACC	TCT	TCA		
<i>Ym1</i>	Forward	CAC	CAT	GGC	CAA	GCT	CAT	TCT	TGT		
	Reverse	TAT	TGG	CCT	GTC	CTT	AGC	CCA	ACT		
<i>Mrc1</i>	Forward	CCA	CAG	CAT	TGA	GGA	GTT	TG			
	Reverse	ACA	GCT	CAT	CAT	TTG	GCT	CA			



### 第三節 実験結果

初めに、マクロファージの LPS 応答における NO 産生に、血小板由来可溶性因子 (Thrombin-stimulated platelet supernatant : PLT-sup) が与える影響を経時的に調べた。BMDM を PLT-sup で 24 時間培養 (PLT-BMDM) した後、LPS にて刺激した (0-24 時間)。その結果、PLT-BMDM は 0.5 U/mL トロンビンのみで培養した BMDM (Control BMDM) と比較して、LPS 刺激 12-24 時間後まで NO 産生が減少した (Figure 3-1)。この結果より、活性化血小板由来の可溶性因子の存在下で LPS に対する感受性が低下することが示された。

LPS は血清中に多く存在する LPS 結合タンパク質 (LPS-binding protein : LBP) に結合した後、LPS-LBP 複合体を形成し、その複合体がマクロファージの細胞表面に発現する受容体 CD14 によって認識される。形成された LPS-LBP-CD14 は、その後、Toll-like receptor 4 (TLR4)/Myeloid differentiation factor 2 (MD-2) 複合体に運ばれ、細胞内への活性化シグナルを伝達する(30)。そこで、PLT-BMDM において、LPS 受容体の発現が変化している可能性を検討した。PLT-BMDM 細胞表面上の CD14 および TLR4/MD-2 の発現をフローサイトメトリーにて解析したところ、Control BMDM との間に顕著な差は認められなかった (Figure 3-2)。このことから、PLT-BMDM において観察される NO 産生抑制は、CD14 もしくは TLR4/MD-2 複合体の減少によるものではないと推測された。

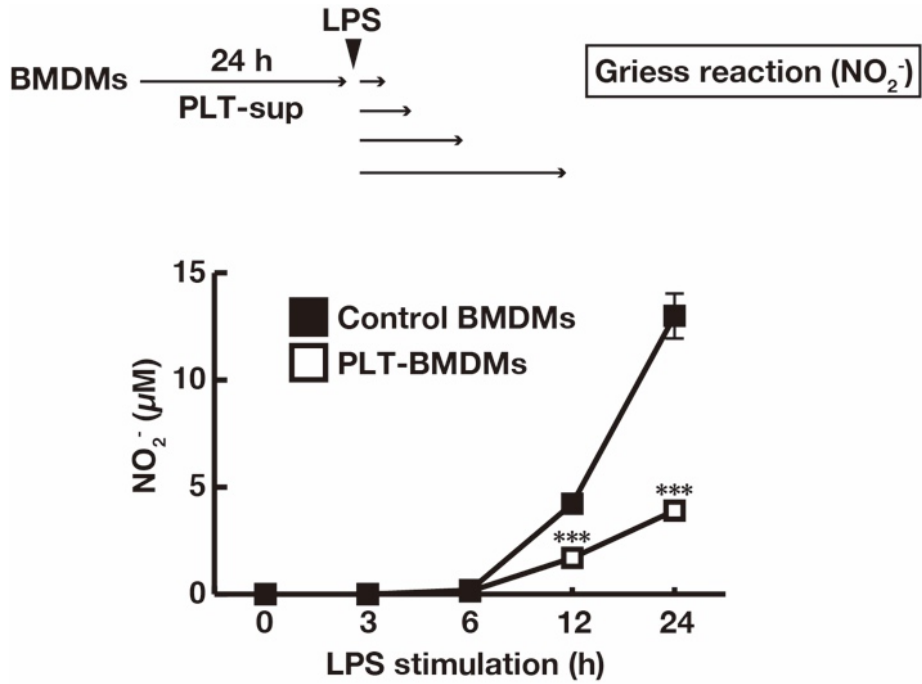


Figure 3-1 PLT-sup により前培養した BMDM の LPS で誘導される NO 産生

BMDM ( $2.5 \times 10^6$  cells/3.5 cm シャーレ) を PLT-sup にて 24 時間培養した (PLT-BMDM) 後, 50 ng/mL LPS を含む Complete medium で培養した (0-24 時間). 対照として, 0.5 U/mL トロンビンを含む培地にて BMDM を 24 時間培養した (Control BMDM). その後, 培養上清中に含まれる  $\text{NO}_2^-$  を Griess 法により測定した.

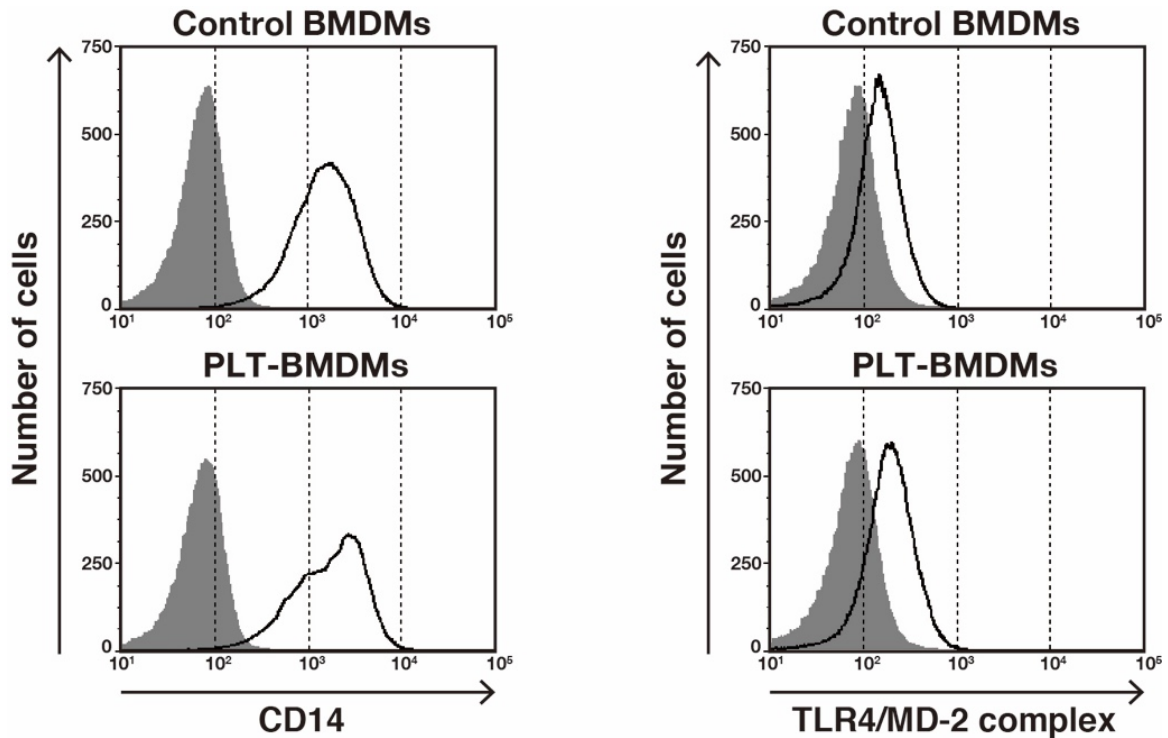


Figure 3-2 PLT-BMDM における CD14 および TLR4/MD-2 複合体の発現

PLT-BMDM および Control BMDM を，抗マウス CD16/32 抗体により 4℃，10 分の条件でブロッキングした．その後，ビオチン標識抗マウス CD14 抗体もしくは抗マウス TLR4/MD-2 複合体抗体で染色（4℃，30 分）した後，PE 標識ストレプトアビジンもしくは Alexa Fluor 647 標識抗ラット IgG-抗体で染色（4℃，30 分）した．FACSVerse フローサイトメーター（BD Bioscience）により解析し，縦軸に細胞数，横軸に蛍光強度をとり，ヒストグラムで表示した．黒線は一次抗体あり，灰色の塗りつぶしは一次抗体なしの結果を示した．

次に、PLT-BMDMにおけるマクロファージの極性化マーカーの遺伝子発現について RT-qPCR にて解析した。一般的に知られている M1-マクロファージマーカー (*Nos2*, *Tnf*, *Il6*, *Il1b*) および M2-マクロファージマーカー (*Arg1*, *Fizz1*, *Ym1*, *Mrc1*) の発現量を Control BMDM と比較した。その結果、アルギニン代謝に関与する二つの酵素の遺伝子 (*Nos2* および *Arg1*) において著しい変化が観察された。PLT-BMDM は Control BMDM と比較して *Nos2* (iNOS) が低く、*Arg1* (アルギナーゼ 1) の発現が高いことが明らかになった (Figure 3-3A)。しかしながら、他の極性化マーカー (*Tnf*, *Il6*, *Il1b*, *Fizz1*, *Ym1*, *Mrc1*) については著しい変化は認められなかった。これらの結果より、PLT-sup は BMDM の M2-マクロファージ様への極性化を誘導するが、このマクロファージは典型的な M2-マクロファージとは異なることが示された。また、PLT-sup による BMDM のアルギナーゼ 1 タンパク質の発現はウエスタンブロットにて解析した (Figure 3-3B)。さらに、その活性についてはアルギナーゼ活性測定により確認した (Figure 3-3C)。以上の結果より、PLT-BMDM は Control BMDM に比べ、アルギナーゼ 1 が高発現であることが明らかになった。

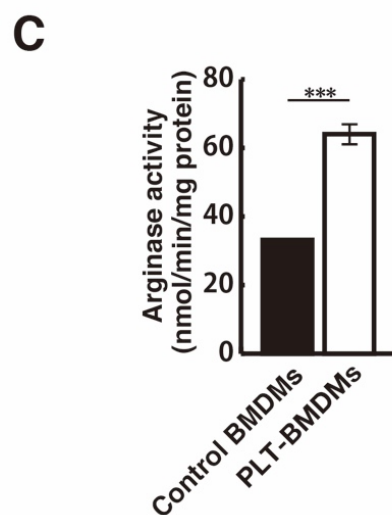
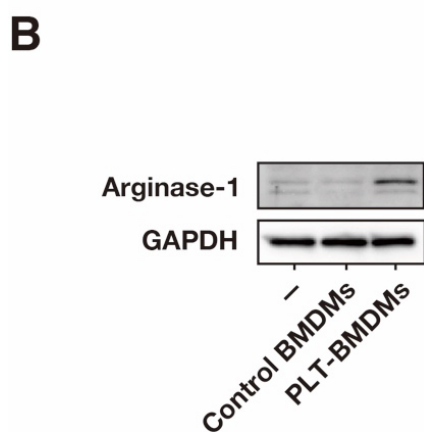
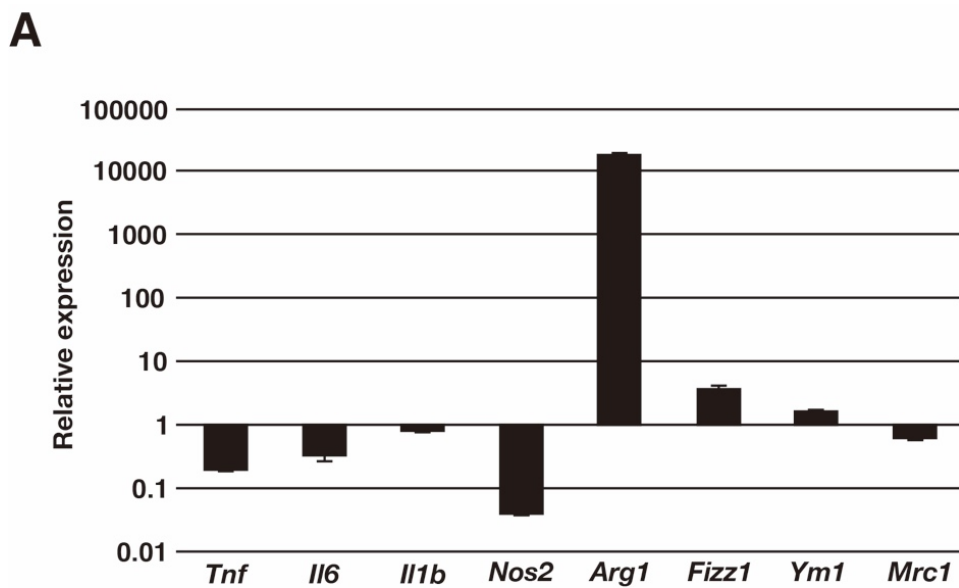


Figure 3-3 PLT-sup による BMDM のアルギナーゼ 1 発現誘導

(A) PLT-BMDM および Control BMDM における *Tnf*, *Il6*, *Il1b*, *Nos2*, *Arg1*, *Fizz1*, *Ym1*, *Mrc1* の遺伝子発現を RT-qPCR を用いて解析した. Control BMDM におけるそれぞれの遺伝子発現量を 1 として, PLT-BMDM における相対的発現量をグラフに示した. (B) PLT-BMDM および Control BMDM におけるアルギナーゼ 1 および GAPDH の発現量をウエスタンブロットで解析した. (C) PLT-BMDM および Control BMDM のアルギナーゼ活性を測定した.

近年、マクロファージの NO 産生における iNOS/アルギナーゼ 1 の発現バランスの重要性が議論されている(42). TLR を介した活性化がマクロファージのアルギナーゼ 1 の発現に影響を与えるとの報告があることから(50,51), PLT-BMDM と Control BMDM を LPS で 24 時間刺激後, RT-qPCR を用いて *Nos2* および *Arg1* の遺伝子発現について解析した. その結果, PLT-BMDM では Control BMDM と比較して, *Nos2* 遺伝子の発現量は 50%程度で, *Arg1* の遺伝子発現量は 40 倍であった. (Figure 3-4A). 次に, LPS で刺激した PLT-BMDM および Control BMDM における, iNOS およびアルギナーゼ 1 発現をウェスタンブロットにより経時的 (0, 3, 6, 12, 24 時間) に解析した. その結果, iNOS の発現は, Control BMDM では LPS 刺激 6 時間後より顕著に増加し, 24 時間後まで高い発現が維持されていたのに対し, PLT-BMDM では, この増加が抑制されていた (Figure 3-4B). 一方, アルギナーゼ 1 の発現は, Control BMDM では認められず, PLT-BMDM では LPS 刺激 12 時間後をピークに有意に増加していた. これらの結果より, PLT-BMDM で認められた NO 産生の低下には, iNOS の発現抑制とアルギナーゼ 1 の発現増加の両者に起因していることが示唆された. さらに, ザイモザンによる PLT-BMDM の刺激においても, Control BMDM と比較して, iNOS の発現抑制ならびにアルギナーゼ 1 の発現増加が観察された (Figure 3-4C). 以上より, PLT-sup によって形質変化した PLT-BMDM は, 微生物成分に対する異なる受容体 (TLR2 や TLR4) を介した刺激によっても同様に iNOS およびアルギナーゼ 1 の発現を調節していることが考えられた.

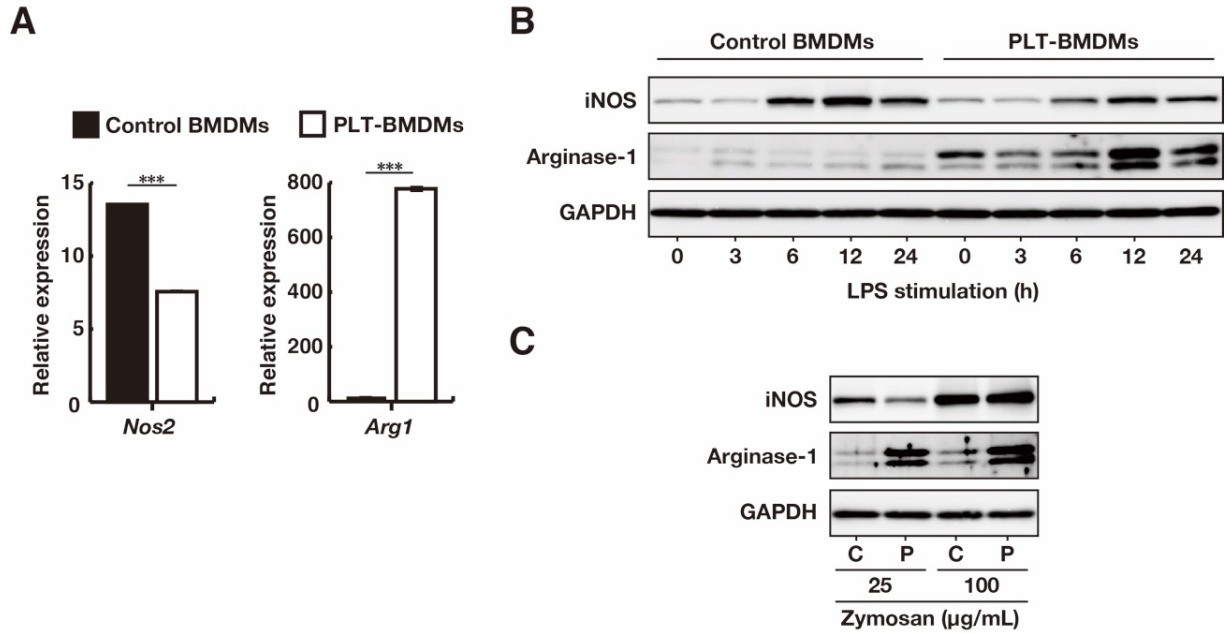


Figure 3-4 LPS 刺激した BMDM における iNOS およびアルギナーゼ 1 の発現

(A) PLT-BMDM および Control BMDM ( $2.5 \times 10^6$  cells) を LPS (50 ng/mL) にて 24 時間刺激後, *Nos2* および *Arg1* の遺伝子発現量を RT-qPCR を用いて解析した. Control BMDM におけるそれぞれの遺伝子発現量を 1 とし, PLT-BMDM における相対的発現量をグラフに示した. (B) PLT-BMDM および Control BMDM ( $2.5 \times 10^6$  cells) を LPS (50 ng/mL) で刺激 (0, 3, 6, 12, 24 時間) した後, iNOS およびアルギナーゼ 1, GAPDH の発現量をウエスタンブロットで解析した. (C) PLT-BMDM および Control BMDM ( $2.5 \times 10^6$  cells) をザイモザン (25 もしくは 100  $\mu\text{g/mL}$ ) で 12 時間刺激した後, iNOS およびアルギナーゼ 1, GAPDH の発現量をウエスタンブロットで解析した.

次に, PLT-supによる iNOSの発現抑制機構を明らかにするため, PLT-BMDMにおける TLR4 の下流のシグナル伝達経路について解析した. Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) 経路は, iNOSの発現調節に関わる非常に重要なシグナル伝達経路であることが知られていることから(52,53), Inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) (NF- $\kappa$ B p65の核移行阻害タンパク質) ならびに NF- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B 経路における転写因子) に着目した(54). PLT-BMDM および Control BMDM を LPS で刺激 (0-120 分) し, リン酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  ならびにリン酸化 NF- $\kappa$ B p65 をウエスタンブロットにより経時的に検出した. その結果, Control BMDM における I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化は, 5-10 分と 60-120 分の二相性のピークを示し, PLT-BMDM では同様な二相性の I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化のピークを認めたが, 60-120 分におけるリン酸化体の量は著しく減少していた (Figure 3-5). また, NF- $\kappa$ B p65 は LPS 刺激によって持続的にリン酸化されるが PLT-BMDM においてはその発現が低下しており, それに伴いリン酸化体も減少していた. また, Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を担う Extracellular signal-regulated kinase (ERK) および c-jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAP kinase についても同様にリン酸化体の検出を行った. その結果, ERK および JNK, p38 MAP kinase は, 10-30 分に一過性のリン酸化が起こるが, Control BMDM と PLT-BMDM との間に顕著な違いは認められなかった.



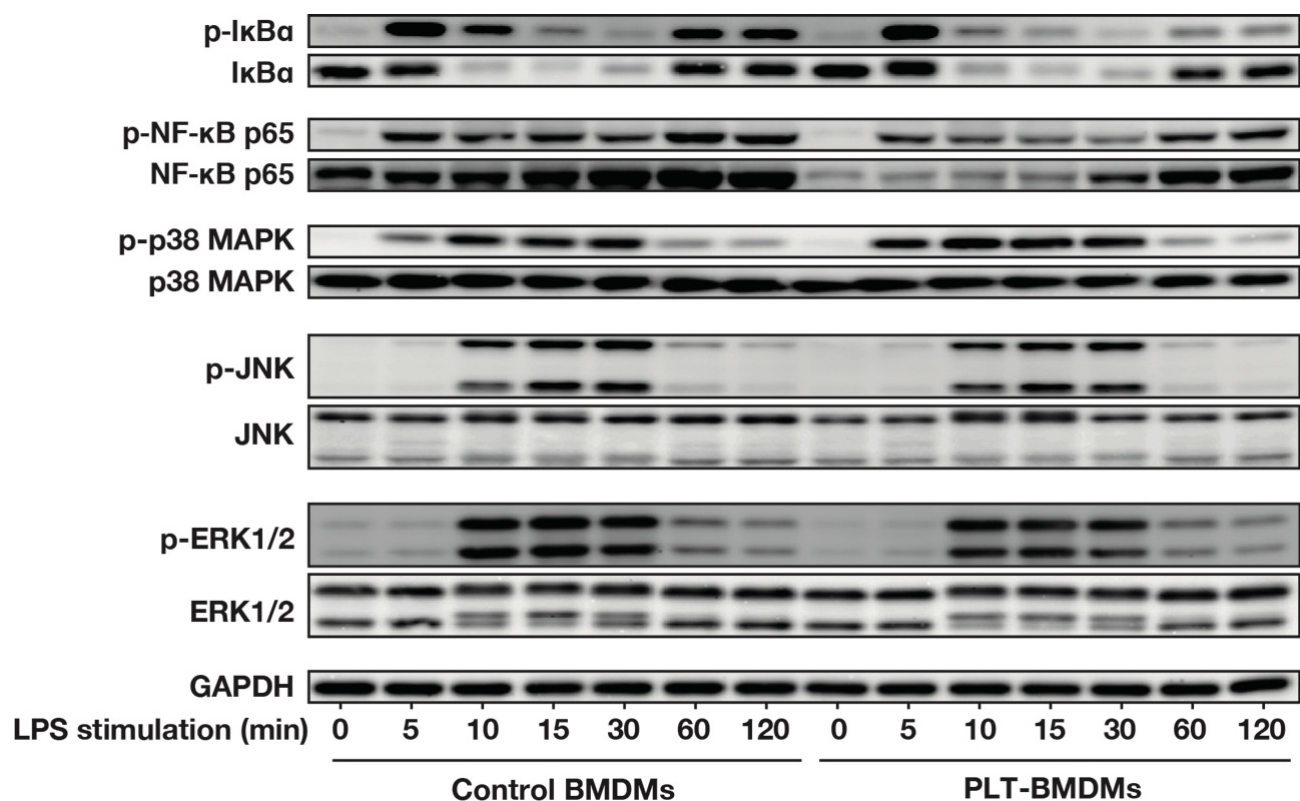


Figure 3-5 LPS 刺激後の BMDM における NF-κB および MAPK 経路分子群のウエスタンブロット解析

PLT-BMDM および Control BMDM ( $2.5 \times 10^6$  cells) を LPS (50 ng/mL) により刺激 (0-120 分) した後,  $1\times$  SDS sample buffer で溶解した. SDS-PAGE 後, リン酸化 IκBα, 総 IκBα, リン酸化 NF-κB p65, 総 NF-κB p65, リン酸化 p38 MAPK, 総 p38 MAPK, リン酸化 JNK, 総 JNK, リン酸化 ERK1/2, 総 ERK1/2, GAPDH に対する抗体を用いたウエスタンブロットを行った.

#### 第四節 考察

マクロファージから産生される NO は、微生物感染に対する生体防御において重要な役割を演じているが、過剰な NO 産生は、LPS により誘導される敗血症ショック症状に代表されるように病状の悪化を招くことが知られている(23,28)。本章では、第二章で明らかにした血小板由来可溶性因子によるマクロファージ応答の減弱を導く分子機構について解析を行った。

初めに、血小板由来可溶性因子 (PLT-sup) にて培養した BMDM は、LPS に対する応答において NO 産生が低下することを示した (Figure 3-1)。しかしながら、LPS によるシグナル伝達に関連する CD14 や TLR4/MD-2 複合体の発現量に変化がなかったことより (Figure 3-2)、血小板可溶性因子による BMDM の形質変化が考えられた。そこで、Control BMDM および PLT-BMDM におけるマクロファージ極性化マーカーの発現について比較した。その結果、PLT-BMDM では、*Nos2* の発現低下と *Arg1* の発現上昇が認められた (Figure 3-3)。また、アルギナーゼ 1 のタンパク質発現は、mRNA 発現の結果と一致していた。アルギナーゼ 1 は、M2-マクロファージにおいて選択的に発現しており、極性化マーカー分子としても知られている。PLT-BMDM は、*Arg1* の高発現が認められたにも関わらず *Fizz1*, *Ym1*, *Mrc1* などの M2-マクロファージマーカー分子の著しい発現増加がみられなかったことから、典型的な M2-マクロファージとは異なる細胞集団であることが示唆された。また、M2-マクロファージは、抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生を通して炎症反応を抑制することが知られているが、PLT-BMDM の IL-10 産生は検出限界

以下であったことから、PLT-BMDM が一般的な M2-マクロファージとは異なる集団であることが考えられた（未発表データ）。

また、PLT-BMDM では LPS により刺激した際に I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化が抑制され、また、NF- $\kappa$ B p65 の発現低下とそれに伴うリン酸化体の減少が観察された（Figure 3-5）。これらの結果より、PLT-BMDM は NF- $\kappa$ B 経路の阻害を介して LPS 刺激による iNOS の発現を抑制していることが示唆された。また、前章では、血小板由来可溶性因子が NO 産生のみならず、TNF- $\alpha$  や IL-6 の産生を抑制することを示している（Figure 2-2, 2-3, 2-5）、この NF- $\kappa$ B 経路の阻害は、これらサイトカインの産生に対しても影響を与えている可能性が考えられた。さらに、iNOS/アルギナーゼ 1 の発現変化は、PLT-BMDM をゼイモザンで刺激した際にも観察されたことから（Figure 3-4）、Myeloid differentiation primary response gene 88（MyD88）依存性経路に代表される TLR2 と TLR4 の共通の活性化シグナル経路の関与が示唆された。

マクロファージにおける TLR を介したアルギナーゼ 1 の発現機構は、多くの研究者によって解析されている。Qualls らは、結核菌が感染したマクロファージでは、TLR を介して IL-6, IL-10, G-CSF を産生し、それらのオートクライン/パラクライン作用により、STAT3 依存的にアルギナーゼ 1 の発現が誘導されることを報告した(55)。そこで、PLT-BMDM におけるアルギナーゼ 1 の発現増加が STAT3 依存的であるかを検討したところ、STAT3 のリン酸化は Control BMDM と同様であり、PLT-BMDM の TLR を介したアルギナーゼ 1 の発現増加は上述とは異なった分子機構であると考えられた（未発表データ）。近年、Chang らは、マウスの肝がん細胞株（ML-1<sub>4a</sub>）の培養上清に、

BMDMにおけるアルギナーゼ 1 の発現誘導や、NF- $\kappa$ B p65 の減少を引き起こす成分が含まれていること、その現象は TLR2 を介して引き起こされることを明らかにした。さらに、NF- $\kappa$ B p65 の発現減少は、p62/SQSTM1 を介した選択的オートファジーによる分解が関与していることを報告した(56)。これらの結果は、本研究で観察された NF- $\kappa$ B p65 の発現減少と類似しており、PLT-sup によるマクロファージの形質変化も同様に選択的オートファジーが関与している可能性が考えられた。

#### 第四章 総括および結論

本研究により，以下のことが明らかになった．

1. 血小板と共培養したマクロファージは，微生物由来成分に対する低い感受性を示し，NO や TNF- $\alpha$ ，IL-6 の産生量が減少した．
2. この感受性の低下には，血小板とマクロファージの接触は必要とせず，血小板由来のタンパク質もしくはタンパク質複合体によると推測された．
3. この活性因子は血小板の顆粒に含まれており，トロンビン刺激により放出された．
4. 血小板由来可溶性因子（PLT-sup）にて培養したマクロファージ（PLT-BMDM）では，iNOS の発現減少とアルギナーゼ 1 の発現上昇が起こり，微生物由来成分への応答において NO 産生量が低下していた．
5. LPS 刺激した PLT-BMDM では，Control BMDM と比較し，I $\kappa$ B $\alpha$  リン酸化の低下と NF- $\kappa$ B p65 の発現減少が認められた

血小板は，低いレベルで自発的に顆粒の内容物を分泌しており(57-60)，血小板の 24 時間培養上清にはトロンビン刺激（15 分）培養上清と類似成分が含まれているために，両者によるマクロファージの変化が同様であったと考えられた．

マクロファージは組織や臓器特異的な分布を示し，取り巻く微小環境により性質や形態が大きく異なることが知られている(61,62)．例えば，脾臓の赤脾髄では赤脾髄マクロファージが存在しており，老化した細胞の貪食や，微

生物などの異物のろ過に関与している(63). 全身の血小板の3分の1が赤脾髄に貯蔵されていることから、赤脾髄におけるマクロファージは、血小板由来物質により過剰な応答を抑制されていることが考えられた。また、感染症や局所的な血管内皮の損傷、炎症などにより活性化された血小板は、マクロファージの過剰な活性化に起因する敗血症からの回避に関連している可能性が考えられた。

アルギナーゼ1を高発現しているマクロファージは、*in vivo*において様々な炎症組織に分布していることが報告されている(64-67)。また、*in vitro*においては、IL-4、IL-13、酸化低密度リポタンパク質（Oxidized low-density lipoprotein : Ox-LDL）などによって発現が誘導されることが明らかにされている(44,68)。これらのアルギナーゼ1発現マクロファージは、T細胞の周囲からL-アルギニンを枯渇させることで、抗原特異的なサイトカイン産生ならびに細胞増殖を抑えていることが示されている(69,70)。

これらのことから、赤脾髄マクロファージは近傍の血小板より分泌される顆粒成分に曝されることによりアルギナーゼ1発現を導き、自身の過剰な免疫応答の抑制や周囲の免疫細胞を抑制していることが示唆された。近年、アルギナーゼ1発現マクロファージはL-プロリンやポリアミンの生成を通してコラーゲン産生や繊維化を促進することで、組織修復や創傷治癒に関与していると考えられている(71-73)。

本研究において、血小板によるマクロファージの免疫応答抑制効果を明らかにした。近年、血小板による免疫細胞調節作用は注目されており、活性化血小板が末梢血単核球や単球由来マクロファージの炎症性サイトカイン産生

を増加させることや(74,75), クッパー細胞への血小板の接着は肝臓における病原体排除を促進することが報告されている(76). また, トロンビンにより活性化した血小板が末梢血単核球に対して CD40/CD40L 相互作用に関連した抗炎症作用を示すことや(77), 血小板由来マイクロ粒子が LPS に誘導されるマクロファージのサイトカイン産生を減少させることが明らかにされている(78). したがって, 血小板は異なる組織を起源とする多様なマクロファージを調節している可能性が考えられた. 本文中にデータは示さないが, マウス腹腔由来マクロファージは BMDM 同様に血小板依存的な活性化抑制を示したが, マウス肺胞由来マクロファージの抑制効果は認められなかった (未発表データ). このように, 血小板によるマクロファージの機能的な調節効果は, その由来や種類に規定されていることが示唆された.

本研究では, 血小板によるマクロファージの iNOS/アルギナーゼ 1 の発現バランスを介した活性化抑制機構の一端を解明した. マクロファージの NO 産生抑制効果およびサイトカイン産生抑制効果は異なる分子に依ることが明らかになったため (Figure 2-6 および第 2 章未発表データ), 複数の血小板由来因子が様々な方向からマクロファージの過剰な活性化を抑制していることが示唆された. さらに, 血小板によるマクロファージの抑制効果は, 生体内でのマクロファージの過剰な活性化を常に抑制している可能性を示唆しており, 血小板の動態が免疫応答に多大な影響を及ぼすことが考えられた. 今後, 血小板が制御するマクロファージの応答機構のさらなる解析を行うことで, 血小板の免疫細胞としての新しい役割を解明し, 感染症の新しい治療戦略に貢献したい.

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり，終始温かく多大な御指導御鞭撻を賜り，また本論文の御校閲を頂きました星薬科大学微生物学教室 辻 勉 教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり，数々の場面で御助言御協力を頂き，日々の研究だけでなく多くの御指導をしていただき，辛抱強く見守って下さいました星薬科大学微生物学教室 奥 輝明 講師に心より厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり，数々の御協力を頂きました星薬科大学微生物学教室 栗坂 知里 学士に深く感謝申し上げます。また，星薬科大学微生物学教室 築地 信 准教授をはじめ微生物学教室の皆様には大変お世話になり，深く感謝致します。

最後に，研究生活から学校生活に至るまで，あらゆる支援をして頂きました両親，そして，これまで私を支えて頂きました兄弟，数多くの先輩，友人，後輩，全ての方々に心より感謝申し上げます。



## 参考文献

1. Majerus, P. W., and Miletich, J. P. (1978) Relationships between platelets and coagulation factors in hemostasis. *Annu. Rev. Med.* **29**, 41-49
2. Deutsch, V. R., and Tomer, A. (2006) Megakaryocyte development and platelet production. *Br. J. Haematol.* **134**, 453-466
3. Semple, J. W., Italiano, J. E., and Freedman, J. (2011) Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 264-274
4. Badimon, L., Vilahur, G., and Padro, T. (2009) Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. *Revista espanola de cardiologia* **62**, 1161-1178
5. von Hundelshausen, P., and Weber, C. (2007) Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* **100**, 27-40
6. Li, C., Li, J., Li, Y., Lang, S., Yougbare, I., Zhu, G., Chen, P., and Ni, H. (2012) Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries. *Advances in hematology* **2012**, 384685
7. Mantovani, A., and Garlanda, C. (2013) Platelet-macrophage partnership in innate immunity and inflammation. *Nat. Immunol.* **14**, 768-770
8. Garraud, O., and Cognasse, F. (2015) Are Platelets Cells? And if Yes, are They Immune Cells? *Frontiers in immunology* **6**, 70
9. Jenne, C. N., and Kubes, P. (2015) Platelets in inflammation and infection. *Platelets* **26**, 286-292

10. Schofield, L., and Grau, G. E. (2005) Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 722-735
11. Gleissner, C. A., von Hundelshausen, P., and Ley, K. (2008) Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1920-1927
12. Andre, P. (2004) P-selectin in haemostasis. *Br. J. Haematol.* **126**, 298-306
13. Inwald, D. P., McDowall, A., Peters, M. J., Callard, R. E., and Klein, N. J. (2003) CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* **92**, 1041-1048
14. Henn, V., Slupsky, J. R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G., and Kroczeck, R. A. (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391**, 591-594
15. Henn, V., Steinbach, S., Buchner, K., Presek, P., and Kroczeck, R. A. (2001) The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* **98**, 1047-1054
16. Andonegui, G., Kerfoot, S. M., McNagny, K., Ebbert, K. V., Patel, K. D., and Kubes, P. (2005) Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* **106**, 2417-2423
17. Aslam, R., Speck, E. R., Kim, M., Crow, A. R., Bang, K. W., Nestel, F. P., Ni, H., Lazarus, A. H., Freedman, J., and Semple, J. W. (2006) Platelet Toll-like

- receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood* **107**, 637-641
18. Beutler, B., and Rietschel, E. T. (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 169-176
  19. Takeda, K., and Akira, S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**, 1-14
  20. Martin, G. S. (2012) Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert review of anti-infective therapy* **10**, 701-706
  21. Angus, D. C., and van der Poll, T. (2013) Severe Sepsis and Septic Shock. *New Engl. J. Med.* **369**, 840-851
  22. Schulte, W., Bernhagen, J., and Bucala, R. (2013) Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators of inflammation* **2013**, 165974
  23. Vincent, J. L., Zhang, H., Szabo, C., and Preiser, J. C. (2000) Effects of nitric oxide in septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1781-1785
  24. Titheradge, M. A. (1999) Nitric oxide in septic shock. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 437-455
  25. Aktan, F. (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* **75**, 639-653

26. MacMicking, J., Xie, Q. W., and Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 323-350
27. Liu, V. W., and Huang, P. L. (2008) Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovascular research* **77**, 19-29
28. Xiang, B., Zhang, G., Guo, L., Li, X. A., Morris, A. J., Daugherty, A., Whiteheart, S. W., Smyth, S. S., and Li, Z. (2013) Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway. *Nature communications* **4**, 2657
29. Weischenfeldt, J., and Porse, B. (2008) Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH protocols* **2008**, pdb prot5080
30. Park, B. S., and Lee, J. O. (2013) Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & molecular medicine* **45**, e66
31. Gobert, A. P., Daulouede, S., Lepoivre, M., Boucher, J. L., Bouteille, B., Buguet, A., Cespuglio, R., Veyret, B., and Vincendeau, P. (2000) L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect. Immun.* **68**, 4653-4657
32. Xu, W., Liu, L. Z., Loizidou, M., Ahmed, M., and Charles, I. G. (2002) The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res.* **12**, 311-320
33. Akaike, T., and Maeda, H. (2000) Nitric oxide and virus infection. *Immunology* **101**, 300-308

34. Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **87**, 315-424
35. Numata, M., Suzuki, S., Miyazawa, N., Miyashita, A., Nagashima, Y., Inoue, S., Kaneko, T., and Okubo, T. (1998) Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. *J. Immunol.* **160**, 3031-3037
36. Sass, G., Koerber, K., Bang, R., Guehring, H., and Tiegs, G. (2001) Inducible nitric oxide synthase is critical for immune-mediated liver injury in mice. *J. Clin. Invest.* **107**, 439-447
37. Garcia-Bonilla, L., Moore, J. M., Racchumi, G., Zhou, P., Butler, J. M., Iadecola, C., and Anrather, J. (2014) Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice. *J. Immunol.* **193**, 2531-2537
38. Heemskerk, S., Masereeuw, R., Russel, F. G., and Pickkers, P. (2009) Selective iNOS inhibition for the treatment of sepsis-induced acute kidney injury. *Nature reviews. Nephrology* **5**, 629-640
39. Munder, M. (2009) Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 638-651
40. Morris, S. M., Jr. (2009) Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 922-930
41. Bronte, V., and Zanovello, P. (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 641-654

42. Rath, M., Muller, I., Kropf, P., Closs, E. I., and Munder, M. (2014) Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Frontiers in immunology* **5**, 532
43. Ash, D. E. (2004) Structure and function of arginases. *J. Nutr.* **134**, 2760S-2764S; discussion 2765S-2767S
44. Pauleau, A. L., Rutschman, R., Lang, R., Pernis, A., Watowich, S. S., and Murray, P. J. (2004) Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J. Immunol.* **172**, 7565-7573
45. Muraille, E., Leo, O., and Moser, M. (2014) TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Frontiers in immunology* **5**, 603
46. Martinez, F. O., and Gordon, S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* **6**, 13
47. Roszer, T. (2015) Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of inflammation* **2015**, 816460
48. Chandra, S., Romero, M. J., Shatanawi, A., Alkilany, A. M., Caldwell, R. B., and Caldwell, R. W. (2012) Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 506-519
49. Oku, T., Itoh, S., Ishii, R., Suzuki, K., Nauseef, W. M., Toyoshima, S., and Tsuji, T. (2005) Homotypic dimerization of the actin-binding protein

- p57/coronin-1 mediated by a leucine zipper motif in the C-terminal region. *Biochem. J.* **387**, 325-331
50. Sonoki, T., Nagasaki, A., Gotoh, T., Takiguchi, M., Takeya, M., Matsuzaki, H., and Mori, M. (1997) Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **272**, 3689-3693
51. El Kasmi, K. C., Qualls, J. E., Pesce, J. T., Smith, A. M., Thompson, R. W., Henao-Tamayo, M., Basaraba, R. J., Konig, T., Schleicher, U., Koo, M. S., Kaplan, G., Fitzgerald, K. A., Tuomanen, E. I., Orme, I. M., Kanneganti, T. D., Bogdan, C., Wynn, T. A., and Murray, P. J. (2008) Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* **9**, 1399-1406
52. Xie, Q. W., Kashiwabara, Y., and Nathan, C. (1994) Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 4705-4708
53. Griscavage, J. M., Wilk, S., and Ignarro, L. J. (1996) Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 3308-3312
54. Oeckinghaus, A., Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2011) Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat. Immunol.* **12**, 695-708

55. Qualls, J. E., Neale, G., Smith, A. M., Koo, M. S., DeFreitas, A. A., Zhang, H., Kaplan, G., Watowich, S. S., and Murray, P. J. (2010) Arginine usage in mycobacteria-infected macrophages depends on autocrine-paracrine cytokine signaling. *Science signaling* **3**, ra62
56. Chang, C. P., Su, Y. C., Hu, C. W., and Lei, H. Y. (2013) TLR2-dependent selective autophagy regulates NF-kappaB lysosomal degradation in hepatoma-derived M2 macrophage differentiation. *Cell Death Differ.* **20**, 515-523
57. Meyer, A., Wang, W., Qu, J., Croft, L., Degen, J. L., Collier, B. S., and Ahamed, J. (2012) Platelet TGF-beta1 contributions to plasma TGF-beta1, cardiac fibrosis, and systolic dysfunction in a mouse model of pressure overload. *Blood* **119**, 1064-1074
58. Switalska, H. I., Niewiarowski, S., Tuszynski, G. P., Rucinski, B., Schmaier, A. H., Morinelli, T. A., and Cierniewski, C. S. (1985) Radioimmunoassay of human platelet thrombospondin: different patterns of thrombospondin and beta-thromboglobulin antigen secretion and clearance from the circulation. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **106**, 690-700
59. Kowalska, M. A., Mahmud, S. A., Lambert, M. P., Poncz, M., and Slungaard, A. (2007) Endogenous platelet factor 4 stimulates activated protein C generation in vivo and improves survival after thrombin or lipopolysaccharide challenge. *Blood* **110**, 1903-1905



60. Levine, S. P., Lindenfeld, J., Ellis, J. B., Raymond, N. M., and Krentz, L. S. (1981) Increased plasma concentrations of platelet factor 4 in coronary artery disease: a measure of in vivo platelet activation and secretion. *Circulation* **64**, 626-632
61. Gordon, S., Pluddemann, A., and Martinez Estrada, F. (2014) Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol. Rev.* **262**, 36-55
62. Gordon, S., and Taylor, P. R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953-964
63. Kurotaki, D., Uede, T., and Tamura, T. (2015) Functions and development of red pulp macrophages. *Microbiol. Immunol.* **59**, 55-62
64. Xu, L., Hilliard, B., Carmody, R. J., Tsabary, G., Shin, H., Christianson, D. W., and Chen, Y. H. (2003) Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunology* **110**, 141-148
65. Ahn, M., Yang, W., Kim, H., Jin, J. K., Moon, C., and Shin, T. (2012) Immunohistochemical study of arginase-1 in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* **1453**, 77-86
66. Daley, J. M., Brancato, S. K., Thomay, A. A., Reichner, J. S., and Albina, J. E. (2010) The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol* **87**, 59-67

67. He, L., and Marneros, A. G. (2013) Macrophages are essential for the early wound healing response and the formation of a fibrovascular scar. *The American journal of pathology* **182**, 2407-2417
68. Gallardo-Soler, A., Gomez-Nieto, C., Campo, M. L., Marathe, C., Tontonoz, P., Castrillo, A., and Corraliza, I. (2008) Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1394-1402
69. Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Mentink-Kane, M. M., Wilson, M. S., El Kasmi, K. C., Smith, A. M., Thompson, R. W., Cheever, A. W., Murray, P. J., and Wynn, T. A. (2009) Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* **5**, e1000371
70. Munder, M., Schneider, H., Luckner, C., Giese, T., Langhans, C. D., Fuentes, J. M., Kropf, P., Mueller, I., Kolb, A., Modolell, M., and Ho, A. D. (2006) Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood* **108**, 1627-1634
71. Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A. C., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A. W., Pearce, E. J., and Wynn, T. A. (2001) Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol.* **167**, 6533-6544

72. Wynn, T. A. (2004) Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 583-594
73. Morris, S. M., Jr. (2002) Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 87-105
74. Waehre, T., Damas, J. K., Yndestad, A., Tasken, K., Pedersen, T. M., Smith, C., Halvorsen, B., Froland, S. S., Solum, N. O., and Aukrust, P. (2004) Effect of activated platelets on expression of cytokines in peripheral blood mononuclear cells - potential role of prostaglandin E2. *Thrombosis and haemostasis* **92**, 1358-1367
75. Scull, C. M., Hays, W. D., and Fischer, T. H. (2010) Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets. *Journal of inflammation (London, England)* **7**, 53
76. Wong, C. H., Jenne, C. N., Petri, B., Chrobok, N. L., and Kubes, P. (2013) Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat. Immunol.* **14**, 785-792
77. Gudbrandsdottir, S., Hasselbalch, H. C., and Nielsen, C. H. (2013) Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF-alpha secretion by monocytes. *J. Immunol.* **191**, 4059-4067
78. Sadallah, S., Eken, C., Martin, P. J., and Schifferli, J. A. (2011) Microparticles (ectosomes) shed by stored human platelets downregulate

macrophages and modify the development of dendritic cells. *J. Immunol.*  
**186**, 6543-6552