

[原著]

## Substance P によるマクロファージからの tissue factor の遊離作用

山口 類<sup>1,3,\*</sup> 坂本 亜里紗<sup>2</sup> 山本 隆 敏<sup>2</sup>  
檜原 真 二<sup>2</sup> 杉内 博 幸<sup>2</sup> 山口 康 雄<sup>3</sup>

Substance P enhances tissue factor release from macrophages

Rui YAMAGUCHI, Arisa SAKAMOTO, Takatoshi YAMAMOTO, Shinji NARAHARA,  
Hiroyuki SUGIUCHI, Yasuo YAMAGUCHI

### 要旨

本研究では、SP によるマクロファージからの TF 遊離作用について検討した。SP 刺激によりマクロファージから TF が遊離されることが判明した。この遊離作用は Aprepitant (SP/neurokinin 1 receptor antagonist) の投与によって有意に抑制された。また、ラジカルスカベンジャである PDTTC 或いは protein kinase C inhibitor である Rottlerin の投与で、SP による TF 遊離作用は有意に阻害された。更に、ROCK inhibitor である Y-27632 或いは dynamin inhibitor である dynasore を投与すると TF 遊離作用は有意に抑制された。この結果は SP が TF の遊離促進作用を示し、血液御凝固能亢進と深く関与していることが示唆される。ヒト凍結内臓脂肪細胞を分化誘導した脂肪細胞では、Body mass index (BMI) <30 kg/m<sup>2</sup> の脂肪細胞に比較して、BMI >30 kg/m<sup>2</sup> の内臓脂肪細胞で細胞内融解液中の SP 濃度が有意に高値であった。

結語：内臓脂肪細胞より産生される SP は、マクロファージからの TF 遊離を促進し、凝固能の亢進を引き起こす可能性が示唆された。

キーワード：Substance P, RhoA, membrane blebbing, TF

### I. 緒言

Substance P (SP) は、11個のアミノ酸からなる神経伝達物質、つまり神経ペプチドである。また、神経成長因子によって神経細胞内で合成が促進される。SP は neurokinin-1 receptor (NK1R) を介し、嘔吐反射などに関与していることが知られている。NK1R はマクロファージに発現していることが報告されている<sup>1)</sup>。human embryonic kidney (HEK) 293 cells に NK1R 遺伝子を導入し、細胞表面上に

NK1R を過剰発現させた細胞に、SP を投与すると membrane blebbing が起こることが報告された<sup>2)</sup>。この membrane blebbing では細胞表面が突出し小胞を形成する現象である。つまり、神経伝達物質である SP は membrane blebbing を引き起こす炎症性神経ペプチドである<sup>3)</sup>。

近年、血中の tissue factor (TF) は単球/マクロファージなどから放出される微粒子 (microparticle: MP) に結合しており、MP には細胞表面タンパクが組み込まれている。これらは TF-bearing

学科

<sup>1</sup>熊本保健科学大学大学院保健科学研究科

<sup>2</sup>熊本保健科学大学 医学検査学科

<sup>3</sup>熊本保健科学大学 リハビリテーション学科言語聴覚学専攻

\*責任著者：yamaguchi.rui@kumamoto-hsu.ac.jp

microparticles として報告されている<sup>4)</sup>。MP は0.1-1  $\mu\text{m}$  の大きさの小胞で血小板、単球、血管内皮細胞など由来する<sup>5)</sup>。また、MP は正常健康人の血中にも存在することが知られている<sup>6)</sup>。このMP の概念により敗血症性ショックに伴う血管内血液凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation: DIC) の発症のバイオマーカーとなることが報告された<sup>7)</sup>。従って、循環血中への TF-bearing microparticles の遊離は凝固能の亢進につながる。

肥満者は凝固能亢進や線維素溶解系の異常をきたすことが報告されている<sup>8)</sup>。3T3L1細胞を用いた研究では、SP は脂肪貯蔵を減少したり、adipocytokine の産生を増加させることが報告された<sup>9)</sup>。一方、炎症性腸疾患では、SP が腸間膜脂肪細胞からの炎症性サイトカインの産生に関与していることが発表された<sup>10)</sup>。従って、SP はサイトカインの分泌に関与していることが示唆される。実際に、SP は好中球のケモカインレセプターの発現やケモカイン産生を促進することが知られている<sup>11)</sup>。また、SP はサルモネラ菌に対するマクロファージの貪食・殺菌能を増強すること、interferon- $\gamma$  や interleukin 4 の刺激によってマクロファージの SP mRNA の発現を誘導すること、などの所見より Th1 及び Th2 タイプの免疫応答にも関与していることが示唆されている<sup>12)</sup>。

本研究では、SP が membrane blebbing に関与し、マクロファージからの TF の遊離作用を起こすであろうという仮説の基に、そのシグナル伝達系の解析を目的とする。

## II. 方法

### 1. ヒト末梢血単球の分離

健康成人ボランティアよりヘパリン加静脈血を採取した。Ficoll を用いた密度勾配遠心分離法で単核球分画を採取した<sup>17)</sup>。本研究は熊本保健科学大学の倫理審査委員会の承認のもとに実施された (熊本保健科学大学倫理審査: 2015-03)。

### 2. 末梢血単球の分化

Recombinant GM-CSF は Tocris Bioscience (Bristol, UK) より購入した。末梢血単球分画に RPMI1640 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) を加えて、1500rpm で5分間遠心し上清を除去して RPMI1640 2mL を加えて、0.5% トリパンブ

ルー溶液で染色し細胞数を計測した。単球分離後は RPMI1640 + 10 % FCS を加えて、1時間培養した。培地を除去し、RPMI1640 + 10 % FCS (Thermo Fischer Scientific) で2回洗浄を行った。RPMI1640 + 10 % FCS + GM-CSF (10 ng/mL) を加えて培養した。3日目に培養液を除去し、新たな RPMI1640 + 10 % FCS + GM-CSF (10 ng/mL) を添加した<sup>18)</sup>。培養9日目のマクロファージを GM-CSF-dependent macrophages (day 9 of culture) として実験に用いた。

### 3. Tissue factor (TF) の測定

GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) を substance P (SP) (ペプチド研究所) 5  $\mu\text{M}$  で6時間刺激し、細胞融解液及び培養上清中の TF 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Abcam Inc., Cambridge, UK) にて測定した。

### 4. Protein kinase C inhibitor (Rottlerin) 及び Radical scavenger (PDTC) の効果

Rottlerin は Tocris Bioscience (Bristol, UK), pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) は BioVision (Mountain View, CA) より購入した。GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) を Rottlerin (10 nM) 及び PDTC (10 nM) で前処置を行い、SP (5  $\mu\text{M}$ ) で6時間刺激後の細胞融解液中の TF 濃度を ELISA にて測定した。

### 5. small interfering RNA (si RNA) の導入

Ras homolog gene family, member A (RhoA), G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) siRNA を Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) より購入した。GM-CSF-dependent macrophages 培養7日目に、Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) ( $2.0 \times 10^3 \mu\text{l/L}$ ) を用いて RhoA siRNA (50 nM), GRK2 siRNA (50 nM) を GM-CSF-dependent macrophages に導入した。同時に、Lipofectamine を単独投与し、細胞死がないことを確認した。Negative control として control siRNA-A (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。

### 6. ROCK inhibitor (Y-27632) 及び Dynamin inhibitor (Dynasore) の効果

Y-27632 は Wako (Osaka), Dynasore は Abcam Inc. (Cambridge, UK) より購入した。GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) を ROCK inhibitor (Y-27632: 10  $\mu\text{M}$ ) 及び Dynamin

inhibitor (Dynasore:  $10\mu\text{M}$ ) で6時間前処置を行い, SP ( $5\mu\text{M}$ ) で6時間刺激した。また, Aprepitant ( $1\text{nM}$ ) で前処置を行い, 次に SP ( $5\mu\text{M}$ ) で6時間刺激を行った。そして細胞内溶解液中の TF 濃度を ELISA kit (Abcam) で測定した。

本実験で使用した薬剤及びその作用を表1に示す。

#### 7. ヒト凍結内臓脂肪前駆細胞の分化・誘導

凍結内臓脂肪前駆細胞は培養用培地 (Omental differentiation medium) (表2) を用いて融解した。

表1. 各種阻害剤とその機能

薬剤	機能
Rottlerin	Protein kinase C inhibitor
PDTC	The radical scavenger
Y-27632	ROCK inhibitor
Dinasore	Dynamain inhibitor
Aprepitant	Substance P/ NK-1 receptor antagonists
ROCK : Rho-associated coiled-coil forming kinase	
NK-1 : Neurokinin 1	

表2. Omental differentiation medium

DMEM/Ham's F-12 medium (1:1,v/v)
HEPES pH7.4
Fetal bovine serum
PPAR $\gamma$ -agonist
Biotin
Isobutylmethylxanthine
Pantothenate
Penicill
Human insulin
Streptomycin
Dexamethasone
Amphotericin B

表3. Omental adipocyte medium

DMEM/Ham's F-12 medium (1:1,v/v)
HEPES pH7.4
Fetal bovine serum
Dexamethasone
Biotin
Amphotericin B
Pantothenate
Penicillin
Human insulin
Streptomycin

$1 \times 10^6$  cells/vial を融解し, 細胞密度を  $4 \times 10^4$  cells/ml に調整した。細胞浮遊液を15ml 遠心管に移し, 更に培地10ml を添加後1,500rpm, 1分間遠心し細胞を洗浄した。上清を取り除き同培地に浮遊させ6 well plate に1 well あたり  $2.5 \times 10^4$  cells を播種した。37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養を行った。2日に1度, 培地交換を行いコンフルエントになるまで4~7日培養した。分化培地 (表2) を用いて分化誘導後に, 内臓脂肪細胞培養用培地 (Omental adipocyte medium) (表3) に交換した。

### III. 結果

GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) を SP ( $5\mu\text{M}$ ) で6時間刺激すると, 細胞融解液中の TF 濃度は著明に減少した (図1)。この時, Rottlerin の同時投与で細胞融解液中の TF 濃度は低下し, 培養上清中の TF 濃度が有意に上昇した。また, PDTC の投与ではさらに培養上清中の TF 濃度は上昇し, SP 非添加との有意な変化は認められなかった (図2)。SP 刺激による細胞融解液中の TF 濃度の低下は, Y-27632 ( $10\mu\text{M}$ ) 及び Dinasore ( $10\mu\text{M}$ ) による前処置により有意に抑制された (図3)。また, SP antagonist である Aprepitant ( $1\text{nM}$ ) の投与により, SP による細胞内融解液中の TF の低下は有意に阻害された。更に, RhoA siRNA を導入したマクロファージでは同様に, TF の低下が阻害された。しかし, GRK2 siRNA を

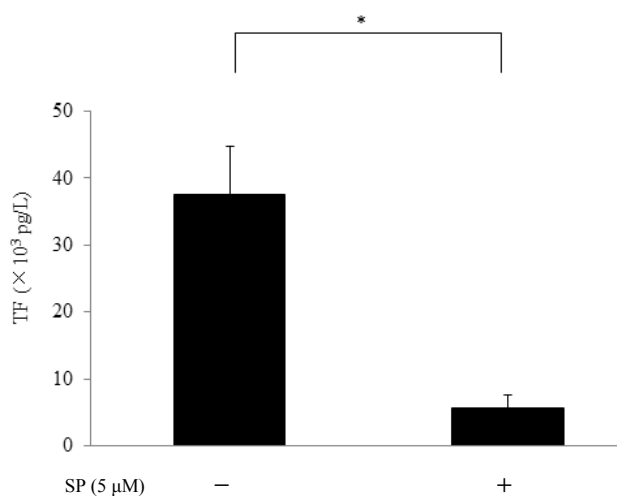


図1. Substancce P 刺激によるマクロファージの細胞融解液中の tissue factor 濃度

Data=the mean  $\pm$  SE (n=3) \*P<0.01

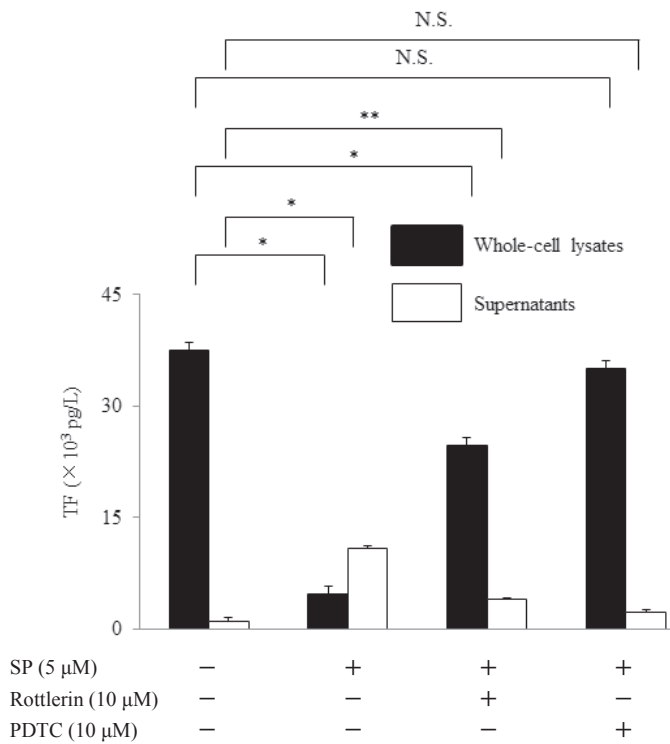


図2. 各種阻害剤と細胞融解液及び培養上清中の tissue factor 濃度の比較

Data=the mean ± SE (n=3) \*P<0.01 \*\*P<0.05 N.S., not significant

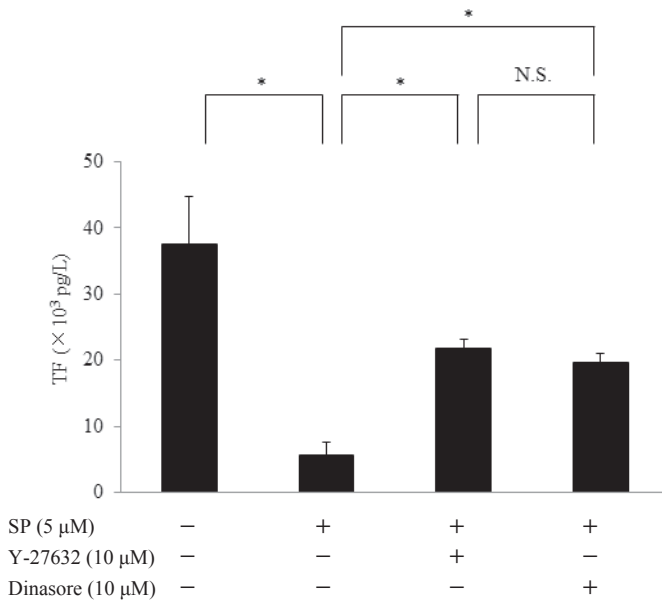


図3. ROCK inhibitor (Y-27632) Dinamin inhibitor (Dinasore) の効果

ROCK : RhoA/Rho-kinase  
Data=the mean ± SE (n=3) \*P<0.01 N.S., not significant

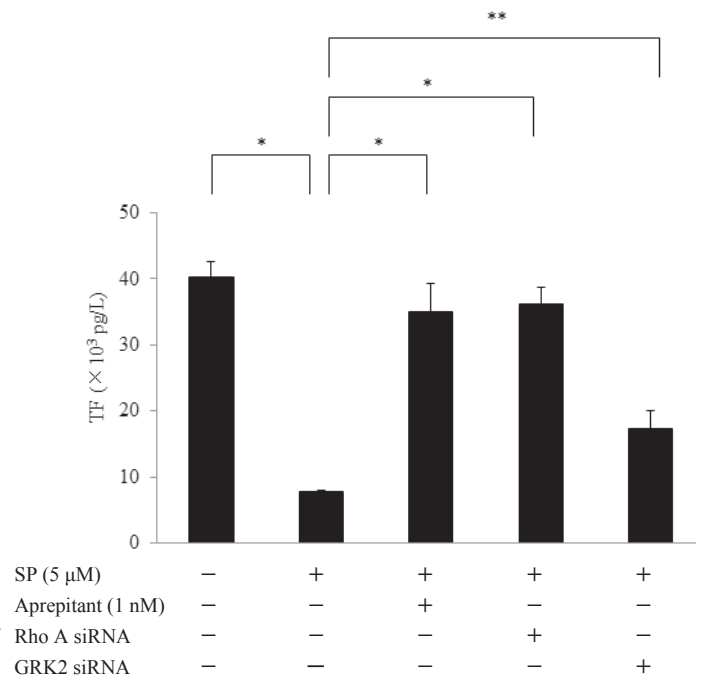


図4. Substance P/ NK-1 R antagonist (Aprepitant), RhoA siRNA 及び GRK2 siRNA の TF 遊離作用に及ぼす効果

RhoA : ras homolog gene family, member A  
GRK2 : G protein-coupled receptor kinase 2  
siRNA : small interfering RNA  
Data=the mean ± SE (n=3) \*P<0.01 \*\*P<0.05

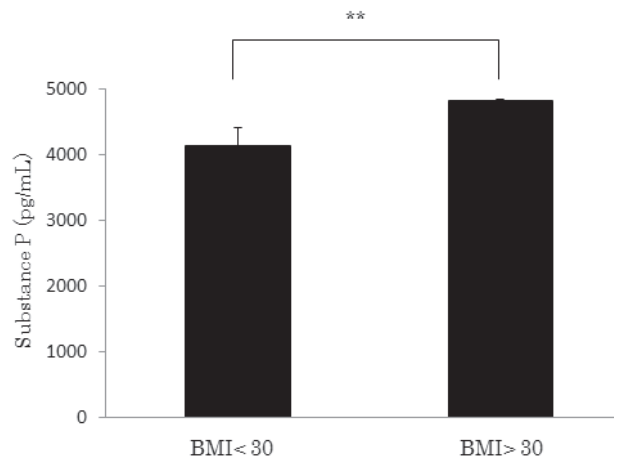


図5. ヒト内臓脂肪細胞の細胞融解液中の Substance P 濃度

BMI : body mass index (kg/m<sup>2</sup>)  
Data=the mean ± SE (n=3) \*P<0.01

導入したマクロファージでは SP による TF の遊離作用は部分的に阻害された (図 4)。SP の産生源を確認する目的で、ヒト凍結内臓脂肪細胞から分化誘導した脂肪細胞の細胞融解液における SP 濃度を ELISA で測定した結果、BMI<30の内臓脂肪細胞と比較して、BMI>30の脂肪細胞の SP 濃度が有意に高かった (図 5)。

#### IV. 考察

本研究では GM-CSF-dependent macrophages より TF が産生され、SP 刺激により TF が培養上清中に遊離することが判明した。この SP の作用は Substance P / NK-1 receptor antagonist である Aprepitant の投与で阻害された。また、Rottlerin (PKC inhibitor) の投与で SP の作用は抑制された。これは、SP によって膵腺房細胞からケモカインの産生が増強する際に、PKC  $\delta$  がシグナル伝達系に重要な役割を演じているとの報告<sup>13)</sup> と一致する。また、SP は NADPH oxidases を活性化する<sup>14)</sup> ことが知られており、活性酸素の産生に繋がる<sup>15)</sup>。本研究では radical scavenger である PDTC の投与により SP による TF の遊離作用が有意に抑制された。また、活性酸素により small GTPase である Rho A が活性化される<sup>16)</sup>。そこで、RhoA siRNA を導入したマクロファージを SP で刺激すると、SP による TF 遊離作用が有意に抑制された。更に、RhoA により活性化される scaffold protein である G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)<sup>17)</sup> の siRNA をマクロファージに導入すると、SP による TF 遊離作用が部分的に阻害された。

Rho-associated protein kinase (ROCK) は RhoA の下流域エフェクターである。NK1R は membrane blebbing を引き起こすことが報告された<sup>18)</sup>。また、Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) が myosin light chain (MLC) のリン酸化に関与していることが知られている<sup>19)</sup>。そこで、ROCK inhibitor である Y-27632 を投与すると、SP による TF の遊離作用が有意に抑制された。また、GTPase である Dynamin が membrane remodeling に重要な役割を演じていることが知られている<sup>20)</sup>。Dynamin の inhibitor である Dynasore<sup>21)</sup> を投与すると、SP の TF 遊離作用は有意に抑制された。

SP は神経伝達物質として知られているが、我々

は SP の産生部位が内臓脂肪組織、特に、脂肪細胞ではないかと想定した。脂肪組織は神経、血管、脂肪細胞などから構成されている。確かに、血管内皮細胞でも SP が産生される<sup>22)</sup>。本研究では、Body mass index (BMI) <30 kg/m<sup>2</sup> 及び BMI>30 の 2 群のヒト凍結内臓脂肪細胞から分化・誘導した脂肪細胞を用いて、細胞内融解液中の SP 濃度を測定した。その結果、BMI>30の内臓脂肪細胞では BMI<30の内臓脂肪細胞と比較して有意に SP 濃度が高かった。このことより、内臓脂肪型肥満では SP 刺激により membrane blebbing によりマクロファージ表面から TF が microparticle として遊離されることにより、凝固能の亢進に至り易い可能性を示唆するものである。

#### V. 結語

SP 刺激により、RhoA の活性化で membrane blebbing が起こり、TF が遊離される。そして、SP の産生源として BMI が高値の内臓脂肪細胞が考えられた。

#### 謝辞

本研究は熊本保健科学大学学内研究助成 (No. 27-A-01) により実施されたものである。

本研究における利益相反は存在しない。

#### 文献

1. Douglas SD, Lai JP, Tuluc F, et al: Neurokinin-1 receptor expression and function in human macrophages and brain: perspective on the role in HIV neuropathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1144 : 90-96, 2008.
2. Meshki J, Douglas SD, Lai JP, et al: Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing in HEK293 cells through a Rho/Rho-associated coiled-coil kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 284 : 9280-9289, 2009.
3. Payan DG. Neuropeptides and inflammation: the role of substance P. *Annu Rev Med*, 40 : 341-352, 1989.

4. Zwicker JL. Tissue factor-bearing microparticles and cancer. *Semin Thromb Hemost*, 34 : 195–198, 2008.
5. Owens AP 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*, 108 : 1284–1297, 2011.
6. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, et al: Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*, 85 : 639–646, 2001.
7. Delabranche X, Boisramé-Helms J, Asfar P, et al: Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med*, 39 : 1695–1703, 2013.
8. De Pergola G, Pannacciulli N. Coagulation and fibrinolysis abnormalities in obesity. *J Endocrinol Invest*, 25 : 899–904, 2002.
9. Miegueu P, St-Pierre DH, Lapointe M, et al: Substance P decreases fat storage and increases adipocytokine production in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 304 : G420–427, 2013
10. Sideri A, Bakirtzi K, Shih DQ, et al: Substance P mediates pro-inflammatory cytokine release from mesenteric adipocytes in Inflammatory Bowel Disease patients. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 1 : 420–432, 2015.
11. Sun J, Ramnath RD, Bhatia M. Neuropeptide substance P upregulates chemokine and chemokine receptor expression in primary mouse neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293 : C696–704, 2007.
12. Marriott I, Bost KL. Substance P receptor mediated macrophage responses. *Adv Exp Med Biol*, 493 : 247–254, 2001.
13. Ramnath RD, Sun J, Adhikari S, et al: Role of PKC- $\delta$  on substance P-induced chemokine synthesis in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294 : C683–692, 2008.
14. Lloyds D, Hallett MB. Activation and priming of the human neutrophil oxidase response by substance P: distinct signal transduction pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1175 : 207–213, 1993.
15. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87 : 245–313, 2007.
16. Resta TC, Broughton BR, Jernigan NL. Reactive oxygen species and RhoA signaling in vascular smooth muscle: role in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Adv Exp Med Biol*, 661 : 355–373, 2010.
17. Robinson JD, Pitcher JA. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) is a Rho-activated scaffold protein for the ERK MAP kinase cascade. *Cell Signal*, 25 : 2831–2839, 2013.
18. Chen P, Douglas SD, Meshki J, et al: Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing and shear stress-induced microparticle formation in HEK293 cells. *PLoS One*, 7 : e45322, 2012.
19. Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton*, 67 : 545–554, 2010.
20. Ferguson SM, De Camilli P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13 : 75–88, 2012.
21. Macia E, Ehrlich M, Massol R, et al: Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell*, 10 : 839–850, 2006.
22. Loesch A, Burnstock G. Ultrastructural localisation of serotonin and substance P in vascular endothelial cells of rat femoral and mesenteric arteries. *Anat Embryol*, 178 : 137–142, 1988.

(平成29年3月9日受理)

## Substance P enhances tissue factor release from macrophages

Rui YAMAGUCHI, Arisa SAKAMOTO Takatoshi YAMAMOTO,  
Shinji NARAHARA, Hiroyuki SUGIUCHI  
and Yasuo YAMAGUCHI

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) induces procoagulant activity of macrophages. Tissue factor (TF) is a membrane-bound glycoprotein and substance P (SP) is a pro-inflammatory neuropeptide involved in formation of membrane blebs. This study investigated the role of SP in TF release by GM-CSF-dependent macrophages.

SP significantly decreased TF levels in whole-cell lysates of GM-CSF-dependent macrophages. TF was detected in the culture supernatant by enzyme-linked immunosorbent assay after stimulation of macrophages by SP. Aprepitant (an SP/neurokinin 1 receptor antagonist) reduced TF release from macrophages stimulated with SP. Pretreatment of macrophages with a radical scavenger (pyrrolidinedithiocarbamate) also limited the decrease of TF in whole-cell lysates after stimulation with SP. A protein kinase C inhibitor (rottlerin) partially blocked this macrophage response to SP, while it was significantly inhibited by a ROCK inhibitor (Y-27632) or a dynamin inhibitor (dinasore). Furthermore, siRNA targeting Rho A, blunted the release of TF from macrophages stimulated with SP. In other experiments, visceral adipocytes derived from cryopreserved preadipocytes were found to produce SP.

In conclusion, SP enhances the release of TF from macrophages via the Rho A signaling pathway.