

Mini Review

Cathelicidin ファミリーの殺菌ペプチド CAP11 による好中球アポトーシスの制御

長岡 功¹⁾, 蓬田 伸¹⁾, 田村弘志²⁾, 平田陸正³⁾¹⁾順天堂大学医学部生化学・生体防御学²⁾生化学工業株式会社³⁾大高酵素株式会社研究所*Modulation of LPS-induced suppression of neutrophil apoptosis by antibacterial cathelicidin peptide CAP11*

Peptide antibiotics possess potent antimicrobial activities against invading microorganisms and contribute to the innate host defense. We previously revealed that antibacterial cathelicidin CAP11 (cationic antibacterial polypeptide of 11 kDa) exhibits protective actions against endotoxin shock model. During Gram-negative bacterial sepsis, lipopolysaccharide (LPS) activates neutrophils and their apoptosis is suppressed. Prolonged presence of activated neutrophils causes uncontrolled release of toxic metabolites, leading to the systemic tissue injury. In this study, we investigate the action of CAP11 on LPS-induced suppression of neutrophil apoptosis using human neutrophils.

LPS suppressed neutrophil apoptosis, accompanied with the activation of NF- κ B, phosphorylation of extracellular signal-related protein kinase, expression of Bcl-XL and inhibition of caspase 3 activation. Interestingly, CAP11 reversed the actions of LPS to trigger these changes, and induced neutrophil apoptosis. Furthermore, LPS activated monocytes to produce anti-apoptotic cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-8) and suppressed neutrophil apoptosis. Importantly, CAP11 inhibited the cytokine production from LPS-stimulated monocytes, and induced neutrophil apoptosis. Finally, CAP11 strongly suppressed the LPS-binding to neutrophils and monocytes.

These observations indicate that CAP11 can block the LPS-induced prolongation of neutrophil survival via the suppression of anti-apoptotic signaling in neutrophils and anti-apoptotic cytokine production from monocytes by inhibiting the binding of LPS to target cells.

Rec.3/15/2004, Acc.4/27/2004, pp166-172

Isao Nagaoka¹⁾, Shin Yomogida¹⁾, Hiroshi Tamura²⁾, Michimasa Hirata³⁾¹⁾Department of Host Defense and Biochemical Research, Juntendo University, School of Medicine²⁾Seikagaku Corporation³⁾Institute of Ohtaka Enzyme**Key words** cathelicidin, apoptosis, neutrophil, endotoxin shock, LPS

はじめに

敗血症は救急救命治療の発達した先進国においてもまだ高頻度に致死経過をたどる重篤な病態であり、その多くにグラム陰性菌感染が関与している。グラム陰性菌由来の病因物質であるリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) は、CD14/Mac-1/TLR (toll-like receptor) 4 を介して単球・マクロファージを活性化し、TNF- α 、IL-1 β 、一酸化窒素 NO などサイトカイン・メディエーターの産生を誘導す

ることによって敗血症性ショックの発症に深く関わっている¹⁾(図1)。

一方、我々のからだには数多くの殺菌ペプチドが存在し、生体を微生物感染から守るために働いている²⁾。近年、新たな殺菌ペプチドファミリーとして cathelicidin が見出されたが、cathelicidin は、その前駆体の pro-sequence がブタ好中球の cathelin タンパク質に相同性を示し、また殺菌活性ペプチドが前駆体の C 末端に存在するという特徴を

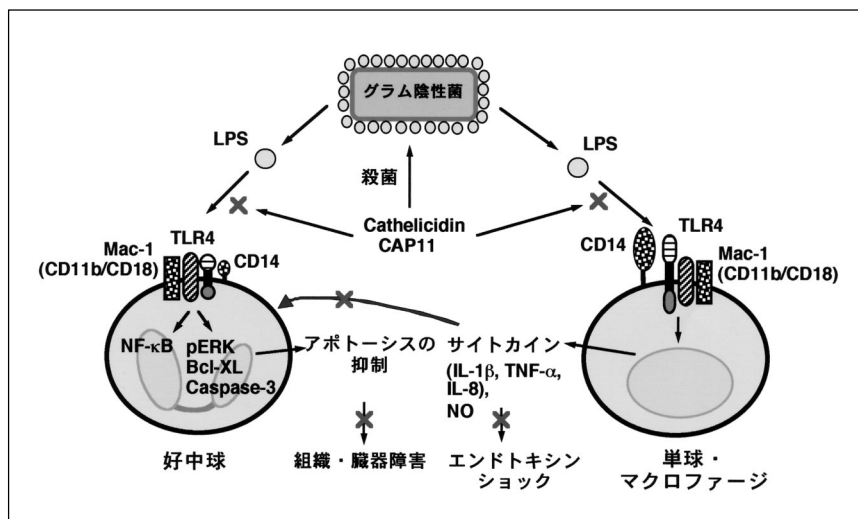


図1 グラム陰性菌感染に伴う敗血症性ショックとCAP11の働き

グラム陰性菌感染による敗血症性ショックでは、菌体から遊離されたLPSが単球・マクロファージに作用して、サイトカインや酸化窒素 (NO) などの産生を介して、エンドトキシンショックの病態を誘導する。一方、好中球がLPSによって刺激されると、アポトーシスが抑制され、活性化された好中球が敗血症性ショックにおける組織障害を引き起こす。今回の研究から、LPSは、主にCD11b、CD18、TLR4などの分子を介して、好中球のアポトーシスを抑制することがわかった。そして、その抑制には、転写因子NF-κBの活性化、MAPキナーゼERKのリン酸化、anti-apoptoticタンパク質Bcl-XLの発現、アポトーシスのエフェクター分子カスパーゼ-3の活性低下が関与していた。また、単球がLPS刺激を受けると好中球のアポトーシスを抑制するIL-1β、TNF-α、IL-8などのサイトカインを生成した。CAP11は、敗血症性ショックにおいて殺菌作用を示すだけでなく、LPSの好中球への結合を抑制することによって(図中に×で示す)、NF-κBの活性化、ERKのリン酸化、Bcl-XLの発現を阻害し、またカスパーゼ-3活性を増大させて好中球のアポトーシスを誘導する。また、CAP11はLPSの単球への結合を抑制することによってIL-1β、TNF-α、IL-8などのサイトカインの生成を阻害して(図中に×で示す)、好中球のアポトーシスを誘導する。このようにしてCAP11はグラム陰性菌感染に伴う敗血症性ショックや組織障害を軽減する可能性が考えられる。

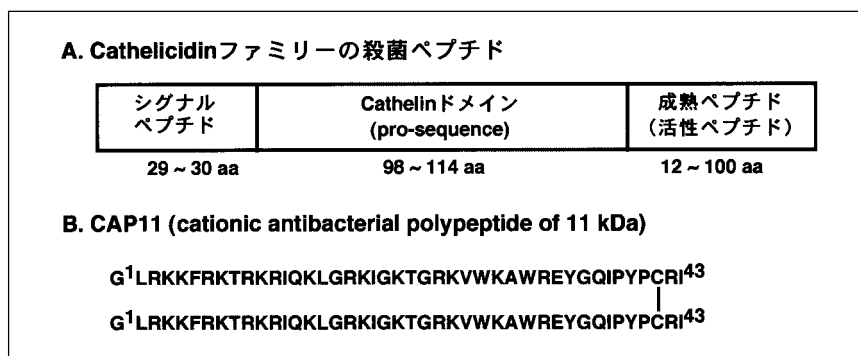


図2 Cathelicidin ファミリーの殺菌ペプチドの構造とCAP11

Cathelicidinファミリーの殺菌ペプチドの一般的な構造 (A)とCAP11のアミノ酸配列 (B)。

持っている³⁾(図2A)。今までに、ヒト、ウサギ、ラット、マウス、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマなどの細胞からcathelicidinファミリーに属する殺菌ペプチドが単離されているが³⁾、我々は、cathelicidinの仲間としてモルモット好中球から11 kDaの塩基性殺菌ペプチドCAP11(cationic antibacterial polypeptide of 11 kDa)を単離し、CAP11がアミノ酸43個からなるペプチドがシステインジスルフィド結合(S-S結合)で繋がったホモダイマーであることを示

した⁴⁾(図2B)。そして、CAP11は、グラム陽性菌、陰性菌に対して強い殺菌作用を示すだけでなく、グラム陰性菌LPSの生物活性を中和することから^{5,6)}、グラム陰性菌感染に伴う敗血症性ショックへの臨床応用が期待されている。

一方、敗血症性ショックでは単球・マクロファージが活性化されるだけでなく、LPS刺激によって好中球のアポトーシスが抑制され、寿命が延び、活性化された好中球が

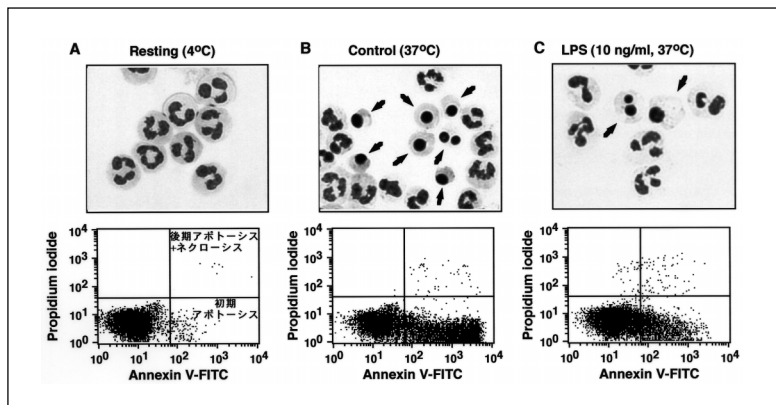


図3 May-Grünwald-Giemsa 染色および FITC 標識 -annexin V/propidium iodide 染色による好中球アポトーシスの評価

ヒト末梢血好中球を37℃で培養した後に、Cytospinで塗抹標本を作成、May-Grünwald-Giemsa染色して検鏡すると、核が濃縮し、円形になり、アポトーシスを起こした好中球(矢印で示す)が観察された(B上段)。また、アポトーシスによって細胞表面に現れたホスファチジルセリンにFITC標識したannexin Vが結合するために、37℃での培養によってannexin V陽性細胞がflow cytometryで増加することがわかった(B下段)。一方、好中球を10 ng/ml LPS (*E. coli*, O111:B4)と培養するとアポトーシスを起こす細胞が顕著に減少した(C上下段)。なお、好中球を4℃で培養した場合には、アポトーシスを起こす細胞はほとんど見られなかった(A上下段)。

組織障害さらに多臓器不全の進展に関わると考えられている¹⁾(図1)。しかし、CAP11が好中球のアポトーシスにどのように影響するかなど不明な点が残されている。

そこで、我々は敗血症性ショックにおけるCAP11の作用メカニズムを明らかにするために、好中球のアポトーシスに及ぼすCAP11の影響について*in vitro*で検討し、興味ある知見を得たので、本稿ではそのデータを紹介する。

LPS刺激による好中球アポトーシスの抑制

好中球のアポトーシスは、形態学的、あるいはflow cytometryで検討した^{7,8)}(図3)。上段に示すように、好中球を37℃でインキュベーションすると、核が濃縮し、円形になり、アポトーシスを起こすことがわかった。しかし、好中球をLPS(*E. coli* O111:B4)と培養するとアポトーシスが顕著に抑制された。また、下段に示すようにflow cytometryで調べると、アポトーシスに伴って蛍光標識したannexin Vに染色される好中球が増加したが、LPSとの培養により、annexin V陽性細胞が減少し、アポトーシスが抑制されることがわかった。

そこで、次にLPS刺激による好中球アポトーシスの抑制に及ぼすCAP11の効果を検討した。好中球を18時間インキュベーションすると50~60%の細胞がアポトーシス

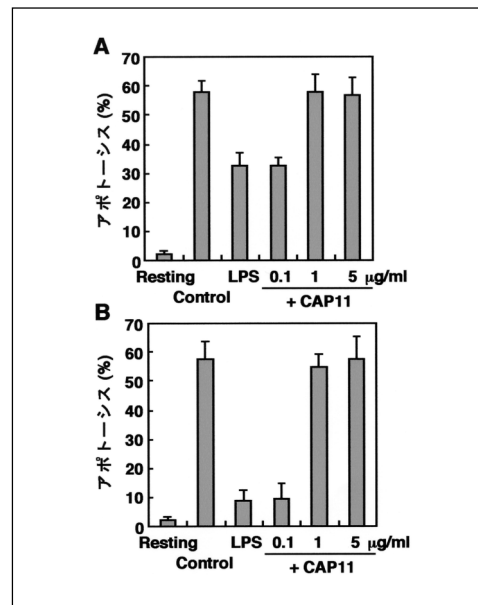


図4 LPS刺激による好中球アポトーシスの抑制に及ぼすCAP11の効果

好中球(10⁶細胞/ml)を単独(A)あるいは単核細胞(6 × 10⁵細胞/ml)(B)存在下で、10 ng/ml LPSとCAP11(0.1~5 µg/ml)非存在下あるいは存在下で18時間培養し、アポトーシスを起こした好中球を算定した。

を起こしたが、好中球を10 ng/ml LPS存在下で培養するとアポトーシスが約30%まで抑制された(図4A)。そして、この系に0.1~5 µg/ml CAP11を加えると、LPSの効果が濃度依存的に阻害され、アポトーシスが誘導されることがわかった。

アポトーシスに関わる細胞内シグナル

LPSは転写因子NF-κBとMAPキナーゼのERK(extracellular signal-related kinase)の活性化を介して好中球のアポトーシスを制御するための細胞内シグナルを生じる⁹⁾。さらに、NF-κBはanti-apoptoticに作用するBcl-2ファミリーのタンパク質(例えばBcl-XL)を発現し、エフェクター分子であるカスパーゼの活性を調節することによって好中球のアポトーシスを制御している¹⁰⁾。そこで、CAP11の作用メカニズムを調べるために、これらアポトーシス関連分子に及ぼすCAP11の影響について検討した。

まず、NF-κBの活性化を調べたところ、LPS刺激によってNF-κBが活性化され(図5A)、その活性化がCAP11の添加によって濃度依存的に抑制されることがわかった(図5B)。

さらに、ERKのリン酸化とBcl-XLの発現に及ぼすCAP11の影響をそれぞれの特異抗体を用いたウエスタン

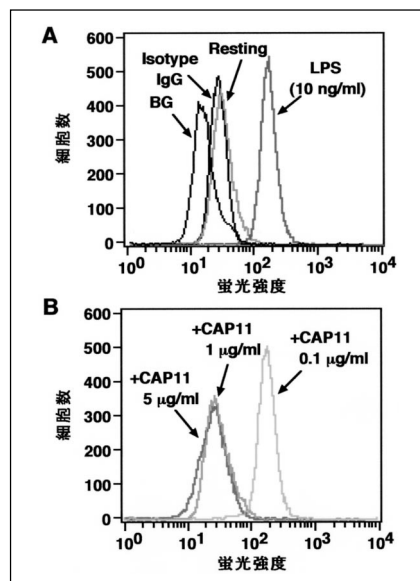


図5 LPS 刺激によるNF- κ Bの活性化に及ぼすCAP11の効果
好中球 (10^6 細胞/ml) を10 ng/ml LPSとCAP11 (0.1 ~ 5 μ g/ml) 非存在下 (A) あるいは存在下 (B) で培養した後に, NF- κ B p65サブユニットの活性化型を認識する抗体を用いてNF- κ Bの活性化をflow cytometryで調べた²¹⁾.

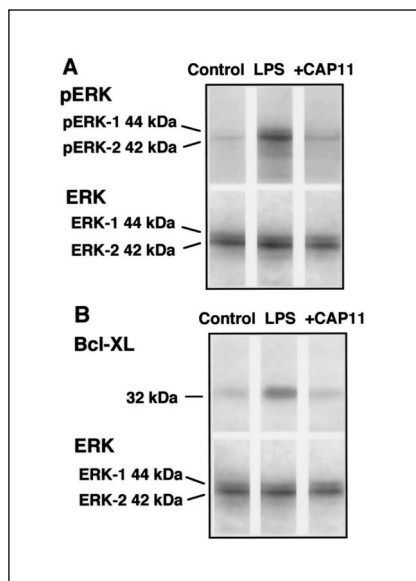


図6 LPS刺激によるERKのリン酸化とBcl-XLの発現に及ぼすCAP11の効果
好中球 (10^6 細胞/ml) を10 ng/ml LPSと1 μ g/ml CAP11非存在下あるいは存在下で培養した. その後, ERKのリン酸化 (pERK (A)) とBcl-XL (B) の発現をそれぞれの特異抗体を用いたウェスタンブロット法で検出した. また, ERKタンパク質を検出することによってほぼ同じ量のタンパク質を解析したことを確認した (下段).

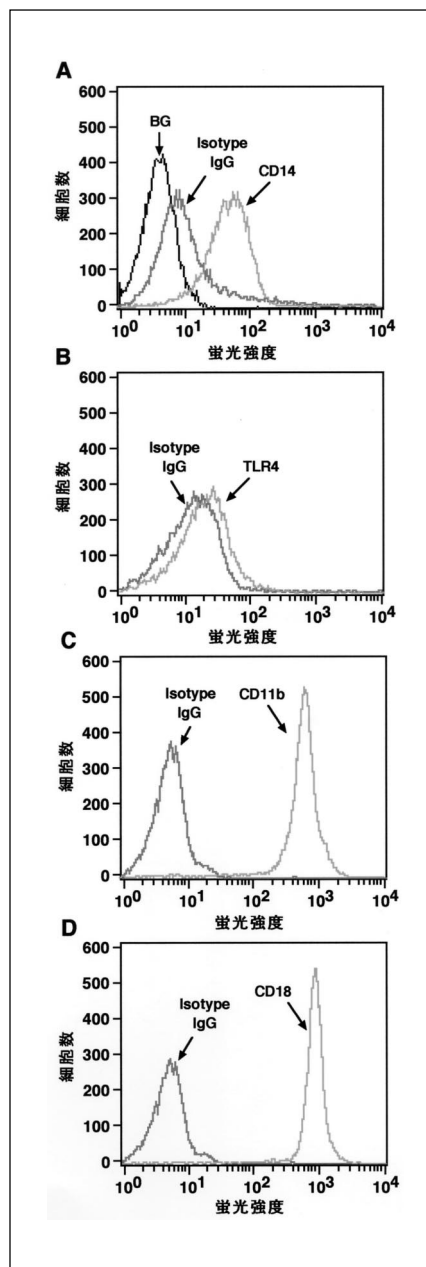


図7 好中球におけるCD14, CD11b, CD18, TLR-4の発現

好中球にマウスanti-CD14 mAb (MY4), anti-CD11b mAb (clone 44), anti-CD18 mAb (IB4) あるいはanti-TLR4 mAb (HTA125) を作用させ, 洗浄後, さらにFITC標識-anti-mouse IgGを作用させて, CD14 (A), TLR4 (B), CD11b (C), CD18 (D) の発現をflow cytometryで解析した.

プロット法で検討した. その結果, LPS 刺激によって, ERK-1/-2 のリン酸化やBcl-XL の発現が認められたが, CAP11 は, LPS 刺激によるこれら分子の発現を抑制することがわかった (図6A, B).

さらに, カスパーゼ-3の活性に及ぼすCAP11の効果を調べた. その結果, 好中球を18時間インキュベーションするとアポトーシスの誘導に一致して, caspase-3 活性 (nmol/10⁶ 細胞/h) が約0.1から2.4に増加した. そして, LPS 刺激によってcaspase-3 活性は約1まで低下したが, CAP11はLPSによるcaspase-3活性の低下を濃度依存的に阻害し, カスパーゼ-3活性を増加させてアポトーシスを誘導することがわかった (data not shown).

LPS刺激の伝達に關与する細胞表面分子

LPS の受容体として, CD14 や接着分子のMac-1 (CD11b, CD18) が, またLPS刺激を細胞内に伝達分子としてTLR4が知られている^{11, 12)}. そこで, 好中球におけるこれら分子の発現をflow cytometryで調べたところ, 好中球は, CD14 よりもはるかに多くのCD11b, CD18を発現していることがわかった. また, 好中球は少ないながらもTLR4を発現していた (図7).

次に, これらの分子に対する中和抗体 (10 μ g/ml, anti-CD14 mAb MEM18, anti-CD11b mAb D12, anti-CD18 mAb IB4, anti-TLR4 mAb HTA125) を用いて, どの分子がLPS

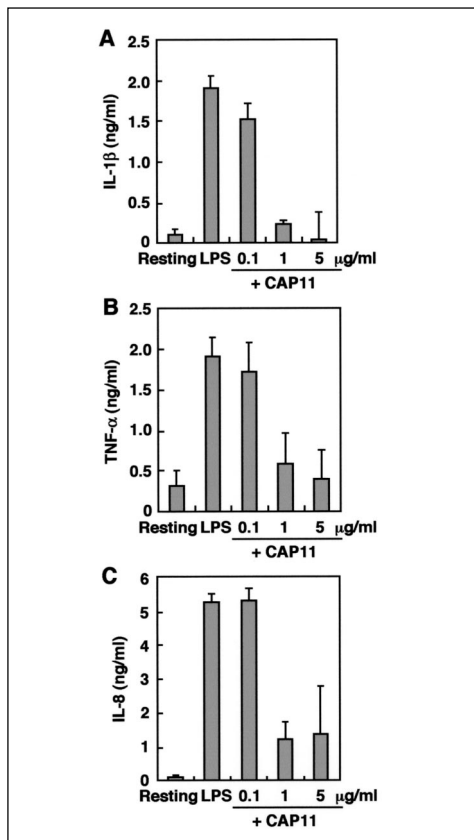


図8 LPS 刺激を受けた単核細胞による IL-1β, TNF-α, IL-8 生成と, それらに及ぼす CAP11 の効果

単核細胞 10^6 細胞/ml を 10 ng/ml LPS と CAP11 (0.1 ~ 5 μg/ml) 非存在下あるいは存在下で 18 時間培養した後に, 生成された IL-1β (A), TNF-α (B), IL-8 (C) を ELISA 法で定量した。

による好中球のアポトーシス抑制に関与しているかを検討した。その結果, CD11b 抗体, CD18 抗体, TLR4 抗体が LPS による好中球のアポトーシス抑制を著明にブロックしたが, CD14 抗体はほとんど影響しないことがわかった (data not shown)。したがって, LPS 刺激による好中球アポトーシスの抑制には, CD11b, CD18, TLR4 が重要な働きをしていると考えられた。

単球が生成するサイトカインの好中球アポトーシスに及ぼす影響

好中球を単核細胞とともに LPS 存在下で培養すると好中球のアポトーシスが, 好中球単独の場合に比べてさらに 10% 以下に抑制されることがわかった (図 4B)。そして, CAP11 はこの LPS の効果を濃度依存的に阻害し, アポトーシスを誘導した。これらの結果は, LPS によって活性化された単球が好中球のアポトーシスを抑制するよう

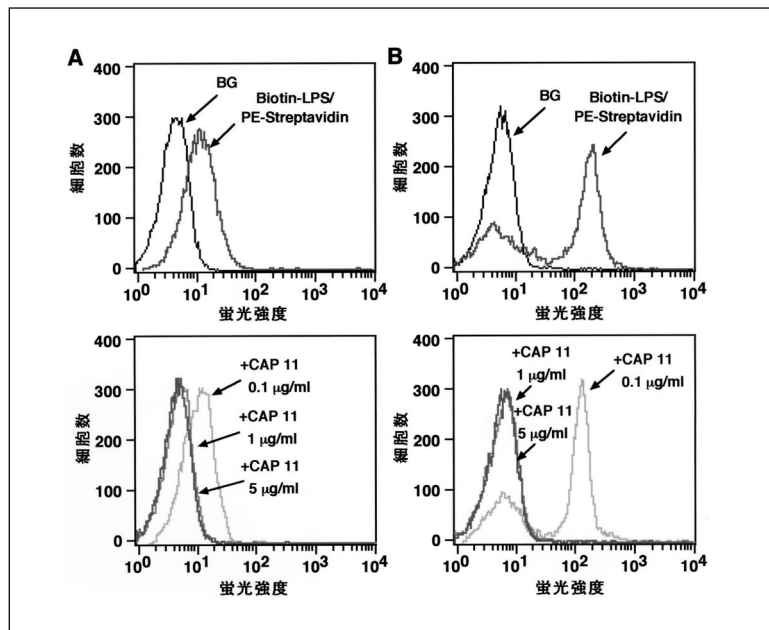


図9 好中球, 単球への LPS の結合と, それらに及ぼす CAP11 の効果

好中球 (A) あるいは単核細胞 ($B \times 10^6$ 細胞/ml) を CAP11 (0.1 ~ 5 μg/ml) 非存在下あるいは存在下で biotin 標識-LPS (100 ng/ml) と反応させた後, さらに PE 標識-streptavidin を作用させて, LPS の好中球と単球への結合を flow cytometry で解析した。

なサイトカインを産生し, その産生が CAP11 によって阻害されるという可能性を示唆している。

そこで, 好中球のアポトーシスを抑制するサイトカインである IL-1β, TNF-α, IL-8^{13, 14)} に対する中和抗体 (10 μg/ml, anti-IL-1β mAb 8516.311, anti-TNF-α mAb 1825.12, anti-IL-8 mAb 6217) の影響を調べてみた。その結果, これらの抗体を好中球と単核細胞の共培養系に添加すると, LPS 刺激によるアポトーシス抑制が有意に阻害され, アポトーシスが誘導されたことから, これらのサイトカインが好中球アポトーシスの抑制に働いていることがわかった (data not shown)。

次に, IL-1β, TNF-α, IL-8 の生成量を ELISA で測定したところ, 単核細胞 (10^6 細胞/ml) から, 約 2 ng/ml の IL-1β と TNF-α, および約 6 ng/ml の IL-8 が生成されることがわかった (図 8A-C)。そして, CAP11 は, 単核細胞によるこれらのサイトカイン生成を濃度依存的に抑制し

た。

さらに、リコンビナントサイトカインを用いて、好中球のアポトーシスに与える影響を調べてみた。その結果、単核細胞 (6×10^5 細胞/ml) (図4B) との共培養系に存在すると考えられる 1 ng/ml の IL-1 β , TNF- α と 4 ng/ml の IL-8 によって好中球のアポトーシスが約30%まで低下し、さらに、LPS (10 ng/ml) の添加によって10%以下になることがわかった (data not shown)。また、この時、アポトーシスの抑制に一致して、カスパーゼ-3 活性も IL-1 β , TNF- α , IL-8 との培養により低下し、LPS の添加によってさらに低下することがわかった (data not shown)。

なお、好中球を LPS で刺激しても IL-1 β , TNF- α , IL-8 は単核細胞に比べるとほんのわずかしが生成されず (< 0.2 ng/ml), それらの濃度の IL-1 β , TNF- α , IL-8 が好中球のアポトーシスに影響することはなかった (data not shown)。

LPSの好中球と単球への結合

最後に、biotin 標識した LPS を用いて、好中球と単球への LPS の結合に及ぼす CAP11 の効果を検討した。その結果、CAP11 は LPS の好中球と単球への結合を濃度依存的に抑制し、しかも、LPS の効果をブロックする 1 μ g/ml と 5 μ g/ml で、LPS の結合をほぼ完全に抑制することがわかった (図9)。

おわりに

今までに哺乳動物の細胞が産生する殺菌ペプチドとして、デフェンシンや cathelicidin ファミリーの殺菌ペプチドが単離されている^{2,3)}。両ファミリーの殺菌ペプチドは、グラム陽性菌、陰性菌のみならず真菌などにも幅広い抗微生物作用を示す。しかし、デフェンシンの殺菌作用は血清や NaCl のような塩の存在によって失活してしまうことから、デフェンシンは細胞外液中で殺菌作用を発揮しにくいと考えられている^{5,15)}。また、デフェンシンには LPS 中和能がほとんどない^{6,16)}。一方、cathelicidin ファミリーの殺菌ペプチド中で、ヒト CAP18 (cationic antibacterial protein of 18 kDa), ウサギ CAP18 およびモルモット CAP11 は、血清や塩存在下でも殺菌作用を保持しており^{5,17)}、さらに、LPS 中和能も有している^{6,18)}。特に CAP11 は強力な殺菌作用と LPS 中和作用を示すことから、細菌感染やエンドトキシンショックに対する治療応用が期待されている。

グラム陰性菌感染による敗血症性ショックでは、菌体から遊離された LPS が単球・マクロファージに作用して、サイトカイン (IL-1 β , TNF- α , IL-8) や一酸化窒素など

の産生を介して、敗血症性ショックの病態を誘導すると考えられている¹⁾。そのため、中和抗体や受容体アンタゴニストを用いてそれら炎症性メディエーターの働きを抑制したり、あるいは合成阻害剤を用いてそれらの生成を抑制することによって敗血症性ショックを制御しようとする試みが今までなされてきた。しかし、これらのやり方では期待するような効果がほとんど認められないという事実があった¹⁹⁾。一方、好中球が LPS によって刺激されると、アポトーシスが抑制され、活性化された好中球が敗血症性ショックにおける臓器障害の増悪に関与すると考えられている¹⁾。したがって、好中球のアポトーシスを制御することは、敗血症性ショックの治療戦略を考える上で重要なターゲットになると思われる^{19,20)}。

今回、LPS の好中球アポトーシス抑制作用に及ぼす CAP11 の影響について検討した結果、LPS は、主に Mac-1 (CD11b/CD18), TLR4 などの分子を介して^{11,12)}、好中球のアポトーシスを抑制することがわかった。そして、その抑制には、転写因子 NF- κ B の活性化、MAP キナーゼである ERK のリン酸化、anti-apoptotic タンパク質である Bcl-XL の発現、アポトーシスの実行分子カスパーゼ-3 の活性低下が関与していた^{9,10)}。そして、CAP11 は、NF- κ B, ERK, Bcl-XL の活性化を阻害し、カスパーゼ-3 活性を増大させて好中球のアポトーシスを誘導することがわかった (図2)。

さらに、単球が LPS 刺激を受けると好中球のアポトーシスを抑制する IL-1 β , TNF- α , IL-8 などのサイトカイン^{13,14)} を生成したが、CAP11 はそれらの生成を阻害して好中球のアポトーシスを誘導することがわかった (図2)。

今までの研究によって CAP11 が強力な LPS 結合能を持つことがわかっている⁶⁾。したがって、CAP11 は、LPS に結合することによって、LPS の好中球、単球への結合を阻害し、その結果、LPS による好中球の活性化と単球によるサイトカイン生成を抑制して好中球のアポトーシスを誘導するという作用機構が考えられる。このような事実から、cathelicidin ファミリーの殺菌ペプチドである CAP11 は、敗血症性ショックにおいて殺菌作用を発揮するだけでなく、単球・マクロファージ系細胞によるサイトカイン生成を抑制し、さらに、Mac-1/TLR4 を介した LPS のシグナル伝達をブロックし、好中球のアポトーシスを誘導することによって臓器障害を緩和する新たな治療薬となる可能性が考えられる。

文 献

- 1) Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420: 885-891, 2002.

- 2) Hancock REW, Diamond G: The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol*, 8: 402-410, 2000.
- 3) Gennaro R, Zanetti M: Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55: 31-49, 2000.
- 4) Yomogida S, Nagaoka I, Yamashita T: Purification of the 11- and 5-kDa antibacterial polypeptides from guinea pig neutrophils. *Arch Biochem Biophys*, 328: 219-226, 1996.
- 5) Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M: Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm Res*, 49: 73-79, 2000.
- 6) Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Heumann D: Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF- α by blocking the binding of LPS to CD14⁺ cells. *J Immunol*, 167: 3329-3338, 2001.
- 7) Majewska E, Sulowska Z, Baj Z: Spontaneous apoptosis of neutrophils in whole blood and its relation to apoptosis gene proteins. *Scand J Immunol*, 52: 496-501, 2000.
- 8) Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C: Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*, 243: 167-190, 2000.
- 9) Akgul C, Moulding DA, Edwards SW: Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett*, 487: 318-322, 2001.
- 10) Weinmann P, Gaehtgens P, Walzog B: Bcl-X_L- and Bax- α -mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3. *Blood*, 93: 3106-3115, 1999.
- 11) Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert SM, Vogel SN: CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol*, 166: 574-581, 2002.
- 12) Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1589: 1-13, 2002.
- 13) Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A: Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, 80: 2012-2020, 1992.
- 14) Leuenroth S, Lee C, Grutkoski P, Keeping H, Simms HH: Interleukin-8-induced suppression of polymorphonuclear leukocyte apoptosis is mediated by suppressing CD95 (Fas/Apo-1) Fas-I interactions. *Surgery*, 124: 409-417, 1998.
- 15) Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T: Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Ann Rev Immunol*, 11: 105-128, 1993.
- 16) Hancock REW, Scott MG: The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 8856-8861, 2000.
- 17) Larrick JW, Hirata M, Shimomura Y, Yoshida M, Zheng H, Zhong J, Wright SC: Antimicrobial activity of rabbit CAP18-derived peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, 37: 2534-2539, 1993.
- 18) Hirata M, Shimomura Y, Yoshida M, Morgan JG, Palings I, Wilson D, Yen MH, Wright SC, Larrick JW: Characterization of a rabbit cationic protein (CAP18) with lipopolysaccharide-inhibitory activity. *Infect Immun*, 62: 1421-1426, 1994.
- 19) Riedemann NC, Guo RF, Ward PA: Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*, 9: 517-524, 2003.
- 20) Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL: Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J*, 15: 879-892, 2001.
- 21) Pyatt DW, Stillman WS, Yang Y, Gross S, Zheng JH, Irons RD: An essential role for NF- κ B in human CD34⁺ bone marrow cell survival. *J Immunol*, 93: 3302-3308, 1999.