

平成 21 年 4 月 9 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18790534  
 研究課題名(和文) 炎症性肺疾患における抗菌ペプチドの病態生理学的意義に関する細胞および個体での検討  
 研究課題名(英文) The investigation of the pathogenic significance of the antimicrobial peptide, defensin, in the pulmonary diseases *in vitro* and *in vivo*.  
 研究代表者  
 山口 泰弘 (YAMAGUCHI YASUHIRO)  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：60376473

## 研究成果の概要：

マウス $\beta$ -defensin-6 過剰発現マウスにおいて、骨格筋線維の変性、再生の所見が認められた。当該マウスは、さらに、寿命の短縮、るいそう、骨密度低下、酸化ストレスの亢進など、老化の促進に相当する表現型を示した。抗菌ペプチドによる組織障害を個体レベルで明らかにした初めての研究である。抗菌ペプチド Human  $\beta$ -defensin-3 は、他の defensin と比較しても、培養細胞に対して、有意に強い細胞傷害性を有した。細胞膜透過性亢進がその主要な原因と考えられ、P2 受容体拮抗薬である PPADS により阻害された。さらに、この細胞傷害性は、抗腫瘍効果として、個体レベルでも確認された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	700,000	0	700,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	210,000	2,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：免疫学 応用動物 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

ディフェンシンは、保存されたシステイン配列をもつ抗菌ペプチドの一群である。このシステイン配列の相違から、 $\alpha$ -defensin と  $\beta$ -defensin の二つのサブファミリーに分類されている。ヒト  $\alpha$ -defensin ファミリーとしては、好中球の顆粒中に存在する human neutrophil peptide-1, 2, 3, 4 (HNP-1, 2, 3, 4) と腸管のパネス細胞に存在する human defensin-5, -6 が知られている。これらは、肺や皮膚などの様々な組織で産生されており、また、好中球顆粒中にも多量に存在する。

一方、defensin が、抗菌活性とともに、哺乳類細胞自身に作用し、炎症の制御因子として機能しうることが報告されてきた。具体的には、細胞増殖の促進、サイトカイン分泌の促進、ヒスタミン分泌の促進、炎症細胞の遊走など様々な機能が報告されている。さらに、高濃度の defensin が細胞傷害性を有することも、主に HNP-1 について報告されている。

これまでの、defensin に関する遺伝子改変マウスを用いた知見では、defensin 欠損による細菌感染の重症化や常在菌数の増加が報告されてきた。しかし、上記のような

defensin の多彩な機能の存在を考慮すると、defensin は、微生物の増殖を抑制するだけでなく、抗腫瘍効果としての作用も有すると推定された。

一方で、多くの炎症性因子が、生体の防御と同時に、その制御異常が、炎症性疾患の発症に關与するように、過剰量の defensin が、炎症性肺疾患などにおける病態生理的意義を有すると推定された。

## 2. 研究の目的

(1) Defensin を過剰発現する遺伝子改変マウスの疾患形成を観察することにより、過剰量の defensin の病態生理的意義を明らかにする。

(2) また、気道上皮由来細胞などに defensin を投与することにより、その細胞傷害性を評価し、そのメカニズムを明らかにする。そして、それらの結果をもとに、個体レベルにおける、defensin の抗腫瘍効果を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) mBD-6 過剰発現マウスの作製

我々は、mBD-6 cDNA を、pCAGGS ベクターに挿入し、トランスジーンを作製した。このベクターでは、挿入された mBD-6 遺伝子は、human cytemogalovirus immediate-early enhancer とそれに続く chicken  $\beta$ -actin promoter により駆動される。chicken  $\beta$ -actin の第一エクソンおよびイントロンに続いて、mBD-6 cDNA が位置し、mBD-6 自身のストップコドンの後、rabbit  $\beta$ -globin poly(A) sequence が、その下流に位置するように設計されている(図1)。

上記より作製したトランスジーンを C57BL/6 マウスの受精卵に注入し、それを仮親マウスの卵管内に移植して出産させた。これらの操作は、熊本大学動物資源開発研究センターとの共同で行われた。

2系統において、次世代への遺伝が確認されたが、一方の系統 Tg1 マウスは、ICR もしくは C57BL6/J で維持し、もう一方の系統 Tg2 マウスは、C57BL6/J で維持した。

### (2) 筋組織からのペプチドの抽出とウエスタンブロット

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、骨格筋を切り出し、液体窒素にて凍結した。組織 100mg あたり、1ml の ISOGEN (Nippon gene) を用いて筋組織をホモジナイズした後、プロトコールに従い蛋白を抽出した。抽出した蛋白のペレットから、0.5% 酢酸水に 4、一晩で溶出した成分を 10% アンモニア水で中和した。上記サンプルをトリシン SDS-PAGE を用いて分離し、PVDF 膜にトランスファーした。一次抗体として、作製した mBD-6 抗血清を使用した。

### (3) マウス筋組織標本の作製

マウスより骨格筋を切り出し、凍結標本を作製し、さらに、厚さ 10  $\mu$ m の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色 (H E 染色)は、型通りに施行した。

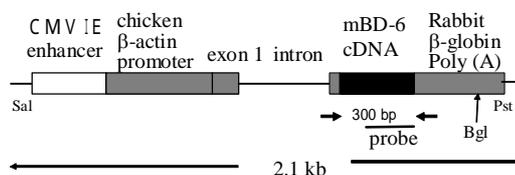


図1 トランスジーン構成.

CMV IE enhancer;  
cytemogalovirus immediate-early enhancer

### (4) マウス骨密度の測定

マウスの大腿骨を摘出し、骨量、骨密度を pQCT 骨密度測定装置により計測した。

### (5) マウス尿中 8-OHdG の測定

マウスの尿を採取後、3000 回転 5 分遠心し、上清の 8-OHdG 濃度を高感度 8-OHdG Check ELISA (日本老化制御研究所) を用いて測定した。尿中クレアチニンは、SRL にて測定した。尿中 8-OHdG 濃度を尿中クレアチニン濃度でわることにより補正した値を、DNA の酸化損傷の指標とした。

### (6) マウス骨密度の測定

マウスの大腿骨を摘出し、骨量、骨密度を pQCT 骨密度測定装置により計測した。

### (7) マウス尿中 8-OHdG の測定

マウスの尿を採取後、3000 回転 5 分遠心し、上清の 8-OHdG 濃度を高感度 8-OHdG Check ELISA (日本老化制御研究所) を用いて測定した。尿中クレアチニンは、SRL にて測定した。尿中 8-OHdG 濃度を尿中クレアチニン濃度でわることにより補正した値を、DNA の酸化損傷の指標とした。

### (8) ヨウ化プロピジウム(PI) による染色

細胞膜傷害による細胞死を観察するために、培地を propidium iodide (PI) と Hoechst 33342 を含む DMEM 培地に置換して染色した。死細胞の割合は、培養皿中央の 0.43mm<sup>2</sup> 内の PI 陽性細胞を、同視野で、Hoechst 33342 に染まる核の総数で割ることにより判定した。

### (9) P2X 受容体の阻害

我々は、hBD-3 の細胞膜傷害に対する P2X 受容体拮抗薬の影響を検討した。PPADS 存在下で細胞を 2 時間培養した後、hBD-3 の効果を評価した。

### (10) LDH 活性の測定

hBD-3 を含む HEPES buffer 溶液(140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25mM CaCl<sub>2</sub>, 1mMNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM HEPES, 11 mM glucose, 0.2% bovine serum albumin, pH 7.4) 下で A549 細胞を 45 分培養した後、上清の LDH 活性を測定し

た。LDH 活性の測定には、LDH-Cytotoxic Test (Wako, Osaka-shi, Japan)を使用した。

#### (11) 細胞総数の測定

3.38cm<sup>2</sup> のwell 中に 1x10<sup>5</sup>個/mlのA549細胞懸濁液1mlを、上記のhBD-3合成ペプチド、あるいは相当量の0.001%酢酸溶液を含む培地で培養した。48時間後、トリプシン/EDTA溶液にて細胞を剥離し、10%(v/v)FCSを含むDMEM培地にて細胞を懸濁し、その細胞数を測定した。細胞数の測定には、コールター・カウンター(ベックマン・コールター株式会社)を使用した。

#### (12) マウスへの腫瘍細胞の接種と、mBD-14合成ペプチドの持続皮下投与

生後3ヶ月の雄のC57BL/6Jマウスを麻酔後、背部の皮下に1x10<sup>6</sup>個のLLC細胞を接種した。9日後に、皮下の腫瘍塊の触知を確認し、その後、腫瘍塊近傍の背部皮下に4.17mg/mlのmBD-14合成ペプチド含有PBSを充填した持続投与ポンプあるいは、相当量の0.01%酢酸含有PBSを充填した持続投与ポンプを埋め、10日後に腫瘍を摘出し、重量を測定した。持続投与ポンプとしては、ALZET MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2002(DURECT)を用いた。本ポンプでは、0.5μl/hの流速で、充填した溶液が皮下に投与されるため、50μg/日のmBD-14合成ペプチドが皮下に投与される。

### 4. 研究成果

#### (1) mBD-6 過剰発現マウスの作製

前記のトランスジーン挿入は、2系統において、次世代への遺伝が確認された。サザンブロット法により、一方の系統では、トランスジーンが複数含まれていることが予想され、もう一方の系統では、トランスジーンが1コピー含まれていることが予想された。ここでは、これらの遺伝子改変マウスを、順に、Tg1マウス、Tg2マウスと呼ぶことにする。

#### (2) mBD-6 ペプチド過剰発現の解析

我々は、蛋白レベルでのmBD-6量を確認するために、等量の骨格筋より抽出した蛋白をウエスタンブロットし、mBD-6抗血清により解析した。図2のようにTgマウスにおいてのみ、mBD-6ペプチドを検出することができた。しかし、Tg1マウスに比較して、Tg2マウスでのシグナルは非常に弱く、mBD-6の発現は、やはりTg1マウスにて有意に高いことが示された。

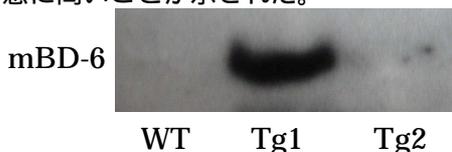


図1. ウエスタンブロットによるmBD-6ペプチド過剰発現の確認。

#### (3) Tg1 マウスの低体重

生後6週頃には、Tg1マウスの低体重が認められるようになり、生後8週での平均体重は、野生型の同腹仔に比べて、有意に小さく、その約80%であった(図2)。なお、出生時から生後20日後まで、Tg1マウスと野生型の同腹仔との間に有意な体重差は認められなかった。

#### (4) Tg1 マウスの寿命の短縮

C57BL6/Jをバックグラウンドに維持したTg1マウスの寿命を記録した(図3)。Tg1マウスの寿命は、野生型の同腹仔と比較して有意に短く、ほぼすべてのマウスが生後一年以内に死亡した。著明な体重減少以外に、癌などの特定の死因は認められず、老衰ともいふべき状態であった。

Tg2マウスは、1年以上生存した。

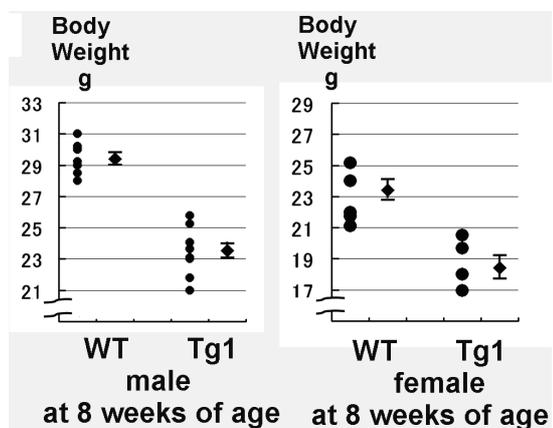


図2. Tg1マウスの低体重。

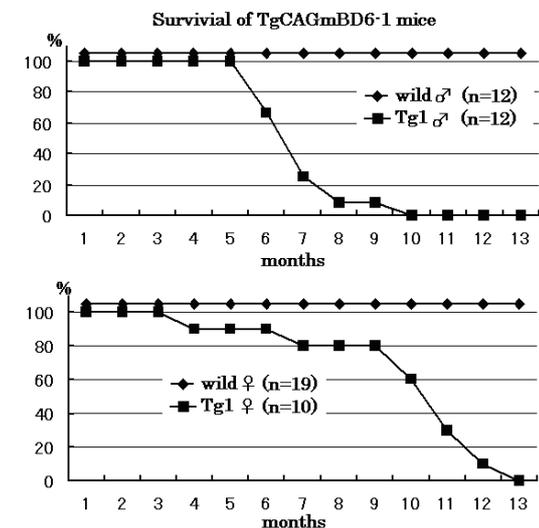


図3. Tg1マウスの生存曲線

#### (5) Tg1 マウスの筋病変

生後3ヶ月のTg1マウスの骨格筋のHE染色では、筋線維の多くは、中心核線維に置換され、円形化し、大小不同も目立ち、肥大線維はしばしば分割して、いわゆるfiber

splitting の所見を示した。さらに、エオジンに淡染する壊死線維や単核細胞の集簇巣が散在し、塩基性の再生線維も認められた(図4)。

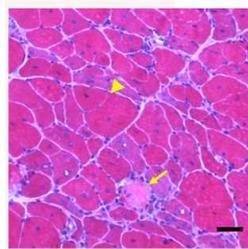
一方、Tg2 マウスは、生後6ヶ月ころまで、骨格筋の病理像において明らかな異常は認められなかった。しかし、生後1年のTg2 マウスでは、少数の淡染する変性線維が認められた。また、生後1年のTg2 マウスの腓腹筋において、同年齢の野生型マウスと比較して有意に多い中心核線維が認められた(2.5±0.5% vs. 0.2±0.1%) ( $p < 0.01$ )。

#### (6) Tg マウスの骨密度

生後3ヶ月のTg1 マウスの大腿骨の骨密度は、平均して0.0451 g/cm<sup>2</sup>、0.0424 g/cm<sup>2</sup> であり、野生型の同腹仔の骨密度、0.0647 g/cm<sup>2</sup>、0.0590 g/cm<sup>2</sup> と比較して、有意に低値であった( $p < 0.01$ )。

#### (7) Tg1 マウスの尿中8-OHdG

DNAの酸化損傷を評価するために、生後3ヶ月のTg1 マウスの尿中8-OHdGを測定した。尿中クレアチニン補正した尿中8-OHdGは有意に上昇しており、酸化ストレスの増強が示された(図5)。



Tg1, 6 months

図4. Tg1 マウスの筋線維変性の進行

#### (8) hBD-3 の細胞膜傷害性

短時間のhBD-3刺激による細胞膜の傷害をPI染色により評価した。10分間のhBD-3刺激により、A549細胞で、PIの取り込みが認められ、急性の細胞膜傷害を示す所見がえられた。PI陽性細胞の割合は、hBD-3濃度に比例して直線的に、有意に増加した(図6)。

hBD-3の細胞傷害性を他のヒト defensinと比較すると、hBD-3の細胞傷害性は、既に報告のあるHNP-1と比較しても有意に強かった。hBD-1やhBD-2では、200 µg/mlの濃度においても、PI陽性細胞は惹起されなかった。また、hBD-3のマウスホモログであるmBD-14は、hBD-3と同様の強い細胞傷害性を示した(図7)。

#### (9) hBD-3 の細胞傷害性に対する P2X 受容体拮抗薬の影響

hBD-3の細胞傷害性の分子機序を検討するために、我々は、P2X受容体に注目した。A549細胞から抽出したmRNAのRT-PCR

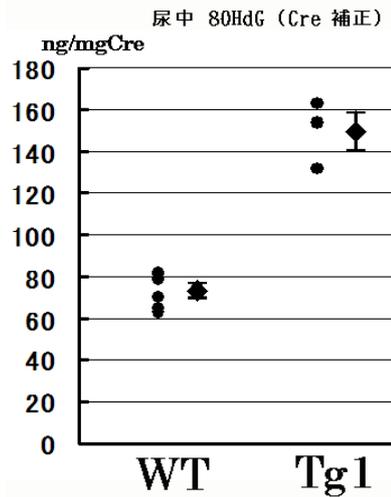


図5. 生後3ヶ月のTg1マウスの尿中8OHdG/尿中クレアチニン比

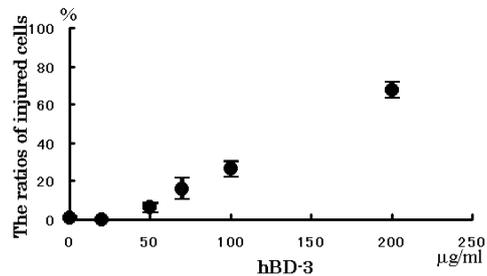


図6. 10分間のhBD-3刺激後のPI取り込みとhBD-3濃度依存性

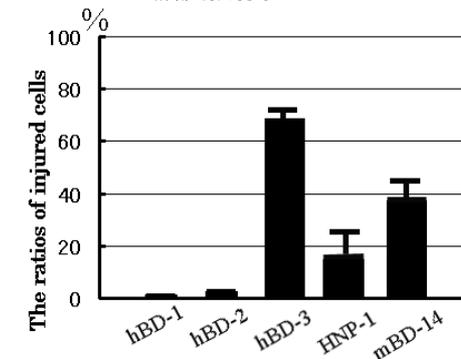


図7. ヒト defensin (200 µg/ml) の細胞傷害性の比較

によりP2X3、P2X4、P2X5受容体の発現が認められた。hBD-3と45分間共培養の後、上清のLDH活性を測定した。P2X受容体の拮抗薬であるPPADSの存在下では、100 µg/mlのhBD-3によるLDH releaseが、有意に抑制されることが確認された(図8)。

#### (10) 低濃度hBD-3の抗腫瘍効果

より低濃度のhBD-3に長時間暴露することによる、A549細胞への影響を評価した。20 µg/mlのhBD-3存在下で、10% (v/v) FCS含有培地で培養し、12時間後に評価し

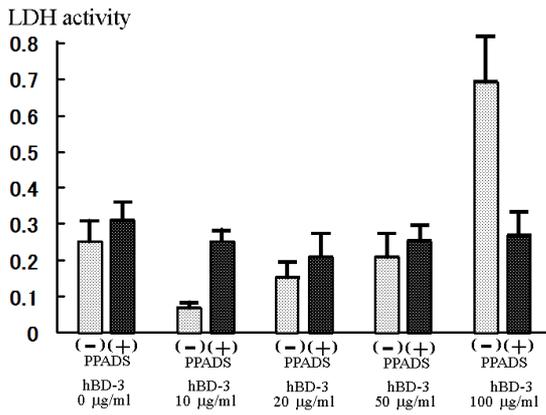


図8. hBD-3による培養上清LDH活性上昇の測定

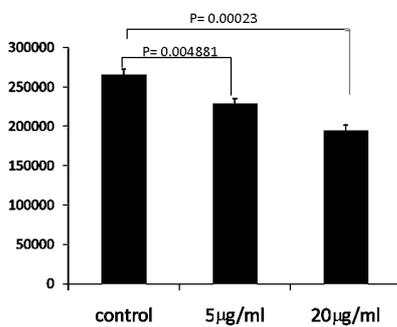


図9. 48時間のhBD-3存在下での培養による細胞数の減少

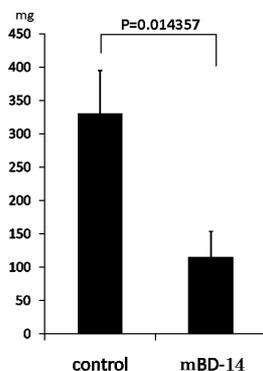


図10. mBD-14投与マウスの腫瘍の重量.

たところ、コントロールと比較して、有意なPI陽性細胞の惹起が認められた。さらに、5 μg/ml あるいは、20 μg/ml の hBD-3 添加培地で 48 時間、培養した A549 細胞の総細胞数も有意に少ないことが確認された (図 9)。

(11) 個体における mBD-14 の抗腫瘍効果

C57BL6/J マウスの皮下に接種した LLC 細胞の腫瘍塊近傍で、mBD-14 ペプチドを持続皮下投与した。9 日後に、腫瘍を摘出し、その重量を評価した結果、mBD-14 投与マウスから摘出した腫瘍はコントロール群と比較して有意に小さいことが明らかとなった

(図 10)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Ishii, M., Yamaguchi, Y., Yamamoto, H., Hanaoka, Y., Ouchi, Y. Airspace Enlargement with Airway Cell Apoptosis in Klotho Mice: A Model of Aging Lung. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008;63:1289-1298. 査読有

Yamamoto, H., Nagase, T., Shindo, T., Teramoto, S., Aoki-Nagase, T., Yamaguchi, Y., Hanaoka, Y., Kurihara, H., Ouchi, Y. Adrenomedullin insufficiency increases allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *J Appl Physiol*. 102: 2361-2368, 2007. 査読有

Yamaguchi, Y., Nagase, T., Tomita, T. et al. β-defensin overexpression induces progressive muscle degeneration in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 292: C2141-C2149, 2007. 査読有

[学会発表](計 6 件)

山口泰弘 ら. 高濃度 beta-ディフェンシンによる気道上皮由来細胞の細胞死と P2X 受容体の関与. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会. 2008.6.16. 神戸

山口泰弘 ら. シンポジウム“細胞分子呼吸器学から臨床へ” 抗菌ペプチド defensin の新しい病態生理学的意義 2008.6.16.神戸 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会

花岡陽子, 山口泰弘 ら. β-defensin 6 過剰発現マウスの肺機能評価. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 2008.6.17.神戸

山口泰弘 ら. 老化モデルとしてのディフェンシン過剰発現マウスの表現型と筋障害の機序. 第 49 回日本老年医学会学術集会 2007.6.22. 札幌

⑤ Yasuhiro Yamaguchi et al. The Molecular Mechanism of Human β-Defensin Cytotoxic Effects on Mammalian Pulmonary Cells. the 2007 ATS International Conference May 21, 2007. San Francisco, California.

山口泰弘 ら. β-ディフェンシンの過剰発現により惹起される筋線維変性と骨量低下. 第 48 回日本老年医学会学術集会 2006.6.9., 金沢.

[その他]

2007 年度日本呼吸器学会学会奨励賞 受賞  
2006 年度財団法人長寿科学振興財団 若手研究者奨励賞 受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 泰弘 (YAMAGUCHI YASUHIRO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究番号：60376473