

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590927

研究課題名(和文) デフェンシンを新しい抗菌薬として開発するための基礎的研究

研究課題名(英文) Fundamental study of development of new antibiotics using defensins

研究代表者

迎 寛 (MUKAE HIROSHI)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：80253821

研究成果の概要(和文)：1、真菌のデフェンシンであるプレクタシンは肺炎球菌に対して強い抗菌活性を持ち、ヒト細胞からのサイトカイン産生や細胞傷害に影響しない。そのため、プレクタシンは新しい抗菌薬としての可能性が示唆された。2、ヒト $\alpha$ デフェンシンはサイトカイン産生誘導能や細胞傷害性を持つが、それ以外に気道上皮細胞からムチン(MUC5AC)産生亢進作用があることが明らかとなった。この作用はマクロライド系抗菌薬により抑制された。3、ヒト $\alpha$ デフェンシンによるヒト細胞からのIL-8や増殖因子の産生は細胞の種類により異なり、それが特発性肺線維症やびまん性汎細気管支炎の病態の相違と関連している可能性がある。これらの作用はヒトに対する投与で副作用となる可能性があり、ヒト $\alpha$ デフェンシンを直接抗菌薬として使用する事は難しい。今後、プレクタシンなどヒト以外のデフェンシンの検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：1. Plectasin is the first defensin-like peptide to be isolated from fungus, which has specific antibacterial activity against *Streptococcus pneumoniae*. In addition, it showed no cytotoxicity to human cells, and it did not induce IL-8 production in A549 cells. This suggests that plectasin could be an inoffensive alternative antibiotic for clinical application. 2. Human  $\alpha$ -defensins contribute to excessive mucus production by increasing the production of MUC5AC from bronchial epithelial cells. Macrolide antibiotics directly inhibit these actions. 3. Human  $\alpha$ -defensins mainly enhanced the expression of IL-8 in epithelial cells, whereas it enhanced transforming growth factor- $\beta$  and vascular endothelial growth factor expressions in lung fibroblasts. These results suggest that human  $\alpha$ -defensins play different roles in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and diffuse panbronchiolitis according to the location in the lung where the human  $\alpha$ -defensins are mainly produced. It is possible that these effects of human  $\alpha$ -defensins carry a risk of adverse effects. Therefore we should examine the possibility of fungal defensins like plectasin as antibiotics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：呼吸器内科学、感染症学

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：デフェンシン、プレクタシン、サイトカイン、増殖因子、気道上皮細胞、抗菌活性

## 1. 研究開始当初の背景

気道・肺は病原微生物の侵入門戸となる臓器であり、充実した免疫機構を持つが、その速やかな発現のためには非特異的な病原微生物に対する反応である自然免疫が特に重要となる。その中でも抗微生物活性やその他の様々な作用をもつ抗菌ペプチド群が現在注目されている。デフェンシンは抗菌ペプチド群の中の一つであり、グラム陽性・陰性菌、真菌、結核菌、エンベロープウイルスに対して広く抗微生物活性を持ち、ほ乳類から昆虫、植物などにまで存在する。ヒトでは構造上の特徴から $\alpha$ 型と $\beta$ 型に分類される。現在、既存薬とは異なる抗菌メカニズムであることからデフェンシンに関連する新しいタイプの抗菌薬の開発が世界的にすすめられているが、まだその商品化までは様々な困難が認められる(Hancock RE et al. Nat Biotechnol. 2006)。我々は今までに様々なヒト・デフェンシンの合成ペプチドを作製し、その抗菌活性の検討を行ってきた。

また、radioimmunoassay を用いてその定量法を確立し(Shiomi K et al. Biochem Biophys Res Commun. 1993, Hiratsuka T et al. Biochem Biophys Res Commun. 1998, Yanagi S et al. Respir Res. 2005, Ishimoto H et al. Eur Respir J. 2006)、肺炎を中心とした様々な呼吸器感染症の患者でデフェンシン値の測定を行ってきた。デフェンシンは患者の肺局所や血漿でその産生量が増加しており、実際にヒトにおいてもデフェンシンが呼吸器感染症で重要な役割を果たしていることが明らかとなった(Ashitani J et al. Eur Respir J. 1998, Chest 2001, Chest 2002, Hiratsuka T et al. Thorax 2003)。

抗菌活性以外にもデフェンシンは様々な作用があることが明らかとされている。まず、デフェンシンには樹状細胞、T細胞、マクロファージなどを遊走させ、自然免疫と獲得免疫の橋渡しを行っていることが明らかとされている。我々も今までにデフェンシンがケミカルメディエーターとしての働きを持つことや線維化に関連することも確認してきた(Sakamoto N et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005, Yoshioka S et al. Life Sci. 2007)。

現在、多剤耐性菌の社会的問題化にも関連し、デフェンシンが「新しい抗菌薬」として世界的に期待され、研究がなされている。しかし、まだ抗菌薬としての商品化というレベルには未だ至っておらず、デフェンシンの抗菌活性、安全性、また抗菌活性以外の作用をより詳細に明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

デフェンシンの「新しい抗菌薬」としての臨床応用を目標に、抗菌活性などの検討を行う。特に最近発見された真菌由来のデフェンシンであるプレクタシンに関する検討を行なう。また、デフェンシンが持つその他の様々な作用の検討をより詳細に行うことでヒトに投与された時の予想される副作用を明らかとし、また抗菌薬以外の作用を利用した新たな創薬の可能性を求めた基礎的研究を行う。

## 3. 研究の方法

①多剤耐性菌に対するデフェンシンの感受性の確認：

多剤耐性菌を中心として、コロニーカウントアッセイなどの手法を用い、ヒトデフェンシンやヒト以外のデフェンシン(Plectasinなど)の抗菌活性を明らかとしていく。

②抗菌活性以外のデフェンシンの効果の検討 1 (ムチン産生におけるデフェンシンのケミカルメディエーターとしての働きとそれに対するマクロライドの影響)：

びまん性汎細気管支炎(DPB)症例では喀痰の増加が著明である。我々の過去の検討から、DPB症例では肺局所でのデフェンシン濃度の増加が明らかであるために、ムチン合成亢進にデフェンシンが関与している可能性を考えた。そこで、気道上皮細胞であるH292細胞に対して $\alpha$ デフェンシンおよびLPSにて刺激を行い、MUC5ACの発現量の変化をRT-PCR法やELISA法を用いて確認する。また、両者による刺激を同時に行った場合の相互作用に関する検討も行う。緑膿菌によるMUC5AC産生亢進がマクロライド系抗菌薬によって抑制されることは以前示した(Kaneko Y et al. Respiration. 2003)が、デフェンシンによる刺激においても同様の作用を示すものか、またマクロライド系抗菌薬やケトライド系抗菌薬にその抑制作用があるか、細胞内情報伝達もからめて確認する。

③抗菌活性以外のデフェンシンの効果の検討 2 (肺線維芽細胞や気道上皮細胞におけるデフェンシンによるサイトカインや増殖因子の産生確認)：

ヒト正常肺線維芽細胞のprimary culture、II型肺胞上皮細胞(A549細胞)、気道上皮細胞を用いて、IL-8やIL-1 $\beta$ といった初期炎症反応に関わるサイトカイン、また線維化に関与するといわれているTGF- $\beta$ 1, PDGF, CTGFなどの成長因子のmRNAの発現について、RNase protection assay (RiboQuant<sup>TM</sup> multi-probe system; PharMingen)やreal time PCRを用い、検討する。これらの検討により、デフェンシンの生体での副作用としての細胞傷害や線維化へのメカニズムを明ら

かとする。

#### 4. 研究成果

まず、デフェンシンの「新しい抗菌薬」としての臨床応用を目標に、最近発見された真菌由来のデフェンシンであるPlectasinについて、その合成ペプチドを用いて*in vitro*における抗菌活性の検討を行った。



図1：PRSPと PSSPともに良好な抗菌活性がみられたが、MSSAに対する抗菌活性はなかった。

種々の細菌や真菌に対する抗菌活性を調べたが、肺炎球菌ではペニシリン感受性、耐性に関係なく、強い抗菌活性がみられた(図1)。また、MRSAを含むブドウ球菌やインフルエンザ菌、緑膿菌、カンジダには抗菌活性は認めなかった。ヒトデフェンシンでは、ヒト血清によりその抗菌活性が消失することが知られているが、我々の検討においてPlectasinの抗菌活性はヒト血清の添加によっても何ら変化を認めなかった。このことから、Plectasinはヒトに対して経静脈的な投与でも活性が減弱しない可能性がある。次に、ヒトデフェンシンは細胞傷害性やサイトカイン産生誘導作用を持つが、Plectasinも同様な作用があるかを検討した。結果としてはPlectasin刺激により、気道上皮細胞からのIL-8産生は見られず(図2)、また気道上皮細胞などの肺内細胞への細胞傷害性はみられなかった。これらの結果から、Plectasinはヒトの感染症において、将来臨床的に使用できる可能性がある。

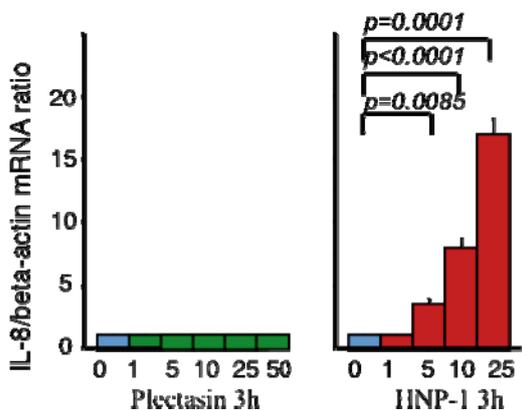


図2：αデフェンシン (HNP-1) とPlectasinによるA549細胞からのIL-8産生への影響

我々は以前にαデフェンシンが持つ細胞傷害などの様々なヒト細胞への影響を明ら

かにしているが、αデフェンシン投与による副作用の可能性を明らかにする目的で、今回、気道上皮細胞からのムチン産生に対するαデフェンシンの影響を検討した。緑膿菌由来LPS同様にαデフェンシンは気道上皮細胞からのムチン産生を亢進させた(図3)。これはLPSによる刺激同様にマクロライド薬の投与で抑制された。シグナル伝達系の検討ではLPSとαデフェンシンのムチン産生へのシグナル伝達系が異なることが示唆された。

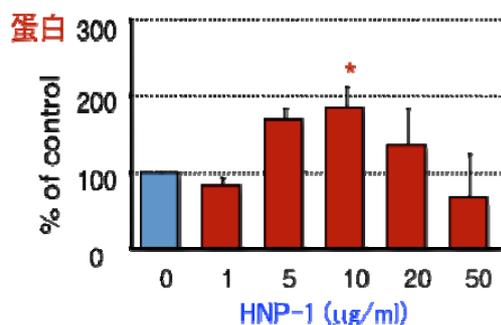


図3：αデフェンシン (HNP-1) は濃度依存性にMUC5AC蛋白の発現を亢進したが、20 µg/ml以上の濃度では細胞傷害性がみられた。

今までに開発した各種デフェンシンのradioimmunoassayを用いて、クローン病などの炎症性腸疾患症例におけるデフェンシンの係わりを臨床的に検討した。クローン病などの炎症性腸疾患では特にαデフェンシン値が健常者よりも高値を示し、特に血漿値は疾患活動性や、CRPやTNFαなどの炎症反応と相関していた。これらの結果よりデフェンシンと炎症性腸疾患の関連性が示唆され、デフェンシンを「新しい抗菌薬」として臨床応用するためには、腸炎などの副作用が出現する可能性が否定できず、マウスなどの動物モデルにデフェンシンを投与することで腸に対する副作用を確認する必要がある。

血漿中のαデフェンシン値が特異性肺線維症において健常者よりも高値となるという結果(Mukae H et al. Thorax. 2002)から、デフェンシンによる肺の線維化の可能性も考慮すべきであると考えた。そこで今回は、*in vitro*において様々な肺内細胞(気道上皮細胞、肺胞上皮細胞、肺線維芽細胞)を用いて、αデフェンシンによる増殖因子やサイトカインの産生の有無、またその細胞間での違いを検討した。上皮細胞ではαデフェンシンによってIL-8の産生が強く亢進されるが、肺線維芽細胞ではIL-8の産生は弱く、逆にTGF-βやVEGFなどの増殖因子の産生が強く亢進された。この様に細胞の違いによってデフェンシンの刺激により産生されるメディエーターの違いがみられた(図4, 5)。

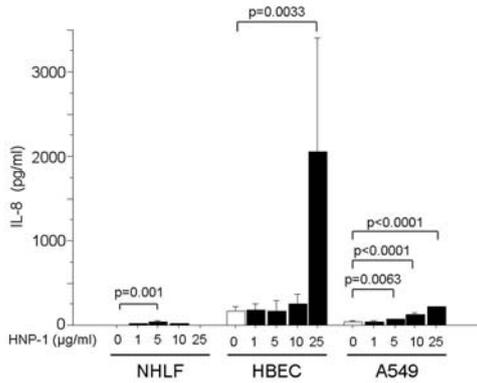


図4:  $\alpha$ デフェンシン (HNP-1) は濃度依存性にヒト気道上皮細胞 (HBEC) からのIL-8蛋白産生を亢進したが、A549細胞や肺線維芽細胞 (NHLF) では認められなかった。

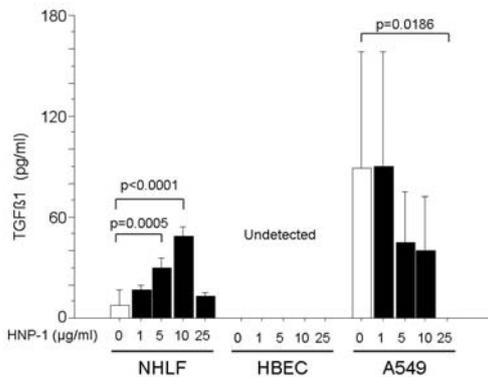


図5:  $\alpha$ デフェンシン (HNP-1) は濃度依存性に肺線維芽細胞 (NHLF) からのTGFβ1蛋白産生を亢進したが、ヒト気道上皮細胞 (HBEC) では認められなかった。

これらの結果からデフェンシンが主に産生される場所 (近隣に存在する細胞) の違いにより、病態 (炎症に進んだり、線維化に進んだりする) が異なってくる可能性が示唆された。

また、現在進行中であるが、 $\alpha$ デフェンシンをマウスの肺内に注入した後の肺の組織学的変化を検討している。まだ十分な解析に至っていないが、ARDSを起こす量の約10分の1の $\alpha$ デフェンシンを慢性的に1週間マウスの肺内に投与し、数日後にマウスの肺を検討したところ、気道を中心とした慢性炎症が起っている可能性が示唆されている。今後は検討数を増やし、長期間での肺への線維化を含めた影響を検討する予定である。

##### 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9件)

1. Amenomori M, Mukae H, Ishimatsu Y,

Sakamoto N, Kakugawa T, Hara A, Hara S, Fujita H, Ishimoto H, Hayashi T, Kohno S, Differential effects of human neutrophil peptide-1 on growth factor and interleukin-8 production by human lung fibroblasts and epithelial cells, *Exp Lung Res*, 査読有, 36巻, 2010, 411-419

2. 迎 寛, デフェンシンと呼吸器疾患特集II自然免疫と呼吸器疾患、炎症と免疫、査読無, 18巻, 2010, 362-365

3. 迎 寛, 「臨床に貢献できる研究」を目指して、呼吸、査読無, 29巻, 2010, 113-114

4. Yamaguchi N, Isomoto H, Mukae H, Ishimoto H, Ohnita K, Shikuwa S, Mizuta Y, Nakazato M, Kohno S, Concentrations of  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease, *Inflamm Res*, 査読有, 58巻, 2009, 192-197

5. 迎 寛, 呼吸器感染症とデフェンシン、臨床と研究、査読無, 85巻, 2009, 246-247

6. Ishimoto H, Mukae H, Sakamoto N, Amenomori M, Kitazaki T, Imamura Y, Fujita H, Ishii H, Nakayama S, Yanagihara K, Kohno S, Different effects of telithromycin on MUC5AC production induced by human neutrophil peptide-1 or lipopolysaccharide in NCI-H292 cells compared with azithromycin and clarithromycin, *J Antimicrob Chemother*, 査読有, 63巻, 2009, 109-114

7. 迎 寛, デフェンシンと呼吸器感染症、呼吸、査読無, 27巻, 2008, 24-28

8. Hara S, Mukae H, Sakamoto N, Ishimoto H, Amenomori M, Fujita H, Ishimatsu Y, Yanagihara K, Kohno S, Plectasin has antimicrobial activity and no affect on cell viability or IL-8 production, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 374巻, 2008, 709-713

9. 迎 寛, デフェンシンと肺の感染防御、炎症、線維化、日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌、査読有, 39巻, 2008, 9-11

[学会発表] (計2件)

1. Hara S, Mukae H, et al, Plectasin has antibacterial activity and no affect on cell viability or IL-8 production, 13th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, 2008年11月20日, Bangkok, Thailand

2. 原信太郎, 迎 寛, 他, Plectasin ~新規抗菌薬としての臨床応用可能性に関する検討~, 第78回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 2008年12月6日, 広島

〔図書〕（計1件）

1. 迎 寛、中外医学社、抗菌ペプチド  
（デフェンシン）、Annual Review呼吸器、  
2009、27-32

6. 研究組織

(1) 研究代表者

迎 寛 (MUKAE HIROSHI)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：80253821