

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790516

研究課題名（和文）2-アラキドノイルグリセロールによる抗菌ペプチド誘導作用の解析と応用
法の確立研究課題名（英文）Establishment of the Enhancement Effect of 2-Arachidonylglycerol on
Antimicrobial Peptide Induction

研究代表者

入江 圭一（IRIE KEIICHI）

福岡大学・加齢脳科学研究所・研究員

研究者番号：50509669

研究成果の概要（和文）：

抗菌ペプチドは自然免疫を担い、病原性微生物などに感染する危険から生体を防御するのに役立っている。本研究では、カンナビノイド受容体のリガンドとして同定された 2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)が、ヒト大腸癌由来 Caco-2 細胞において、抗菌ペプチドの発現を誘導することを見出した。また、BALB/c マウスに 2-AG を投与した後、病原微生物マーカーを経口投与し、2-AG が GFP 発現大腸菌の生存に与える影響を測定し、2-AG は GFP 発現大腸菌投与 1 時間後の GFP 発現大腸菌数を減少させることを明らかにした。以上のことから、2-AG は病原性微生物などの感染から生体を防御することが示唆された。よって、2-AG は、生体の抗菌ペプチドの発現を増加させ、自然免疫を賦活させることで、予防的な感染防御に利用できると思われる。

研究成果の概要（英文）：

Antimicrobial peptides (AMPs) are secreted from intestinal epithelium cell as the starting point for infection, contribute to innate immunity in the intestinal tract. We investigated that the 2-arachidonylglycerol (2-AG) secretes AMPs and that injection of 2-AG suppresses infection of pathogenic microorganism. The present study showed that 2-AG secreted the AMPs from Caco-2 cells. Furthermore, 2-AG suppressed the total number of *E. coli* marker during 6-hour period. Taken together, we found that 2-AG might suppress against pathogenic microorganism infection by secreting AMPs from intestinal epithelium cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：応用薬理学

科研費の分科・細目：薬物治療学

キーワード：2-アラキドノイルグリセロール、抗菌ペプチド、カンナビノイド

1. 研究開始当初の背景

我々は、日常生活する上で、種々の病原微生物との接触を避けることはできない。病原微生物が存在する外界と接する上皮組織には、消化管や皮膚、肺などがある。上皮組織は単に物理的なバリアとしてはたらくだけでなく、抗菌ペプチド (anti microbial peptides: AMPs) などを産生することで自然免疫を形成し、病原微生物から身体を保護している。抗菌ペプチドの一種である LL-37 は cathelicidin 系に属し、細菌、スピロヘータ、酵母などに対して幅広い抗菌スペクトルを

有することが知られている (Biochim Biophys Acta 1758: 1408-25 (2006))。このような抗菌活性をもつ抗菌ペプチド LL-37 は、多数の扁平上皮細胞で発現し、微生物感染から我々を守っていると考えられている。近年では、様々な形で疾患と関わっていることが明らかとなっており、抗菌ペプチドの発現量が減少することによって、炎症性腸疾患をはじめとする上皮組織における様々な疾患に罹患しやすくなることが推測される。

胸腺の発達していない乳幼児や胸腺の退化している高齢者では免疫機能が低下し、感染症に罹患しやすくなることが知られている。このような時期に胸腺依存の免疫を賦活するのは困難であると考えられる。胸腺に依存しない免疫系の賦活が重要であり、特に外界から侵入する病原微生物を防ぐ上皮組織の自然免疫は重要である。少子高齢化の現代、上皮組織がもつ抗菌ペプチドをはじめとする自然免疫は、小児や高齢者、あるいは日和見感染を起こすような状況において感染症の罹患から身体をまもるため重要であると考えられる。

研究代表者は、2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) の生理作用を探索している。2-AG は、カンナビノイド受容体のリガンドとして同定された脂質メディエーターの一種である。2-AG はマクロファージ様に分化させた細胞を遊走させるなどの作用をもつことが報告されており (Kishimoto, J Biochem 135: 517-524 (2003))、免疫系への関与が示唆されている。自然免疫に関する報告はなかったが 2-AG は、ヒトの母乳中に含まれること (Marzo, Nature 396: 636-637 (1998)) から、胸腺が十分に発達していない新生児では、生体防御を行うため 2-AG が自然免疫に関わっていることが予想された。

以上のことから、本研究は、腸管上皮における母乳中にも含まれる脂質メディエーター 2-AG の抗菌ペプチド誘導作用を解析し、応用法の確立を行った。

2. 研究の目的

本研究は 1). 腸管上皮由来細胞において、2-AG が抗菌ペプチド誘導作用をもつこと、2). 2-AG の抗菌ペプチド誘導作用の作用機序を明らかにする。加えて、3). 2-AG の抗菌ペプチド誘導作用がマウスの感染防御に機能することを確認する。

3. 研究の方法

<Caco-2 細胞を用いた 2-AG による抗菌ペプチド LL-37 発現誘導作用> : ヒト大腸癌由来 Caco-2 細胞を 6well plate に

1×10^4 cells/well の密度で巻き、一晚放置し、定着させた。各 well から培地を抜き、新たに 1%FBS 培地 2mL を加えた後、2-AG を曝露した。各濃度で 2-AG を曝露した後、培養上清をエッペンに回収し、その上清を ELISA 用サンプルとした。培養上清中の LL-37 は b. v. 社の Human LL-37 ELISA kit (Hycult biotechnology Inc.) を用い、定量した。キットのプロトコールに従い、各試薬を反応させた後、450nm の吸光度を測定し、検量線から LL-37 量を算出した。

80% コンフレントに達した Caco-2 細胞を 30 μ M PD98059、または 30 μ M SB203580 をそれぞれ添加後 1 時間インキュベートし、300 μ M 2-AG を添加した後、48 時間培養した。培養後、培養上清を回収し、ELISA 用サンプルとした。

<マウスを用いた 2-AG による抗菌ペプチド発現誘導作用と感染防御> :

DH5 α に pGFPuv を形質導入し、病原微生物マーカーとした。5 週齢の雌性 BALB/c マウスに 2-AG (10mg/kg) を、GFP 発現大腸菌を経口投与する 48、24、0 時間前の 3 回投与する群、24、0 時間前の 2 回投与する群、2-AG を投与しない群 (control) の 3 群を用意し、それぞれに腹腔内投与した。そして、0 時間で病原微生物マーカーとして作出した GFP 発現大腸菌 (1×10^9 CFU/100 μ L) を経口感染させた。経口感染後、1 時間ごとに 6 時間まで糞便を回収した。回収した糞便は、LB 寒天培地にプレティングし、37 $^{\circ}$ C で一晚培養した。培養後、紫外線照射下で蛍光を発するコロニーのみを数えた。感染防御への有効性は、計出したコロニーの経時的推移と 6 時間の合計数で評価した。

4. 研究成果

(1) 2-AG による抗菌ペプチド誘導作用

2-AG が Caco-2 細胞の LL-37 発現量に与える影響を検討した。その結果、2-AG を培地に添加することで、Caco-2 細胞の LL-37 発現量は添加 24 時間後に約 11 倍、48 時間後に約 32 倍となることが明らかとなった (図 1)。また、培地に添加する 2-AG 濃度を 3、10、30、100、300 μ M にしたところ、10 μ M から 300 μ M まで用

量依存的に発現誘導作用が強くなっていた (図 2)。また、2-AG 添加時の培養上清中の LDH 量を測定した結果、2-AG による Caco-2 細胞外 LL-37 分泌誘導作用は細胞膜が傷害を受けて起きるものではないことが示唆された。

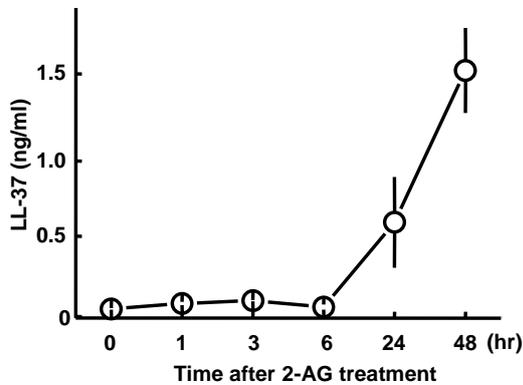


図 1. 2-AG による抗菌ペプチド誘導作用の経時的变化

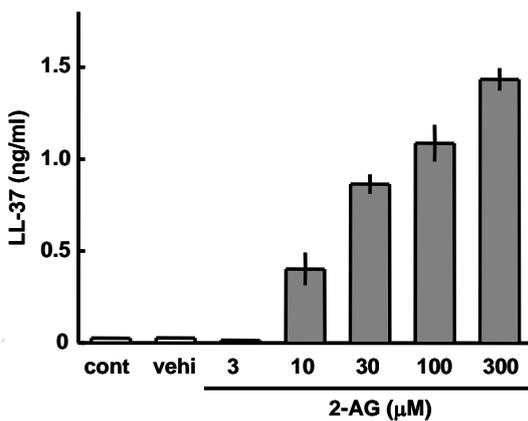


図 2. 用量依存的な 2-AG による抗菌ペプチド誘導作用

(2) 2-AG による抗菌ペプチド誘導作用の細胞内情報伝達経路

2-AG による LL-37 発現誘導の細胞内情報伝達機構を解明するために、MAPK 経路である ERK と p38 の関わりを検討した。その結果、Caco-2 細胞に 2-AG を添加すると、24 時間後まで ERK, P-ERK 及び p38, P-p38 の発現誘導および活性化が確認された。また、ERK, p38 に対する阻害剤 (PD98059, SB203580) を用い、2-AG による LL-37 発現誘導に対する ERK, p38 の関与を検討した。その結果、2-AG 添加 48 時間後、p38 阻害剤 (SB203580) を用いた場合、2-AG による LL-37 の発現誘導が約 1/3 に抑制された。一方で、ERK 阻害剤 (PD98059) を用いて ERK の活性化を阻害した場合は、2-AG 添加 48 時間後の LL-37 発現誘導に影響は見られなかった (図 3)。

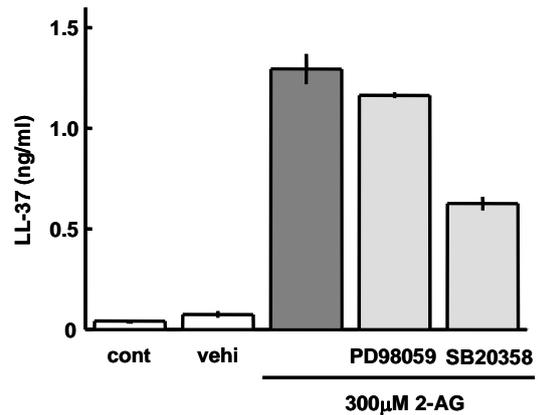


図 3. 2-AG の抗菌ペプチド誘導作用に対する MAPK 阻害剤の影響

(3) マウスを用いた 2-AG による感染防御作用
糞便中の GFP 発現大腸菌数は、感染後上昇し、1 時間後にピークを迎え、その後減少した。2-AG の投与は、1 時間後の GFP 発現大腸菌数が有意に抑制した。また、2-AG の 2 回投与と比較して 3 回投与には、菌数をより減少させる傾向が見られた。さらに、6 時間の生菌数の合計においても、2-AG の投与は生菌数を減少させた。2-AG の 2 回投与に比べて、3 回投与はより強い抑制作用が見られた (図 4)。

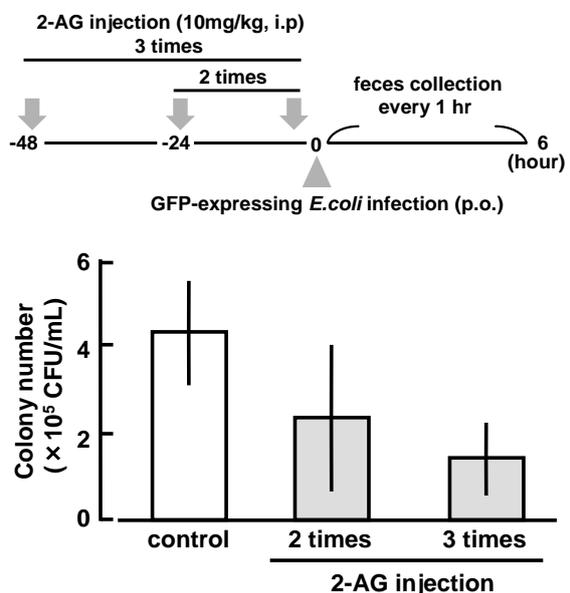


図 4. マウスを用いた 2-AG による感染防御作用

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1件)

① Parimal Talukder, Tomomitsu Satho, Keiichi Irie, Tanjina Sharmin, Dieng Hamady, Yukihiro Nakashima, Nobuhiro Kashige, Fumio Miake, Trace metal zinc stimulates secretion of antimicrobial peptide LL-37 from Caco-2 cells through ERK and p38 MAP kinase, International Immunopharmacology11(1), 141-144 (2010), 査読有

〔学会発表〕(計4件)

① Saori Uyeda, Keiichi Irie, Takahiro Okuno, Shodai Tsuruda, Mari Ioki, Yukie Tamura, Tomomitsu Satho, Kenichi Miahima, Yukihiro Nakashima, Nobuhiro Kashige, Fumio Miake, 2-Arachidonylglycerol protects against infection by secretion of antimicrobial peptides from the intestinal tract., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011), 2011年9月7日、北海道

② 赤司唯、頭島美幸、入江圭一、佐藤朝光、中島幸彦、三島健一、藤原道弘、鹿志毛信広、見明史雄、ウコン含有成分クルクミンが腸管の自然免疫に与える影響、第28回和漢医薬学会学術大会、2011年8月27日、富山

③ 上田沙織、入江圭一、佐藤朝光、三島健一、鶴田翔大、五百木真里、田村幸恵、奥野隆啓、中島幸彦、岩崎克典、鹿志毛信広、藤原道弘、見明史雄、2-arachidonylglycerol の腸管病原微生物に対する感染防御への有効性、日本薬学会第131年会、2011年3月28日、静岡

④ 飯岡利規、入江圭一、Talukder Parimal、佐藤朝光、中島幸彦、鹿志毛信広、見明史雄、脂肪酸によるヒト腸管上皮細胞からの抗菌ペプチドLL-37の発現誘導、日本薬学会第131年会、2011年3月28日、静岡

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 生体試料中 2-アラキドノイルグリセロールの定量法

発明者: 入江圭一、藤原道弘、三島健一、樋口聖、三島健司、早川和秀、佐野和憲、佐藤朝光、秋武義治、荒木舞子、大治万喜子

権利者: 福岡大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-234486

出願年月日: 2010年10月19日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 圭一 (IRIE KEIICHI)

福岡大学・加齢脳科学研究所・研究員

研究者番号: 50509669

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: