

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591173

研究課題名(和文)サーファクタント蛋白質による抗菌ペプチドの細胞傷害性抑制の分子機構解明と臨床応用

研究課題名(英文) Studies on molecular basis of inhibitory effect of surfactant protein A against cytotoxicity of human b-defensin3.

研究代表者

有木 茂 (Ariki, Shigeru)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80464478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌ペプチドは、感染に応答して宿主が分泌する生体防御因子の一つであり、幅広い感染微生物に対して強い抗菌作用を示す。本研究課題では、ヒトベータディフェンシン3 (hBD3) を新規感染症治療薬として応用するために、SP-Aペプチドと混合投与することが有効であることを示した。SP-Aペプチドは、hBD3投与に起因する組織傷害や過剰炎症を抑制するが、hBD3の抗菌活性は抑制しなかった。hBD3は多剤耐性菌に対しても抗菌活性を示すことから、既存の抗生剤では治療困難な感染症に対して臨床応用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial peptides are host defense peptides with a broad spectrum of microbicidal activity. In this study, we suggested that combined use of hBD3 and SP-A-derived peptide (SAP01) is a candidate as a therapeutic reagent against infectious diseases. Binding of SAP01 to hBD3 attenuated cytotoxicity and excess inflammation induced by hBD3. Interestingly, SAP01 did not affect microbicidal activity at concentration sufficient for anti-cytotoxic activity. Because hBD3 also effectively kill drug-resistant microbes, there is appreciable interest in hBD3 for pharmaceutical applications.

研究分野：生化学

キーワード：自然免疫 抗菌ペプチド 肺コレクチン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、易感染性宿主の急速な増加により感染症の新興・再興が懸念されている。これら感染症の原因菌の中には多剤耐性を示すものが出現してきており、治療が困難な症例や、死に至る症例も数多く報告されている。このような現状から、既存の抗生剤にたよらない新規治療法の開発は社会的ニーズの高い研究課題である。

生物界に広く存在する抗菌ペプチドは、感染微生物の生存にとっても必須な分子群を標的として殺菌作用を示す。したがって、感染微生物が抗菌ペプチドに対する耐性を獲得するために、これら標的分子群の構造を変化させることは容易ではない。つまり、抗菌ペプチドを臨床応用することができれば、耐性菌が出現する可能性の低い新薬・治療法が開発できると期待される。ヒトから単離された抗菌ペプチドの中でも、ヒト  $\beta$ -defensin 3 (hBD3) は、広範囲の感染微生物に対して強力な殺菌作用を示すことから、臨床応用が期待されている分子のひとつである。しかしながら、抗菌ペプチドは抗菌活性のみならず、炎症促進作用を示すほか、高濃度に存在すると宿主細胞に対しても毒性を示す。これらの作用は、抗菌ペプチドを生体に投与した際に過剰炎症や組織傷害を引き起こす原因となりかねないことから、臨床応用の妨げとなっている。

我々は、これまでの研究において、肺に多量に発現している SP-A というタンパク質が hBD3 の宿主細胞傷害性を抑制することを発見した。また、このような抑制作用を示すには、SP-A に由来する 40 アミノ酸残基のペプチド (SP-A ペプチド) で充分であることを明らかにしてきた。これまでの研究成果は、hBD3 と SP-A ペプチドを併用することで、hBD3 の副作用を抑制することができることを示唆しており、より詳細な解析を進めることで hBD3 の臨床応用に発展することが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、SP-A ペプチドの作用機序を生化学的に明らかにするとともに、SP-A ペプチドによる hBD3 の宿主細胞傷害抑制効果を生体内で評価することを目的とした。具体的には、以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) SP-A ペプチドには糖鎖付加部位が存在する。hBD3 の宿主細胞傷害性を抑制するのに、SP-A ペプチドの糖鎖が必要であるのかを明らかにする。

(2) hBD3 の抗菌活性に対する SP-A ペプチドの影響を解析する。SP-A ペプチドの作用が宿主細胞傷害性に特異的なものなのか、あるいは、hBD3 の他の機能にも影響するの

かを明らかにする。

(3) 感染モデルマウスを作製し、hBD3 を単独で投与した場合、hBD3 と SP-A ペプチドを混合して投与した場合の治療効果を比較する。また、その際の組織傷害の程度を測定することで、hBD3 の宿主細胞傷害性に対する SP-A ペプチドの抑制効果が生体内でもみられるのかを明らかにする。

(4) hBD3 と SP-A ペプチドの相互作用を、表面プラズモン共鳴センサーを用いて解析する。また、両分子の相互作用がどのような種類の結合によるものであるのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) SP-A ペプチドの糖鎖の機能解析

N-glycosidaseF で処理して糖鎖を取り除いた SP-A ペプチドと、糖鎖が付加されたままの SP-A ペプチドの作用を比較した。高濃度の hBD3 は羊赤血球を溶血させてしまうが、SP-A ペプチド存在下では溶血が有意に抑制される。糖鎖を取り除いた SP-A ペプチドを用いた場合に、溶血の抑制効果がどのように変化するのかを解析することで、SP-A ペプチドの糖鎖が機能上重要であるのかを解析した。溶血の程度は、緩衝液中に漏出したヘモグロビンの量を吸光度で測定して評価した。

### (2) hBD3 の抗菌活性に対する SP-A ペプチドの影響解析

グラム陽性菌として黄色ブドウ球菌、グラム陰性菌として緑膿菌を用いて、hBD3 の抗菌活性測定を行なった。hBD3 の宿主細胞傷害性を抑制するのに十分なモル比の SP-A ペプチドを実験系に加えたときに、抗菌活性がどのように変化するのかを解析した。抗菌活性は、hBD3 とインキュベーションした細菌懸濁液を寒天培地にまき、形成されるコロニー数を計測することで評価した。

### (3) 感染モデルマウスでの治療効果の評価

緑膿菌を経鼻感染させたマウスに hBD3 を単独、あるいは、hBD3 と SP-A ペプチドを混合して投与した。投与後、肺組織の破砕液を作製して寒天培地にまき、肺組織内に残存する細菌数を計測した。さらに、一定時間ごとに複数回投与した場合の生存率も測定した。

当初の計画では、hBD3 投与による副作用の評価も行なう予定であった。しかし、組織傷害や炎症反応が hBD3 投与によるものなのか、感染に起因するものであるのかを判断するのは不可能であった。そこで、感染モデルマウスでは治療効果の評価のみを行ない、hBD3 投与による組織傷害や炎症反応などの副作用評価は、非感染マウスで行なった。

#### (4) hBD3 投与による組織傷害や炎症反応に対する SP-A ペプチドの作用解析

マウスに経気道的に hBD3 を単独、あるいは、hBD3 と SP-A ペプチドを混合して投与し、気管支肺胞洗浄液 (BALF) を回収した。BALF 中の炎症細胞数を計測するとともに、分泌されたサイトカインを網羅的に解析した。

#### (5) hBD3 と SP-A ペプチドの相互作用解析

表面プラズモン共鳴センサー (BIAcore) のセンサーチップに SP-A ペプチドを固相化し、hBD3 を添加して相互作用解析を行なった。また、グリシンメチルエステルで化学修飾した SP-A ペプチドを固相化したセンサーチップで同様の相互作用解析を行ない、SP-A ペプチドの酸性アミノ酸が相互作用に及ぼす影響を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) SP-A ペプチドの糖鎖の機能

SP-A ペプチドを N-glycosidaseF で処理して糖鎖を取り除いた。糖鎖が取り除かれていることは、電気泳動および質量分析にて確認した。このペプチドは、未処理の SP-A ペプチドと同程度に hBD3 による羊赤血球の溶血を抑制した。したがって、SP-A ペプチドの糖鎖は、hBD3 の宿主細胞傷害性を抑制するのには必要ないと考えられる。

#### (2) hBD3 の抗菌活性に対する SP-A ペプチドの影響

hBD3 はグラム陽性菌の黄色ブドウ球菌、グラム陰性菌の緑膿菌に対して、強い抗菌活性を示した。hBD3 の 10 倍のモル濃度で実験系に SP-A ペプチドを添加したが、抗菌活性はまったく抑制されなかった。この濃度比では hBD3 の宿主細胞傷害性は完全に抑制されることから、SP-A ペプチドは hBD3 の特定の作用を特異的に制御している可能性がある。また、临床上より重要であるメリシチン耐性黄色ブドウ球菌、多剤耐性アシネトバクター、レジオネラに対する抗菌活性測定も行なったが、いずれの細菌においても十分な抗菌活性が確認でき、また、抗菌活性は SP-A ペプチドで抑制されなかった。

#### (3) 感染モデルマウスでの治療効果

マウスに緑膿菌を経鼻感染させ、感染 3 時間後に hBD3 を単独、あるいは、hBD3 と SP-A ペプチドを混合して投与した。投与 1-2 時間後に肺組織内に残存する菌体数を計測したところ、いずれの投与群でも生理食塩水投与群と比較して残存菌体数が有意に減少していた。そこで、緑膿菌を感染させたマウスに hBD3 を複数回投与した場合の生存率を解析し、治療効果を評価した。その結果、

感染後 3 日で非治療群のマウスの生存率が 0% となったのに対して、hBD3 と SP-A ペプチドを混合して 3 回投与した群では、生存率が 0% になるまでの時間が感染後 5 日まで延びた。興味深いことに、hBD3 を単独で 3 回投与した群では、生存率が 0% になるまでの時間が非治療群よりもわずかに短くなった。今後の詳細な解析が必要であるが、hBD3 を単独で複数回投与した場合には、hBD3 による組織傷害のために感染が増悪している可能性がある。SP-A ペプチドを混合投与した場合には、hBD3 の抗菌活性は維持されたまま、組織傷害は抑制されたことで、感染増悪を引き起こすことなく治療効果が得られたのではないかと考えられる。

#### (4) hBD3 投与による組織傷害や炎症反応に対する SP-A ペプチドの作用

hBD3 を投与したマウスでは、肺胞洗浄液中への LDH の漏出、肺胞壁の肥厚といった組織傷害を示す所見がみられた。また、肺胞洗浄液中に回収されるサイトカイン、ケモカインを網羅的に解析したところ、IL-5、CCL-2、TIMP-1 などの炎症性サイトカインが有意に上昇していた。さらに、肺胞洗浄液中の炎症細胞を計測したところ、好中球、単球、好酸球、リンパ球が有意に増加しており、過剰な炎症が引き起こされていることを示す結果が得られた。一方、これらの組織傷害や過剰炎症は、hBD3 と SP-A ペプチドを混合して投与したマウスではみられなかったことから、SP-A ペプチドは生体内においても hBD3 の組織傷害性を抑制できることが明らかとなった。これらの結果は、研究成果 (3) の項目での生存率解析の結果を解釈するうえで、非常に重要な知見である。

#### (5) hBD3 と SP-A ペプチドの相互作用

BIAcore による解析では、hBD3 と SP-A ペプチドの相互作用の解離定数は  $2.59 \times 10^{-7}$  M であった。hBD3 には塩基性アミノ酸が多く含まれており、SP-A ペプチドには酸性アミノ酸が数残基含まれていることから、静電的な相互作用が関与しているのではないかと考え、さらなる解析を行なった。まず、解析に用いる緩衝液のイオン強度を変化させてみたが、非特異的な結合が非常に多くなってしまい、正確な測定が行えなかった。そこで、グリシンメチルエステルで酸性アミノ酸の側鎖を修飾した SP-A ペプチドを用いて相互作用解析を行なった。その結果、得られた解離定数は  $3.11 \times 10^{-6}$  M であった。SP-A ペプチドの酸性アミノ酸を修飾することで、相互作用が弱くなったものの、結合がみられなくなるほどの影響はなかった。したがって、hBD3 と SP-A ペプチドの相互作用には、静電的な結合も関与しているが、その他の結合も関与しており、複雑な相互作用をしていると考えられる。

#### (6) 今後の展望

本研究課題では、SP-A ペプチドが hBD3 による組織傷害、過剰炎症を生体内に投与した場合でも抑制することを明らかにできた。一方、SP-A ペプチドは hBD3 の抗菌活性は抑制しない。これらの成果は、hBD3 と SP-A ペプチドを組み合わせて使用することで、新規感染症治療薬として臨床応用できる可能性があることを示している。今後、投与回数をさらに増やすことで、感染を完全に排除することができるのか、さらなる解析を継続していく。

また、hBD3 は慢性炎症疾患との関与が示唆されている。たとえば、皮膚の慢性炎症疾患である乾癬では hBD3 が高発現している。また、気管支喘息の増悪原因であるリノウイルス感染時にも hBD3 が発現する。hBD3 がこれらの病態形成過程においてどのような役割を果たしているかは不明であるが、hBD3 が炎症促進作用を示すことを考えると、まったく無関係であるとは考えられない。本研究では、SP-A ペプチドが hBD3 の炎症促進作用を抑制することが明らかになったことから、SP-A ペプチドを慢性炎症疾患の治療薬として応用できる可能性がある。今後、hBD3 が慢性炎症疾患の病態形成にどのように関わるのか、また、関わるのであれば、SP-A ペプチドが病態形成を阻止できるのかを解析していきたい。

#### 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 8 件)

Saito A, Ariki S, Sohma H, Nishitani C, Inoue K, Ebata N, Takahashi M, Hasegawa Y, Kuronuma K, Takahashi H & Kuroki Y (2012) Pulmonary surfactant protein A protects lung epithelium from cytotoxicity of human  $\beta$ -defensin 3. *J. Biol. Chem.* **287**, 15034-15043. 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M111.308056.

[学会発表](計 11 件)

1) Uehara Y, Ariki S, Takahashi M, Takamiya R, Hasegawa Y, Takahashi H & Kuroki Y. Surfactant protein A-derived peptide decreases cytotoxicity of human  $\beta$ -defensin 3 without attenuating antimicrobial activity. 2014 年 5 月 20 日 American Thoracic Society International Conference 2014. San Diego, USA.

- 2) Uehara Y, Ariki S, Takahashi M, Takamiya R, Hasegawa Y, Takahashi H & Kuroki Y. Surfactant protein A-derived peptide protects lung epithelial cells from cytotoxic activity of human  $\beta$ -defensin 3. 2013 年 11 月 12 日 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. Pacifico Yokohama (Kanagawa, Japan).
- 3) 上原康昭、有木茂、高橋素子、高宮里奈、長谷川喜弘、橋本次朗、高橋弘毅、黒木由夫. 肺サーファクタント蛋白質 A 由来ペプチドはヒト $\beta$ ディフェンシン3の細胞傷害を抑制する. 2013 年 9 月 11 日 第 86 回日本生化学会大会. パシフィコ横浜(横浜).

[図書](計 3 件)

高橋素子、有木茂、黒木由夫 (2014) 肺サーファクタントの感染・炎症防御における役割. 呼吸器内科 26, 科学評論社. P 33-41.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

有木 茂 (ARIKI SHIGERU)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80464478

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

黒木 由夫 (KUROKI YOSHIO)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70161784

##### (4) 研究協力者

上原 康昭 (UEHARA YASUAKI)