

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009 ～ 2010  
 課題番号：21790766  
 研究課題名（和文） 抗菌ペプチド defensin の炎症性疾患への関与に関する研究  
 研究課題名（英文） Antimicrobial peptides, defensin, in inflammatory diseases  
 研究代表者  
 山口 泰弘（ YAMAGUCHI YASUHIRO ）  
 東京大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：60376473

## 研究成果の概要（和文）：

Human  $\alpha$ -defensin-3 とそのマウスホモログ mouse  $\alpha$ -defensin-14 は、他の defensin と比較して癌細胞に対して強い細胞傷害性を示す。C57BL/6 マウスに接種した LLC 腺癌の近傍で mBD-14 ペプチドを持続的に皮下投与すると腫瘍塊の増大を有意に抑制した。さらに、mBD-14 遺伝子欠損マウスに LLC 腺癌細胞を接種したところ、接種後 7 日の腫瘍径は、mBD-14 遺伝子欠損マウスにおいて有意に大きかった。

## 研究成果の概要（英文）：

Human  $\alpha$ -defensin-3 and its mouse homologue, mouse  $\alpha$ -defensin-14, showed potent cytotoxicity to mammalian cancer cells compared to other defensin isoforms. After implanting LLC adenocarcinoma in C57BL/6 mice, we continuously injected mBD-14 peptide into the subcutaneous tissues around the tumor. The growth of tumor was significantly inhibited by mBD-14 peptide. In addition, the growth of LLC adenocarcinoma was significantly promoted in mBD-14-deficient mice 7 days after the implantation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 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：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、微生物、低体重

## 1. 研究開始当初の背景

Defensin は、哺乳類の代表的な抗菌ペプチドであり、その強い抗菌活性により自然免疫のエフェクター因子として機能している。加えて、defensin は、炎症細胞の遊走やサイトカイン分泌の促進に働き、いわば免疫反応全体の制御因子としても機能している。しかし、defensin のこのような多様な機能に関

する個体での意義やヒトの疾病との関連は、未だ確立されていない。

我々は、human  $\alpha$ -defensin-3 (hBD-3) の強い細胞障害性から、hBD-3 や hBD-3 マウスホモログ mBD-14 の抗腫瘍効果に注目した。

また、炎症のエフェクター因子である defensin の上昇が、逆に病因の一つにもなりうることも予想される。ヒトにおいても、抗

菌ペプチドの過剰が、様々な炎症性疾患に関与していることを示す知見がえられてきた。ヒトのゲノム上には、複数コピーの  $\alpha$ -defensin 遺伝子が存在し、そのコピー数の増大は、 $\alpha$ -defensin の発現量と相関する。近年、 $\alpha$ -defensin 遺伝子のコピー数の増加に相関して、COPD のリスクも増大することや、 $\alpha$ -defensin 遺伝子のコピー数の増加に相関して重症の敗血症の増加することが報告された。

我々が作製した mouse  $\alpha$ -defensin-6 (mBD-6) の過剰発現マウスは、低体重、寿命の短縮、筋線維の変性、骨密度低下を呈し、過剰な defensin が、むしろ病因になりうることを、個体レベルで示唆する所見であった。本マウスの肺機能を詳細に検討したところ、mBD-6 過剰発現マウスは、肺実質や気道病変の存在を支持する静肺コンプライアンスの異常や 0.1 秒率の異常を示さなかったが、神経筋疾患に相当する変化を示した。

## 2. 研究の目的

我々は、human  $\alpha$ -defensin-3 (hBD-3) の強い細胞障害性から、hBD-3 や hBD-3 マウスホモログ mBD-14 の抗腫瘍効果に注目した。

著明なるいそうを示す Defensin 過剰発現マウスの肺機能の評価に続いて、著しい低体重を示す患者の呼吸機能の特徴を調査した。

## 3. 研究の方法

ヒト肺腺癌細胞である A549 細胞を、5  $\mu$ g/dl から 20  $\mu$ g/dl の hBD-3 ペプチドとともに培養し、細胞数を測定した。さらに、hBD-3 ペプチドの細胞死への関与を、PI 染色を用いて評価した。また、hBD-3 ペプチドの細胞増殖への関与を BrdU の取り込みを測定することにより評価した。

hBD-3 ペプチドについては、ペプチド研より購入した。

生後 3ヶ月の雄の C57BL/6J マウスをケタミンおよびキシラジンにて麻酔後、背部の皮下に  $1 \times 10^6$  個の LLC 細胞を接種した。9日後に、ケタミンおよびキシラジンにて麻酔後、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 4.17 mg/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、0.5  $\mu$ l/h の流速で、充填した溶液が皮下に投与されるため、50  $\mu$ g/日の mBD-14 合成ペプチドが皮下に投与される。

なお、mBD-14 合成ペプチドについては、ペプチド研により化学的に合成され、精製されたペプチドを使用した。

次に mBD-14 欠損マウス (KO マウス) に LLC 細胞を同様に接種し、腫瘍の形成を外観から観察した。体表からの触知によって腫瘍体積を計算した。

また、当科の外来患者の肺機能、胸部 X 線写真などを後向きに調査した。さらに、肺疾患非合併患者として、BMI 30 未満で肺機能に関わる合併症のない症例を抽出し解析した。

## 4. 研究成果

A549 細胞を、5  $\mu$ g/dl あるいは 20  $\mu$ g/dl の hBD-3 ペプチドとともに培養し、細胞数をコントロールと比較したところ、いずれの濃度においても細胞数の有意に抑制されていることが明らかとなった (図 1)。5  $\mu$ g/dl は、hBD-3 ペプチドが抗菌活性をしめす濃度に近く、hBD-3 が生理的濃度においても抗腫瘍作用を併せ持つ可能性が示唆された。

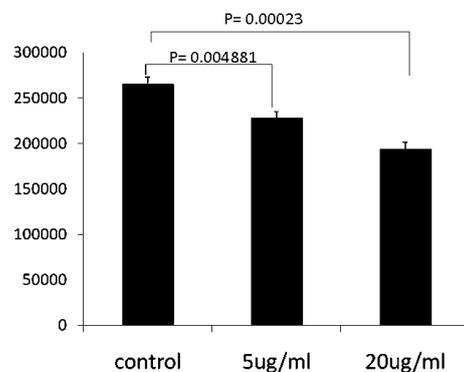


図 1. hBD-3 ペプチドによる A549 細胞の細胞数の抑制

PI 染色では、20  $\mu$ g/dl の hBD-3 ペプチド下で、有意な死細胞の増加が確認された (図 2)。一方、BrdU の取り込みについては、5  $\mu$ g/dl あるいは 20  $\mu$ g/dl の hBD-3 ペプチド下において、コントロールと有意な差はみられなかった。hBD-3 ペプチドによる細胞数の抑制が、細胞分裂の抑制ではなく、細胞死の惹起によることが示唆され

た。

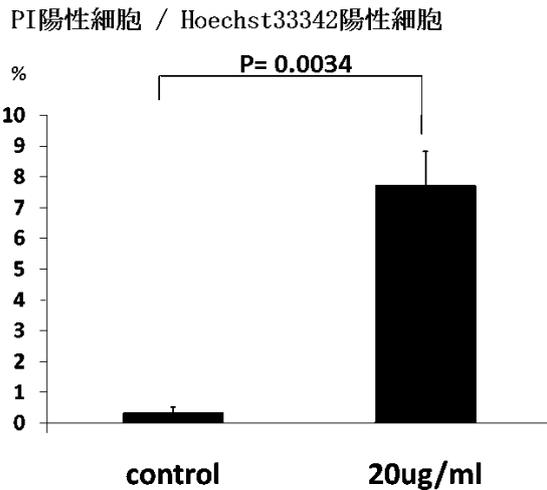


図 2. 20・g/dl の hBD-3 ペプチド下における A549 細胞の有意な細胞死の増加

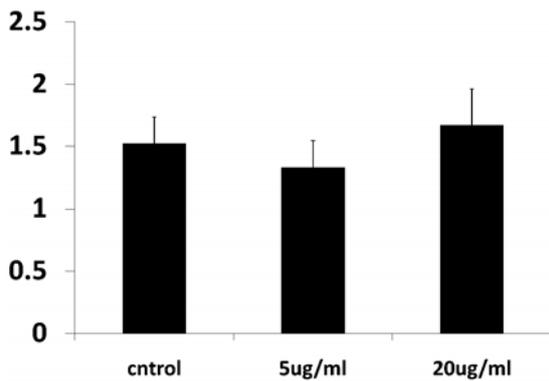


図 3. hBD-3 ペプチド下における A549 細胞の BrdU の取り込み  
BrdU の取り込みについては有意な差はみられなかった。

これらの in vitro の実験における hBD-3 ペプチドの抗腫瘍効果をもとに、マウス個体においても、defensin ペプチドに抗腫瘍作用がみられるかを検討した。Defensin としては、hBD-3 のマウスホモログである mBD-14 を用いた。

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 4)。

また、mBD-14 ペプチドを持続投与したマウスにおいても、肉眼的に明らかな正常組織の破壊像は認められなかった。

TUNEL 染色では、mBD-14 ペプチドを投与した腫瘍塊において細胞死の増加が認められた。

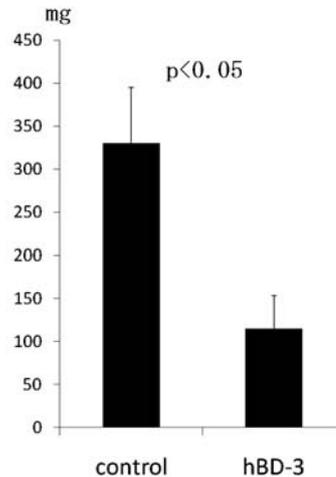


図 4 mBD-14 ペプチドの持続皮下投与による腫瘍塊の増大の抑制

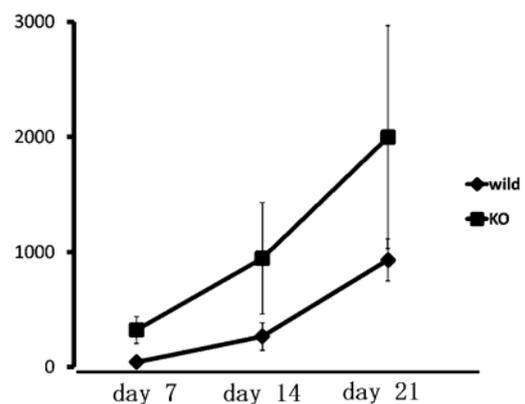


図 5. mBD-14 遺伝子欠損マウスとその野生型同腹仔に LLC 細胞を接種後の腫瘍体積の推移

mBD-14 遺伝子欠損マウスにおいて、野生型同腹仔と比較して、LLC 細胞接種後早期に腫瘍径の増大が有意に促進されていた

また、mBD-14 遺伝子欠損マウスでは、野生型同腹仔と比較して、LLC 細胞接種後早期に腫瘍径の増大の有意に促進されていることが観察された (図 5)。これらの知見は、抗菌ペプチドの非常に新しい生理的意義の解明につながり、さらに、癌治療や予防にも生かしうると思われる。

一方、著明なるいそを示す mBD-6 過剰発

現マウスは、肺実質や気道病変を支持する静肺コンプライアンスの異常や0.1秒率の異常を示さなかったが、神経筋疾患に相当する変化を示した。

ヒトにおいては、男性の全患者および肺疾患非合併患者において、低体重者ほど有意な相関をもって、残気率は上昇し、DLCO/VAは低下した。さらに、男性の肺疾患非合併患者では、一秒率は、低体重者ほど有意な相関をもってむしろ上昇し、肺気腫とは明らかに異なる所見を示した。これらの相関は、全年齢に認められたが、75歳以上の高齢者においてより顕著であった(図6)。

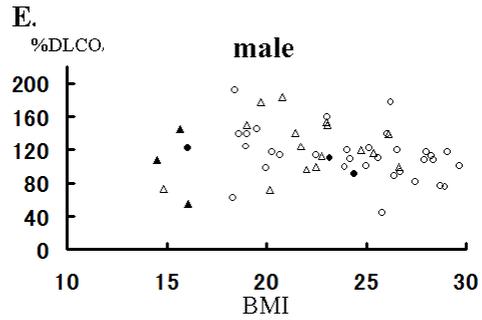
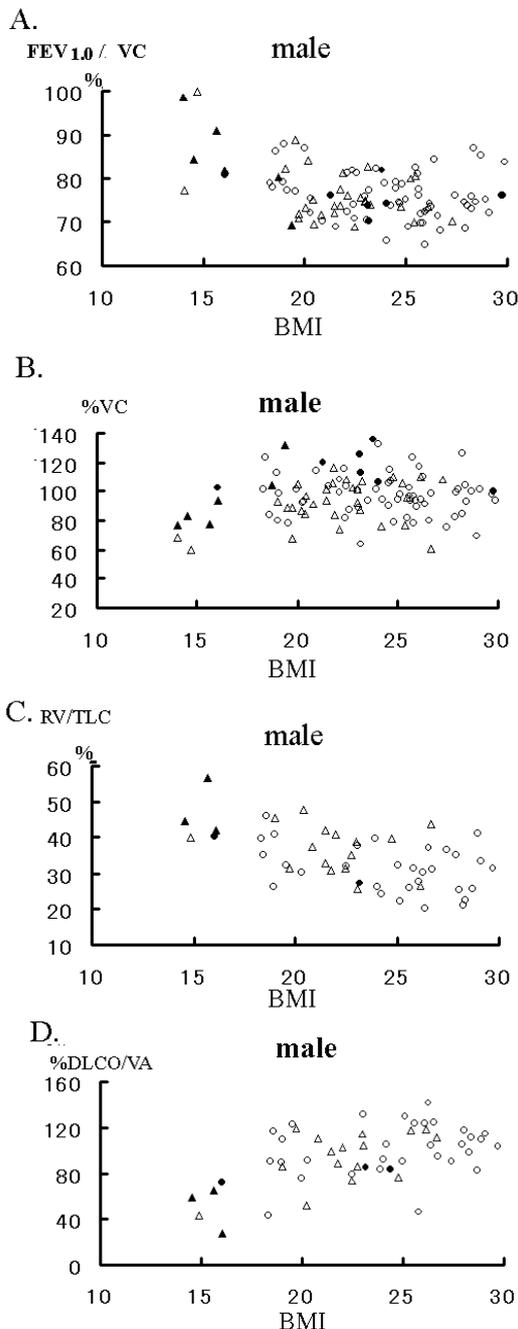


図6. 肺疾患を合併しない男性のBMIと肺機能の相関

○は75歳未満、△は75歳以上。

### 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0件)

〔学会発表〕(計3件)

1, 低体重男性の示す特徴的な肺機能所見に関する評価. 第52回日本老年医学会学術集会. 2010年6月25日, 神戸

2, An evaluation of the peculiar pulmonary functional and morphological features associated with a severely low body weight.

2010 ATS International Conference. May 16, 2010. New Orleans, Louisiana, USA

3, 閉塞性換気障害を伴わない過膨張肺を示す高齢者症例に関する検討. 第51回日本老年医学会学術集会. 2009年6月19日, 横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕○出願状況(計0件)

〔その他〕ホームページ等

### 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・講師

研究者番号: 60376473

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし