

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591154

研究課題名(和文)炎症性肺疾患における抗菌ペプチドDEFENSINと細胞外ATPの関与

研究課題名(英文)The role of extracellular ATP and antimicrobial peptide, defensin in inflammatory lung 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子多型の知見などから、抗菌ペプチドDefensin (hBD-3, mBD-14 など) は、その発現が過剰になると病的な炎症を促進することが示唆されていた。本研究で、mBD-14遺伝子欠損マウスの急性肺損傷モデルを作成したところ、本マウスで、その炎症所見が軽減していた。また、気道上皮細胞へhBD-3を投与すると、細胞外ATP濃度が上昇し、その細胞傷害性がATP受容体阻害薬で抑制された。さらに、急性肺損傷モデルマウスにATP受容体阻害薬を投与すると炎症の軽減がみられた。しかし、本モデルでのmBD-14の発現上昇は確認できず、mBD-14が直接的に肺損傷に働くことは否定的であった。

研究成果の概要(英文)：The past investigations of the genetic polymorphism suggested that the increase of the antimicrobial peptide, defensin, ex. hBD-3 and mBD-14 augment inflammation in various pulmonary diseases. In this investigation, the acute lung injury model of mBD-14-deficient mice showed that inflammatory responses were reduced in the mBD-14-deficient mice. hBD-3 induced the increase in ATP concentration in airway cells, and the cytotoxicity of hBD-3 was inhibited by the antagonists of ATP. Furthermore, the injection of ATP antagonists reduced the inflammatory responses in acute lung injury model. However, we could not indicate the increase in mBD-14 expression in this model, which suggested that mBD-14 would not directly damage lung cells in vivo.

研究分野：炎症性肺疾患や睡眠呼吸障害、老年医学

キーワード：抗菌ペプチド ATP

1. 研究開始当初の背景

Defensin (ディフェンシン) は、特異的な 6 つのシステイン配列をもつ抗菌ペプチドである。ヒトでは、 α -defensin と β -defensin の 2 つのサブファミリーが発現している。 α -defensin は、好中球のアズール顆粒の主要な成分であり、 β -defensin は、口腔、咽頭腔、気道を含む、主として上皮系細胞に発現している。defensin は、その抗菌活性により、感染防御の第一線で、自然免疫のエフェクター因子として機能している。くわえて、defensin は、サイトカイン分泌を惹起したり、免疫細胞の遊走に関わったりすることで、免疫反応全体の制御因子としての機能も担っていると考えられている。

成人呼吸促拍症候群の肺胞洗浄液中の α -defensin 濃度は、健常者の 50 倍に上昇していることが報告されている (Ashitani J et al. *Life Sci*, 75: 1123-34, 2004)。同様に、COPD 患者と非 COPD 喫煙者の肺胞洗浄液中の蛋白、ペプチドをプロテオーム解析によって網羅的に比較した研究では、COPD 患者の肺胞洗浄液中で、defensin は、もっとも顕著な上昇を示した (Merkel D et al. *Proteomics*, 5: 2972-80, 2005)。最近の報告では、特発性肺線維症の急性増悪に伴って、肺組織中に最も顕著に上昇した mRNA のひとつも、 α -defensin であったと報告されている (Konishi K et al. *Am J Respir Crit Care Med*. 180:167-75, 2009)。

近年、遺伝子多型の研究において、一部のゲノム領域において遺伝子の重複がみられ、そのコピー数に多型 (コピー数多型) のみられることが注目されている。ヒトゲノム上では予想以上にこのような多型がみられ、好中球に発現する α -defensin-1/3 の領域や、皮膚や気道上皮を中心に発現する β -defensin-2 や β -defensin-3 などを含む領域が、それぞれ複数コピー存在し、そのコピー数に 2 から 12 個のコピー数多型の存在することが明ら

かとなった。さらに、そのコピー数と実際の発現量の相関することが報告されている。

ヒト defensin 領域のコピー数多型と様々な疾患の発症率の関連をみる研究において、予想に反して、重症敗血症患者に、好中球 α -defensin のコピー数の増加のみられることが報告された (Chen Q et al. *Anesthesiology*. 112: 1428-1434, 2010)。さらに、 β -defensin のコピー数の増加は、COPD の発症率の増加と相関することが報告された (Janssens W et al. *Am J Respir CritCare Med*, 182: 163-169, 2010)。これらの知見は、defensin が感染防御に寄与する一方で、過剰になると、病的な炎症反応を促進している可能性を示唆している。

我々は、これまでも、過剰な defensin が、炎症性疾患に関わる可能性を、動物モデルを用いて検討してきた。興味深いことに、 β -defensin を全身に過剰発現させたマウスでは、筋線維変性、筋力低下、寿命の短縮が認められた (Yamaguchi Y et al. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292: C2141-149, 2007)。より生理的な系で、defensin の病態生理上の意義をみるために、我々は、human β -defensin-3 (hBD-3) のマウスホモログである mouse β -defensin-14 (mBD-14) 遺伝子を、 β -galactosidase 遺伝子に置換した、mBD-14 遺伝子欠損マウスを作製した。野生型マウスの肺には mBD-14 の発現がみられたが、mBD-14 遺伝子欠損マウスの肺には mBD-14 遺伝子の発現はみられなかった。

なお、hBD-3 は、高い塩濃度下でも抗菌活性を示す β -defensin として報告され、気管、肺や皮膚、食道、リンパ系細胞などでの発現が確認されている。さらに、TNF α や IFN γ により発現が誘導、増強されることが報告されている。さらに、我々は、hBD-3 や mBD-14 を培養細胞に投与したところ、他の α -defensin や β -defensin と比較して、顕著な細胞傷害性を示すことを見出した

(Yamaguchi Y. et al. ATS International Conference, 2007)。マウスには、好中球の α -defensin が存在しないことも考慮すると、炎症性疾患における defensin の関与をマウスのモデルで観察するためには、最も適した遺伝子欠損マウスであると考えている。

さらに、我々は、defensin の細胞傷害性の下位シグナルとして、細胞外 ATP とその P2X 受容体が関与していると推定している。これまでの報告では、defensin と同じくヒト抗菌ペプチドである LL-37 について、LL-37 による IL-8 の分泌の促進や IL-1 β の分泌は、P2X 受容体阻害薬であるスラミンや PPADS により抑制されることが報告されている。

肺の炎症性疾患における細胞外 ATP の関与は、古くから注目されているが、近年、COPD 患者や肺線維症の患者の気管支肺胞洗浄液中の ATP 濃度が健常者と比較して有意に上昇していることがあいついで報告された (Riteau N et al. Am J Respir Crit Care Med. 182: 774-783, 2010, Cicko S et al. J Immunol. 185: 688-697, 2010)。生理的条件下では細胞外 ATP は低濃度に厳密にコントロールされているが、何らかの因子により上昇した細胞外 ATP は、好中球の遊走や、炎症性サイトカイン、蛋白分解酵素の分泌を促進することが知られており、不可逆的な組織破壊の進行を惹起している可能性がある。加えて、ATP によるシグナルが気道のリモデリングに関わるとの報告もみられる。我々は、この細胞外 ATP の上昇を招く因子の 1 つとして defensin が関与している可能性を検討する。

2. 研究の目的

我々は、炎症により過剰になった defensin は細胞傷害性にも働くと考え、既に作製した mouse β -defensin-14 (mBD-14) 遺伝子欠損マウスを用いた急性肺損傷モデルにより、defensin の病態生理上の意義を評価

する。さらに、*in vitro* では、PPADS のような ATP の受容体阻害薬が、defensin の細胞傷害を抑制することを見だしており、これらのモデルでの細胞外 ATP の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

3 (1) mBD-14 遺伝子欠損マウスを用いた急性肺損傷モデル

mBD-14 遺伝子欠損マウスとその野生型同腹仔をケタミンとキシラジンにて麻酔後、大腸菌由来のリポポリサッカライド (LPS) 溶液 0.2mg/ml もしくは、コントロールとしての PBS を 50 μ l 気管内に投与する。24 時間後に、気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の細胞数、細胞分画を評価する。

3 (2) hBD-3 による細胞外 ATP 濃度上昇の測定

A549 細胞を 10%FCS 加 DMEM 培地にて培養。培地を HBSS 培地に置換し 1 時間後に hBD-3 合成ペプチドを最終濃度 5 μ g/ml および 20 μ g/ml となるように添加、さらに 1 時間後に培地の一部を採取して、ATP バイオルミネッセンス アッセイ キット (Roche inc.)にて ATP 濃度を測定した。

3 (3) 急性肺損傷モデルの mBD-14 発現

3 (1) の系における肺組織中の defensin 遺伝子量を定量的 RT-PCR により評価する。

3 (4) 急性肺損傷モデルにおける P2X 受容体阻害薬の影響

マウスの喫煙モデルやブレオマイシンによる肺線維症モデルについては、すでに、P2X 受容体阻害薬であるスラミンや PPADS により炎症が抑制されるとの報告 (Lucattelli M et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 44: 423-429, 2011 など) がみられる。

我々は、これらの報告を参考に、LPS 気管内投与前に、スラミン 100 mg/kg (体重)をマウス腹腔内投与する群と PBS のみを投与する群を作成した。その後、ケタミンとキ

シラジンにて麻酔後、大腸菌由来のリポポリサッカライド (LPS) 溶液 0.2mg/ml を 50 μ l 気管内に投与した。24 時間後に、気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の細胞数、細胞分画を評価した。

3 (5) . ビタミン D 受容体発現の評価

ラット 型肺胞上皮細胞にタバコ煙水抽出液 (CSE: cigarette smoke extra) を負荷後、細胞より RNA を抽出し、ビタミン D 受容体の発現量に関して、定量的 RT-PCR を施行した。なお、市販タバコを 50ml シリンジを用いて bubbling し、フィルター滅菌したものを 100% CSE と定義した。また、A549 細胞を用いて、siRNA によるビタミン D 受容体遺伝子の抑制を行い、MIP-1 α 、IP10、MMP12 の発現量について定量的 RT-PCR を施行した。

4 . 研究成果

4 (1) mBD-14 遺伝子欠損マウスを用いた急性肺損傷

mBD-14 遺伝子欠損マウスもしくはその同腹仔に対して、エンドトキシンを気管内投与した ARDS モデルを作製し、24 時間後の BALF を解析した (図 1) 。 mBD-14 遺伝子欠損マウスでは、野生型と比較し、BALF 中の総細胞数や好中球数の増加が、有意に抑制されていた ($p < 0.01$) 。

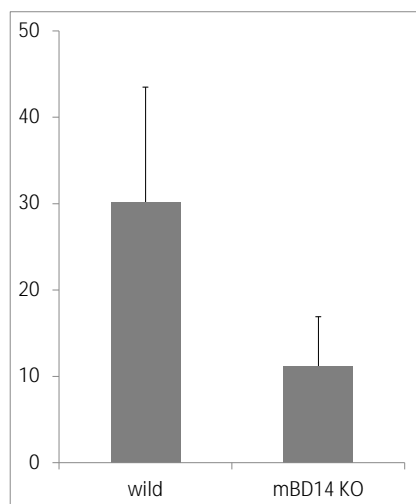


図 1a. ARDS モデルでの BAL 液総細胞数 (x 10⁴/ml)

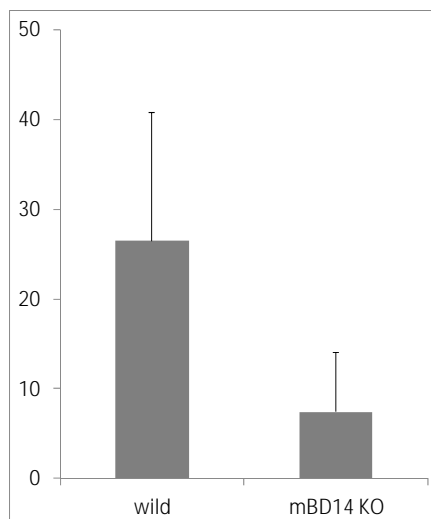


図 1b. ARDS モデルでの BAL 液好中球数 (x 10⁴/ml)

4 (2) hBD-3 による細胞外 ATP の上昇

我々は、mBD-14 の哺乳類細胞への作用には、細胞外への ATP の流出が関与しているのではないかと考えた。mBD-14 は、hBD-3 のマウスホモログであり、A549 細胞への hBD-3 の作用を評価した。

図 2 のように、hBD-3 により細胞外の ATP の上昇がみられた。

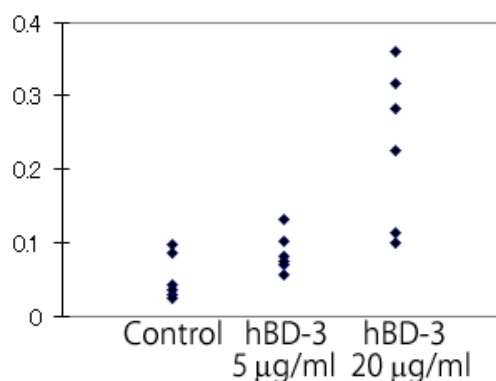


図 2 . hBD-3 による細胞外 ATP 濃度の上昇

4 (3) hBD-3 の細胞傷害性と ATP

スラミンや PPADS は、ATP をリガンドとするプリナージック受容体の阻害薬として機能する。驚いたことに、高濃度の hBD-3 ペプチドに 30 分間暴露することによる

A549 細胞の細胞死（トリパンブルー染色により観察）は、スラミンや PPADS により明らかに抑制された。

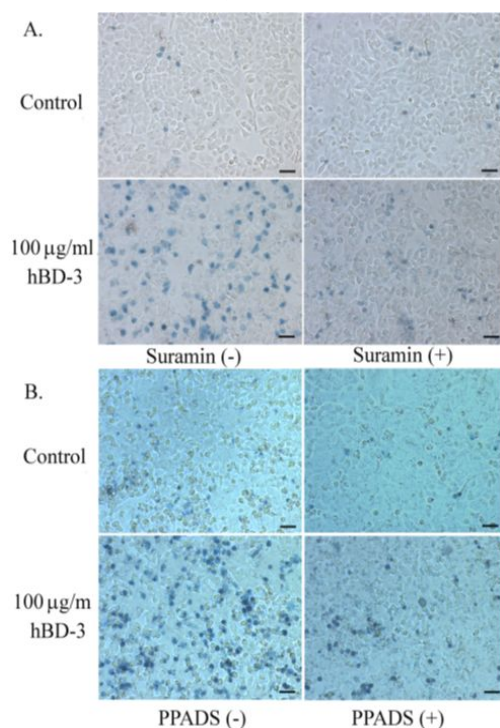


図 3. プリナージック受容体阻害薬による hBD-3 ペプチドの細胞傷害性の阻害

4 (4) スラミンによる急性肺損傷の抑制

エンドトキシンを気管内投与する ARDS モデルにおいて、スラミンの腹腔内投与の影響を評価した。スラミンを投与した群では、PBS のみを投与した群と比較して、有意に BAL 液中の総細胞数は低下していた ($p < 0.05$) (図 4)。

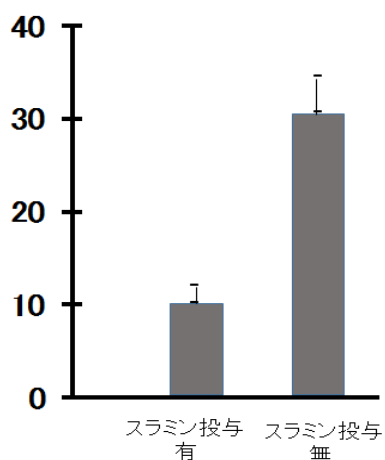


図 4. スラミン投与後の ARDS モデルでの BAL 液総細胞数 (x 10⁴/ml)

4 (5) エンドトキシン気管内投与後の mBD-14 の発現

マウスの肺内に LPS 投与後 12 時間での肺での mBD-14 の発現を定量的 PCR にて評価した。残念ながら、LPS 投与後の肺での発現量は、コントロールマウスでの肺での発現量よりむしろやや低かった。

これらの結果は、近年の他の報告の示すとおり、ATP 受容体が急性肺損傷に重要であることを支持しているが、肺での細胞外 ATP の上昇に defensin が直接関与している可能性は否定的であった。一方で、mBD-14 遺伝子欠損マウスでは、急性肺損傷における炎症の抑制はみられ、そのメカニズムの探索が、今後の重要な課題である。近年の報告からは、正常菌叢の変化が、免疫系全体に影響している可能性も示唆される。

4 (6) 喫煙暴露とビタミン D 受容体発現、サイトカイン発現の評価

10% CSE、50% CSE の負荷によりビタミン D 受容体の発現は、定量的 PCR 法による測定で、有意に減少した。また、A549 細胞において、ビタミン D 受容体の発現を siRNA によりノックダウンすると MIP-1 α や MMP-12 の発現が、有意に上昇した。

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 6 件)

- 1) Yamaguchi Y, Hibi S, Ishii M, Hanaoka Y, Yamamoto H, Ouchi Y, Akishita M. Removal of the CPAP Therapy Device During Sleep and Its Association With Body Position Changes and Oxygen Desaturations. *Respir Care*. 60:658-665, 2015. 査読有. doi: 10.4187/respcare.03520
- 2) Horie M, Saito A, Yamauchi Y, Mikami Y, Sakamoto M, Jo T, Nakajima J,

Takizawa H, Nagase T, Kohyama T.
Histamine induces human lung
fibroblast-mediated collagen gel
contraction via histamine H1 receptor. *Exp
Lung Res*. 40:222-36, 2014. 査読有. doi:
10.3109/01902148.2014.900155.

3) Hibi S, Yamaguchi Y,
Umeda-Kameyama Y, Iijima K, Takahashi
M, Momose T, Akishita M, Ouchi Y:
Respiratory dysrhythmia in dementia with
Lewy bodies: a cross-sectional study. *BMJ
open* 3(9):e002870, 2013 査読有. doi:
10.1136/bmjopen-2013-002870

4) Mikami Y, Yamauchi Y, Horie M, Kase
M, Jo T, Takizawa H, Kohyama T, Nagase
T. Tumor necrosis factor superfamily
member LIGHT induces
epithelial-mesenchymal transition in A549
human alveolar epithelial cells. *Biochem
Biophys Res Commun*. 428:451-457,2012.
査読有. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.097.

5) Hibi S, Yamaguchi Y,
Umeda-Kameyama Y, Yamamoto H, Iijima
K, Momose T, Akishita M, Ouchi Y: The
high frequency of periodic limb movements
in patients with Lewy body dementia. *J
Psychiatr Res* 46:1590-4,2012 査読有.
10.1016/j.jpsychires.2012.07.007.

6) Ishii M, Yamaguchi Y, Yamamoto H,
Ouchi Y, Osumi S, Nakamura T:
Relationship Between Sleep Apnea and
Respiratory Infections in BedRidden
Elderly Individuals on Tube Feeding. *J Am
Geriatr Soc* 60:790-792,2012 査読無. doi:
10.1111/j.1532-5415.2011.03874.x.

〔学会発表〕(計 3 件)

石井 正紀, 山口 泰弘, 他. 肺組織におけ
る抗炎症効果としてのビタミンD受容体機能
とその発現制御因子に関する検討. 第55回日

本呼吸器学会学術講演会 (平成27年4月18日,
東京)

石井 正紀, 山口 泰弘, 他. 肺組織にお
けるビタミンDによる抗炎症効果と組織保護
効果についての検討. 第 56 回日本老年医学
学術集会 (平成 26 年 6 月 12 日, 福岡)

Yasuhiro Yamaguchi, et al. Frequent
periodic limb movements are associated
with dementia with Lewy bodies and a
higher risk of falls. The 20th IAGG World
Congress of Gerontology and Geriatrics
(June 23, 2013. Seoul)

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称: 認知症鑑別装置

発明者: 山口泰弘, 大内尉義, 日比慎一郎

権利者: 国立大学法人 東京大学

種類:

番号: 特許第 5517141 号

出願年月日: 2013/7/17

取得年月日: 2014/4/11

国内外の別: 国内

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

幸山 正 (Kohyama, Tadashi)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号: 00302703

山本 寛 (Yamamoto, Hiroshi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ
ンター(東京都健康長寿医療センター研究
所)・その他部局等・研究員

研究者番号: 10361487