

平成21年 3月 23日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590708
 研究課題名（和文） 炎症非惹起型プロディフェンシンの構造作用特性に注目した炎症性腸疾患の治療
 研究課題名（英文） The structure-activity relationship of prodefensin is investigated for a novel therapy of inflammatory bowel disease
 研究代表者
 田邊 裕貴（TANABE HIROKI）
 旭川医科大学・医学部・助教
 研究者番号：50396363

研究成果の概要：

ヒト消化管における抗菌ペプチドに依存する自然免疫機能の感染防御機構を解明し、炎症性腸疾患の消化管粘膜上皮における自然免疫の関与を検討してきた。ディフェンシンの分子異常と機能異常を検討することによって、炎症性腸疾患の病因・病態における自然免疫機構異常の関与を解明した。さらに、内因性抗菌ペプチドをターゲットとする新たな炎症制御の可能性を検討し、炎症性腸疾患に対する特異的な新規治療法の開発をめざす。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：消化器学，自然免疫

1. 研究開始当初の背景

腸管の自然免疫と獲得免疫の破綻がクローン病の病態であることが、臨床病理学的、または遺伝子改変動物の検討から明らかとなっている。特に欧米では *NOD2* 遺伝子がクローン病の原因遺伝子の一つである事が示され、*NOD2* 遺伝子改変マウスが自然免疫と獲得免疫の欠落を呈することから (Kobayashi K. *Science* 2005, Maeda S. *Science* 2005), *NOD2* 蛋白による細菌抗原認識機構が注目されている。腸管上皮細胞の一つである Paneth 細胞は *NOD2* を高発現し (Lala S. *Gastroenterol* 2003), 様々な細菌抗原を認

識し抗菌ペプチドを腸管内に分泌し感染防御に貢献することを我々は初めて見いだした (Ayabe T. *Nat Immunol* 2000). 更にその詳細な分泌誘導のメカニズムを解明してきた (Tanabe H. *Infect Immun* 2005).

ディフェンシンは上皮細胞や血液細胞中に含まれる抗菌ペプチドで自然免疫の主なエフェクター分子である。マウスモデルにおいてその生体における感染防御機能が証明され (Ghosh D. *Nat Immunol* 2002), ヒト疾患との関連性が検討されている。とりわけ、クローン病におけるディフェンシンの欠落が最近注目され (Wehkamp J. *PNAS* 2005),

クローン病の病態に Paneth 細胞の機能低下が関与していることが明らかとなってきた。

ディフェンシンはプロディフェンシンとして Paneth 細胞内の顆粒に保存され細菌などによる刺激で腸管に分泌される。トリプシンがプロペプチドを切断することが想定されているが、活性化の機構は明らかになっていない。プロディフェンシンからディフェンシンへの活性化機構と炎症性腸疾患の病態との関係は検討されていない。そこで、抗菌ペプチドの一次構造の変化とその活性を検討し、炎症性腸疾患の新規治療に応用する試みを想定した。

2. 研究の目的

(1) プロディフェンシンとディフェンシンの生理学的特性の評価と構造解析

我々が既に構築した蛋白生成システムを用い (Tanabe H. *J Virol* 2004), リコンビナント蛋白を作成する。Human defensin (HD)-5 とそのプロペプチド (proHD-5) の抗菌活性, 細胞障害作用, 免疫誘導作用の差異について検討する。

(2) マウス腸管ディフェンシン同定とリコンビナント蛋白, 特異抗体の作成

マウス腸管からディフェンシンを同定し, リコンビナント蛋白の生成系を確立する。さらに, ウサギに免疫して特異的抗体を作成する。マウス腸管における発現を確認する。

(3) マウス実験の導入とディフェンシンによる治療効果の検討

マウスを用いて DSS 腸炎モデルを作成し実験系を確立する。まず, 内因性のマウスディフェンシンの変動を確認する。マウス腸管炎症を誘導し, ディフェンシンを複数の投与経路からマウスに投与し治療効果を検討する。その, 作用機序について病理組織学的に詳細な検討を加える。

3. 研究の方法

(1) proHD-5 と HD-5 の生理学的特性の評価と構造解析

①既に作成したリコンビナント蛋白発現系を使用し (Tanabe H. *J Virol* 2004), proHD-5 と HD-5 の発現誘導と精製をおこなった。

②抗菌活性の測定

得られた proHD-5 と HD-5 の抗菌活性を異なる菌株 (サルモネラ菌, 大腸菌, 黄色ブドウ球菌) を対象に検討した。10⁶ CFU/ml の対数増殖期の細菌をペプチドと 1 時間 37 °C で共培養の後に寒天培地に希釈塗布, 一晚培養後にコロニー数をカウントして生菌数を算定した。

③抗菌ペプチドの獲得免疫賦活作用

大腸癌細胞株 SW480 を無血清 DMEM 培地にて培養し, ディフェンシンで刺激後に培地を回収した。サイトカイン抗体アレイ

(RayBiotech 社) を用い上皮細胞から分泌されるサイトカインを検出した。また, 分泌刺激後の培地中のサイトカインの濃度を ELISA キットをもちいて定量した。

④プロディフェンシンの酵素的切断

作製した proHD-5 はトリプシン処理で分解すると約 4kD の HD-5 が得られた。AU-PAGE 及び MALDI-TOF MS にて分解された蛋白を同定した。

(2) マウス腸管ディフェンシンの同定とリコンビナント蛋白, 特異抗体の作成

①マウス腸管からのクローニング

小腸粘膜から cDNA ライブラリーを作製しクローニングを行った。既に GenBank に登録されている cDNA シークエンス特異的なプライマーを作製し PCR 増幅と TA クローニング, DNA シークエンスを行った。

②マウスディフェンシン蛋白の生成

マウスディフェンシン特異的なシークエンスを pET28 ベクターにライゲーションし, 大腸菌 BL21 発現システムで発現誘導させた。His タグを有する蛋白をニッケルレジンで部分精製し, CNBr でメチオニン残基を切断しタグを除去した後に C18 逆送カラムと HPLC をもちいてリコンビナント蛋白を精製した。

精製蛋白にアジュバントを付加し, ウサギに免疫後ポリクローナル抗体を IgG 精製した。得られた抗体を用いてマウスディフェンシンの発現を免疫組織学的に検討した。正常な C57Bl/6 と BALB/c および自然腸炎発症モデルである IL-10 KO マウスの遠位, 近位小腸の薄節切片を作成し, 一次抗体と反応後に, ABC 法を用いて DAB にて発色した。

(3) マウス実験の導入とディフェンシンによる治療効果の検討

①マウス DSS 腸炎モデルの作成とディフェンシンの有効性の検討

C57Bl/6 に DSS を経口投与し, 安定して腸炎モデルを作製する。腸炎の発症により内因性の Paneth 細胞ディフェンシンの発現量が変化しないことを AU-PAGE とポリクローナル抗体の免疫組織染色で確認した。経口, 腹腔内, 経静脈ルートで HD-5, proHD-5 を投与し腸炎発症の抑制効果を検討した。

②腸炎抑制効果の解析

腸炎モデルを屠殺後の大腸標本を用いて Ki-67 染色と TUNEL 法をもちいて細胞増殖とアポトーシスをそれぞれ検討した。

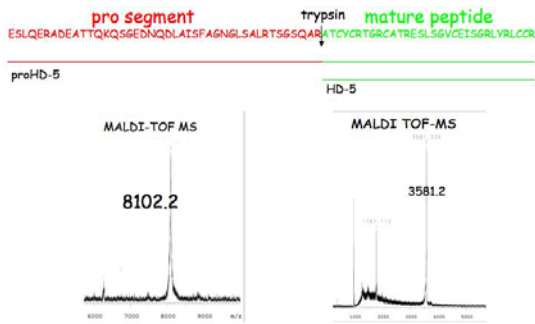
4. 研究成果

(1) proHD-5 と HD-5 の生理学的特性の評価と構造解析

①リコンビナント蛋白発現

proHD-5 と HD-5 は Fig. 1 に示した一次構造を有し、6つのシステインにより分子内ジスルフィド結合で fold される構造を有する。それぞれの蛋白を発現、精製し、精製度を HPLC および Acid urea-PAGE にて確認した。更に、分子量は MALDI TOF-MS にて確認同定した。

Figure 1



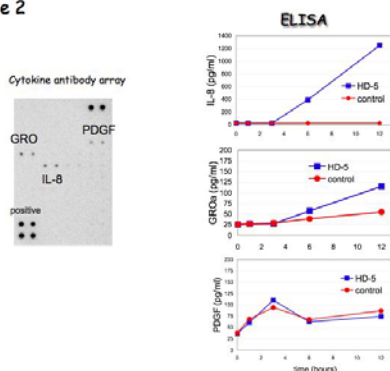
②抗菌活性の測定

4種の細菌株(サルモネラ菌, 大腸菌2株, 黄色ブドウ球菌)に対する抗菌活性を検討した。HD-5は10 mg/mlの濃度ですべての菌株に活性を示したが, proHD-5は100 mg/mlでサルモネラ菌に活性を示したが, 大腸菌を1/10に減少させる程度の弱い活性を示し, 黄色ブドウ球菌には活性を示さなかった。この抗菌活性の違いは細菌膜の組成が異なるためペプチド細胞膜間の静電的親和性が異なることに起因すると考えられている。

③抗菌ペプチドの獲得免疫賦活作用

細胞外に分泌されたサイトカインをアレイにて解析し, 分泌された IL-8, PDGF, GRO はさらに ELISA にて HD-5 による分泌刺激試験にて検討した。IL-8 は HD-5 にて発現が誘導され, 高濃度に分泌された (Figure 2)。

Figure 2



④プロディフェンシンの酵素的切断

75個のアミノ酸からなる proHD-5はトリプシンにより切断され, 32個のアミノ酸からなる HD-5として腸管にて作用すると考えられ

た (Fig. 1)。

(2)マウス腸管ディフェンシンの同定とリコンビナント蛋白, 特異抗体の作成

①マウス腸管からのクローニング

C57Bl/6マウス小腸粘膜から cDNA ライブラリーを作成し, ディフェンシンコンセンサスプライマーをもちいて PCR をおこないディフェンシンシーケンスを増幅した。生成物の TA クローニング後に, 複数のコロニーから直接シーケンシングで配列を決定した。蛋白配列が同定されているマウスディフェンシン (cryptdin) -5, 1 だけでなく C57Bl/6 に特異的な cryptdin-4 (B6b) の配列が同定された (Shirafuji Y. *J Biol Chem* 2002)。

②マウスディフェンシン蛋白の生成

マウスディフェンシン配列のうち cryptdin-4, -5, 4 (B6b) をベクターに挿入してリコンビナント蛋白を生成した。リコンビナント cryptdin-4 (B6b) 蛋白をウサギに免疫し, 特異的なポリクローナル抗体を作成し IgG 精製した。この抗体は免疫染色で C57Bl/6 マウスの Paneth 細胞内顆粒に特異的で, 遠位小腸で高発現し近位小腸では低発現となった。この発現様式は既知の cryptdin-4 発現と同様な傾向であった。なお, BALB/c マウスの Paneth 細胞とは反応せず, cryptdin-4 (B6b) は系統特異的なディフェンシンであることが示された。腸炎発症モデル IL-10 KO マウスでは発現が減弱し, 腸炎発症とディフェンシン減弱との関係が示唆された。

(3)マウス実験の導入とディフェンシンによる治療効果の検討

①マウス DSS 腸炎モデルの作成とディフェンシンの有効性の検討

C57Bl/6 マウスは, DSS の自由飲水にて大腸有意の腸炎をきたし, 実験結果は安定していた。DSS 投与によってマウス大腸炎がみられたが小腸には粘膜障害がみられず, 小腸 Paneth 細胞の内因性 α -defensin の濃度は Acid Urea-PAGE にて差がみられなかった。また, 免疫染色では Paneth 細胞特異的なディフェンシン発現は DSS 投与後に変化はなかった。

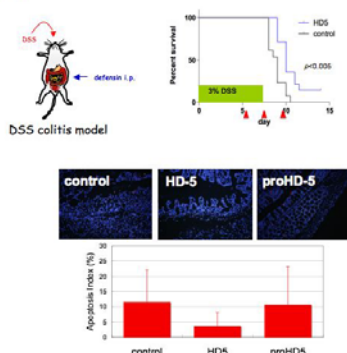
DSS マウスに対して 2.5 mg/kg の HD-5 を 3 日間腹腔内投与することで, 生存期間は著明に改善した ($p < 0.005$)。大腸組織は病理学的に HD-5 投与により粘膜障害の程度は軽減していた。経口的に投与した群と, 注腸投与群では生存期間の改善はみられなかった。

②腸炎抑制効果の解析

Ki-67 染色陽性細胞数はごくわずかで HD-5 投与非投与で差はなかった。アポトーシス陽

性細胞は HD-5 投与により減少した (Figure 3). HD-5 が上皮細胞のアポトーシスを抑制する可能性が示唆された.

Figure 3



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3件)

① Hiroki Tanabe, Tomonobu Sato, Jiro Watari, Atsuo Maemoto, Mikihiko Fujiya, Toru Kono, Toshifumi Ashida, Tokiyoshi Ayabe, Yutaka Kohgo. Functional Role of Metaplastic Paneth Cell Defensins in Helicobacter pylori-Infected Stomach. Helicobacter 13: 370-379, 2008, 査読有り

② Tanabe H, Ayabe T, Maemoto A, Ishikawa C, Inaba Y, Sato R, Moriichi K, Okamoto K, Watari J, Kono T, Ashida T, Kohgo Y. Denatured human alpha-defensin attenuates the bactericidal activity and the stability against enzymatic digestion. Biochem Biophys Res Commun. 358: 349-55. 2007. 査読有り

③ 田邊裕貴, 前本篤男, 綾部時芳, 河野透, 蘆田知史, 高後裕. クロウン病における Paneth細胞由来抗菌ペプチドの産生異常分子消化器病 4: 110-115, 2007. 査読なし

[学会発表] (計8件)

① Hiroki Tanabe. Precursor processing of human defensin-5 is essential to the physiological functions in vivo and in vitro. 2009 International symposium on Regulatory Peptide 2009.01.27 Santa Barbara, CA

② 金野陽高, 田邊裕貴, 前本篤男, 蘆田知史, 高後裕. 必須アミノ酸 L-isoleucine は β -defensin 2 発現量を増加させる. 第50回日本消化器病学会 2008.10.02 東京

③ 田邊裕貴, 藤谷幹浩, 高後裕. 腸管粘膜

における抗菌ペプチドの役割. 平成20年度北海道腸内細菌叢研究会 2008.9.19 札幌

④ 田邊裕貴, Zaky Amen, 石川千里, 上野伸展, 金野陽高, 稲場勇平, 伊藤貴博, 盛一健太郎, 岡本耕太郎, 藤谷幹浩, 高後裕. ヒト大腸癌における α -defensin 発現は MAPK 阻害剤にて抑制される. 第95回北海道癌談話会 2008.09.06 旭川

⑤ 綾部時芳, 深谷梨恵, 坂井直樹, 前本篤男, 蘆田知史, 河野透, 田邊裕貴, 高後裕. パネト細胞 α -defensin と腸内自然免疫 クロウン病との関わりを含めて

第45回補体シンポジウム 2008.07.11.札幌

⑥ Tanabe H. Human enteric defensin induces acquired immunity through activation processing. 13th International Congress of Mucosal Immunology 2007.7.10 Tokyo.

⑦ Maemoto A, Tanabe H, Inaba Y, Ito T, Ashida T, Ayabe T, Kohgo Y. Disruption of innate immunity in Crohn's disease. 13th International Congress of Mucosal Immunology. 2007.7.10. Tokyo

⑧ Maemoto A, Ayabe T, Tanabe H, Inaba Y, Ashida T, Fukaya R, Sakai N, Kono T, Kohgo Y. Down-regulation of Paneth cell α -defensin expression and function in patients with Crohn's disease. American Gastroenterological Association, 2007.5.22 Washington DC,

[その他]

ホームページ等

本研究の一部は旭川医科大学学術成果リポジトリ (AMCoR) から検索が可能である.

(<http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/modules/xoonips/>)

6. 研究組織

特記事項なし