

平成 21 年 3 月 17 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590903
 研究課題名 (和文) 呼吸器感染症におけるデフェンシンの病態生理学的意義と臨床応用
 研究課題名 (英文) A significance of defensins in respiratory infection and the clinical application
 研究代表者 芦谷 淳一
 宮崎大学・医学部・准教授
 研究者番号：50347069

研究成果の概要：デフェンシンは生体内に存在する内因性抗菌物質で自然免疫を担っている。リン脂質膜透過性を亢進して、外界から侵入した病原体に対する生体防御因子として機能するが、一方で宿主の組織や細胞に対しても組織傷害性を有している。デフェンシンには、主に好中球に存在する α デフェンシンと気道上皮に存在する β デフェンシンがあり、申請者らは、高感度ラジオイムノアッセイ法を確立して、血清、胸水、気管支肺胞洗浄液、などの検体を用いたデフェンシンの定量化や病理組織を用いた免疫組織学適検討により、呼吸器疾患の病態におけるデフェンシンの意義について詳細に解析してきた。本研究では、呼吸器感染症を対象にデフェンシンの病態生理学的意義を解明し、臨床応用するための基礎データを集積した。また新規に開発されたマイクロサンプリング法を用いて気道局所から気道被覆液をサンプリングし、呼吸器感染症患者で局所発現しているデフェンシンを定量化した。また、新規デフェンシンであるプレクタシンについてcolony count assay法により、従来のデフェンシン同様に抗菌活性を有していることを解明した。デフェンシンは亜型が多く、複数のデフェンシンの組み合わせにより、抗菌作用に相乗効果があることを報告した。デフェンシンの組織傷害と抗菌作用の発現には濃度による差があるため、今後の治療応用が可能である。デフェンシンはウイルスや抗酸菌に対しても抗菌作用があり、本研究で得られた成果は、難治性呼吸器感染症の新規治療ツールとしてデフェンシンを活用する場合の基礎データとなる。当初の研究計画に沿って、概ね事業は終了し、臨床応用へ向けた次の段階へ進むことができた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2008 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：呼吸器

科研費の分科・細目：7204

キーワード：デフェンシン、呼吸器感染症

1. 研究開始当初の背景

デフェンシンは生体内に存在する内因性抗菌物質で外界から侵入した病原体に対して生体防御因子として機能する抗菌ペプチドであるが、一方で宿主の組織や細胞に対しては組織傷害的に作用している。デフェンシンには、主に好中球に存在する α デフェンシンと気道上皮に存在する β デフェンシンがあり、申請者らはこれまでに、高感度ラジオイムノアッセイ法を確立して、血清、胸水、気管支肺胞洗浄液、などのデフェンシンの定量化や病理組織を用いた免疫組織学的検討を行い、呼吸器疾患の病態におけるデフェンシンの意義について詳細に解析してきた。現在、新興再興感染症や多剤耐性菌の出現などから、抗病原体物質の製薬化や誘導が注目されており、一般細菌だけでなく、ウイルスや抗酸菌にも抗菌作用を有するデフェンシンは新たな治療ツールとして重要である。

2. 研究の目的

呼吸器感染症におけるデフェンシンの病態生理学的意義を解明し、内因性生理活性物質を医療シーズとして治療応用するための基礎データを集積する。また、新規デフェンシンであるプレクタシンの抗菌活性や生理機能を解析し、既存のデフェンシンとの抗菌力の相違を検討する。

3. 研究の方法

(1) 呼吸器感染症患者の血清中デフェンシン濃度の測定

呼吸器感染症患者の血清を対象に β 1~4デフェンシンを高感度ラジオイムノアッセイ法により測定し、健康人と比較する。

(2) 呼吸器感染症における気道被覆液の回収と被覆液中デフェンシン濃度の測定

緑膿菌による慢性気道感染患者を対象に気管支鏡下にマイクロサンプリングチューブで、気道被覆液を回収する。回収した気道被覆液中の β デフェンシン1~4を高感度ラジオイムノアッセイ法により測定する。ムコイド型と非ムコイド型緑膿菌におけるデフェンシンの発現の差を評価する。

(3) β デフェンシン1~4の抗菌活性と亜型の組み合わせの違いによる抗菌活性の評価

radial diffusion assay法とcolony count assay法で大腸菌に対する β デフェンシン1~4の抗菌活性を評価する。また亜型2種類を混合させたときの抗菌活性の相互効果を評価する。

(4) 気道上皮細胞における β デフェンシン誘導の評価

培養気道上皮細胞をlipopolysaccharideとともに培養し、上清中の β デフェンシンをELISA法にて測定する。また培養細胞中のm-RNAを回収して、RT-PCR法によりデフェンシンの生合成を検討した。

(5) プレクタシンの抗菌活性評価

colony count assay法で大腸菌に対するプレクタシンの抗菌活性を評価し、 β デフェンシンと比較検討する。また β デフェンシンとの相乗効果の有無について検討する。

4. 研究成果

(1) 呼吸器感染症患者の血清中デフェンシン濃度の測定

急性呼吸器疾患患者では β デフェンシン2~4が急性期に上昇し、回復期には低下した。一方、 β デフェンシン1は急性期の上昇はなく、回復期と差はなかった。

(2) 気道被覆液中のデフェンシン濃度

緑膿菌による慢性気道感染症患者ではβデフェンシン1と3が健常者に比較して高値であった。βデフェンシン2と4は健常者ですべて測定できず、慢性気道感染症患者の約半数で測定可能であった。ムコイド型ではβデフェンシン2と4が高値であった。

(3) βデフェンシン1~4の抗菌活性と亜型の組み合わせによる抗菌活性の違いの評価

すべての亜型でβデフェンシン2が最も抗菌活性が強かった。また、βデフェンシン2と4はムコイド型緑膿菌に対して相乗的に抗菌活性が発現した。緑膿菌感染に対する生体側の自然免疫応答にムコイド型と非ムコイド型で相違があることが解明された。ムコイド型緑膿菌における生体防御系ではβデフェンシン2と4が特に重要であることが推察された。

(4) 気道上皮細胞におけるβデフェンシンの誘導の評価

Lipopolysaccharideの刺激により、培養気道上皮細胞からβデフェンシン2と4の放出を認めた。また、βデフェンシン4の生合成の亢進が確認された。このことから、病原体による気道上皮細胞のデフェンシン誘導が確認された。

(5) プレクタシンの抗菌活性評価

プレクタシンは大腸菌に対してβデフェンシン2より弱く、βデフェンシン4よりは強い抗菌活性を示した。他のデフェンシンとの間に抗菌活性の相乗効果や減弱作用などの相互作用はなかった。

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. Kodama T, Ashitani J, Matsumoto N, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin treatment for suppression of neutrophil-dominant inflammation in airways of patients with chronic

respiratory infection. *Pulm Pharmacol Ther.* 21:774-779, 2008.

2. Ashitani J, Kyoraku Y, Yanagi S, Matsumoto N, Nakazato M. Elevated levels of β-D glucan in bronchoalveolar lavage fluid in patients with farmer's lung in Miyazaki, Japan. *Respiration.* 75: 182-188, 2008.
3. Yanagi S, Ashitani J, Imai K, Kyoraku Y, Sano A, Matsumoto N, Nakazato M. Significance of human β-defensins in epithelial lining fluid of patients with chronic lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect.* 13: 63-69, 2007.
4. Iiboshi H, Ashitani J, Katoh S, Sano A, Matsumoto N, Mukae H, Nakazato M. Long-term treatment with theophyllin reduces neutrophils, interleukin-8 and tumor necrosis factor-α in the sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther.* 20: 46-51, 2007.
5. Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M. Elevated levels of antimicrobial peptides in bronchoalveolar lavage fluid in patients with chronic eosinophilic pneumonia. *Respiration.* 74: 69-75, 2007.
6. Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M. Elevated α-defensin levels in plasma of patients with pulmonary sarcoidosis. *Respirology.* 12: 339-345, 2007.

[学会発表] (計2件)

1. Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M: A significant of defensins in patients with respiratory infection. European Respiratory Society 2007.9 Stockholm, Sweden.

2. 芦谷淳一、松元信弘、中里雅光：体
重減少をきたした慢性呼吸器疾患患
者における高容量オクタン酸含有栄
養補助剤のグレリン誘導と臨床効果
日本呼吸器学会総会 平成20年6月1
7日（神戸）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦谷淳一（宮崎大学医学部）

(2) 研究分担者

松元信弘（宮崎大学医学部）

(3) 連携研究者

なし