

論文の内容の要旨

論文題目 β -defensin-2 の抗菌活性機序および発現の分子機構

指導教官 大内 尉義教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 9 年 4 月入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

氏名 富田 哲治

生物が生来もっている生体防御機構として、植物、昆虫、哺乳類などに抗菌ペプチドが存在していることが知られている。ヒトにおける抗菌ペプチドは3組の分子内ジスルフィド結合で架橋された塩基性ペプチドであり、defensin と総称されている。その抗菌活性は広範囲であり、細菌以外に真菌やウイルスにも抗菌活性をもつことが知られている。ヒトでは顆粒球、小腸粘膜由来の 6 種類の α -defensin および粘膜上皮由来の 2 種類の β -defensin に分類される。

β -defensin のうち human β -defensin-2 (hBD-2) は human β -defensin-1 (hBD-1) と相同性をもつ新たな抗菌ペプチドとして、1997 年に乾癬患者の皮膚より単離・構造決定された 41 アミノ酸残基からなるペプチドである。hBD-2 は全身臓器にその発現分布がみられるが、特に皮膚、気管および肺で強く発現がみられる。また、hBD-1 の発現は恒常的にみられるのに対して hBD-2 では細菌感染や炎症性サイトカイン刺激にてその発現が誘導されるという特徴をもっている。そのため、hBD-2 は肺炎などの呼吸器感染とより密接な関係をもつことが示唆される。よって、ヒトの抗菌ペプチドであり気道粘膜上皮の感染防御の関与が考えられている hBD-2 について以下の検討を加えた。

defensin の抗菌メカニズムについては、顆粒球由来である α -defensin はイオンチャンネルを標的細胞膜上に形成し膜透過性を変化させることが知られている。一方、 β -defensin である hBD-1、hBD-2 は Na^+ 濃度依存性に抗菌活性を消失すること以外は、その他の陽イオン、陰イオンなどの影響については報告されておらず、またその抗菌活性機序についても知られていない。よって第1の検討として、hBD-2 の抗菌活性機序について検討する目的にて、大腸菌を用いた細菌学的方法(Harwig らの colony count assay 法)にて hBD-2 と電解質イオンとの関係について検討した。

その結果、hBD-2 は大腸菌に対して濃度依存性に抗菌活性がみられた。その抗菌活性は大腸菌実験株、臨床分離株では差を認めなかった。次に1価の陽イオンである Na^+ 、 K^+ による hBD-2 抗菌活性に対する影響について検討した。その結果、 Na^+ 、 K^+ ともそれぞれ濃度依存性に hBD-2 抗菌活性に影響を及ぼした。*In vivo* における airway surface liquid(ASL)中の電解質組成について Zabner らの最近の報告によると、radiotracer 法にて ASL 中の Na^+ 濃度は正常 50mM、Cystic fibrosis(CF) 100mM であり、このため CF では defensin の活性が低下し細菌感染を起こしやすいと考えられている。今回の *in vitro* での抗菌実験では、 Na^+ 濃度 50mM 以下の環境では hBD-2 抗菌活性がみられるが、 Na^+ 濃度 100mM 以上の環境では著明に hBD-2 抗菌活性の低下がみられたことは、Zabner らの報告による *in vivo* での ASL 電解質組成と矛盾しないと考えられる。さらに Na^+ 、 K^+ の複合した影響について検討した。イオンを補充して反応液の最終イオン濃度をそれぞれ (A). K^+ 37mM、(B). Na^+ 50mM に調整した。pH 補正のために含まれている磷酸緩衝液により、反応液中にはあらかじめ Na^+ 14.8mM、 K^+ 1.6mM が含まれている。よって (A)、(B) の反応液中の Na^+ と K^+ のイオン総和はそれぞれ約 52mM と等しくなり、さらにこのときの抗菌活性は (A)、(B) 両者に差を認めなかった。一方、反応液の最終イオン濃度をそれぞれ (B). Na^+ 50mM、(C). K^+ 50mM に調整したものでは、反応液中の Na^+ と K^+ のイオン総和は (B). 約 52mM、(C). 約 65mM となり、このときの抗菌活性の比較では、総和イオン濃度が低い (B). の方がより強い抗菌活性を認めた。さらに (D). K^+ 87mM、(E). Na^+ 100mM、(F). K^+ 100mM の比較ではいずれも抗菌活性に差を認めなかった。以上の結果より Na^+ 、 K^+ 自体の作用よりもその電荷当量により抗菌活性が影響を受ける可能性が示唆された。また、陰イオンによる影響について検討したが、 Cl^- 、 SO_4^{2-} とともに抗菌活性に差を認めなかった。また、2 価の陽イオンで

ある Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の検討ではそれぞれ Na^+ 、 K^+ よりかなり低いイオン濃度 (0.05mM 以下) で抗菌活性がみられた。2 価の陽イオンである Ca^{2+} 、 Mg^{2+} と 1 価の陽イオンである Na^+ 、 K^+ とは異なる抗菌活性機序が推測された。ウサギ血小板由来の抗菌ペプチドである tPMP (Thrombin-induced platelet microbial protein) は *Staphylococcus aureus* に対する抗菌活性実験にて、 I_{100} (菌発育を 100% 阻止する最小濃度) は 1 価陽イオンでは Na^+ 250mM、 K^+ 250mM であるのに対して、2 価陽イオンでは Ca^{2+} 25mM、 Mg^{2+} 10mM であるとの報告があり、抗菌活性はイオン電荷当量と相関があると推察されている。今回の実験結果より、tPMP と同様に hBD-2 の抗菌活性はイオン電荷当量の関与がある可能性が示唆された。

hBD-2 は肺や気管に発現がみられること及び、細菌感染や炎症性サイトカインなどの刺激により発現が誘導されることより、肺炎などの急性炎症との関係が示唆される抗菌ペプチドである。hBD-2 遺伝子配列をみると、転写開始上流域に NF- κ B および AP-1 と類似した配列が存在している。これは hBD-2 が急性期に誘導されることと一致した事実であり、その転写調節に NF- κ B および AP-1 が関与していることが予想される。hBD-2 の転写活性について、初代培養ヒト気道上皮細胞を用いた *in vitro* の系にて LPS 刺激がマクロファージ表面抗原である CD14 と LPS receptor である TLRs (Toll like receptor) を介して NF- κ B を活性化することが最近報告されている。しかし、AP-1 の関与についてはまだ報告がない。よって本研究では第 2 の検討として、*in vitro* の系での hBD-2 発現の転写調節について、(1) 転写因子 NF- κ B、AP-1 の関与、(2) Glucocorticoid および COX inhibitor である Indomethacin, NS-398, Aspirin などの薬剤の hBD-2 発現誘導に及ぼす影響について検討した。

日本人肺腺癌由来である LC-2/ad 細胞を用いて hBD-2 の発現の分子機構について、Northern blot 法にて検討した。その結果、まず LPS 用量依存性に hBD-2 発現の増加がみられた。また LPS 刺激にて hBD-2 の発現は刺激後 24 時間にてプラトーに達する経時的な増加がみられた。NF- κ B 阻害剤である PDTC は LPS による hBD-2 発現を用量依存的に抑制した。12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) は PKC を介して転写因子である AP-1 を活性化する一方、TPA を長時間作用させると逆に PKC を downregulation することが *in vitro* の検討にて知られている。TPA 単独刺激では hBD-2 の発現誘導はみられなかったが、TPA 24 時間前処置後

(PKC downregulation)の LPS 刺激では、対照群に比べ hBD-2 の部分的な発現抑制がみられた。以上より、hBD-2 の転写活性は NF- κ B の関与および一部 AP-1 の関与が考えられた。さらに細胞内 Caキレーターである BAPTA-AM により LPS による hBD-2 発現は著明に抑制された。次に抗炎症薬による影響について検討した。Glucocorticoid の転写活性については、Glucocorticoid Receptor(GCR)は Glucocorticoid Response Element(GRE)を介してある特定の遺伝子を活性化することが知られている。一方、GCR は NF- κ B 複合体 p65 subunit に結合して NF- κ B 活性を抑制することにより、抗炎症作用をもつことが報告されている。さらに GCR は Jun-Fos 複合体に結合し、AP-1 を介する遺伝子発現を抑制するとの報告もある。本研究による検討では、Glucocorticoid は LPS 刺激による hBD-2 発現を用量依存性に抑制した。これより、Glucocorticoid は NF- κ B および AP-1 の両方または一方を抑制することにより、hBD-2 の発現を抑制することが推察された。また COX inhibitor である Indomethacin, NS-398, Aspirin はいずれも同刺激による hBD-2 発現を抑制しなかった。これより、hBD-2 の転写発現には cyclooxygenase 系の関与がないことが予想された。

hBD-2 は肺炎などの呼吸器疾患とより密接な関係があることが示唆される抗菌ペプチドである。hBD-2 は元来生体内で産生されるものであり広範囲に抗菌活性をもつことから、今後の臨床的応用が期待される。