

論文内容の要旨

human β -defensin-3 の抗腫瘍効果の検討

指導教員 大内尉義 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

花岡陽子

緒言

抗菌ペプチド defensin は約 40 のアミノ酸からなり、特異的な 6 つのシステイン配列と 3 つの分子内ジスルフィド結合をもつ、約 4kD の小さなペプチドである。このシステイン配列の相違から、alpha-defensin と beta-defensin に分類されている。また、現在までに 3 種類の beta-defensin が単離・同定され、報告されている。defensin は、抗菌作用を示す一方で、それが高濃度になると細胞傷害性を有することが報告されており、最近では、腫瘍との関連報告も散見される。

human beta-defensin-3 (hBD-3) はヒト乾癬の鱗片抽出物から、2001 年に初めて抽出され、他の beta-defensin よりも広域抗菌スペクトラムを有するなどの特徴をもつことが知られている。hBD-3 と腫瘍の関連性については、口腔内扁平上皮癌で強く発現していることや、単球と骨髄性樹状細胞の Toll 様受容体 1, 2 を介して抗原提示細胞を活性化することが報告されており、hBD-3 が生体内で抗腫瘍作用を有することが期待される。そこで、私は hBD-3 の細胞傷害性と抗腫瘍作用について検討した。まず、hBD-3 が癌細胞に対し細胞傷害性を有するか、他の defensin との相違はないか、検討した。さらに hBD-3 のマウス相同体である mouse beta-defensin-14 (mBD-14) を欠損するホモ接合体ノックアウトマウスを作製し、これとその同腹子のそれぞれに対して、接種した腫瘍の生着、増殖の過程を観察した。最後に、mBD-14 の抗腫瘍薬としての可能性を探るため、実際に腫瘍モデルマウスに mBD-14 合成ペプチドを投与し、腫瘍増大への影響を検討した。

方法

1. hBD-3 の細胞傷害性に関する検討

- ①トリパンブルー染色による hBD-3 の細胞傷害性の確認：hBD-3 が癌細胞に対し細胞傷害性を示すか、ヒト肺癌細胞 A549 に hBD-3 を添加し、トリパンブルー染色を施行した。
- ②各 beta-defensin の細胞障害性の比較：A549 細胞に各 defensin を 200 μ g/ml になるよう添加し、10 分後に propidium iodide (PI) 染色、Hoechst 33342 染色を行い、PI 陽性の死細胞の割合を算出した。

- ③hBD-3 の各濃度での細胞傷害性の検討： hBD-3 の各濃度で 10 分間曝露した A549 細胞に PI/Hoechst 33342 染色を行い、PI 陽性の死細胞の割合を算出した。
- ④hBD-3 による細胞傷害性の経時変化の検討： 100 μ g/ml の hBD-3 に曝露した A549 細胞に時間経過で PI/Hoechst 33342 染色を行い、PI 陽性の死細胞の割合を算出した。
- ⑤抗菌活性を示す濃度に近い濃度の hBD-3 の細胞傷害性の検討： hBD-3 を 5 μ g/ml または 20 μ g/ml の濃度の培地で A549 細胞を 48 時間培養し、細胞数を測定した。また、XTT アッセイを用いて複数の細胞種についても検討した。細胞増殖能への影響の検討では BrdU の取り込みを測定し検討した。アポトーシス誘導の検討では A549 細胞を hBD-3 が 100 μ g/ml の濃度で 9 時間培養後に TUNEL 染色を行った。

2. 個体における mBD-14 の抗腫瘍効果の検討

- ①mBD-14 欠損マウスの作製・ノックアウトの確認： mBD-14 遺伝子全体を LacZ 遺伝子に置換するターゲティングベクターを mBD-14 遺伝子を含む BAC クローンを用いて作製した。ES 細胞としては、TT2 細胞を利用した。線状化したターゲティングベクターを、エレクトロポレーションにより、ES 細胞に導入し、G418 とガンシクロビルによるセレクションを施行した。得られた約 150 個のクローンについて、ショートアームをはさむ PCR 法とサザンブロットにより相同組み換えのスクリーニングを施行した。変異導入 ES 細胞を、ICR マウスの 8 細胞胚に注入して、仮親マウスの子宮内に移植し、キメラマウスを作製した。C57BL/6 マウスへのバッククロスは 5 代まで行って遺伝的背景を均一化した。作製した mBD-14 欠損マウスと同腹子の野生型マウスより皮膚を摘出し ISOGEN を用いて RNA を抽出した。RT-PCR 法にて mBD-14 遺伝子の欠損を確認した。また、皮膚の凍結切片を作成し、LacZ 染色を行った。
- ②mBD-14 欠損マウスと野生型マウスの腫瘍形成の観察： 野生型マウス、mBD-14 遺伝子欠損マウスそれぞれ対し、その背部皮下に LLC 細胞を接種した。18 日間の腫瘍の増大の経過観察をし、7 日目、または 18 日目に腫瘍の摘出を行ってその重量を比較した。
- ③個体における mBD-14 の抗腫瘍効果の検討： 腫瘍モデルマウスを作製し、mBD-14 を腫瘍近傍に持続的に投与し、10 日目に腫瘍を摘出した。

結果

1. hBD-3 の細胞傷害性に関する検討

- ①トリパンブルー染色による hBD-3 の細胞傷害性の確認： 50 μ g/ml 以上の濃度ではトリパンブルーに染まる A549 細胞が観察され、hBD-3 による細胞膜破壊が惹起されていることを確認した。
- ②各 defensin の細胞障害性の比較： hBD-1 や hBD-2 では、200 μ g/ml において、PI 陽性細胞はほとんど確認されなかった。PI 陽性の死細胞の割合を算出すると、hBD-3 では他の defensin と比較して有意に多かった ($p < 0.01$)。また、hBD-3 のマウス相同体である mBD-14 では hBD-3 と同様に PI 陽性細胞の割合が多かった ($p < 0.01$)。
- ③各濃度の hBD-3 の細胞傷害性の検討： 50 μ g/ml 以上の濃度の hBD-3 で PI 染色陽性の死細胞が確認された。PI/Hoechst 33342 染色陽性細胞の割合を算出すると、その程度は濃度依存的であった。70 μ g/ml の濃度で死細胞の割合が有意に ($p < 0.01$) 増加していた。
- ④hBD-3 による細胞傷害の経時変化の検討： 100 μ g/ml の hBD-3 に曝露し、経時変化を観察したところ、30 分後には、約 20%の細胞が、PI 陽性像を示し、その後 90 分、270 分、

540 分後には PI 陽性細胞の割合は少しずつ増加した。⑤抗菌活性を示す濃度での hBD-3 の細胞傷害性の検討:hBD-3 を 5 $\mu\text{g/ml}$ または 20 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した培地で A549 細胞を 48 時間培養したところ、細胞数は、20 $\mu\text{g/ml}$ で有意に減少していた。XTT アッセイの検討では、癌細胞のみならず、正常細胞の細胞株も hBD-3 (20 $\mu\text{g/ml}$) 群で有意に減少していた。また、hBD-3 を 20 $\mu\text{g/ml}$ になるよう添加し、12 時間後に PI/Hoechst33342 染色を行ったところ、20 $\mu\text{g/ml}$ 添加群で有意に PI 陽性の死細胞の割合が高かった。⑥BrdU 測定による hBD-3 の細胞増殖能への影響を検討:hBD-3 を添加した群は vehicle 群と BrdU の取り込みに有意差は認めなかった。⑦hBD-3 によるアポトーシス誘導の検討:hBD-3 を添加した群では TUNEL 陽性細胞が増加していたが、同時に施行した PI 染色でも同様に PI 陽性細胞を多数認めた。

2. 個体における mBD-14 の抗腫瘍効果の検討

①mBD-14 欠損マウスの作製・ノックアウトの確認:RT-PCR 法にて mBD-14 遺伝子の欠損を確認した。また、皮膚の凍結切片の LacZ 染色で、KO マウスで LacZ に置き換わっているのが確認された。同腹子の野生型と比較して体重、外観に有意な差は認めなかった。

②mBD-14 欠損マウスと野生型マウスの腫瘍形成の観察:早期より、KO マウスでは腫瘍塊が外表から確認された。しかし、18 日目に摘出した腫瘍の重量に有意差はみとめなかった。7 日目の腫瘍を摘出したところ、その重量は WT マウスでは $11.75 \pm 1.03 \text{ mg}$ 、KO マウスでは $36.67 \pm 3.57 \text{ mg}$ であり、KO マウスで有意に増大していた ($p < 0.01$)。

③個体における mBD-14 の抗腫瘍効果の検討:Lewis lung carcinoma cell (LLC) 接種後、9 日目の時点で摘出した腫瘍の重量は vehicle 投与群で $396.75 \pm 95.46 \text{ mg}$ だったのに対し、mBD-14 投与群では $136.41 \pm 24.77 \text{ mg}$ と有意に減少していた ($p = 0.015$)。

考察

今回、私は抗菌ペプチドとされている hBD-3 が他の defensin と比較して非常に強い細胞傷害性を有すること、そして生体においては腫瘍の増大を抑制する作用を有することを示した。これまで、hBD-3 の抗腫瘍作用を直接示した報告はなされておらず、その機序を含めてきわめて興味深い結果と考えられる。まず、hBD-3 が高濃度になるとトリパンブルーで染色され、高濃度の hBD-3 が癌細胞の細胞膜を直接破壊することが示された。また、200 $\mu\text{g/ml}$ という高濃度において、hBD-3 が 10 分という極めて短時間で強力に細胞死を惹起したのに対し、hBD-1、hBD-2 では細胞死がほとんど惹起されなかったことから、hBD-3 が他の defensin と比較して癌細胞に対する強い細胞傷害性を有することが示唆された。その細胞傷害性は BrdU の取り込み測定、Tunnel 染色の結果から、細胞増殖能の抑制にはならず、DNA 傷害によるアポトーシスが誘導されるより前に、hBD-3 が直接的に細胞膜を破壊し、細胞死を惹起する可能性が高いと考えた。生体内における hBD-3 の抗腫瘍作用の検討のため、hBD-3 のマウス相同体である mBD-14 遺伝子を欠損した KO マウスを作製し、腫瘍細胞を接種した。KO マウスでは、より早期から腫瘍の形成が確認でき、投与 7 日目に摘出した腫瘍の重量は有意差をもって増大していた。このことから、生理的な mBD-14 は腫瘍の増大を抑制している可能性が示唆された。一方で、腫瘍モデルマウスに mBD-14 を腫瘍近傍の皮下に持続投与したところ、mBD-14 の投与によって腫瘍の増大を抑制しうることも直接証明できた。また、文献的考察から、hBD-3 の腫瘍抑制効果の機序として、直接の細胞膜

傷害に加えて、腫瘍細胞に対する免疫監視を賦活している可能性も示唆された。生理的な mBD-14 が腫瘍形成の抑制に関与し、mBD-14 の投与が腫瘍の増大を抑制するのを確認したことは、ヒト相同体である hBD-3 もヒト悪性腫瘍の増大を生体で抑制する可能性を示唆する重要な結果がえられたと考える。生体内において、hBD-3 が抗菌作用のみならず、抗腫瘍作用という生理的機能も有していることが示された。