

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 花岡 陽子

本研究は、抗菌ペプチドとして生体内で重要な役割を担っていると考えられている human β -defensin-3 (以下、hBD-3)が、抗腫瘍効果を有するかどうかについて、*in vitro*、および *in vivo* で検討し、下記の結果を得ている。

1. 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、hBD-3 が癌細胞の細胞膜破壊が惹起することを確認した。

2. 他の defensin との細胞傷害性の比較するため A549 細胞に各 defensin 200 $\mu\text{g/ml}$ を添加した。hBD-1 や hBD-2 では細胞死がほとんど観察されなかったが、hBD-3 では有意に Propidium iodide(PI)陽性の死細胞が多く観察され、他の defensin と比較して強い細胞傷害性を有することが確認された。hBD-3 に 10 分間曝露すると 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で死細胞が観察され、70 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では有意に増加することを確認した。100 $\mu\text{g/ml}$ の hBD-3 に曝露し、死細胞の割合を時間経過で観察したところ、30 分後には約 20%の死細胞が確認された。

3. hBD-3 が抗菌活性を示すとされている濃度に近い濃度で、A549 細胞を長時間曝露し、細胞傷害性を検討した。20 $\mu\text{g/ml}$ で有意な PI 陽性の死細胞の増加を確認した。他の細胞株についても、XTT アッセイを施行し、同様の細胞傷害性を示すことを確認した。hBD-3 を添加した培地で培養した細胞では BrdU の取り込みに有意差は認めず、細胞増殖能の抑制にはよらないことが示された。また、100 $\mu\text{g/ml}$ の hBD-3 に 9 時間曝露した A549 細胞の TUNEL 染色、PI 染色の結果からアポトーシスより先に直接細胞膜破壊による細胞死が惹起していることが示唆された。

4. hBD-3 の生体における生理的な抗腫瘍作用の検討するため、hBD-3 のマウス相同体である mouse β -defensin-14(mBD-14)遺伝子を欠損したホモ接合体ノックアウトマウス (KO マウス) を作製した。この KO マウスとその同腹子である野生型マウスにの背部に Lewis Lung Carcinoma (LLC)細胞を接種し、腫瘍形成の経過を観察、比較した。その結果、早期から KO マウスで腫瘍の形成が確認され、7 日目時点で摘出した腫瘍の重量は KO マウスで有意に増大していることを確認した。

5. hBD-3 の抗腫瘍薬としての可能性を探るため、腫瘍モデルマウスに実際に mBD-14 を腫瘍近傍に持続投与後、腫瘍を摘出した。mBD-14 投与群は対照群と比較して有意に腫瘍の重量が小さく、mBD-14 の生体における腫瘍の増大を抑制することが示された。

以上、本論文は hBD-3 が他の defensin と比べて強い細胞傷害性を有することを明らかにす

るとともに、そのマウス相同体である mBD-14 遺伝子欠損マウスでは、接種した腫瘍細胞が有意に増大することを明らかにした。さらに、腫瘍モデルマウスに mBD-14 を投与することで腫瘍の増大が抑制されることを明らかにした。本研究はこれまで明らかにされていなかった hBD-3 の抗腫瘍効果を証明した画期的な内容であり、学位の授与に値するものと考えられる。