

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	石川千里
<h3>学位論文題目</h3> <p>ヒト Paneth 細胞ディフェンシンは抗菌活性をもつプロペプチドとして分泌され、活性化された後に interleukin-8 分泌誘導能を獲得する</p> <p>未公表</p> <h3>研究目的</h3> <p>ヒトは病原微生物に対する防御機構として、自然免疫および獲得免疫を有しているが、皮膚や腸管など外界と接する領域では、非特異的に細菌・真菌・ウイルスなどの病原微生物を不活化する自然免疫が重要な役割を果たしている。自然免疫において主要な役割を担っている分子が抗菌ペプチドで、外来病原菌の侵入を防ぐバリアーを形成している。抗菌ペプチドの一つにディフェンシンがあり、ヒトには<math>\alpha</math>-と<math>\beta</math>-ディフェンシンがある。<math>\alpha</math>-ディフェンシンは6種類あり、そのうち小腸の免疫担当細胞である Paneth 細胞から human defensin (HD)-5 および-6 が分泌される。Paneth 細胞には様々な抗菌ペプチドが含まれているが、抗菌活性の多くを HD-5 が担っている。HD-5 は前駆体である proHD-5 の形で Paneth 細胞の顆粒内に蓄えられ、抗原刺激により分泌され、腸管内でトリプシンにより活性化される。しかし、HD-5 と proHD-5 の活性の違いについてはこれまで明らかになっていなかった。本研究では、proHD-5 として分泌後に腸管内で HD-5 となる過程の生理的意義を明らかにするために、大腸菌からリコンビナント proHD-5 を生成し、その抗菌活性とサイトカイン分泌刺激作用を HD-5 のそれと比較検討した。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

ヒト小腸 cDNA から proHD-5 認識配列を PCR 増幅した。制限酵素配列を含む proHD-5 配列に特異的なプライマーセットで増幅後に pET28a ベクターに導入した。このプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlus-RIL に形質転換し、isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)を加え蛋白発現を誘導した。回収した大腸菌を nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) レジンで精製し、cyanogen bromide にて 6xHis タグを切離した。C18 逆相カラムを用い高速液体クロマトグラフ (HPLC) で精製し、リコンビナント proHD-5 を得た。

$1 \times 10^6$  colony forming units (CFU) /ml のサルモネラ菌に合成 HD-5、または、リコンビナント proHD-5 を加え、37°C で 1 時間培養した後、トリプチケース寒天培地で一晚培養し残存細菌数をカウントし、抗菌活性を測定した。

ヒト腸管上皮細胞モデルである大腸癌細胞株 HT29、SW480 を用いて HD-5 と proHD-5 の細胞毒性を検討した。細胞毒性分析を行い比色法により吸光度 490 nm を測定した。

大腸癌細胞株 HT29 を HD-5 と proHD-5 で刺激して、その上清を回収し抗体アレイにてサイトカイン分泌を同定した。さらに、サイトカイン濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて測定した。統計学的処理には *t* 検定を用い、 $p < .05$  を優位差有りとした。

## 成 績

リコンビナント蛋白の発現をゲル電気泳動にて確認した。大腸菌に IPTG を加え発現誘導した細胞抽出液では、バンドは認識できない程度であったが、Ni-NTA レジン精製後にバンドとして認識できた。6xHis-除去後の HPLC 精製 proHD-5 は 6xHis-リコンビナント蛋白より小さい分子として精製された。

HD-5 と proHD-5 を用いてディフェンシン高感受性の *Salmonella typhimurium* phoP-null に対する抗菌活性を測定した。HD-5、proHD-5 ともに 10  $\mu$ g/ml の濃度で  $10^3$  CFU 減少させる強い抗菌活性を示した。一方、ヒト上皮細胞のモデルとして用いた大腸癌細胞株には、最大 100  $\mu$ g/ml の濃度まで細胞毒性は認めなかった。

次に、ヒト上皮細胞に対するサイトカイン刺激作用を、抗体アレイを用いて検討した。ヒト大腸癌細胞株 HT29 からはディフェンシンの添加の有無にかかわらず interleukin (IL) -8、growth-regulated oncogene の分泌が見られた。更に、IL-8 の分泌刺激作用について ELISA を用いて検討した。HT29、SW480 両細胞株で、HD-5 は濃度依存性に、IL-8 発現を誘導した。一方、proHD-5 添加では、HD-5 と比較して IL-8 の発現はみられなかった。IL-10 分泌は微量で両細胞株の発現に差はなかった。

## 考 案

本研究では、HD-5 と proHD-5 がサルモネラ菌に対して抗菌活性を示し、生理的濃度である 100  $\mu$ g/ml までは、ヒト腸管上皮細胞に対して細胞毒性を認めなかった。活性化マウスディフェンシンをもたない matrix- metalloprotease-7 欠損マウスや、ヒトの HD-5 遺伝子を Paneth 細胞に強制発現させたマウスでの *in vivo* の実験で、腸管ディフェンシンが小腸の自然免疫機構の主要な役割を果たすことが明らかである。今回の実験結果からも Paneth 細胞からの分泌後の proHD-5 が、活性化の過程を経ずに抗菌活性を保持し、細菌感染防御に貢献していることが明らかとなった。

IL-8 は、炎症に最も重要なケモカインの一種であるが、ELISA を用いた腸管上皮細胞からの IL-8 分泌の検討では、HD-5 の濃度依存性に発現が誘導された。ProHD-5 は IL-8 発現を誘導せず、HD-5 活性化の過程が IL-8 を介した獲得免疫の誘導には必須であると考えられた。また、HD-5 は tumor necrosis factor- $\alpha$  と相互作用し IL-8 の発現を誘導することが報告され、HD-5 単独ではなく他のサイトカインとともに腸管免疫機構の調整を担っていると考えられる。

従って、Paneth 細胞由来の HD-5 を介した腸管の自然免疫機構の破綻は、クローン病や潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患の病態とも関連があると考えられている。今後の炎症性腸疾患の治療への応用が期待される。

## 結 論

HD-5 と proHD-5 はともに生理的濃度で抗菌活性を示したが、ヒト腸管上皮細胞に対して細胞毒性を認めなかった。

ProHD-5 は活性化 HD-5 となり、他のサイトカインと相互作用し IL-8 の発現誘導などを行うことで、獲得免疫を惹起する能力を獲得すると考えられた。

## 引 用 文 献

Bevins CL. Events at the Host-Microbial Interface of Gastrointestinal Tract V. Paneth cell  $\alpha$ -defensins in intestinal host defense. *Am J Physiol*. 2005; **289**: G173-6

Leeuw E, Burks SR, Li X, Kao JPY, Lu W. Structure-dependent functional properties of human defensin 5. *FEBS Letters*. 2007; **581**: 515-20.

Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2(CARD15) mutations in Crohn' s disease are associated with diminished mucosal  $\alpha$ -defensin expression. *Gut*. 2004; **53**: 1658-64.

### 参 考 论 文

Porter EM, Liu L, Oren A, Anton PA, Ganz T. Localization of Human Intestinal Defensin 5 in Paneth cell Granules. *Infect and Immun*. 1997; **65**: 2389-95.

Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal  $\alpha$ -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol*. 2000; **1**: 113-8.

Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, Lopetz-Boado YS, Stratman JL, Hultgren SJ, Matrisian LM, Parks WC. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*. 1999; **28**: 113-117.

Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature*. 2003; **422**: 522-6.

Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr., Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell  $\alpha$ -defensins in ileal Crohn' s disease. *Proc Nat Acad Sci*. 2005; **102**: 18129-34

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	石 川 千 里
<u>審査委員長 立 野 正 敏</u> <u>審査委員 葛 西 眞 一</u> <u>審査委員 若 宮 伸 隆</u> <u>審査委員 高 後 裕</u>			
<h3 style="margin: 0;">学 位 論 文 題 目</h3> <p style="margin: 10px 0 0 40px;">ヒト Paneth 細胞デフェンシンは抗菌活性をもつプロペプチドとして分泌され、活性化された後に interleukin-8 分泌誘導能を獲得する</p>			
<p>デフェンシンは、18 から 45 個のアミノ酸からなり、内部に 3 個のジスルフィド結合を有する短鎖ポリペプチドである。ヒトでは、広範な抗菌活性を有することが知られている。ヒト デフェンシンは <math>\alpha</math>、<math>\beta</math> の 2 つのデフェンシンが存在し、<math>\alpha</math> には Human neutrophils peptide (HNP)-1 から 4 と、腸管上皮細胞に存在する Human defensin (HD)-5.6 の 6 種類が存在する。HD-5 は Paneth 細胞下流の抗菌活性の大半を占めている。HD-5 は、前駆体 proHD-5 の形で、Paneth 細胞の顆粒に蓄えられ、種々の刺激によって、顆粒が分泌されると、腺窩内のトリプシンによって活性化され、抗菌作用を呈すると考えられている。</p> <p>論文提出者である石川氏は、大腸菌を用いてリコンビナント proHD-5 を作成し、その抗菌活性と腸管上皮細胞との相互作用を検討するモデルを用い、proHD-5 のサイトカイン分泌誘導能について、HD-5 との比較検討を行った。実験結果として、大腸菌由来リコンビナント proHD-5 は HD-5 とほぼ同様の抗菌活性を持つことを明らかにした。また、腸管上皮細胞では、サイトカイン抗体アレイを用いた解析では顕著な結果は得られなかったが、腸上皮由来培養細胞の培養上清中のサイトカイン産生を ELISA 法で検討すると、IL-8 分泌を誘導する能力があることが明らかになった。一方、IL-10 分泌に関しては優位な誘導能は認められなかった。</p> <p>これらの研究結果は、HD-5 や proHD-5 が抗菌活性ばかりではなく、IL-8 の発現誘導などによって腸管の免疫機構において自然免疫と獲得免疫との橋渡しをする重要な抗菌ペプチドであることを示した。従来の研究から defensin 分泌低下と並行した Th1 型優位のサイトカイン環境の成立が、難治性腸疾患の進展に関わることが提唱されており、リコンビナント HD-5 が抗菌ペプチド治療に応用可能なことを示した非常に重要な知見であり、本研究分野の発展に寄与するものであると考えられる。</p> <p>また、諮問審査においても非常に適切で論理的な回答がなされ、関連する分野においても十分な知識を有していることを確認した。</p> <p>以上の結果から、申請者の論文が医学博士の学位に値するものと判定した。</p>			