

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	金野陽高
学位論文題目			
必須アミノ酸 isoleucine による human β defensin 2 誘導に関する研究			
未公表			
研究目的			
<p>粘膜上皮における自然免疫機構を担うものの一つとして内因性抗菌ペプチドである defensin が知られている。大腸粘膜より分泌される human β defensin 2 (HBD2) は通常の状態では発現しておらず、何らかの刺激で腸管上皮細胞に発現が誘導されるが、その誘導因子の解明は未だ研究途上である。HBD2 の発現は、細菌由来の LPS や炎症惹起性サイトカインである TNF α、IL-1 α などが、MAPK 経路を介して誘導することが報告されているに過ぎない。</p> <p>一方、難治性炎症性腸疾患であるクローン病の病因については未だに解明されていないが、細胞内の病原菌受容体の一つと考えられる NOD2 蛋白の遺伝子変異がクローン病の発症に関わっているという報告や、本症において小腸粘膜の Paneth 細胞から放出される α-defensin の分泌の低下があきらかになっており [1]、自然免疫機構の低下が想定されている。HBD とクローン病との関与については明らかではないが、クローン病患者において大腸粘膜からの HBD 分泌が低下している可能性が報告されており、クローン病は一種の自然免疫不全状態とも考えられ、これを改善することがクローン病治の有効な治療手段になる可能性がある。</p> <p>この観点から、炎症や感染など生体へ悪影響を与える要因以外の HBD2 の誘導因子はクローン病の治療薬として有望であると考えられる。2000 年に Fehlbauer らは、必須アミノ酸である Isoleucine (Ile) がウシ腎由来細胞を用い、β-defensin の inducer となる可能性を示した [2]。本研究では Ile が HBD2 を発現誘導する活性があるか否か、また必須アミノ酸である Ile がどのように細胞内にシグナルを伝達するのかについて明らかにすることを目的とした。Ile の受容体としては、アミノ酸であるグルタミン酸の G-protein coupled receptor (GPCR) 型受容体である mGluR (metabotropic glutamate receptor) が消化管粘膜に発現していることから、同様の GPCR の存在を想定し検討を行った。</p>			
材料・方法			
培養細胞株			
本研究はヒト大腸上皮細胞培養株 CaCO2 を用いて実験した。			
HBD2 mRNA の発現誘導と定量			

6穴のプレートでCaCO₂細胞を培養後、IleあるいはIL-1 α またはIleとIL-1 α 同時に各最終濃度で添加、10時間培養した後RNAを採取した。HBD2 mRNAの定量は、3.5 μ gのtotal RNAを鋳型として逆転写反応を行いcDNAを作成したのち、realtime-PCR反応を行い発現量を定量した。

HBD2 蛋白の定量

種々の培養条件の細胞からタンパクを回収し材料とした。材料中に含まれるHBD2の濃度の測定にはHuman BD-2 ELISA Development Kitをprotocolに従って使用した。

細胞内シグナル伝達経路の解析

ERK経路の阻害剤であるPD98059を各濃度で培養細胞に添加し2時間培養後、HBD2の発現誘導を行って前述と同様にRT-PCRで阻害効果を検討した。Western blot法は、培養したCaCO₂細胞に各種inducerを加えて培養した後、蛋白を回収した。抽出した蛋白を電気泳動し、membraneに転写した。1次抗体にはAnti-rabbit p44/p42 phospho または total-ERK antibodyを、2次抗体にはHRP-conjugated rabbit anti-mouse IgGを使用して化学反応法により検出した。

Ile レセプターの解析

GPCRのGiサブユニット阻害剤であるPertussis toxin (PTX)を各濃度で添加し16時間培養した後、IleのHBD誘導活性についてRT-PCRで検討した。細胞内カルシウム濃度[Ca²⁺]の変動については、共焦点レーザー倒立顕微鏡を用い、蛍光色素法による蛍光強度の経時的変化を測光して解析した。

成 績

1. CaCO₂ cellにおけるIle投与によるHBD2mRNA発現量の変化

細胞通常の状態ではCaCO₂にHBD2 mRNAは発現しておらず、Ileを種々の濃度で培養液に添加し、24時間培養後でもHBD2mRNAの発現は誘導されなかった。HBD2のinducerとして報告のあるIL-1 α を培養液に添加するとHBD2 mRNAの発現が誘導された。IL-1 α の添加により濃度依存性にHBD2のmRNA発現量は増加し、そのピークは培養開始後10時間であった。IL-1 α によるHBD2 mRNAの発現誘導に対するIleの影響を解析した。その結果、IL-1 α とIleの同時投与ではIL-1 α 単独に比較し、有意にHBD2のmRNA発現量が増加した。

また、細胞質に含まれるHBD2蛋白量を測定した。IL-1 α , IL-1 α とIleの同時投与では、有意にHBD2反応性が無刺激に比較し高値を示し、転写の亢進が蛋白産生の増加を生じていることが示唆された。

2. HBD2 mRNA発現量増加に関与する細胞内シグナル伝達経路の解析

MEK1選択阻害剤PD98059を添加し、2時間培養後IL-1 α による刺激を行った。HBD2 mRNAの発現量はPD98059濃度依存性に最大60%低下しており、MEK-ERK経路がHBD2の発現誘導に関与している可能性が示された。

シグナル伝達経路の活性化の有無をp44/42 (ERK1/2)のリン酸化を指標としてWestern Blot法により解析した。IL-1 α は刺激開始後10分から15分後でリン酸化p44/42が増加し、30分後には刺激前の状態に戻った。一方Ileを単独で添加した場合、30秒後にはリン酸化p44/42が増加したが、10分後には刺激前と同様の状態に戻った。IL-1 α とIleの同時投与では投与5分後にリン酸化p44/42が

増加し、IL-1 α 単独刺激時と同様に30分後に不活化した。このことからIL-1 α 、IleともにERKのリン酸化を誘導し、その両者を同時に添加した場合は相加的な作用でERK経路の活性化の持続時間が長くなることが考えられた。

3 .L-Isoleucineの刺激伝達経路の解析

CaCO₂にPTXを各濃度で添加し16時間後にIL-1 α (50ng/ml)とIle (10 μ g/ml)を添加した。PTXの濃度依存性にHBD2mRNA発現誘導量は低下し、IL-1 α 単独添加時と同様のレベルまで低下した。

Ileの添加による細胞内Ca²⁺濃度の変化をFluo-4/AM標識とコンフォーカル顕微鏡を用いた測光で計測した。一部の細胞でIle添加の直後にCa²⁺濃度上昇を認めた。これらの結果からCaCO₂細胞においてIleによりHBD2発現量の増加が誘導される過程では、何らかのGPCRが関与していること可能性が示唆された。

考 案

以上の解析から、腸管上皮細胞において必須アミノ酸であるIleはIL-1 α で誘導されるHBD2の産生誘導をMAPK経路の活性化により増強する作用を有していること、この活性はG proteinの特異的抑制剤であるPTで消去されることからGPCRを介している可能性が高いことが示された。従来の報告では、大腸上皮細胞においては細菌菌体やLPSやPGNなどの菌体成分でToll like receptor (TLR)を介するHBD2の誘導が認められており、また、炎症性サイトカインであるIL-1 α 、IL-1 β +TNF- α の組み合わせがHBD2発現誘導物質であると報告されている。一方、GPCRを介する抗菌物質の誘導も報告がある。また、*S. enteritidis*由来のFliCによるCaCO₂ cellからのHBD2分泌がCa²⁺濃度の上昇を伴うことを報告している。今回の解析結果およびこれらの報告から、生体内に広く分布する様々な細胞における抗菌物質の発現誘導には、TLRやサイトカイン受容体系のみならず、GPCR系の関与による調節系が存在することを示している。

近年の報告では、ある種のGPCRにおいて、リガンド結合によりGiサブユニットと結合していたG $\beta\gamma$ サブユニットが関与してMAPKシグナルを活性化するとされている[3]。HBD2発現経路においてMAPKは重要な役割を有し、IL-1 α はSrc-Raf-MEK1/2-ERK1/2のMAPK経路を活性化し、これがHBD2発現に寄与するとされている。腸管上皮細胞を用いた我々の実験でもIL-1 α によるHBD2の発現誘導は、ERKがリン酸化されて活性化され、またERKの阻害剤によりHBD2発現量が低下することからERKが主要な経路となっていると考えられた。一方Ile添加によってもERK経路がより早い時間軸で活性化され、これがIL-1 α のHBD2発現誘導を相加的に増強したと考えられた。今後、培養細胞におけるGPCRの発現とIle投与によるメッセージの変化を解析しIleの受容体解明につなげたいと考える。

Ileは炎症が若起された状態でのみ抗菌物質分泌に関与する可能性があることや、必須アミノ酸であり副作用の可能性がないという点も、今後の創薬開発や臨床応用に有利であると考えられた。

結 論

腸管上皮細胞においてIleはIL-1 α で誘導されるHBD2の産生誘導をMAPK経路の活性化により

増強する作用を有していること、この活性は G protein の特異的抑制剤である PT で消去されることから GPCR を介している可能性が高いことが示された。

引用文献

- [1] 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 Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 18129-34.

- [2] Pascale Fehlbaum, Meena Rao, Michael Zasloff, and G. Mark Anderson. An essential amino acid induces epithelial β -defensin expression. PNAS 2000; 97: 12723-12728.

- [3] Louis M. Luttrell, Gregory J. Della Rocca, Tim van Biesen, Deirdre K. Luttrelli, Robert J. Lefkowitz. G $\beta\gamma$ Subunits Mediate Src-dependent Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor. A Scaffold for G protein-coupled Receptor-Mediated Ras Activation. J Biol Chem 1997; 272: 4637-44.

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	金野 陽高
<p style="text-align: right;">審査委員長 若 宮 伸 隆 ㊞</p> <p style="text-align: right;">審査委員 高 後 裕 ㊞</p> <p style="text-align: right;">審査委員 河 野 透 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>必須アミノ酸 isoleucine による human β defensin 2 誘導に関する研究</p>			
<p>現在免疫は、特異性とメモリーを特徴とする獲得免疫とパターン認識を特徴とする自然免疫の2つに分類されている。自然免疫に関わる因子の中で抗菌ペプチドは、下等生物から保存された重要な因子で、特に腸上皮では、Panethから defensin が分泌されることが明らかにされている。さらに近年、α-defensin による抗菌活性の低下が cystic fibrosis の病因や新生児における壊死性腸炎において小腸の α-defensin の低下が疾患の病態形成に重要な因子であることが想定されている。それに比して、大腸では、β-defensin の分泌が明らかになっている。さらに、クローン病では、その病態形成に本 β-defensin が関与するとする報告が近年なされている。</p> <p>本学論文提出者の金野は、必須アミノ酸である isoleucine (Ile) が、β-defensin である HBD1 遺伝子の誘導因子である性質に着目し、Ile の他の β-defensin である HBD2 の発現誘導やそれらの発現誘導のメカニズムの解析を行った。</p>			

実験結果として、

1. Caco-2 細胞における Ile 単独 による HBD2 mRNA の誘導は、起こらない。
2. Caco-2 細胞において、IL-1 α とともに、Ile 添加すると HBD2 mRNA 誘導が起こる。
3. 上記の HBD2 誘導は、タンパク質レベルでもその増加が認められた。
4. Caco-2 細胞における ERK のリン酸化は、IL-1 α では10分後からおこり、Ile では、より早期の30秒から起こる。さらに、両者の添加では5分から ERK 経路の活性化がおこり、30分まで活性化が継続した。
5. Caco-2 細胞において、Ile 投与により、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を認めた。IL-1 α と Ile の同時投与による HBD2 mRNA の誘導の亢進は GPGR の阻害薬である pertussis toxin 投与により、抑制された。

腸管上皮細胞において、必須アミノ酸 Ile は、IL-1 α で誘導される HBD2 の産生を、MARK 経路の活性化に関連して増強することを明らかにし、さらにその誘導に GPGR が関与する可能性を提示した。これらの研究成果は、炎症性腸疾患や感染性腸疾患における defensin 研究に新たな知見を付与するものであり、本分野の研究発展に寄与するものと考えられる。

また、試問審査においても、非常に適切で論理的な回答がなされ、関連する十分な知識を有していることを確認しました。

以上の結果から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。