

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者炎症性・難治性肺疾患における病態分子機序の解明  
および新治療法開発の戦略的展開に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長瀬 隆英

平成15（2003）年 3月

## 目 次

I. 統括研究報告書		
高齢者炎症性・難治性肺疾患における病態分子機序の解明	-----	1
長瀬 隆英		
II. 分担研究報告		
1. 高齢者炎症性肺疾患におけるdefensinの役割に関する研究	-----	15
栗原 裕基		
2. 脂質メディエーターに関する分子生物学的解析	-----	26
石井 聡		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	40

# 厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

## 総括研究報告書

### 高齢者炎症性・難治性肺疾患における病態分子機序の解明

主任研究者 長瀬隆英 東京大学医学部 講師

#### 研究要旨

老年者における重症肺感染症（特に嚥下性肺炎）、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などは、炎症を主体とする病態であり、治療の困難さや発症頻度から、社会的にも極めて重大な疾患群である。これらの炎症性肺疾患発症機序は未だに不明確であるため、有効な治療法、治療薬も存在せず、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、近年、その生理学的意義が注目されている 1) 脂質性メディエーター、2) 抗菌ペプチド、および3)CGRP ファミリーなどに着目し、老年者炎症性肺疾患発症との関連を探索した。その結果、以下の新知見が得られた。

1) 肺線維症の発症分子機構は不明であるが、炎症性メディエーターの関与が推察されている。本研究により、アラキドン酸カスケードの起点となる cPLA<sub>2</sub> が、肺線維症の発症機序に重要であることが明らかとなり、治療標的となる可能性が示唆された。

2) cPLA<sub>2</sub> 阻害作用のある arachidonyl trifluoromethyl ketone (ATK) の投与により、敗血症モデルの肺水腫・呼吸不全が改善し、cPLA<sub>2</sub> 阻害薬がARDSの治療候補薬となることが示唆された。

3) LPS による hBD2 発現を検討したところ、転写因子 (AP-1, NFκ-B) が hBD2 誘導・発現に必須であること、および steroid が hBD2 誘導・発現を減弱することなどが明らかにされた。

4) マウス筋肉、およびヒト・マウス精巣上体に発現する新しい beta defensin を発見した。

5) CGRP 遺伝子欠損マウスを用いた検討により、内因性 CGRP の存在が気道過敏性発症に関与することが示された。

以上の知見は、難治性の老年者呼吸器系炎症性疾患に対する新しい治療薬開発の実現化に寄与することが期待される。

#### A. 研究目的

##### 分担研究者

栗原裕基・熊本大学発生医学研究センター教授

石井 聡・東京大学大学院医学系研究科助手

老年者における重症肺感染症（特に嚥下性肺炎）、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などは、炎症を主体とする病態であり、治療の困難さや発症頻度から、

社会的にも極めて重大な疾患群である。これらの炎症性肺疾患発症に関しては、種々の化学物質が複雑に関与していると考えられ、TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8等のサイトカインなどが関与している可能性が報告されている。しかし、サイトカイン以外のメディエーターとの関連については、十分な検討がなされていない。また、治療の標的が不明確であるため、有効な治療法、治療薬も存在せず、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、近年、その生理学的意義が注目されている 1) 脂質性メディエーター、2) 抗菌ペプチド、および3) CGRPファミリーなどその他のメディエーターに着目し、老年者炎症性肺疾患発症との関連を探索する。

### 1) 脂質性メディエーター：

脂質性メディエーターであるプロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどはエイコサノイドと総称され、アラキドン酸を起点とする代謝経路の代謝産物である。アラキドン酸は、炭素数20よりなる構造をもち、生体ではリン脂質から細胞質型ホスホリパーゼA<sub>2</sub>(cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>)によって切り出される。この際に、同時にリゾPAF(lyso-PAF)が生成され、リゾPAFから血小板活性化因子(platelet-activating factor, PAF)が作られる。アラキドン酸は、図1に示すように、アラキドン酸カスケードと呼ばれる代謝経路を経て様々なエイコサノイドを生成する。その2つの大きな経路が、シクロオキシゲナーゼ(cyclooxygenase, COX)系および、5-リポキシゲナーゼ(5-lipoxygenase, 5-LO)系である。プロ

スタグランジン、トロンボキサンはシクロオキシゲナーゼ系の代謝物であり、ロイコトリエンは5-リポキシゲナーゼ系の代謝物である。

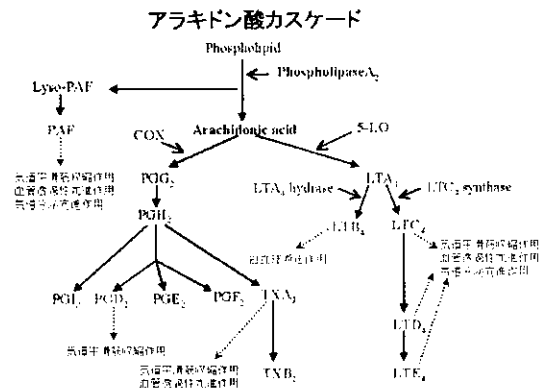


図1 アラキドン酸カスケードの模式図

アラキドン酸カスケードの代謝産物であるエイコサノイドは、ごく微量で多彩な生理活性作用を呈するのが特徴である。呼吸器系においても、エイコサノイドは極めて重要な生理的意義を有することが示唆されている。例えば気管支喘息は、気道平滑筋収縮、血管透過性亢進、血管拡張等による気管支収縮を主体とする病態であり、種々の化学物質が複雑に関与していると考えられるが、近年、特にトロンボキサン、ロイコトリエンなどのエイコサノイドが重要な発症因子とされ、有効な治療標的となりつつある。

PAFおよびエイコサノイドは、その生理活性作用より、炎症性肺疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が推察されるが、未だに検証されていない。本研究では、発生工学的手法を応用し、脂質性メディエーターの炎症性肺疾患発症機序における重要性について検討する。特に、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などにおける、PAFおよびエイコ

サノイド関連遺伝子の意義を明らかにする。さらに、a) 白血球遊走に関与するロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 受容体の遺伝子ノックアウトマウス、b) PAF およびエイコサノイド関連遺伝子のダブルノックアウトマウスを新たに作成し、解析・検討を行う。以上を総括して、治療の標的を明確にし、有効な治療法、治療薬の開発および実用化を目的とする。

## 2) 抗菌ペプチド：

近年、生体における感染防御機構の一環として、抗菌ペプチド defensin の存在が注目されている。ヒトでは、抗菌ペプチドとして alpha-defensin (6 種類) および beta-defensin (4 種類) が発見されており、その抗菌作用によって感染防御に関与していることが想定される。特に、最近発見された human beta-defensin-2 (hBD2) および hBD3 は、皮膚や呼吸器系に存在し、細菌・真菌感染や TNF $\alpha$  等の炎症性サイトカイン刺激によって誘導・産生され、感染防御および炎症調節機序に重要な役割を果たしている可能性が考えられる (*Nature* 1997, *J Biol Chem* 2000)。さらに、この hBD2 は、ケモカイン CCR6 を介して T cell を遊走させ、免疫機序活性化にも関与することが報告されている。高齢者肺炎をはじめとする炎症性呼吸器疾患においては、感染症が重要な病態悪化因子となっており、defensin を含めた感染防御機構および炎症成立機序の解明が研究推進上、必須と考えられる。本研究では、抗菌ペプチド defensin の炎症性呼吸器疾患発症分子機構への関与について検討を加える。さらに、遺伝子工学的アプローチによって、defensin の未知の機能および生体調節への関与に

ついて探索する。

## 3) CGRP ファミリー：

近年、炎症を促進あるいは抑制する生理活性因子として、エンドセリン-1 (endothelin-1, ET-1)、アドレノメデュリン (adrenomedullin, AM)、calcitonin gene-related peptide (CGRP) などのペプチドが注目されている。ET-1 は、炎症促進、血管・気管支平滑筋収縮、エイコサノイド産生、サイトカイン産生刺激能を有することが報告されている (T.Nagase. *Am. J. physiol.* 1995)。一方、CGRP は、炎症抑制、血管・気管支平滑筋の拡張・弛緩作用を有しており (T.Nagase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996)、アドレノメデュリンも同様の血管平滑筋拡張・弛緩作用が報告されている。CGRP およびアドレノメデュリンは、受容体を共有することが報告されており、CGRP ファミリーと呼ばれるペプチド群に属している。CGRP およびアドレノメデュリンは、気管支喘息の発症メカニズムに重要な役割を担っている可能性が考えられるが、国内・海外において未だ十分な検討がなされていないのが現状である。生理活性作用を有する循環ペプチドは、気管支喘息などの治療薬開発の標的としても画期的な系であると考えられる。

本研究では、この CGRP およびアドレノメデュリン遺伝子の気管支喘息発症機序への関与について探索する。CGRP は 37 アミノ酸残基より構成され、循環器・神経系を中心に多彩な作用を有することが知られている。肺・気管支には CGRP を含む感覚神経 C-fiber が豊富に存在し、また receptor も豊富に存在することが報告されている。従って、気道過敏

性発症機序に関与する可能性が想定されるが、未だ十分に検討されていない。最近、CGRP 遺伝子欠損マウスが作成され(Oh-hashii. *Circ. Res.* 2001; 89: 983-990)、CGRP が循環動態に重要であることが報告されている。本研究では、この CGRP 遺伝子欠損マウスを用いて、CGRP の気道過敏性発症機序への関与について検討を加える。

＜本研究の意義＞ 脂質性メディエーターや抗菌ペプチドは、呼吸器系炎症の発症・制御に寄与している可能性が高く、治療薬開発の標的として有望であることが期待される。本研究成果は、難治性の老年者呼吸器炎症性疾患に対する新治療薬開発の実現化に寄与することが予想される。本研究は、1)難治性炎症性疾患の病態解明、2)ゲノム創薬、を志向した独創的なものであり、高齢者炎症性肺疾患治療の戦略的開発展開を目指している。社会的重要性の高い高齢者炎症性肺疾患に対する治療薬開発は、社会医学・医療福祉・医療経済的にも莫大な貢献をなすものであり、厚生行政に寄与することが期待される。

## B. 研究方法

### 1) 脂質性メディエーター：

＜transgenic/knockout mouse の作成＞ 本研究では、発生工学的技術を用いて作成した遺伝子ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスを使用する。PAF 受容体に関しては、本研究者らが、PAF 受容体遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウス (PAF receptor

overexpression transgenic mouse, 以下 PAFR-Tg マウス) の作成に成功した (S.Ishii, T.Nagase, *EMBO J.* 1997)。また、ジーンターゲットングの手法を用いて、PAF 受容体遺伝子ノックアウトマウス (PAF receptor knockout mouse, 以下 PAFR-KO マウス) も作成した (S.Ishii, K.Kume, T.Nagase, *J.Exp.Med.* 1998)。一方、エイコサノイド関連遺伝子として、細胞可溶性フォスホオリパーゼ A<sub>2</sub>(cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, 以下 cPLA<sub>2</sub>) 遺伝子に着目した。cPLA<sub>2</sub> はアラキドン酸産生に関わる酵素であるため、全てのエイコサノイド産生を規定している。本研究者らは、ジーンターゲットングにより、cPLA<sub>2</sub> 遺伝子ノックアウトマウス (以下 cPLA<sub>2</sub>-KO マウス) を作成し、細胞レベルにおいて、エイコサノイドを産生しないことを確認した (N.Uozumi, K.Kume, T.Nagase, et al. *Nature* 1997)。さらに、本研究の共同研究者 (清水) らは、世界ではじめてロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 受容体のクローニングに成功し (*Nature* 1997)、現在、LTB<sub>4</sub> 受容体遺伝子ノックアウトマウス (以下 LTB<sub>4</sub>R-KO マウス) の作成に着手している。

本研究では、PAFR-Tg、PAFR-KO、cPLA<sub>2</sub>-KO マウスを用いて、PAF 受容体遺伝子発現および cPLA<sub>2</sub> 遺伝子発現と炎症性肺疾患との関連について評価・検討を加える。また、LTB<sub>4</sub> が、白血球を遊走・賦活化することにより炎症メカニズムに関与する可能性が考えられるため、LTB<sub>4</sub>R-KO マウスを完成させ、LTB<sub>4</sub> 受容体遺伝子の疾患への寄与度を検索する。＜炎症性肺疾患における PAFR, cPLA<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> 遺伝子発現の関与＞ 炎症性肺疾患モデルとして、ARDS、特発性間質

性肺炎、気管支喘息の動物モデルを用いる(T.Nagase, *J.Clin.Invest.* 1999; T.Nagase, *Nature Immunology* 2000)。老若マウス各群に、塩酸気管内投与 (ARDS)、ブレオマイシン気管内投与 (特発性間質性肺炎)、抗原感作 (気管支喘息) などの処置を行い、生理学的、生化学的、免疫組織化学的、分子生物学的検討により、PAFR, cPLA<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> 遺伝子発現と炎症性肺疾患の関係について評価・検討を加える。PAF受容体、LTB<sub>4</sub>受容体および cPLA<sub>2</sub> 遺伝子発現が、特異的もしくは相互的に発症機序に寄与することが明らかになった場合、アンタゴニストなどの治療的アプローチ研究を進展させる。

## 2) 抗菌ペプチド :

＜未知の defensin の探索＞ マウスを中心に、未発見の defensin を探索する。defensin 遺伝子は、クラスターを形成して存在することが推測されており、mBD1-6 遺伝子の近傍をスクリーニングし、未知の defensin 遺伝子を同定する。また、ヒトゲノム情報を参考に、マウス defensin に相同する未知のヒト defensin を探索し、発見された場合は、抗菌活性を含め生理学的意義を検討する。

＜炎症性呼吸器疾患発症への関与＞ 炎症性肺疾患モデルとして、細菌感染、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息の動物モデルを用いる。老若マウス各群に、細菌気管内投与 (肺炎) 塩酸気管内投与 (ARDS)、ブレオマイシン気管内投与 (特発性間質性肺炎)、抗原感作 (気管支喘息) などの処置を行い、defensin 遺伝子発現と炎症性肺疾患の関係について評価・検討を加える。

## ＜mBD transgenic/knockout mouse の作

成＞ マウス beta defensin の生理的機能を解明するため、mBD transgenic mouse および knockout mouse の作成に着手する。未知の遺伝子改変マウスであり、生存個体を得られるか否か不明であるが、1) もし重大な奇形を生じた場合、胎生期の発生過程を追跡し、mBD 遺伝子の機能を解析する、2) 奇形・発育異常を呈さず、生存個体を得られた場合、全身臓器における生理学的機能の評価を行い、mBD 遺伝子の生体調節における意義を明らかにする。また、上記の炎症性肺疾患モデルを用いて集学的に検討を行う。

## 3) CGRP ファミリー :

Oh-hashii らによって確立された CGRP ノックアウトマウス (ホモ接合体) と、その littermate コントロールの野生型マウスを用いた。アレルギー性気管支喘息モデルとして、ovalbumin による抗原感作・吸入負荷を施行した。実験第 15 日に、気道反応性試験・気管支肺胞洗浄液サンプリング・肺組織サンプリングなどを施行した。

まず MCh 気道反応性を検討するため、MCh を aerosol 吸入投与し、反応性を検討した。

別群において、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) を採取・遠心分離し、細胞成分・上清を得た。また BALF の IgE、CysLTs (LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>)、TXB<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub> の指標)、ET-1 濃度を測定した。さらに肺組織のサンプリングと、CGRP に対する免疫組織染色を施行した。CGRP-immunoreactivity を評価するため、免疫組織染色の濃度を 0-4 に分けてスコアリングを行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、東京大学医学部動物実験施設内規に則して、動物愛護への配慮を最大限に行った。

C. 研究結果

1) 脂質性メディエーター :

<肺線維症モデル>

ブレオマイシンは、悪性腫瘍（特に精巣腫瘍など）に対する化学療法薬として臨床的に使用されているが、重大な副作用として薬剤性の肺線維症をきたすことが知られている。このことより肺線維症の動物実験モデルを作成する手法として、ブレオマイシン投与が頻用されている。今回われわれは、ブレオマイシン投与による肺線維症マウスモデルを確立し、cPLA<sub>2</sub>-KO マウス（ホモ接合体）を用いて、肺線維症成立機序における cPLA<sub>2</sub> の役割を検討した。

野生型マウスに、ブレオマイシンを気管内投与したところ、生理学的な肺の硬化、肺線維症に合致する病理組織所見（肺胞壁の肥厚、炎症性細胞浸潤、コラーゲン沈着）が認められた。また、気管支肺胞洗浄液中のトロンボキサン、ロイコトリエンが増加していた。一方、同様にブレオマイシンを投与された cPLA<sub>2</sub>-KO マウスでは、生理学的にも病理組織学的にも肺線維症様の諸症状が著しく軽減していた（図2）。気管支肺胞洗浄液中のトロンボキサン、ロイコトリエンは、ほとんど検出されなかった。以上の所見より、cPLA<sub>2</sub> が肺線維症の発症機序において決定的な役割を果たしている可能性が示唆された。

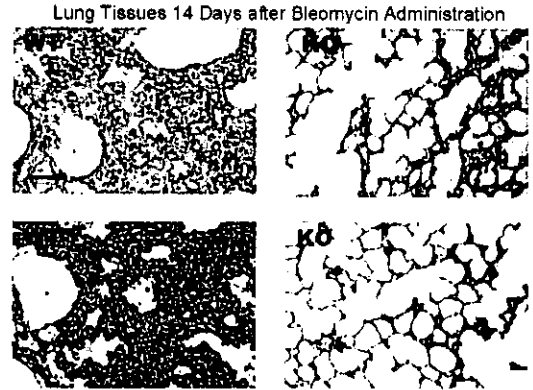


図2 ブレオマイシン気管内投与後の野生型マウス(WT) および cPLA<sub>2</sub>-KO マウス(KO)の肺組織所見(染色は、上段が HE, 下段が Masson's trichrome, scale bar = 50 μm). 野生型マウスでは、肺胞壁の肥厚、炎症性細胞浸潤、コラーゲン沈着が認められるが、cPLA<sub>2</sub>-KO マウスでは肺線維症様所見が著しく軽減している。

ちなみに、cPLA<sub>2</sub> の下流のメディエーターである PAF の関与についても、PAF 受容体ノックアウトマウス (PAF receptor knockout mouse, PAFR-KO マウス)を用いて検討した。その結果、PAFR-KO マウスでは、肺線維症様の諸症状が部分的に軽減していることが観察された。

<ARDS モデル>

敗血症性 ARDS モデルとして、C57BL6 マウスに LPS/zymosan の投与を行い、4 時間後に、呼吸不全・肺障害の進展度を検討した (Nagase, *Nature Immunology* 1:42-46, 2000)。cPLA<sub>2</sub> 阻害薬としては、アラキドン酸誘導体である arachidonyl trifluoromethyl ketone (ATK)を投与し、その効果をコントロール群と比較検討した。

ATK 非投与群では、LPS/zymosan の投与により著明な呼吸不全・肺障害を認め、saline 群に比べ有意に肺エラスタンスが



増加していた。一方、ATK を投与された LPS/zymosan 群は、ATK 非投与群と比べて有意に呼吸不全・肺障害・肺エラストランスが低下しており、ATK が ARDS 進展阻止に関わる可能性が示唆された(図 3, 4, 5)。

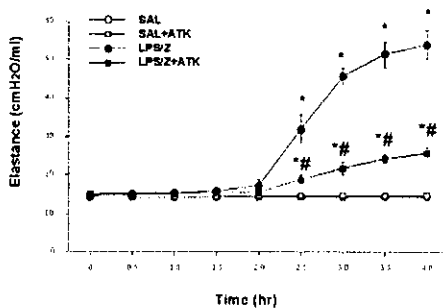


図3 LPS/zymosan 投与(zymosan は LPS 投与後 2h に投与)における肺エラストランスの経時的変化。ATK を投与された LPS/zymosan 群は、ATK 非投与群と比べて有意に肺エラストランスが低下しており、生理学的変化が軽度であることが示唆される。

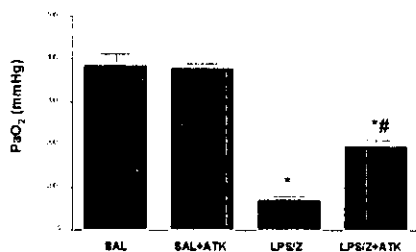


図4 LPS/zymosan 投与 ARDS モデルにおける動脈血酸素分圧 (PaO<sub>2</sub>)。ATK を投与された LPS/zymosan 群は、ATK 非投与群と比べて有意に呼吸不全が軽度である。

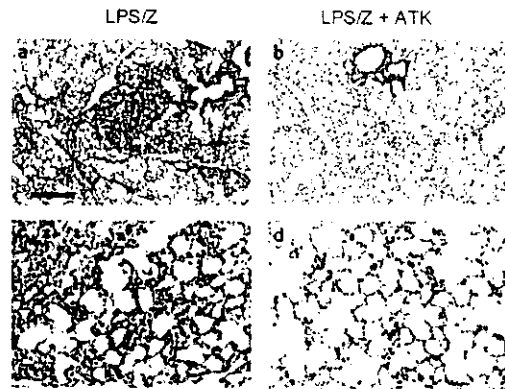


図5 LPS/zymosan 投与 ARDS モデルにおける肺組織所見。ATK を投与された LPS/zymosan 群は、ATK 非投与群と比べて有意に組織学的変化(炎症細胞浸潤や diffuse alveolar damage)が軽度である。HE 染色、scale bar = 200  $\mu$ m (a,b), 50  $\mu$ m (c,d)。

BALF 細胞分画解析において、LPS/zymosan 投与により著明な neutrophilia が認められたが、この neutrophilia は ATK 投与により有意に軽減していた。また、LPS/zymosan 投与群は、対照となる saline 群と比べて有意に TXB<sub>2</sub>、LTB<sub>4</sub>、CysLTs (LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>) が上昇していたが、ATK 投与群では、いずれも有意に低下していた。

#### <LTB<sub>4</sub>R-KO マウスの作成>

LTB<sub>4</sub>R-KO マウスの作成プロセスは順調に進展した。キメラマウスの中で、germ line にノックアウト DNA コンストラクトが移行したものを選び、ヘテロ接合体を得た。LTB<sub>4</sub> ノックアウトマウスについては、LTB<sub>4</sub> の生理的意義、治療応用において重要な知見が得られることが期待され、本研究グループと国外グループが激しく競合している状況にある。

## 2) 抗菌ペプチド：

<defensin の抗菌作用機序> hBD2 を中心に、defensin の抗菌メカニズムを探索した。defensin は、Na<sup>+</sup>の存在によって濃度依存的に抗菌活性を消失することが知られており、イオン環境が抗菌作用発現に重要と考えられる。今回、新たにCa<sup>2+</sup>など陽イオンの存在が、hBD2 抗菌活性を減弱することを明らかにした。

### <defensin の誘導・発現分子機構>

hBD2 の誘導・発現分子機構を、ヒト気道培養細胞を用いて検討した。hBD2-mRNA 発現等を指標として、LPS による hBD2 発現を検討した。その結果、1) 転写因子 (AP-1, NFκ-B) が hBD2 誘導・発現に必須であること、2) steroid が hBD2 誘導・発現を減弱すること、3) COX inhibitor は hBD2 誘導・発現に影響を与えないことを明らかにした。

<マウス defensin の探索> 新たに 6 番目のマウス beta defensin を発見し、mBD6 と命名、発表した。mBD6 は、筋肉に多く分布し抗菌活性を呈した。さらに、ヒトおよびマウスの精巣上体において特異的に発現する defensin (hBD5,6 および mBD11,12) を発見し、やはり抗菌活性を有することを報告した。本知見より、defensin の多彩な生理学的機能が推測される。

### <mBD transgenic/knockout mouse の作成>

Beta defensin の生理的機能を解明するため、mBD transgenic mouse および knockout mouse の作成に着手し、現在進行中である。

## 3) CGRP ファミリー：

MCh 気道反応性において、感作された

野生型群では、saline 群に比べ有意に肺抵抗・肺エラスタンスが増加していた。一方、感作されたノックアウトマウス群は、野生型群と比べて有意に肺抵抗・肺エラスタンスが低下しており、MCh 気道反応性が低下していることが示唆された (図6)。

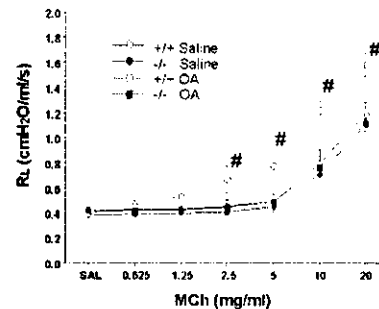


図6 Methacholine (MCh) 投与における肺抵抗の反応

MCh 吸入投与において、ovalbumin (OA) 感作・野生型群は、肺抵抗 (R<sub>L</sub>)が他群よりも有意に高い。OA 感作ノックアウトマウスは、saline (SAL) 群と同様の MCh 気道反応性を呈する。

#P<0.05 vs the other groups.

BALF 細胞分画解析において、感作により著明な eosinophilia が認められたが、野生型・ノックアウトマウス両群間において有意差は認めなかった。また両群間に BALF IgE 濃度の有意差は認めず、抗原感作レベルが同等であることが示唆された。BALF CysLTs (LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>)に関しては、感作された野生型群で、saline 群に比べ有意に上昇しており、本研究に用いたアレルギー性気管支喘息実験モデルにおいて肺内 CysLTs (LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>)が増加することが示唆された。一方、感作された

ノックアウトマウス群は、対照となる野生型群と比べて有意に CysLTs (LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>) が低下していた (図7)。

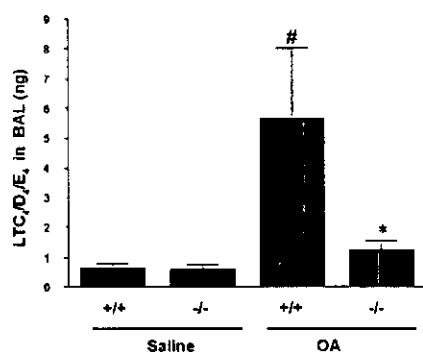


図7 BALF CysLTs (LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>) 濃度の測定結果

BALF CysLTs (LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>)は、ovalbumin (OA) 感作・野生型群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、感作ノックアウトマウス群は、対照となる感作・野生型群と比べて有意に CysLTs (LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>) が低下していた。

\*P<0.05 vs OA-sensitized wild type mice.  
#P<0.05 vs the saline groups.

一方、TXB<sub>2</sub>、ET-1 濃度においては、各群間に有意差を認めなかった。

中枢気道においては、野生型群で CGRP-immunoreactivity を認め、特に感作・野生型群において著明であった。一方、ノックアウトマウスでは、非感作・感作群のいずれにおいてもほとんど CGRP-immunoreactivity を認めなかった (図8)。



図8 中枢気道における CGRP 免疫組織染色

野生型群で CGRP-immunoreactivity を認め、特に感作・野生型群において著明である。一方、ノックアウトマウスでは、非感作・感作群のいずれにおいてもほとんど CGRP-immunoreactivity を認めない。(scale bar = 50 μm).

## D. 考察

### 1) 脂質性メディエーター： ＜cPLA<sub>2</sub> 遺伝子ノックアウトマウス＞

上述のように、PAF、プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどは、多彩な生理活性作用を有するメディエーターであり、呼吸器系炎症性疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が極めて高い。特に、cPLA<sub>2</sub>は、治療薬開発のターゲットとして有望であることが期待される。この cPLA<sub>2</sub> 遺伝子を破壊したノックアウトマウス (cPLA<sub>2</sub>-KO マウス) が、Uozumi らにより報告された。この cPLA<sub>2</sub>-KO マウスは、エイコサノイドおよび PAF をほとんど産生せず、感作後の抗原暴露時に出現するべき気道過敏性が消失していることが示された。な

お、雌 cPLA<sub>2</sub>-KO マウスにおいては分娩時に陣痛が出現しないことが観察された。一方、出生時形態的奇形を呈しておらず、発育・成長においてもコントロールの野性型マウスと比べ全く差を認めていない。すなわち、cPLA<sub>2</sub> の遺伝子-酵素系を完全に抑制し、アラキドン酸カスケードの産生を阻害しても、生体の発生・発育に重大な支障をきたさない可能性を呈示する。この知見は、治療薬の開発・実用化の見通しに寄与すると考えられる。また、cPLA<sub>2</sub>-KO マウスを用いて、敗血症 (LPS 投与) および胃液吸引 (塩酸気管内投与) モデルを作成したところ、いずれのモデルにおいても、ノックアウトマウスでは肺水腫、呼吸不全、好中球浸潤が抑制され、生存率が改善することが観察された (Nagase, *Nature Immunology* 1:42-46, 2000)。従って、ARDS 分子機序における cPLA<sub>2</sub> の重要な関与が示され、新治療法への展望が期待されている。

#### <肺線維症モデル>

肺線維症 (特発性間質性肺炎) は、特定疾患に指定されている難病である。病理学的には肺胞壁における炎症性細胞浸潤、線維芽細胞増生、コラーゲン沈着を呈する。また病態生理学的には、肺胞気と肺毛細血管の間のガス交換障害により、進行性の呼吸不全をきたすのが特徴である。本邦における肺線維症の有病率は10万人中2-3人とされているが、米国での疫学的研究では10万人中20-30人程度 (75歳以上では10万人中250人) という報告もある。平均生存年数は発症から約3年とされ、予後は極めて不良である。肺線維症に対して根本的に有効な治療薬剤は開発されておらず、治療としては保存的治療 (酸素療法) が行なわれている。

外科的には肺移植の選択肢もあるが、実施は極めて困難であるのが実情である。肺線維症の発症分子機構は不明であるが、肺胞壁における炎症促進機序が基盤に存在しており、炎症性メディエーターの関与が推察されている。

今回の実験結果より、cPLA<sub>2</sub> が肺線維症の発症機序において決定的な役割を果たしている可能性が示唆された (Nagase, *Nature Medicine*, 2002)。

なお、cPLA<sub>2</sub> の下流のメディエーターである PAF の関与について PAFR-KO マウスを用いて検討したところ、PAFR-KO マウスでは、肺線維症様の諸症状が部分的に軽減していることが観察された。一方、プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなど個別のエイコサノイドの関与については、未だ詳細ではなく今後の検討課題である。

肺線維症は、社会的にも極めて重大な疾患であり、治療薬の開発が切実に待たれている。その疾患発症機序において、エイコサノイドは極めて重要な生理的意義を有することが推察されている。今後、各々のエイコサノイドがもつ生理的意義・重要性が解明されることにより、肺線維症に対する有効な治療法・治療薬の開発および実用化が期待される。

#### <ARDS モデル>

ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrome、成人呼吸促迫症候群) は、1967年、Ashbaughらによって提唱された疾患概念であり、最近では急性肺損傷 (acute lung injury) に包含される病態である。ARDSは、発症後短時間で肺水腫、低酸素血症を呈する急性呼吸不全であり、頻度の高い誘発原因として敗血症、胃液誤嚥 (嚥下性肺炎)、外傷などが挙げられ

る。ARDSは、報告後30年以上を経た現在もなお死亡率が40-70%にも達する予後不良の疾患である。現在のところ、その治療は、人工呼吸管理、感染症対策といった対症療法が主体であり、有効性が実証された薬剤はない。ARDSの発症機序には、サイトカインなど種々の炎症関連物質が複雑に関与している可能性が報告されている。しかしながら、その分子機構は未だ明かではない。現在、ARDSの有効な治療法、治療薬の開発および実用化を目的として、様々な研究アプローチがなされており、研究面では、有望と思われる分子機序が報告されつつある。

例えば、エイコサノイドなどの脂質性メディエーターは、重要な炎症起因物質と想定され、ARDS発症の分子機構に寄与している可能性が推察される。

本研究では、敗血症(LPS投与)モデルを検討したが、cPLA<sub>2</sub>阻害薬としてのATK投与により、肺障害・呼吸不全が抑制されることが観察された。この知見は、cPLA<sub>2</sub>ノックアウトマウスと同等である。この本実験の観察結果より、ARDS分子機序におけるcPLA<sub>2</sub>の重要な関与が示され、新治療法への展望が見込まれる。

## 2) 抗菌ペプチド：

<defensinの抗菌作用発現機構> ヒトにおいてhuman beta defensin-2 (hBD2)が発見され、皮膚や呼吸器系において感染防御および炎症調節機序に重要な役割を果たしている可能性が報告されてから(Nature, 1997)、defensinは、感染防御機構の重要な構成因子として急速に注目されつつある。さらにhBD2が、ケモカイン

CCR6を介してT cellを遊走させ、免疫機序活性化にも関与することが報告され(Science 1999)、免疫学的にもその重要性が着目されている。しかしながら、defensinの抗菌メカニズムをはじめ、その発現機構は未だ解明されていない。たとえば、defensinは、Na<sup>+</sup>の存在によって濃度依存的に抗菌活性を消失することが知られており、イオン環境が抗菌作用発現に重要と考えられるが、生体内におけるdefensinの抗菌作用は全く未知であり、生体内イオン環境における抗菌活性の検討が必須である。また、TNFなどの炎症誘起性サイトカインがdefensinの誘導・産生に寄与することが報告されているが、その他の主要な炎症促進・制御メディエーター(エイコサノイド、PAFなど)のdefensinの誘導・産生への関与に関しては不明であり、現在、本研究グループが着手しつつある。

<新しいdefensinの発見> 2000年以降、マウスなどにおいて新しいdefensinが次々と発見され、GenBankのデータ上でも、新しいdefensinが次々と報告されている。本研究者が発見したmBD6(J Biol Chem 2001)は、従来との報告と異なっており、骨格筋に多量に存在することが報告された。さらに、ヒトおよびマウスの精巢上体において特異的に発現するdefensin(hBD5,6およびmBD11,12)を発見し、やはり抗菌活性を有することを報告した。本知見より、defensinの多彩な生理学的機能が推測される(詳細は、栗原裕基教授による分担研究者報告を参照)。

## 3) CGRPファミリー：

CGRPは気道収縮物質あるいは気道拡

張物質のどちらであるか、また、好酸球遊走能を持つかあるいは持たないか、ということに関してこれまで議論が行われてきたが、様々な報告が呈示され、結論は出ていなかった。今回の研究結果により、少なくとも内因性 CGRP は気道過敏性に関与すること、また好酸球浸潤に関わる可能性が低いことが示された。気管支喘息における気道炎症の発症機序に、炎症メディエーターなどの生理活性物質が関与すると考えられている。本研究の結果、TXB<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub> の指標)、ET-1 では実験各群で有意差を認めず、本実験モデルにおいて気道過敏性・気道炎症への関与は証明されなかった。一方、感作・抗原負荷された CGRP 遺伝子欠損マウスは、対照となる感作・抗原負荷野生型マウスに比べて有意に BALF CysLTs (LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>) が低下していることが観察された。これは、本実験に用いたアレルギー性気管支喘息モデルにおいて、内因性 CGRP の存在が CysLTs (LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>) の産生・代謝に関与することを示唆している。免疫組織学的検討では、野生型マウスの中枢気道において、CGRP immunoreactivity が観察されたが、ノックアウトマウスではほとんど CGRP-immunoreactivity を認めなかった。

以上、本実験による知見により、内因性 CGRP の存在が気道過敏性発症に関与することが示された。従って今後、CGRP 本体や、その機能発現に関わる系などが、気管支喘息の研究対象として拮がることが推察される。また、本研究で用いた CGRP 遺伝子欠損マウスは、CGRP が関与する呼吸器疾患の病態メカニズムの解明に寄与することが期待される。

### <本研究成果の重要性>

高齢者における炎症性肺疾患は、社会的に極めて重大な疾患となっている。特に、ARDS、特発性間質性肺炎は、難治性、致死性において他に類をみない程、重篤な疾患であり、治療薬の開発が切実に待たれている。肺炎や気管支喘息は、世界的にも発症頻度、死亡率が増大しつつあり、画期的な治療薬の開発が期待されている。これら炎症性呼吸器疾患の発症分子機構は、極めて複雑であり、より一層の研究が必要である。また、感染症が重要な病態悪化因子となっており、defensin を含めた感染防御の視点も必須と考えられる。

PAF およびエイコサノイド(プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエン)は、多彩な生理活性作用を有するメディエーターであり、気管支喘息やARDSなど呼吸器系炎症性疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が極めて高い。特に、アラキドン酸カスケードの起点となる酵素である cPLA<sub>2</sub> は、治療薬開発のターゲットとして有望であることが期待される。また、LTB<sub>4</sub> ノックアウトマウスからの知見により、LTB<sub>4</sub> の阻害薬が実用化されることも期待される。

以上より本研究の成果は、難治性の高齢者呼吸器系炎症性疾患に対する新しい治療薬開発の実現化に寄与することが予想される。

本研究の成果により、cPLA<sub>2</sub> や defensin などをはじめとして、炎症抑制治療の標的を明確にした場合、有効な治療法・治療薬の開発および実用化は近いと思われる。発生工学的手法を用いたアプローチは、難治性炎症性疾患の病態解明および未知の遺伝子機能解析において新しい視点を提供する独創的なものであり、本研究の成果は炎症性肺疾患治療の展開に重要な寄与をなすものと考えられ

る。また発生工学的技術を用いた研究は、薬剤開発のプロセスを短縮し、実用化に大きく寄与することが予想される。老年者における重症肺炎、ARDS、特発性間質性肺炎、難治性気管支喘息に対する治療薬の開発は、社会医学的にも医療福祉・医療経済的にも莫大な貢献をなすことが期待される。

#### E. 結論

1) 肺線維症は、呼吸不全をきたす難病であり、現在有効な薬剤が開発されていない。その発症分子機構は不明であるが、炎症性メディエーターの関与が推察されている。本研究により、アラキドン酸カスケードの起点となる cPLA<sub>2</sub> が、肺線維症の発症機序に重要であることが明らかとなり、治療標的となる可能性が示唆された。

2) cPLA<sub>2</sub> 阻害作用のある arachidonyl trifluoromethyl ketone (ATK) の投与により、敗血症モデルの肺水腫・呼吸不全が改善し、cPLA<sub>2</sub> 阻害薬がARDSの治療候補薬となりうる可能性が示唆された。

3) LPS による hBD2 発現を検討したところ、転写因子 (AP-1, NFκ-B) が hBD2 誘導・発現に必須であること、および steroid が hBD2 誘導・発現を減弱すること、さらに COX inhibitor は hBD2 誘導・発現に影響を与えないことが明らかにされた。

4) 新しい beta defensin を発見した。mBD6 は、筋肉に多く分布し抗菌活性を呈した。ヒトおよびマウスの精巣上体において特異的に発現する defensin (hBD5,6 および mBD11,12) を発見し、やはり抗菌活性を有することを報告した。

5) CGRP 遺伝子欠損マウスを用いた検

討により、内因性 CGRP の存在が気道過敏性発症に関与することが示された。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1). Nagase T, Uozumi N, Aoki-Nagase T, Terawaki K, Ishii S, Tomita T, Yamamoto H, Hashizume K, Ouchi Y, Shimizu T. A potent inhibitor of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, arachidonyl trifluoromethyl ketone, attenuates LPS-induced lung injury in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** (in press, published on line, 10.1152/ajplung.00396, Dec. 27, 2002).
- 2). Ohga E, Tomita T, Wada H, Yamamoto H, Nagase T, Ouchi Y. The effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8 and MCP-1. **J Appl Physiol** 2003; 94: 179-184.
- 3). Aoki-Nagase T, Nagase T, Oh-hashii Y, Shindo T, Kurihara Y, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Tomita T, Ohga E, Nagai R, Kurihara H, Ouchi Y. Attenuation of antigen-induced airway hyperresponsiveness in CGRP-deficient mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2002; 283: L963-L970.
- 4). Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in the humans and mice. **J**

- Immunol** 2002; 169: 2516-2523. ジウム), 2002.
- 5). Tomita T, Nagase T, Ohga E, Yamaguchi Y, Yoshizumi M, Ouchi Y. Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad). **Respirology** 2002; 7: 305-310. **H. 知的財産権の出願・登録状況**  
現時点ではなし。
- 6). Nagase T, Uozumi N, Ishii S, Kita Y, Yamamoto H, Ohga E, Ouchi Y, Shimizu T. A pivotal role of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Nature Medicine** 2002; 8: 480-484. (新聞各紙誌上にて紹介される)
- 7). Nagase T, Ishii S, Shindou H, Ouchi Y, Shimizu T. Airway hyperresponsiveness in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor is mediated by an atropine sensitive pathway. **Am J Respir Crit Care Med** 2002; 165: 200-205.

## 2.学会発表

- 1). Roles of lipid mediators in respiratory diseases. 第 42 回日本呼吸器学会総会 (Leading Lecture), 2002.
- 2). 炎症性肺疾患発症分子機構の解明による新治療法開発の戦略的展開. 第42回日本呼吸器学会総会 (熊谷賞受賞講演), 2002.
- 3). 気道過敏性の構成要素：遺伝子操作マウスモデルから得られたアイデア. 第 52 回日本アレルギー学会総会 (シンポ



厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)  
分担研究報告書

高齢者炎症性肺疾患における defensin の役割に関する研究  
分担研究者 栗原裕基 熊本大学 教授

研究要旨

- 1) ヒトおよびマウスのゲノムシーケンスをもとに新規  $\beta$ -defensin 遺伝子を複数見出した。さらに、これらの遺伝子の発現組織を同定することにより、高齢者炎症性肺疾患に関わると予想される  $\beta$ -defensin の一群を明確にした。
- 2) 気道系で発現する  $\beta$ -defensin の発現パターンを細胞レベルで検討し、これらが、上皮細胞だけでなく間葉系の細胞にも発現することを明らかにした。

A. 研究目的

大量の空気の出入り口である気道は、肺を無菌に保つために、空気中の微生物を有効に排除する重要な役割を担っている。高等脊椎動物には、高度に発展した獲得免疫機構が備わっているが、それでも、感染防御の第一線で機能しているのは、先天的、非特異的な防御機構である自然免疫機構である。そして、粘液輸送という物理的作用に加えて、抗菌物質による化学的作用は、その自然免疫の重要な柱の一つといえる。もし気道粘液中を微生物が自由に増殖するとすれば、気道の末梢に付着した微生物が物理的作用により排出される数時間の間に微生物の数はおびただしいものになってしまう。すべての感染防御機構がともに働くことにより肺を無菌に保っているといえる。

この化学的作用によるヒトでの感染防御機構の発見は、80年前に Flemming により鼻汁の抗菌活性が報告されたことに始まる。この古典的な発見に始まり、喀痰、鼻腔洗浄液、Bal 液中の抗菌物質について多くの報告がある。

鼻汁は、鼻腔内の状態で採取できる点で

たいへん有用なサンプルである。Coles らの報告によると、鼻汁中に黄色ブドウ球菌を多数認められる保菌者が 12.5% の割合でみられ、この黄色ブドウ球菌は、保菌者の鼻汁中では増殖を続けるが、非保菌者の鼻汁中では増殖しなかった。すなわち、鼻汁中の何らかの抗菌物質の個人差が病態に影響している可能性を示している。

さらに興味深いことに、Coles らは、鼻汁を熱処理すると抗菌作用を失い、これに相当量の lysozyme や lactoferrin を加えても作用は回復しなかったと報告している。すなわち、鼻汁の抗菌作用の主要な担い手は量的に多い lysozyme や lactoferrin 以外にありそうであり、質量的には少ない抗菌ペプチドがその候補となっている。

脊椎動物の抗菌ペプチドの発見は、アフリカツメガエルの皮膚から分泌される magainin1 と magainin2 の同定に始まる。その後、哺乳類の抗菌ペプチドも数多く同定され、すべての動物の抗菌ペプチドをあわせるとその数は数百に及ぶ。微生物の刺激により分泌の制御される抗菌ペプチドもヒトから次々と単離され、その重要性が注目されてきている。

日常臨床において、特発性間質性肺炎などの炎症性肺疾患を基礎にもつ患者においても、くりかえす二次感染の合併は、原病の悪化の誘引となる重要な問題である。特に、高齢者の炎症性肺疾患においては、原病そのものの進行は極めて緩徐であっても、再発する二次感染の合併が、患者のQOL低下の大きな要因となっている。健常人が元来そなえている感染防御機構が、これらの疾患において、どのように破綻をきたしているのかは、極めて重要な問題といえる。

一方、多くの抗菌物質において、抗菌作用と同時に哺乳類細胞への毒性が報告されている。一般に、抗菌ペプチドは、親水性の部分と疎水性の部分をもっており、その親水性の部分は塩基性アミノ酸により陽性に帯電している。一方、微生物の細胞膜にはホスファチジルグリセロールやカルジオリピンといった酸性脂質が豊富に含まれており負に帯電しており、我々の細胞膜は、電気的に中性なホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンが中心であり、酸性リン脂質は細胞質側を向いている。この静電気的作用の違いにより、抗菌ペプチドは、微生物膜に選択的に結合するとされている。そのほか、細菌の細胞膜にはコレステロールが含まれないことや、代謝の活発な細菌では膜電位が大きく細胞質側の負に傾いていることが抗菌ペプチドの選択性に関わっていることも指摘されている。

しかし、ヒトの代表的な抗菌ペプチドである LL-37 は、宿主である哺乳類の細胞にも毒性を示す。また、同じく哺乳類の代表的な抗菌ペプチドである defensin も高濃度で受精卵や腫瘍細胞への毒性が報告されている。一方、生体内では、血清が宿主細胞に対して保護的に働いているようである。このように、抗菌ペプチドの選択性も

、抗菌ペプチドの濃度や、哺乳類側の変化により容易に破綻をきたすようである。抗菌物質が、何らかの病的要因により肺組織自身を攻撃するようになり、炎症性肺疾患の病態そのものに関与してくることも充分予想される。

我々は、以前より、抗菌物質のなかでも defensin と呼ばれる、分子量約 4 kD の抗菌ペプチドに注目してきた。defensin 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る。 $\alpha$ -defensin と  $\beta$ -defensin の二つに分類され、これらは、それぞれ異なったシステインの配列とジスルフィド結合のパターンをもっている。

これまで、ヒトの  $\alpha$ -defensin としては、好中球顆粒中の HNP-1,-2,-3,-4 と小腸の Paneth cell 中の HD-5, -6 が知られており、 $\beta$ -defensin としては、human  $\beta$ -defensin-1, -2, -3, -4 (hBD-1, -2, -3, -4) が知られてきた。そのほか、精巣上体に発現する蛋白として同定された EP2 ファミリーに属する HE2 $\beta$ 1 も  $\beta$ -defensin に特異的なシステイン配列を保つことが知られている。また、重要な動物モデルであるマウスの  $\beta$ -defensin としては、mouse  $\beta$ -defensin-1, -2, -3, -4, -6 (mBD-1, -2, -3, -4, -6) の5つのアイソフォームが報告されていた。これらのアイソフォームは、共通の組織に分布していることが多く、局所において互いに協調して作用していると思われる。その一方で、炎症刺激に対する分泌の制御などにおいて、それぞれのアイソフォームは特異的な性格も有している。したがって、 $\beta$ -defensin の機能について個体レベルで検討するためには、一つのアイソフォームに限られた評価ではなく、全体としての動態を解析する必要がある。

炎症性肺疾患と  $\beta$ -defensin の関連を検討するために、我々は、ヒトおよびマウスに

発現している $\beta$ -defensin のアイソフォームについてひろく同定することから始めなければならないと考えた。そのうえで、それらが、全体としてどのように病態に関与するかを追求しなければならない。

我々は、先にマウスゲノム上の mBD-3 遺伝子近傍に、新規の $\beta$ -defensin 遺伝子を同定して mouse  $\beta$ -defensin-6 (mBD-6) として報告した。引き続き、ヒトおよびマウスのゲノム情報を利用して、新しい $\beta$ -defensin の同定とその特性の解析を目的に実験を施行した。次に、炎症性肺疾患に関わると予想される一群の $\beta$ -defensin の発現分布を細胞レベルで観察するために in situ hybridization を施行した。

## B. 研究方法

### 1) ヒト新規 $\beta$ -defensin のクローニング

ヒトゲノム塩基配列は NCBI データベースより得た。 $\beta$ -defensin 遺伝子群周囲について、ゲノム塩基配列全体を可能性のある 6 方向のフレームでアミノ酸に翻訳した。このアミノ酸配列上に、 $\beta$ -defensin に特徴的な 6 つのシステイン残基の配列を保つ部分が既知の $\beta$ -defensin 遺伝子以外にも複数存在することを見出した。これらの塩基配列をもとに BLAST サーチを施行し、新規の $\beta$ -defensin である DEFB6 遺伝子と同一の EST を見出した。さらに、市販のヒト精巣上体および精巣 RNA を逆転写後、PCR (forward primer : 5' - CAGTCATGAGGACTTTCCTC - 3' ; reverse primer: 5'-AGAAGCTAGGTTATGTATGC-3') することにより、この DEFB6 遺伝子の発現を実際に確認した。さらに、同じく新規の $\beta$ -defensin 遺伝子 DEFB5 についても、同様の RT-PCR 法により発現を確認した。次に、5' RACE 法により、DEFB5 遺伝子の mRNA の 5' 端を決定し

た。

### 2) マウス新規 $\beta$ -defensin のクローニング

上記の DEFB5 遺伝子のマウスホモログは、ヒト DEFB5 遺伝子をもとに BLAST サーチすることにより得ることができた。また、ヒト HE2 $\beta$ 1 遺伝子のマウスホモログについては、マウス精巣上体 RNA を逆転写後、degenerate PCR を施行することにより同定できた。

これらのヒトに対するホモログに加えて、マウスについても新規の $\beta$ -defensin 遺伝子をひろくクローニングするために、マウスゲノム塩基配列を NCBI データベースおよび Celera データベースより得た。次に、 $\beta$ -defensin 遺伝子群周囲について、ヒトゲノムと同様に可能性のある 6 方向のフレームで全体をアミノ酸に翻訳した。 $\beta$ -defensin に特徴的な 6 つのシステイン残基の配列を保つ部分が、既知の遺伝子の他に複数存在することを見出した。そのうち上記ヒトホモログを含めて 5 つの遺伝子について、RT-PCR により実際の発現を確認した。なお、RT-PCR の方法は後述の通りである。引き続き、マウス精巣上体 RNA あるいは食道 RNA を用いた 5'-RACE と 3'-RACE により cDNA の全長を決定した。

### 3) mouse $\beta$ -defensin -12 ペプチドの化学合成

先に、我々は、mouse  $\beta$ -defensin -6 ペプチドを化学合成し抗菌活性を示すことを証明した。今回、同様の方法により、mouse  $\beta$ -defensin -12 の C 端から 34 残基に相当する部分を化学的に合成した。なお、作製したペプチドの 3 つの S-S 結合は、空気酸化の手法で合成した。合成物の RP-HPLC ではシングルピークが得られ、さらに合成物について質量分析による確認

を行った。合成物は、凍結乾燥後、0.01% 酢酸水に溶解した。

4) 抗菌活性の測定 化学合成した mBD-6 および mBD-12 ペプチドの抗菌活性を調べるために、Harwig により記載された colony count assay を施行した。対数増殖期の大腸菌 (*E. Coli*, ATCC 25922 strain) を 10 mM リン酸ナトリウムバッファーに  $5 \times 10^7$  CFU/ml の濃度に懸濁し、この懸濁液を mBD-6 あるいは mBD-12 溶液と混ぜた。この最終的な菌液の塩濃度は 15 mM であり、mouse  $\beta$ -defensin 濃度は、それぞれ 2  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml に調整した。コントロールとして、defensin を含まない菌液を用意した。これらの菌液を 37 度で 2 時間培養した後、10 倍ずつ希釈して tripticase soy agar plates にまき 37 °C で培養した。48 時間後、プレート上のコロニー数をカウントし、菌の生存数をコントロールと比較して生存率を計算し、抗菌活性の指標とした。

次に、我々は、抗菌活性の塩濃度依存性を評価した。すなわち、 $\beta$ -defensin 20  $\mu$ g/ml を含む菌液の最終 Na 濃度を 15 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM にあわせ、37 °C で 2 時間培養した。コントロールとして、 $\beta$ -defensin を含まない菌液をそれぞれの Na 濃度で同様に培養した。10 倍ずつ希釈して tripticase soy agar plates にまいて 37°C で培養し、48 時間後コロニー数をカウントした。なお、操作は 4 回以上繰り返した。

5) RT-PCR ヒトの精巣上体と精巣は、三井記念病院の前立腺患者の手術検体を利用した。なお、三井記念病院の倫理委員会は、この研究を承認した。これらのサンプルから ISOGEN (Nippon gene) を用いて RNA を抽出した。また、CLONTECH Laboratories からヒト脳、肝、肺、気管、腎、心、骨格

筋の RNA を購入した。また、マウス RNA は、成熟したオス ICR マウスから ISOGEN (Nippon gene) を用いて抽出した。それぞれ、5  $\mu$ g の RNA を random hexamer primers により superscript II (Life Technologies, Inc.) を用いて逆転写した。

イントロンをはさむ特異的なプライマーを

hBD-6 : 5'端, CAGTCATGAGGACTTTCCTC

3'端, AGAAGCTAGGTTATGTATGC、

hBD-5 : 5'端, TTGGTTCAACTGCCATCAGG

3'端, CCAGGTCTGCTTCTAAGGCC

hBD-4 : 5'端, CTCCGACTTGCGTCTGCTTC

3'端, CCTGAGCAAACTTTCGATC、

HE2 $\beta$ 1 : 5'端, TCTGGCTGCAGTGCTCTTG

3'端, CTTGGGATACTTCAACATCC

のごとく作製した。

マウス遺伝子についても、イントロンをはさむ特異的なプライマーを

mBD-12 : 5'端, TGAAGAATCTCCCCTCAAAC  
-ATGG

3'端, GGAGCATAGCACTTTCGTTTG

mBD-11 : 5'端, GCCCTTCAGGTCATGAAGAC

3'端, AGCATCTGCTTCCATCAGGT

mBD-34 : 5'端, GCCCTTCAGGTCATGAAGAC

3'端, ACAGCAAAAGGACAAAGCTA

mEP2c : 5'端, AGCCATGATACCAAGACTCC

3'端, TGACTTTGGAGATGTGTCTG

mEP2e : 5'端, ATCAGTCACACCTGCTTTCC

3'端, CACATACTCAAAGCCTTTGG

mEP ヴァリアント

: 5'端, AGCCATGATACCAAGACTCC

3'端, ATCCTTTCACCGGACCTTTG

mBD-14 : 5'端, GCAGTCAACTATGAGGCTTC

3'端, CACCCTCACCTGCATATTC

mBD-3 :

5'端, GCTTCAGTCATGAGGATCCATTACCTTC

3'端, GCTAGGGAGCACTTGTGTTGCATTTAATC

のごとく作製した。