

炎症性疾患における defensin 発現異常の関与に関する研究
分担研究者 栗原裕基 東京大学 教授

研究要旨

- 1) マウス β -defensin-6 過剰発現マウスにおいて、筋ジストロフィーに相当する骨格筋線維の壊死、再生の所見と筋力低下を認めた。
- 2) 抗菌ペプチドによる組織傷害性作用を個体レベルで明らかにした初めての研究であり、肺を含む全身の炎症性疾患においても defensin の関与の可能性を示唆する所見である。

A. 背景

1981年、蛾の抗菌ペプチド、cecropin が同定されたのを始めに、昆虫に多くの抗菌ペプチドの産生されることが知られてきた。昆虫は、高度な免疫機構をもたず、先天的、非特異的な防御機構である自然免疫によって微生物から身を守っており、抗菌ペプチドはその中心的な位置にあると推測される。すべての動物の抗菌ペプチドをあわせると、その種類は、数百に及ぶことが報告されている。

高等脊椎動物には、後天的、特異的な獲得免疫機構が備えられているが、侵入する微生物に対して常に最も迅速に反応しているのは、複雑で巧妙な獲得免疫機構よりも自然免疫機構であると考えられる。例えば、気道では、粘液輸送という物理的作用と、抗菌物質による化学的作用が、空気中の微生物を常に有効に排除し続けている。そして、後者の化学的作用の担い手として、リゾチームやラクトフェリンのような分子量の比較的大きな抗菌物質に加えて、高等脊椎動物にも数 kD の小さな抗菌ペプチドが存在することが明かとなった。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、ヒトの代表的な抗菌ペプチドとして、defensin や cathelicidin が知られるようになった。

抗菌ペプチドの多くは、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により負に帯電しており、抗菌ペプチドは、静電的な力により微生物膜に結合する。微生物膜に結合した cecropin や magainin のような小さなペプチドは、細胞膜の表面をカーペットのように覆いつくし、細胞膜脂質成分を抱きこむようにして穴をつくり、最終的に膜を完全に破壊してしまうと推測されている。一方、哺乳類の代表的な抗菌ペプチドである defensin は膜様構造のなかで多量体を形成することが知られている。すなわち、微生物膜に結合した defensin は、ペプチド同士の複合体を形成して細胞膜内にとりこまれ、細胞膜を横断する穴をつくると考えられている。この穴により、イオン透過性が亢進し、細菌は最終的に死に至ると推測される。

defensin は、前述した多くの抗菌ペプチドと同様に、塩基性アミノ酸により陽性に帯電している。加えて、defensin は、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保存している。このシステイン配列の相違から、 α -defensin と β -defensin の二つのファミリーに分類されている。そのほか、サルでは2分子が3つの分子間ジスルフィド結合をつくり defensin と同じ構造をつくる環状 θ defensin が知られている。ヒト α -defensin ファミリーとしては、好中球の顆粒中に存在する human neutrophil peptide-1, 2, 3, 4 (HNP-1, 2, 3, 4) と腸管のパネス細胞に存在する human defensin-5, -6 が知られている。これらについて、細菌、真菌、ウイルスへの抗菌作用、抗ウイルス作用が報告されている。

ヒトの β -defensin としては、1995年に human β -defensin-1 (hBD-1) が、1997年に human β -defensin-2 (hBD-2) が報告され、その後、human β -defensin-3, 4 (hBD-3, 4) が報告された。そのほか、HE2 β 1 は、精巣上体に発現する EP2 ファミリーの選択的スプライシングの一つとして報告されたが、 β -defensin に特異的なシステイン配列を保つことが後に明らかとなった。さらに、我々は、2002年に精巣上体に特異的に発現する新規のヒト β -defensin である human β -defensin-5 (hBD-5)、human β -defensin-6 (hBD-6) を同定し報告した。

また、マウスの β -defensin としては、4つのアイソフォーム、mouse β -defensin-1, -2, -3, -4 (mBD-1, -2, -3, -4) が報告された。mBD-1、mBD-3 は、それぞれ hBD-1、hBD-2 のマウスホモロ

グであり、いずれもグラム陰性細菌に対して、Na 濃度依存性に殺菌作用を示すことが確認された。さらに我々は、2001年に mouse β -defensin-6 (mBD-6) を同定し、その抗菌活性を証明した。また、2002年にヒトの HE2 β 1、hBD-5、hBD-6 のマウスホモログとして mouse EP2e (mEP2e)、mouse β -defensin-12 (mBD-12)、mouse β -defensin-11 (mBD-11) について報告した。

hBD-1 は、主に尿路生殖器系に発現しているが、腭や肺、皮膚、腸管にも発現が認められた。hBD-2 は、ヒトの皮膚、肺、気管で発現しており、腸管の上皮でも発現誘導が確認された。hBD-3 もヒトの皮膚から単離されたが、男性生殖器や胎盤に強く発現していることが後に明らかとなった。また、我々の報告した hBD-5、hBD-6 は、ヒト精巣上体に特異的に発現していた。

マウス β -defensin も、肺、気管、食道、舌、腎臓のような様々な器官での発現が報告されている。さらに、我々は、マウスにも、mBD-11、mBD-12、mEP2e など、精巣上体に特異的に発現する β -defensin の一群の存在することを明らかにした。また、我々の報告した mBD-6 は、舌や食道に加えて骨格筋でも発現が観察された。このように、複数の β -defensin アイソフォームの相次ぐ同定とともに、その発現分布は、予想以上に幅広いことが明らかとなった。

これまで、 β -defensin の機能解析については、*in vitro* での抗菌活性の証明が主体であった。hBD-1、hBD-2、hBD-4 は、Na 濃度依存性に殺菌作用を示し、hBD-3 は、Na 濃度非依存性に殺菌作用を示すと

報告されている。我々も、mBD-6、mBD-12の Na 濃度依存性の殺菌作用を証明した。さらに、hBD-2 は、CCR6 受容体を活性化することにより、未分化な樹状細胞やメモリーT細胞に対してケモアトラクタントとして機能することが報告されている。また、同様に、mBD-2 は、toll-like receptor 4 の内因性のリガンドとして、樹状細胞の成熟を促す。すなわち、抗菌ペプチドは、その抗微生物作用によりエフェクター因子として機能しているだけでなく、炎症反応の制御因子としても機能している。

近年、個体レベルでの抗菌ペプチドの機能の解析も進んできた。defensin とともに代表的な抗菌ペプチドである cathelicidin の欠損マウスでは、皮膚感染症の悪化することが知られている。

また腸管の α -defensin の機能が、matrilysin 欠損マウスの解析により明らかとなった。このマウスは、マウス腸管の α -defensin に相当する cryptdin の前駆体から pro segment を切断できないことが明らかとなった。このように機能的に cryptdin を欠いた matrilysin 欠損マウスは、腸管において細菌に対する易感染性を示した。また、ヒト腸管の α -defensin である HD-5 を発現するトランスジェニックマウスにおいて、HD-5 が、サルモネラ症への抵抗性に寄与することも報告された。

β -defensin に関しては、mBD-1 の欠損した遺伝子改変マウスの解析が報告された。このマウスでは、インフルエンザ桿菌の肺への感染が長びくことや、尿路の常在菌数の増加することが明らかにされた。

しかし、炎症反応は、対異物作用の総体であると同時に、コントロールの異常によ

り宿主自身への傷害性を有しうる。これまでの遺伝子改変マウスの評価では、defensin の感染防御上の重要性が明らかにされてきたが、炎症反応の一翼を担う defensin 発現の異常が、同時に様々な炎症性疾患の病態生理に関わることも予想される。

我々は、mBD-6 を過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、未知の病態との関与を検討した。

B. 研究方法

1) mBD-6 cDNA のクローニング

成熟した ICR マウスから ISOGEN (Nippon Gene) を用いて食道の全 RNA を抽出した後、5 μ g の RNA をランダムプライマーにより superscript II (Invitrogen) を用いて逆転写した。mBD-6 遺伝子の蛋白発現を増強するために、mBD-6 遺伝子の開始コドンの前に kozak シークエンスを連結した DNA プライマー (5'-ACCATGAAGATCCATTACCTG-3') を作製した。また、mBD-6 遺伝子の 3' 端非転写領域にアンチセンスプライマー (5'-TGTGCATATTACGAAGAAG-3') を作製し、Advantage-HF2 PCR kit (Clontech) により、mBD-6 cDNA を増幅した。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 15 秒、68 $^{\circ}$ C 3 分である。得られた DNA フラグメントを、TA クローニングの手法により、PCR4TOPO ベクター (Invitrogen) に挿入し、大腸菌内で増幅した。なお、この大腸菌より抽出したプラスミドのシークエンスにより、増幅された mBD-6 cDNA の塩基配列に変異の存在しないことを確認した。

2) トランスジーン の 作 製

得られた mBD-6 cDNA を、pCAGGS ベクターに挿入した。このベクターでは、挿入された mBD-6 は、human cytemogalovirus immediate-early enhancer とそれに続く chicken β -actin promoter により駆動される。蛋白発現の効率をあげるために、chicken β -actin の第一エクソンおよびイントロンに続いて、mBD-6 cDNA が位置し、mBD-6 自身のストップコドンの後、rabbit β -globin poly(A) sequence が、その下流に位置するように設計されている (図 1)。

PCR4TOPO ベクターに mBD-6 cDNA を挿入したプラスミドを EcoRI にて切断後に電気泳動し、mBD-6 cDNA を含む DNA 断片をアガロースゲルより抽出した。EcoRI にて直鎖状にした pCAGGS ベクターと、上記で得られた DNA 断片をライゲーションし、大腸菌内で増幅した。pCAGGS ベクターへの mBD-6 cDNA の挿入とその方向は、抽出したプラスミドのシーケンスにより確認した。

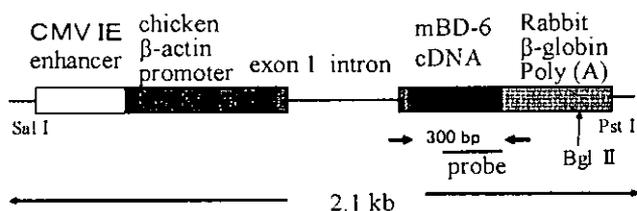


図 1 トランスジーン の 構 成.

mBD-6 を過剰発現するために、pCAGGS ベクターを利用した。矢印は、スクリーニングに使用した PCR プライマーの位置を示す。Probe は、サザンプロットに利用したプローブの位置を示す。

CMV IE enhancer;

cytemogalovirus immediate-early enhancer

この mBD-6 cDNA を含む pCAGGS ベクター 100 μ g を、BamH I, Dra I, Sal I, Pst I にて切断し、0.8% アガロースゲルにて電気泳動し、mBD-6 cDNA を含む 2.1 kb の DNA 断片を抽出した。この DNA 断片を精製し、トランスジーンとして T₁₀E_{0.1} 液に溶解した。

3) トランスジェニックマウスの作製

上記のトランスジーンを C57BL/6 マウスの受精卵に注入し、それを仮親マウスの卵管内に移植して出産させた。これらの操作は、熊本大学動物資源開発研究センターとの共同で行われた。得られたマウスの尾よりゲノム DNA を Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) を用いて抽出し、PCR 法によりスクリーニングを行った。

我々は、まず、トランスジーン の rabbit β -globin 遺伝子上にセンスプライマー (5'-GGTTATTGTGCTGTCTCATC-3') およびアンチセンスプライマー (5'-ATTTGTGAGCCAGGGCATTG-3') を mBD-6 cDNA を挟むように作製した (図 1)。抽出したゲノム DNA をテンプレートとして、Taq polymerase (TAKARA) を用いて、94 $^{\circ}$ C 30 秒、58 $^{\circ}$ C 45 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分、35 サイクルの条件で PCR を施行した。

さらに、我々は、サザンプロット法により、トランスジーンを確認し、そのコピー数の推定を行った。すなわち、マウスのゲノム DNA 5 μ g を Bgl II にて切断し、0.8% アガロースゲルに電気泳動した後、Hybond-N+ (Amersham) にトランスファーした。サザンプロットのためのプローブ

は、mBD-6 遺伝子第二エクソンの一部からなる、250 bp の DNA フラグメントを利用した。なお、このフラグメントは、mBD-6

遺伝子を含む BAC クローン D11 をテンプレートとして、mBD-6 遺伝子第二エクソン上の二つのプライマー (5'-AATCCAGTAACATGCATGAG-3'、5'-TGTGCATATTACGAAGAAG-3') を用いて PCR を施行することにより得た。

上記 DNA フラグメントを、random primed DNA labeling kit (Roche) を用いて、 $[^{32}\text{P}]d\text{CTP}$ によりラベルし、ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech) を用いて、60 °C、一晩、ハイブリダイゼーションを行った。シグナルの検出には、BASS2000 (富士フィルム) を用いた。

4) RT-PCR

外来遺伝子の発現を確認するために、変異マウスとその同腹仔を頸椎脱臼により安楽死させた後、肺、骨格筋を切り出し、液体窒素にて凍結した。これらの組織の全 RNA は、ISOGEN (Nippon gene) を用いてプロトコールに従い抽出した。抽出した 5 μg の RNA をランダムプライマーにより superscript II (Invitrogen) を用いて逆転写した。

PCR のプライマーとして、mBD-6 cDNA 上にセンスプライマー (5'-ACCATGAAGATCCATTACCTG-3')、rabbit β -globin 上にアンチセンスプライマー (5'-ATTTGTGAGCCAGGGCATTG-3') を作製した。PCR は、Taq polymerase (TAKARA) を用いて、94 °C 40 秒、60 °C 30 秒、72 °C 1 分、30 サイクルの条件で

施行した。

5) mBD-6 ペプチドの化学合成

hBD-2 や mBD-3 でのシグナルペプチドの切断箇所から、mBD-6 についてもシグナルペプチドの切断箇所を推定し、C 端より 40 残基からなるペプチドをペプチド研究所にて化学合成した。3 つのジスルフィド結合を空気酸化の手法で合成し、合成物の逆相高速液体クロマトグラフィーにてシングルピークを確認し、最終産物を質量分析により解析した。合成ペプチドは、0.01% 酢酸水に溶解した。

6) mBD-6 抗血清の作製

上記の通り化学的に合成した mBD-6 ペプチドを抗原として、ラビット抗血清をペプチド研究所にて作製した。

7) 筋組織からのペプチドの抽出とウエスタンブロット

変異マウスとその同腹仔を頸椎脱臼により安楽死させた後、骨格筋を切り出し、液体窒素にて凍結した。組織 100mg あたり 1ml の ISOGEN (Nippon gene) を用いて筋組織をホモジナイズした後、プロトコールに従い蛋白を抽出した。抽出した蛋白のペレットから、0.5% 酢酸水に 4 °C 下、一晩で溶出した成分を 10% アンモニア水で中和した。

上記サンプルをトリシン SDS-PAGE を用いて分離し、PVDF 膜にトランスファーした。ブロットは、4% BSA を含む TBST (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20) 中に 1 時間浸した後、一次抗体として、上記の mBD-6 抗血清と 4 °C、一晩反応させた。洗浄後、二次抗体

としてペルオキシダーゼ結合抗ラビット IgG 抗体 (ICN) と室温にて一時間反応させ、シグナルは、ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて検出した。

8) マウス筋力の評価

生後 4 ヶ月のメスの変異マウスとその同腹仔を、高さ 20 cm に水平に置いた直径 10 cm の円形の網にぶらさげ、下の敷いたマット上に落下するまでの時間を 2 分間測定した。同じ個体につき 2 回テストを施行し、長い方の記録を採用した。

9) マウス筋組織標本の作製

ジエチルエーテル吸入により麻酔したマウスの腹部大動脈より全血を採血した後、目的の骨格筋を切り出した。切り出した骨格筋は、水で練ったトラガカントゴムを用いて、小コルク片に固定した後、液体窒素により冷却したイソペンタン内で急速に凍結した。この組織標本から、クライオスタット内で、厚さ 10 μm の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色 (H E 染色)、Gomori トリクローム変法は、型通りに施行した。

10) 免疫染色

上記の通り作製した切片を乾燥後、アセトン液に 5 分間浸して、固定を行った。

mBD-6 やジストロフィンの検出には、蛍光抗体法を利用した。5% BSA 液にて 20 分間ブロッキングの後、一次抗体として、mBD-6 抗血清や抗ジストロフィン抗体 (Santa Cruz) と 4°C、一晩反応させた。洗浄後、二次抗体として、それぞれ、FITC 結合抗ラビット IgG 抗体 (Sigma)、FITC 結合抗ゴート IgG 抗体 (Sigma) と室温に

て一時間反応させた。洗浄後、vectashield (Vector) をマウントし、蛍光顕微鏡にて観察した。

mBD-6 や Neural cell adhesion molecule (NCAM) の検出には、酵素抗体法を利用した。すなわち、0.15% NaN_3 、0.15% H_2O_2 / メタノール液に 30 分浸すことにより、内因性のペルオキシダーゼを失活させた後、5% BSA 液にて 20 分間ブロッキングを行った。一次抗体として、抗 NCAM 抗体 (Chemicon) とは、37 度 100 分もしくは 4°C、一晩反応させ、また、mBD-6 抗血清とは 4°C、一晩反応させた。それぞれ、二次抗体として、HRP 結合抗ラット IgG (Biosource)、HRP 結合抗ラビット IgG (Cappel) と室温にて一時間反応させた後、DAB NiCl 液に 15 分浸し、 H_2O_2 液を加えてシグナルを検出した。一部の標本で、ヘマトキシリンによる核染色を加えた。なお、mBD-6 抗血清のコントロールとして、免疫前の血清を用いて同様に免疫染色を行った。

11) 血清クレアチンキナーゼ活性、トランスアミナーゼ活性の測定

ジエチルエーテル吸入により麻酔したマウスの腹部大動脈より全血を採血した後、血清を分離し、測定まで凍結保存した。血清中のクレアチンキナーゼ活性は、SRL にて UV 法により測定した。

(倫理面への配慮)

実験動物であるマウスに無用な苦痛を与えないように十分に配慮した。具体的には、採血や尾の採取は、エーテル麻酔下で行った。他の実験は、頸椎脱臼による速やかな安楽死の後に行った。

C. 研究結果

1) 遺伝子改変マウスの作製

6匹のF0 マウスにおいて、PCR 法およびサザンブロット法により、トランスジーン挿入が確認され、2ラインにおいて、次世代への遺伝が確認された。

サザンブロット法により、一方のラインでは、トランスジーンが複数含まれていることが予想され、もう一方のラインでは、トランスジーンが1コピー含まれていることが予想された(図2)。ここでは、これらの遺伝子改変マウスを、順に、TgCAGmBD6-1 マウス、TgCAGmBD6-2 マウスと呼ぶことにする。

なお、3匹のメスのF0 マウスは、生後

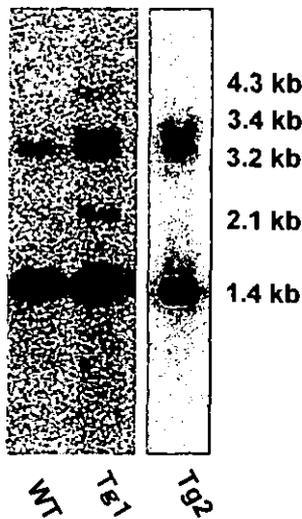


図2. トランスジーン挿入のサザンブロット

野生型(WT)では、内因性のmBD-6遺伝子による1.4kbのシグナルと偽遺伝子による3.2kbのシグナルを認めた。TgCAGmBD6-1マウス(Tg1)では、内因性のシグナルに加えて、トランスジーンが隣接して挿入されたことによると思われる2.1kbのシグナルと約4.3kbと3.4kbのシグナルを認めた。TgCAGmBD6-2マウス(Tg2)では、約3.4kbの位置にのみトランスジーンによるシグナルを認めた。

3ヶ月以内に死亡したが、死亡原因は不明であった。

2) TgCAGmBD6 マウスにおける mBD-6 過剰発現の解析

トランスジーン発現を、TgCAGmBD6マウスの骨格筋や肺より抽出した全RNAを用いてRT-PCR法により確認した。

トランスジーン発現を特異的に増幅するプライマーを用いることにより、TgCAGmBD6-2マウスのいずれの系統においても、トランスジーンが肺や骨格筋に発現していることが確認された(図3)。

次に、我々は、蛋白レベルでのmBD-6の発現量を確認するために、等量の骨格筋より抽出した蛋白をウェスタンブロットし、mBD-6抗血清により解析した。図4のようにトランスジェニックマウスにおいてのみ、mBD-6ペプチドを検出することができ、発現の上昇が蛋白レベルで確認された。しかし、TgCAGmBD6-1マウスと比較して、TgCAGmBD6-2マウスでのシグナルは非常に弱く、mBD-6の発現は、TgCAGmBD6-1マウスにおいて有意に高いことが示された。

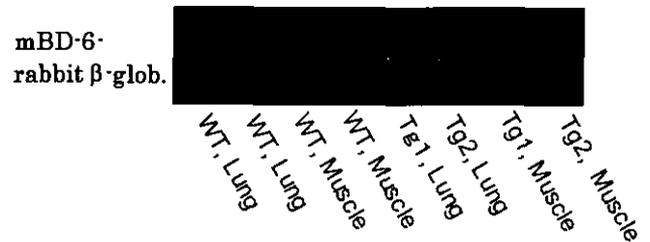


図3. RT-PCRによるトランスジーン発現解析.

TgCAGmBD6-1マウス(Tg1)、TgCAGmBD6-2マウス(Tg2)の肺、骨格筋において、野生型(WT)では認められない300bpのトランスジーンによるシグナルが認められた。

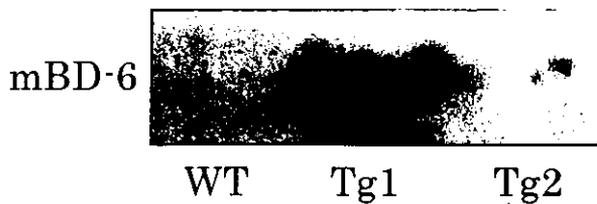


図 4. ウェスタンブロットによる mBD-6 ペプチド過剰発現の確認.

TgCAGmBD6-1 マウス (Tg1)、TgCAGmBD6-2 マウス (Tg2) の骨格筋より抽出した蛋白中に、4 kD の mBD-6 ペプチドが検出された。しかし、TgCAGmBD6-2 マウスの mBD-6 分泌量は、TgCAGmBD6-1 マウスに比べて非常に少なかった。

3) TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋における mBD-6 の分布

TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋の凍結切片に対して、mBD-6 抗血清による免疫染色を行った。

蛍光抗体法では、mBD-6 が、筋線維膜に沿って存在している所見が得られた (図 5)。興味深いことに、mBD-6 のシグナルは、すべての筋線維膜に均一に認められるわけではなく、一部の筋線維にのみ強く認められた。一方、野生型マウスでは、明瞭なシグナルは検出されなかった。

酵素抗体法では、一部の筋線維において、筋線維膜に沿って存在する mBD-6 のシグナルを認めると同時に、細胞質内にも淡い mBD-6 のシグナルを認めた (図 6)。

図 5. mBD-6 抗血清による免疫染色.

TgCAGmBD6-1 マウス (Tg1) 骨格筋の mBD-6 抗血清による免疫染色により、一部の筋線維膜 (*) に沿って存在する mBD-6 を認めた (A)。野生型マウス (Wild) では、mBD-6 を検出できなかった (C)。それぞれコントロール血清では、特異的なシグナルを認めなかった (B, D)。

A. Mutant, anti-mBD-6

B. Mutant, control

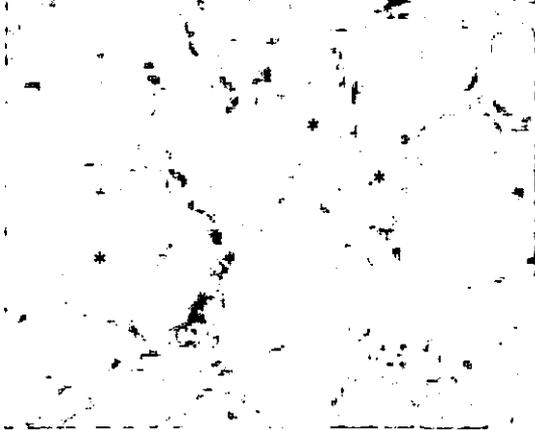
C. Wild, anti-mBD-6

D. Wild, control

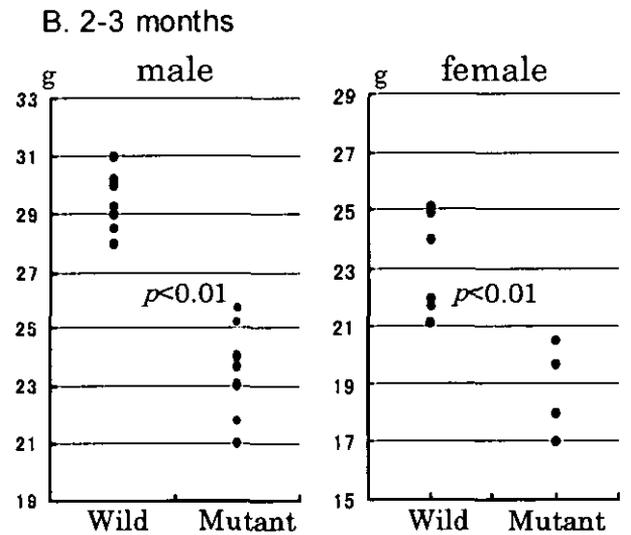
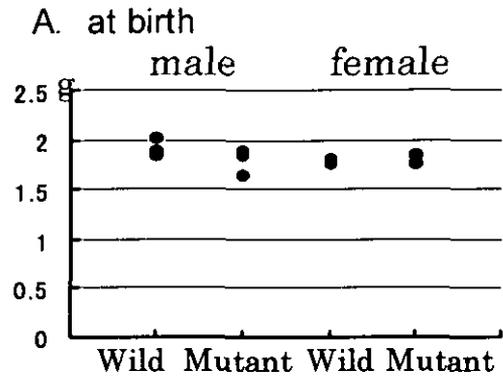
A. Mutant, anti-mBD-6



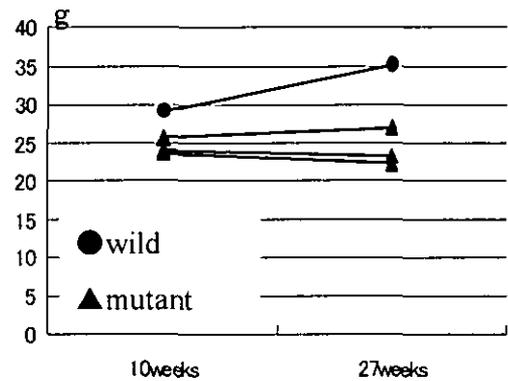
B. Mutant, control



TgCAGmBD-6-1 マウスでは、体重増加が認められず (図 7C)、そのほとんどは、生後 8-11 ヶ月後に死亡した。



C. Aged more than 3 months



4) TgCAGmBD6-1 マウスの低体重

誕生時、TgCAGmBD6-1 マウスと野生型の同腹仔との間に外見上の相違は認められなかった (図 7A)。しかし、生後 6 週頃には、TgCAGmBD-6-1 マウスの発育遅延が認められるようになり、生後 8 週での平均体重は、野生型の同腹仔に比べて、その約 80% であった (図 7B)。加齢に伴い、野生型では体重増加を続けるが、

5) TgCAGmBD6-1 マウスの筋力低下

興味深いことに、生後 6 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスでは、のびきった下肢と進行性の亀背を認めた (図 8)。このような所見は、他の筋ジストロフィーマウスの多くで報告されたように、マウスにおける筋力低下の特徴的な所見である。

次に、生後 4 ヶ月の TgCAGmBD6-1 メスマウスを水平においた網の下にぶらさげ、落下までの時間を比較した。野生型の同腹仔では、すべて 2 分以上体を保持しているのに対して、TgCAGmBD6-1 マウスは、およそ 30 秒から 1 分で落下することがわかった (図 9)。



図 8. TgCAGmBD6-1 マウスの亀背
生後 6 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスは、進行性の亀背を示した (矢印)。

	落下までの時間		
Wild	2 分以上,	2 分以上,	2 分以上
Tg1	64 秒,	25 秒,	55 秒

図 9. TgCAGmBD6-1 マウスの筋力テスト
生後 4 ヶ月の TgCAGmBD6-1 メスマウス (Tg1) を水平においた網の下にぶらさげ、落下までの時間を比較した。各個体の記録を示す。

6) TgCAGmBD6-1 マウスの筋病理所見

我々は、生後 3 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋の組織学的な解析を行った。TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋の HE 染色において、筋線維の多くは、中心核線維に置換され、円形化し、大小不同も目立ち、肥大線維はしばしば分割して、いわゆる fiber splitting の所見を示した。さらに、エオジンに淡染する壊死線維や単核細胞の集簇巣が散在し、塩基性の再生線維も認められた (図 10)。これらの特徴は、調べたすべての骨格筋、すなわち、横隔膜、頸部の筋、背部の筋に共通して認められた (図 11)。

次に、生後 3 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋を Gomori トリクローム変法にて評価した。Gomori トリクローム変法においても、骨格筋の壊死、再生の所見が確認されたが、異常な封入体などは認められなかった (図 12)。

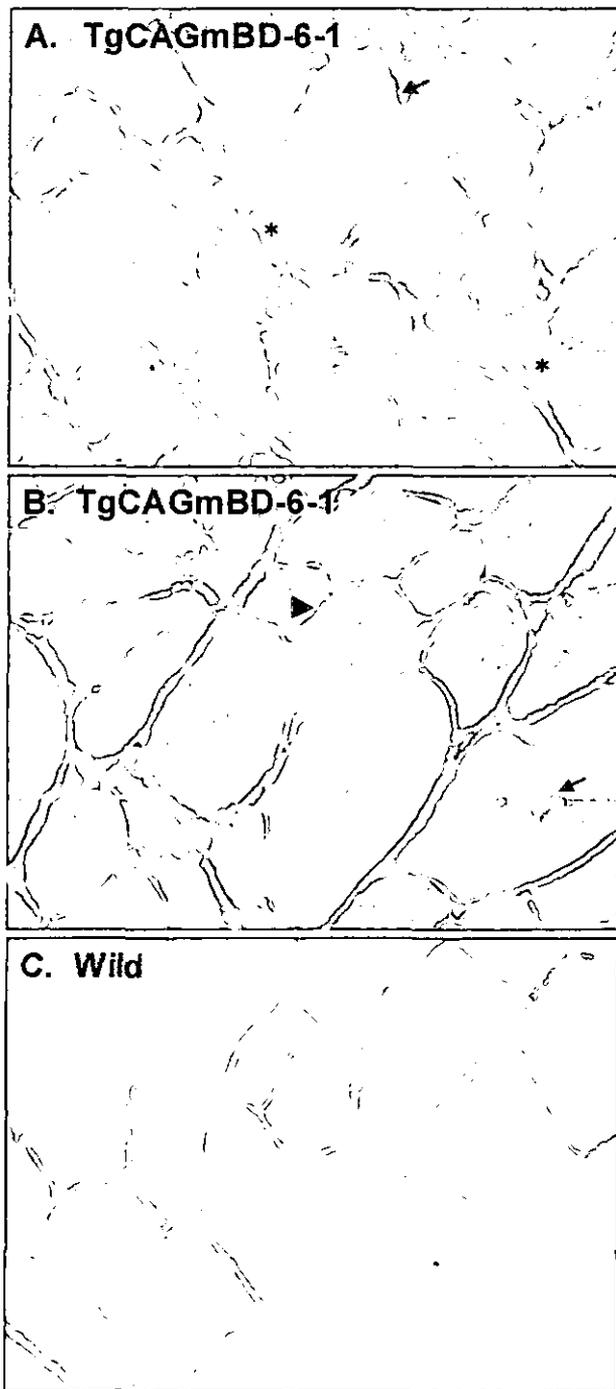


図 10. TgCAGmBD6-1 マウスの筋病理所見
 A. B. 生後 3 ヶ月の TgCAGmBD6-1 オスマウスの腓腹筋の HE 染色所見。筋線維の多くは、中心核線維に置換され、円形化し、大小不同も目立つ。fiber splitting (矢印)、エオジンに淡染する壊死線維(矢頭)、単核細胞の集簇巣や塩基性の再生線維 (*) が認められる。C. 野生型の腓腹筋所見。

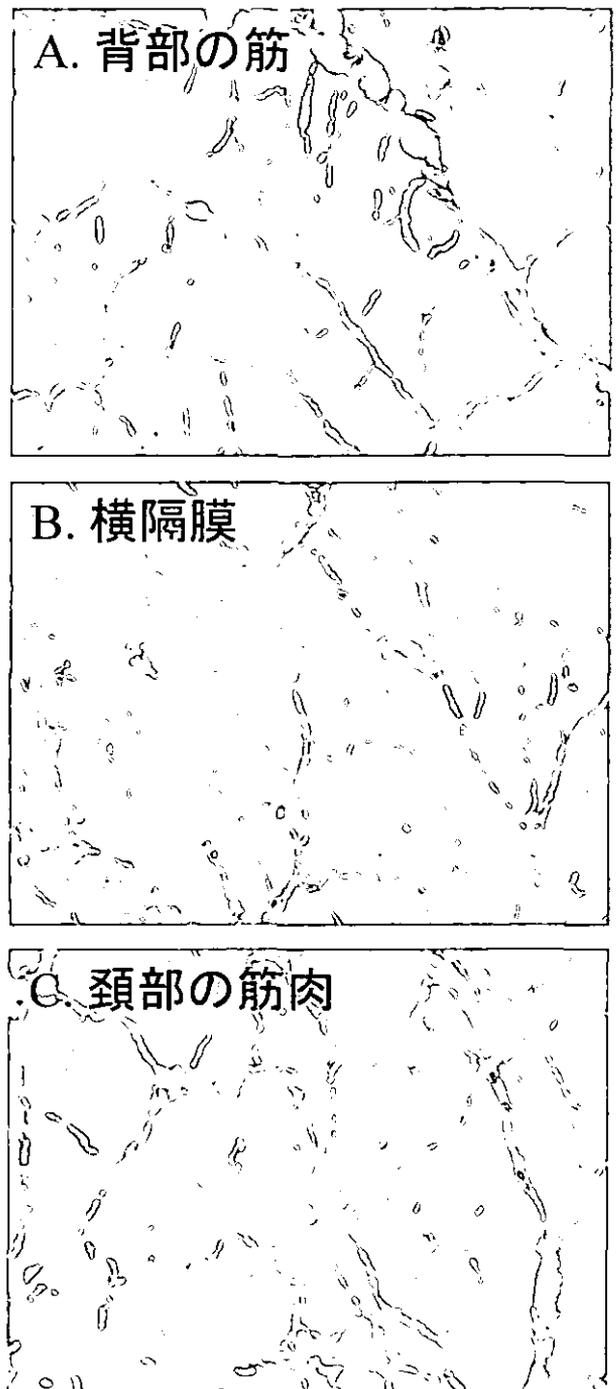


図 11. TgCAGmBD6-1 マウスの各部の筋所見
 背部の筋、横隔膜、頸部の筋のいずれにも、筋線維の壊死と再生、中心核線維が共通して認められた。

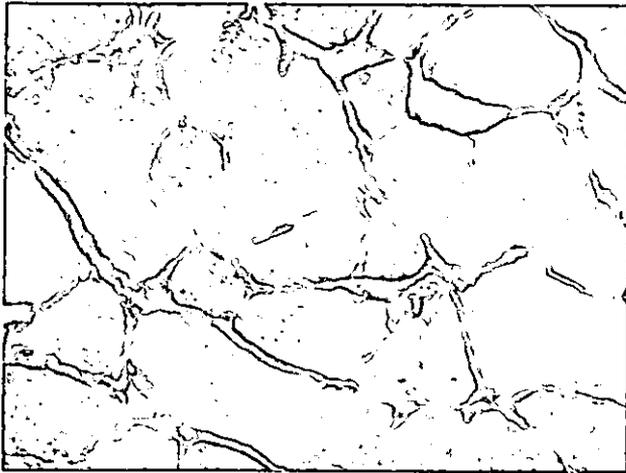


図 12. Gomori 染色

生後3ヶ月の TgCAGmBD6-1 オスマウスの腓腹筋の Gomori トリクローム変法による染色所見。異常な封入体などは認められなかった。

筋の病理変化を経時的に評価するために、生後 20 日および生後 4 週の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋を解析した。生後 20 日の TgCAGmBD6-1 マウスでは、外見上も野生型の同腹仔と相違を認めず、病理学的にも骨格筋に異常を認めなかった (図 13)。

生後一ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋では、筋線維の壊死や単核細胞の集簇巣が、生後 3 ヶ月のマウスと同程度に認められた。しかし、多くの筋線維の核は、細胞内に偏在しており、壊死、再生の進行しつつある状態を示す所見であった (図 14)。

生後 3 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスでは、既に筋線維の多くは、中心核線維に置換されていた。さらに、生後 6 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋においても、筋線維の多くは中心核線維に置換され、筋線維の壊死再生の所見が認められた。しかし、加齢に伴う新たな病理変化は認められなかった (図 15)。

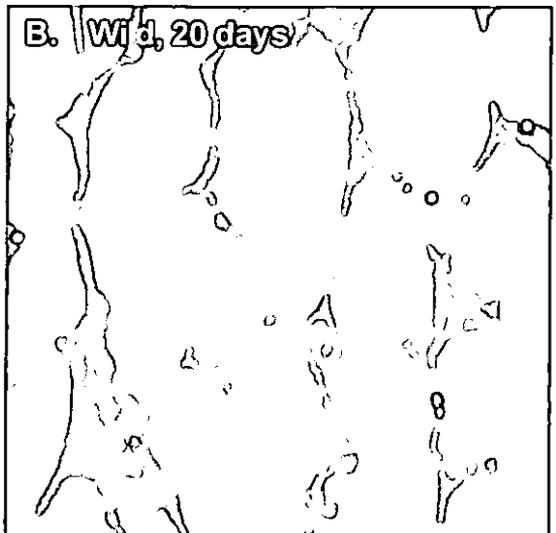
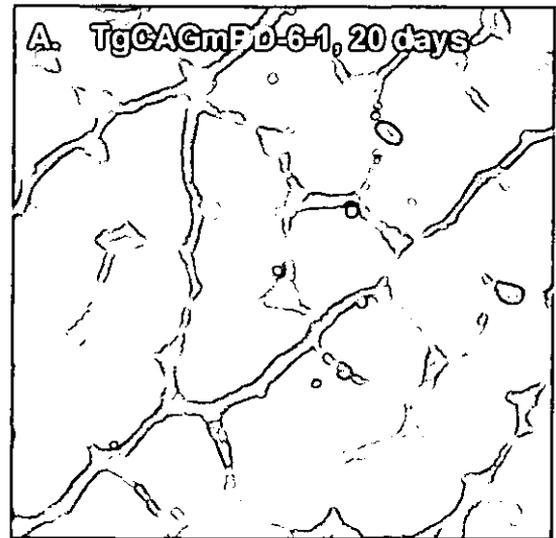


図 13. 生後 20 日の筋病理所見

生後 20 日の TgCAGmBD6-1 マウス (A) と野生型の同腹仔 (B) の腓腹筋の HE 染色所見。いずれにも、筋線維の壊死や再生の所見は乏しい。

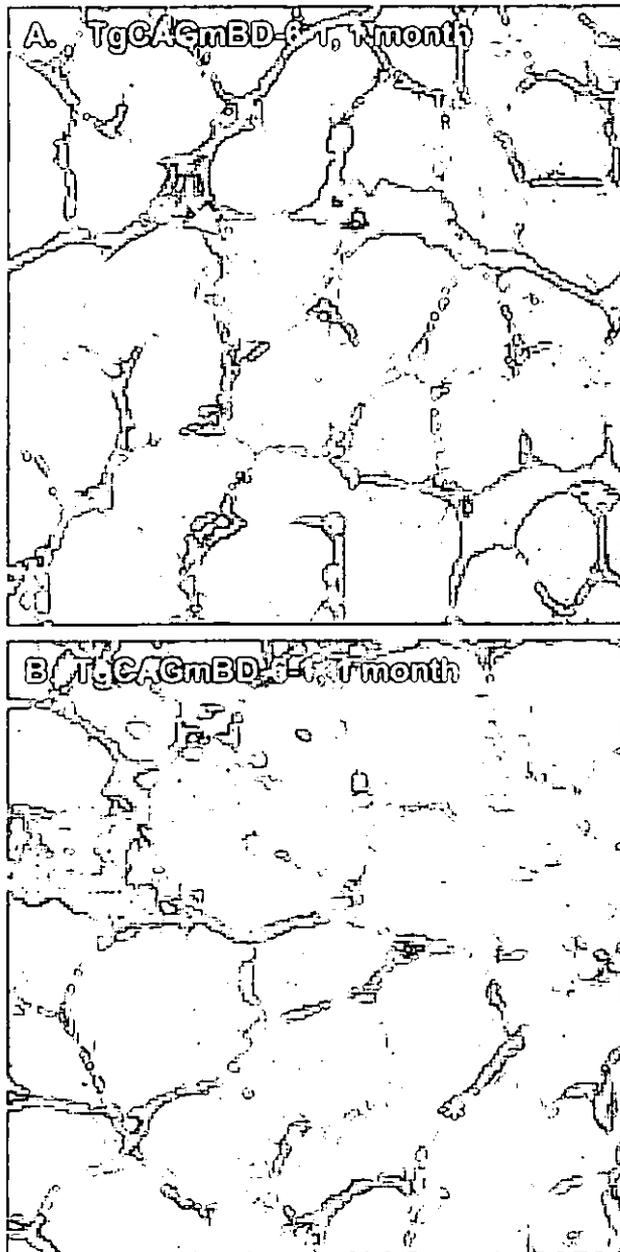


図 14. 生後一ヶ月の筋病理所見

生後4週の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋では、筋線維の壊死(矢印)や単核細胞の集簇巢(*)が、生後3ヶ月のマウスと同程度に認められた。しかし、中心核線維はまだ少なく、多くの筋線維の核は、細胞内に偏在していた。



図 15. 生後六ヶ月の筋病理所見

生後6ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋においても、筋線維の多くは中心核線維に置換され、筋線維の壊死再生の所見が認められた。しかし、加齢に伴う新たな病理変化は認められなかった。

7) TgCAGmBD6-1 マウスの血清所見

我々は、生後3ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの血清クレアチンキナーゼ活性を測定した。図 16A のように、TgCAGmBD6-1 マウスの血清クレアチンキナーゼ活性の平均は、233 IU/l であり、野生型の同腹仔の血清クレアチンキナーゼ活性より有意に高かった($p < 0.01$)。

また、同様に、TgCAGmBD6-1 マウスの血清トランスアミナーゼの活性を比較した。図 16B のように、TgCAGmBD6-1 マウスのアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性 (GOT) の平均は、229 IU/l であり、同腹仔の GOT より有意に高かった($p < 0.01$)。一方、TgCAGmBD6-1 マウスのアラニンアミノトランスフェラーゼ活性 (GPT) については、野生型の同腹仔と有意差を認めなかった。

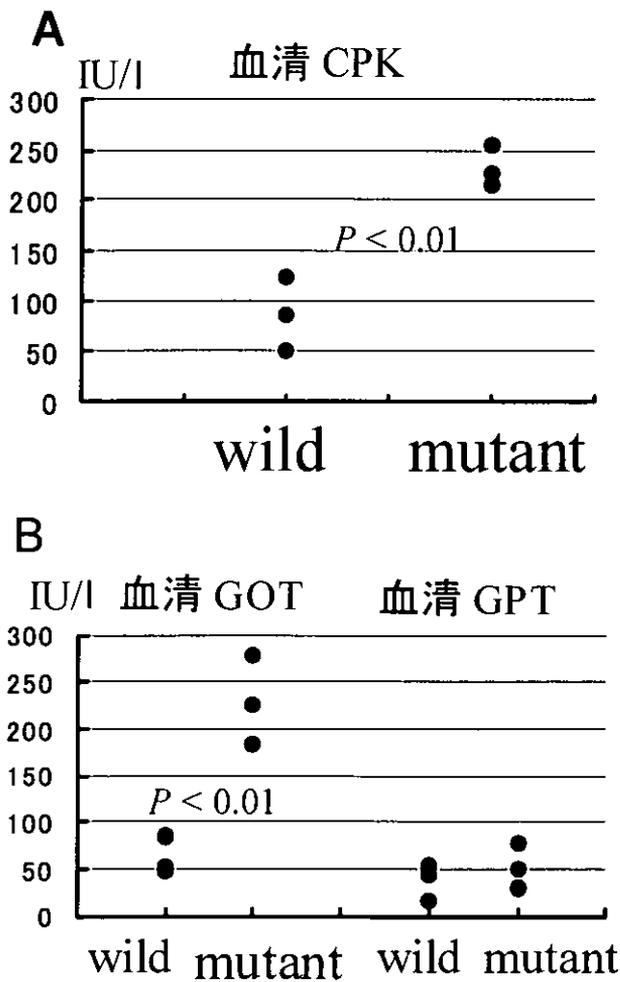


図 16. TgCAGmBD6-1 マウスの血清所見
 A. 生後 3 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウス (Mutant) と野生型 (Wild) の同腹仔の血清クレアチンキナーゼ活性を測定した。TgCAGmBD6-1 マウスの血清クレアチンキナーゼ活性は、有意に高値であった ($p < 0.01$)。
 B. 生後 3 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウス (Mutant) と野生型 (Wild) の同腹仔の血清 GOT, GPT を測定した。TgCAGmBD6-1 マウスにおいて、血清 GOT が、有意に高値であった ($p < 0.01$)。

8) Tg CAGmBD6-1 マウスのジストロフィンの分布

TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋の病理変化が、筋ジストロフィーの病理所見に類似していたため、我々は、まず、ジストロフィン抗体による染色を行った。TgCAGmBD6-1 マウスの腓腹筋においても、野生型の同腹仔と同様に、筋膜に沿って存在するジストロフィンが明瞭に示され、ジストロフィンおよびジストロフィン関連蛋白の異常を疑わせる所見は認められなかった (図 17)。

9) Tg CAGmBD6-1 マウスの NCAM の分布

我々は、Tg CAGmBD6-1 マウスの骨格筋の病理変化の機序について分子レベルで検討するために、いまだ病理変化の少ない生後一ヶ月の Tg CAGmBD6-1 マウスの筋線維での NCAM の分布を、免疫組織学的に評価した。一般に、成熟した筋線維では、NCAM は、神経筋接合部に限局して存在する。そのため、野生型の同腹仔では、その存在が検出できなかったが、Tg CAGmBD6-1 マウスでは、細胞質全体に NCAM の存在する筋線維が高頻度に認められた (図 18)。特に、再生線維ではないと思われる偏在核の筋線維にも NCAM の強染する線維が認められたことは興味深い。

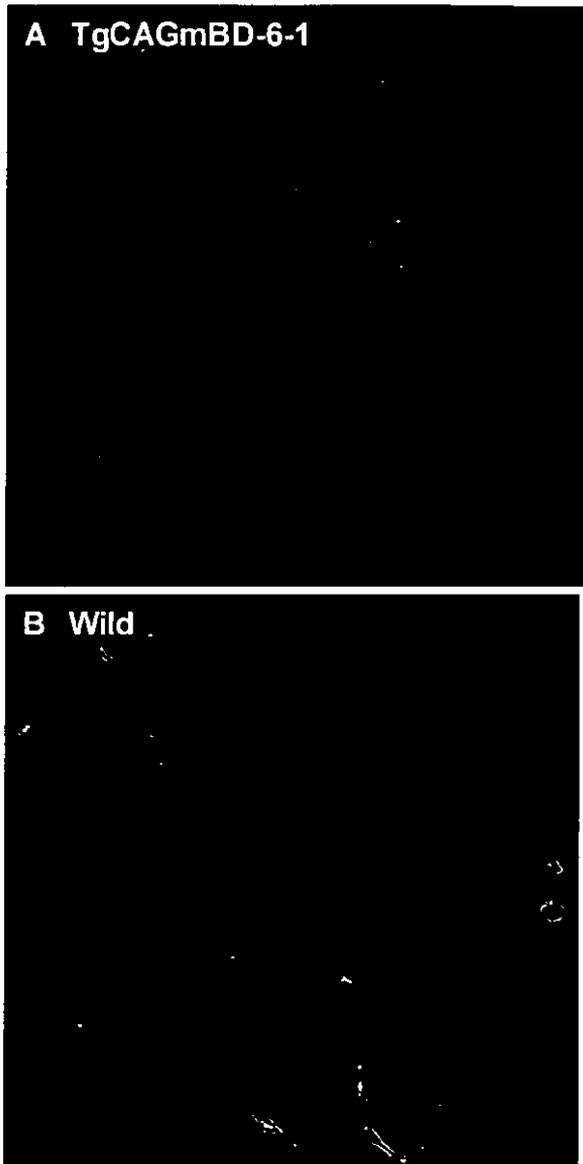


図 17. TgCAGmBD6-1 マウスのジストロフィンの分布

TgCAGmBD6-1 マウスの腓腹筋においても、野生型の同腹仔と同様に、筋膜に沿って存在するジストロフィンが明瞭に示された。

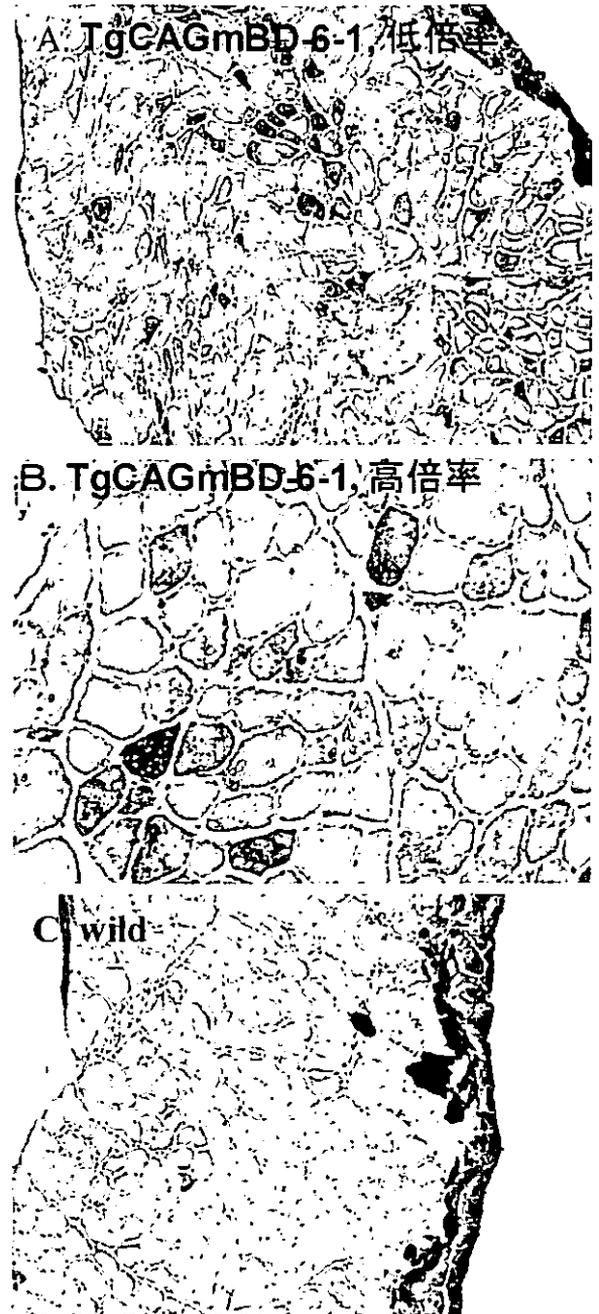


図 18. TgCAGmBD6-1 マウスの NCAM の分布
 生後一ヶ月の Tg CAGmBD6-1 マウスの前脛骨筋での NCAM の分布を、免疫組織学的に評価した。A. Tg CAGmBD6-1 マウスでは、細胞質全体に NCAM の存在する筋線維が高頻度に認められた。B. 高倍率で観察すると、再生線維ではない偏在核の線維にも NCAM の強染する線維が認められる。C. 野生型マウスでは、NCAM は検出されなかった。

10) TgCAGmBD6-2 マウスの所見

TgCAGmBD6-2 マウスでは、TgCAGmBD6-1 マウスで認められた低体重、筋力低下、骨格筋の病理変化は認められなかった (図 19)。しかし、生後6ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウスにおいて NCAM の筋線維での分布を検討したところ、TgCAGmBD6-1 マウスと同様に、細胞質全体に NCAM の存在する筋線維が認められた (図 20)。

さらに、生後9ヶ月の TgCAGmBD6-2 系統の F0 マウスのひらめ筋について、同様に NCAM の筋線維での分布を検討したところ、細胞質全体に NCAM の存在する筋線維が、より高頻度、かつ明瞭に示された (図 21)。同様の所見は、TgCAGmBD6-1 の F0 マウスでも認められたが、トランスジーンの遺伝しなかった F0 マウスでは、認められなかった。

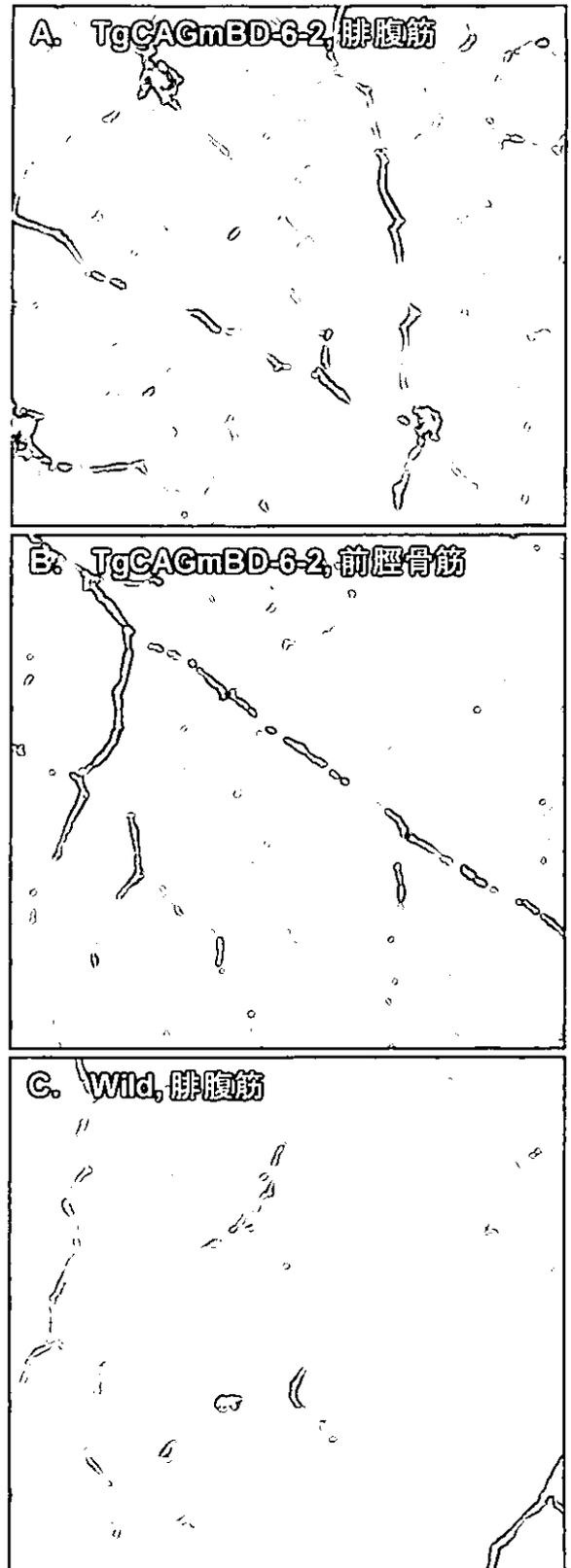


図 19. TgCAGmBD6-2 マウスの筋所見
TgCAGmBD6-2 マウスの腓腹筋 (A)、前脛骨筋 (B) には、HE 染色において、筋線維の壊死や再生の所見、中心核線維は認められなかった。(C) には、野生型の同腹仔の所見を示した。

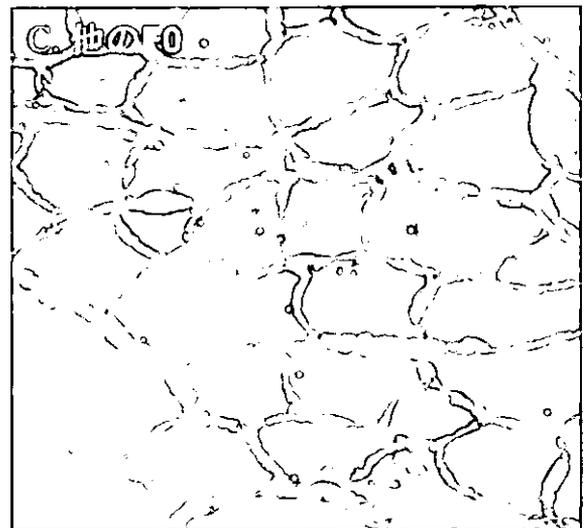
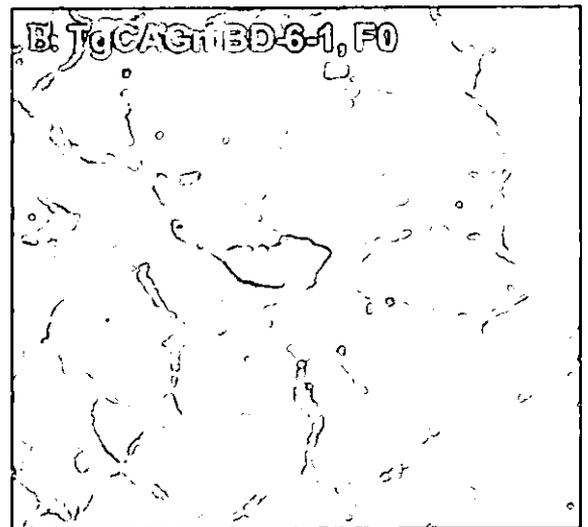
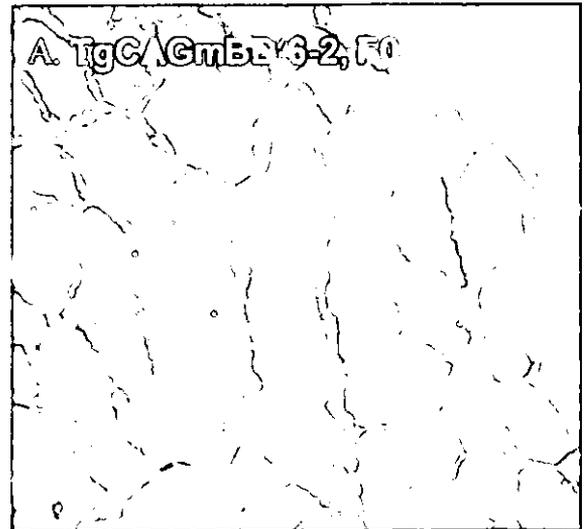
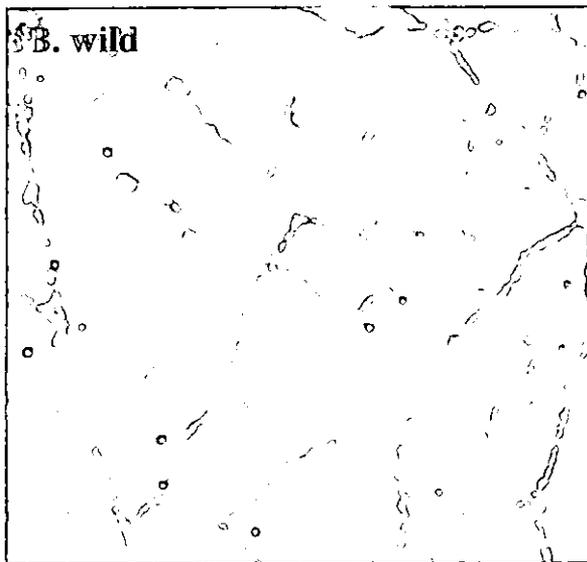
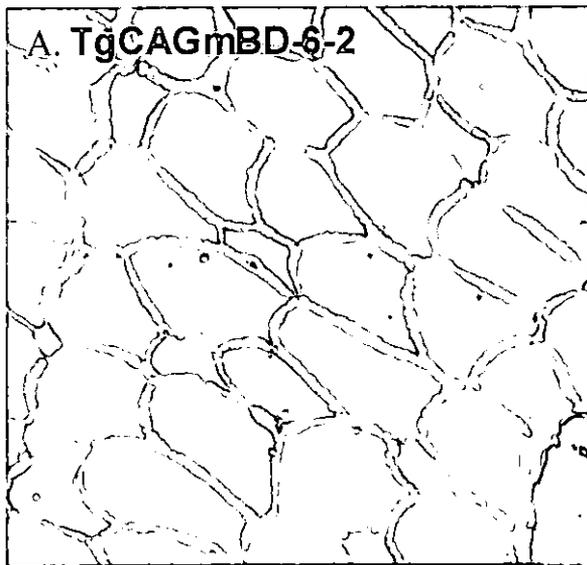


図 20. TgCAGmBD6-2 マウスの NCAM の分布
 生後六ヶ月の Tg CAGmBD6-2 マウスの腓腹筋
 での NCAM の分布を、免疫組織学的に評価した。
 A. TgCAGmBD6-2 マウスでは、TgCAGmBD6-1
 マウスと同様に、細胞質全体に NCAM の存在す
 る筋線維が高頻度に認められた。 B. 野生型マウ
 スでは、NCAM は検出されなかった。

図 21. F0 マウスの NCAM の分布

F0 マウスのひらめ筋での NCAM の分布を、免疫
 組織学的に評価した。 A. TgCAGmBD6-2 系統の
 F0 マウスでは、細胞質全体に NCAM の強染する筋
 線維が高頻度に認められた。野生型マウスでは、
 NCAM は検出されなかった。

B. 同様に TgCAGmBD6-1 系統の F0 マウスでも、
 細胞質全体に NCAM の強染する筋線維が高頻度に
 認められた。 C. 他の F0 マウスでは、NCAM は検
 出されなかった。

D. 考察

我々は、mBD-6 を過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、興味深い表現型を見出した。すなわち、TgCAGmBD6-1 マウスは、成長障害と筋力低下を示し、骨格筋には、筋線維の壊死と再生の所見が認められた。

生後 20 日頃までの TgCAGmBD6-1 マウスでは、明らかな体重減少もなく、筋組織上も核の偏在する正常の筋線維が主体であることから、骨格筋の発生過程に異常はないと考えられる。しかし、生後一ヶ月ころより、成長障害が明らかとなり、進行性に筋力も低下し、生後 6 ヶ月ころには、一見して亀背が認められるようになった。また、筋力のテストにおいても、体重を保持する能力の低下していることが明らかとなった。

さらに、血清中のクレアチンキナーゼ活性やアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性の上昇を認め、筋破壊による酵素の逸脱を示す所見が得られた。アラニンアミノトランスフェラーゼ活性は上昇していなかったことも、骨格筋に由来する異常所見であることに合致している。これらの所見は、ヒトおよび動物モデルで認められる筋ジストロフィー症の所見に極めて類似している。

一方、TgCAGmBD6-2 マウスでは、上記のような体重減少、筋力低下、筋線維の壊死、再生の所見はえられなかったが、NCAM の筋線維内での分布に異常が認められた。TgCAGmBD6-2 マウスの一見正常と思われた筋組織において、TgCAGmBD6-1 マウスと共通の特異的な異常が見出されたことは、病態を検討する上でも非常に興味深い。

さらに、部分的にも TgCAGmBD6-1 マウスと TgCAGmBD6-2 マウスの間で共通の異常所見が得られたことは、TgCAGmBD6-1 マウスの筋病変が、染色体への挿入変異による偶発的異常ではないことを強く支持している。TgCAGmBD6-2 マウスでは、ゲノム上のトランスジーンのコピー数も少なく、蛋白レベルでの発現量も少ないことが示されており、そのために顕著な異常をきたさなかったものと察せられる。

我々の研究により、mBD-6 の過剰発現が、筋ジストロフィー症に類似した病態をきたすことが明らかとなった。個体レベルで、defensin と疾患との関連を明確に指摘した初めての知見である。これまでの動物モデルの研究は、defensin の抗微生物作用による感染防御上の重要性を示すものであった。しかし、defensin は、免疫系のエフェクター因子としての機能だけでなく、炎症反応の制御にも関わっており、defensin 自身も複雑な発現の制御を受けていることが明らかになりつつある。したがって、defensin の過剰発現は、感染防御に有利になる一方で、様々な炎症性疾患を惹起するものと思われる。

筋ジストロフィー症は、筋線維の壊死と再生を示し、進行性に筋力の低下をきたす疾患である。ジストロフィン遺伝子の変異によるデュシャンヌ型筋ジストロフィーを代表として、ジストロフィン関連蛋白の変異が多く知られており、これらの症例では、細胞骨格と細胞外器質との物理的な結合に異常がある。そのほか、カルパイン 3 やカヴェオリンの変異による筋ジストロフィー症も知られている。

我々は、免疫染色を用いて、ジストロフ

インの分布について調べたが、異常は認められなかった。また、他のジストロフィン関連蛋白の変異による筋ジストロフィーモデルマウスの例と比較して、血清クレアチンキナーゼ活性の上昇は軽度である。おそらく、筋の壊死には、他の機序が働いていると思われる。

筋線維における NCAM の発現の変化は、再生線維に認められるほか、神経原性筋疾患でよく報告されている。しかし、我々のマウスでは、脊髄前角の運動ニューロンの数や末梢神経に、明らかな病理学的異常は認められなかった。また、ブンガロトキシンを用いて、神経筋接合部を観察したが、やはり明らかな変化は認められなかった。

我々の研究は、呼吸器疾患との関わりにおいて、二つの方向での発展性を示唆している。一般に pCAGGS ベクターでは、骨格筋において外来遺伝子が最も強く発現することが多く、TgCAGmBD6-1 マウスも骨格筋に最も顕著な病変をきたした。しかし、このような過剰発現による有害事象は、肺を含めた他の組織においても起こりうると思われる。すなわち、炎症反応の一因子である defensin が、いわゆる炎症性肺疾患と関わりうることも示唆される。実際、ヒトにおいて hBD-1 の遺伝子多型と肺気腫の関連を示す報告がある。

また、呼吸器疾患と骨格筋との関わりは深い。慢性呼吸不全や肺悪性腫瘍の末期には、体重は減少し、筋力は低下する。この、いわゆるカヘキシアでは、骨格筋の蛋白合成の低下と蛋白の異化亢進により筋量が減少する。その筋萎縮にはアポトーシスが深く関わり、tumor necrosis factor- α のようなサイトカインが直接、あるいは間接

的に筋のアポトーシスを誘導するといわれている。TgCAGmBD6-1 マウスでみられた筋萎縮は、炎症反応の一因子である β -defensin とカヘキシアの間の関連を示唆しているのかもしれない。

E. 結論

mBD-6 を過剰発現するマウスにおいて、筋ジストロフィー症に類似した筋線維の壊死、再生の所見が得られた。抗菌ペプチドの過剰発現は、感染防御に有利になる一方で、様々な炎症性疾患の原因になりうることを示唆する所見である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi Y. et. al., Identification of Multiple Novel Epididymis-Specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J. Immunology* 2002, 169: 2516-2523
- 2) 山口泰弘. 抗菌ペプチドによる気道の感染防御. *呼吸* 2002 21 巻 9 号: 799-804

2. 学会発表

- 1) 山口泰弘 ら. 新規 β -defensin の同定とその発現パターンの検討. 第 44 回日本老年医学会学術集会 (2002)
- 2) Yamaguchi Y. et. al. A Clinical Study on the Elderly Tuberculosis Patients. 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology. (2003)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得予定

筋ジストロフィー症の病態モデル哺乳動物、及びその製造方法

分担研究報告書

新規リゾフォスファチジン酸（LPA）受容体のクローニング

分担研究者 石井 聡 東京大学大学院医学系研究科生化学講座 講師

研究要旨

オーファン受容体の一つであるヒト p2y₉（別名 GPR23）を過剰に発現した CHO 細胞に約 200 種類の脂質を作用させたところ、この受容体はグリセロリン脂質の一種であるリゾフォスファチジン酸（Lysophosphatidic Acid, LPA）に反応して細胞内カルシウム濃度やサイクリック AMP 濃度を上昇することが明らかとなった。LPA が p2y₉/GPR23 受容体に特異的に結合（解離定数 = 45 nM）することも、放射ラベルした LPA を用いて確認した。ヒト腎臓、骨格筋、および巨核球系細胞から抽出した RNA を用いたノーザンハイブリダイゼーションで p2y₉/GPR23 受容体の mRNA を検出した。さらに、多種のヒト組織由来の cDNA を鋳型にして定量的 PCR を行ったところ、p2y₉/GPR23 受容体 mRNA は卵巣で比較的高発現していることが分かった。以上の結果より、p2y₉/GPR23 が LPA の新規受容体であることが同定された。

A. 研究目的

G タンパク質共役型受容体の総数はおよそ 1000 といわれているが、その多くは依然としてリガンドが不明の、いわゆるオーファン受容体である。本研究では脂質を特異的リガンドとする未知の受容体が存在することを想定し、グリセロリン脂質の一種である血小板活性化因子受容体の一次構造に相同性の高いオーファン受容体を BLAST 検索した。その結果 p2y₅ と p2y₉（別名 GPR23）の二つが候補として上がった（図 1）。そこで、これらのオーファン受容体を培養細胞に発現させて、細胞内シグナル伝達を指標に特異的な脂質リガンドの探索を試みた。

B. 研究方法

p2y₅ と p2y₉/GPR23 受容体遺伝子のオープンリーディングフレーム内にはイントロンが存在しない。そこで両遺伝子を、ヒトゲノム DNA を鋳型とした入れ子 PCR によりクローニングした。この際、N 末端に 9 アミノ酸より成る HA エピトープタグを付加した。このクローンを、強力な発現作用を有する CAG プロモーターとネオマイシン耐性遺伝子を持つ発現用プラスミドベクター（pCXN2.1）に挿入し、哺乳動物細胞（CHO 細胞）にトランスフェクトした。その後 G418 で薬剤選択をかけ、モノクローナルな G418 耐性細胞株を得た。G タンパク質共役型受容体は 7 回膜貫通型構造で、その N 末端は細胞膜の外側