

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'-TGTGCATATTCACGAAGAAG-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。

9) Evans Blue dye 染色

PBS に溶解した 10mg/ml の Evans Blue Dye を、0.1ml/10g 体重、腹腔内に注射し、16 時間後に骨格筋を摘出した。この骨格筋を上記と同様に、凍結標本とし、蛍光顕微鏡にて観察した。

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。

ジストロフィン、ジストログリカン、ラミニンの検出には、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、抗ジストロフィン抗体 (Santa Cruz)、抗ジストログリカン抗体 (upstate)、抗ラミニン抗体 (LSL) 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。

Neural cell adhesion molecule (NCAM) や I κ B の検出には、酵素抗体法を利用した。すなわち、0.15% NaN₃, 0.15% H₂O₂ / 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)、抗 I κ B 抗体 (Santa Cruz) と 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、H₂O₂ 液を加えてシグナルを検出した。

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、トランスジェーンの挿入が確認され、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、トランスジェ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、トランスジェーンが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

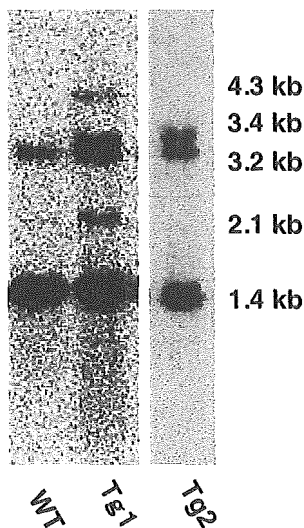


図2. トランスジェーンのサザンブロット

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、トランスジェ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ェ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

トランスジェーンの発現を、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。トランスジェーンの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、TgCAGmBD6-6マウスのいずれの系統においても、トランスジェ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エスタンブロットし、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。

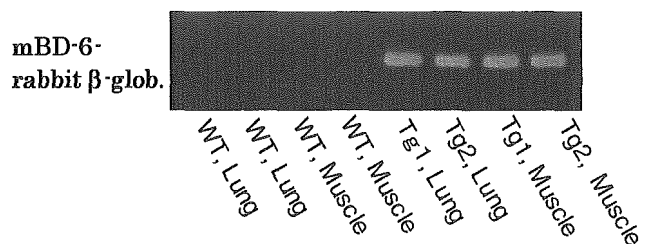


図3. RT-PCRによるトランスジェーン発現解析.

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のトランスジェーンによるシグナルが認められた。

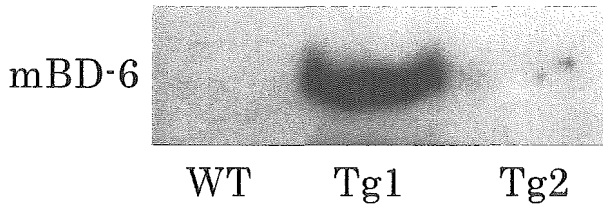


図 4. ウェスタンブロットによる mBD-6 ペプチド過剰発現の確認.

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。

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 5A)。しかし、生後 6 週頃には、TgCAGmBD6-1 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 5B)。加齢に伴い、野生型では体重増加を続けるが、TgCAGmBD6-1 マウスでは、体重増加が認められず、そのほとんどは、生後 8-11 ヶ月後に死亡した。

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 6)。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。

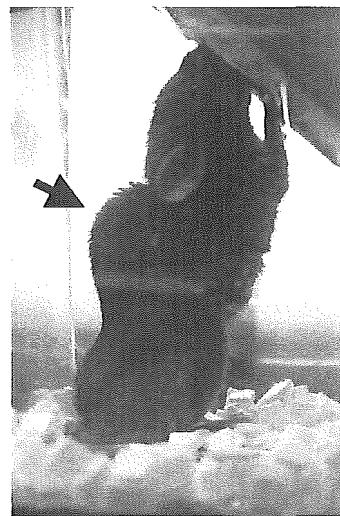
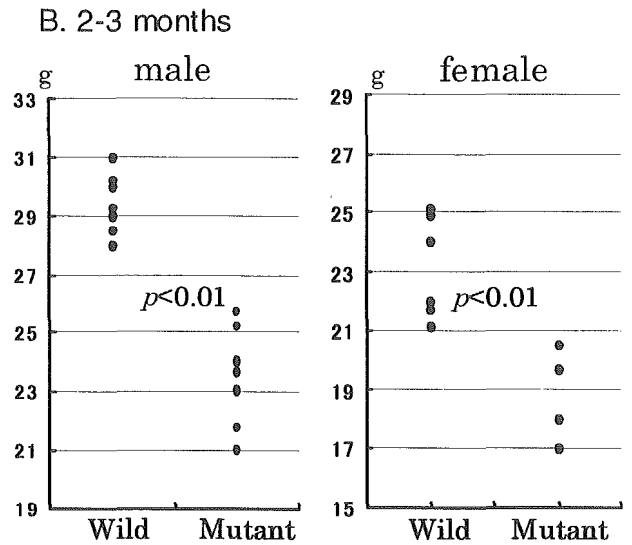
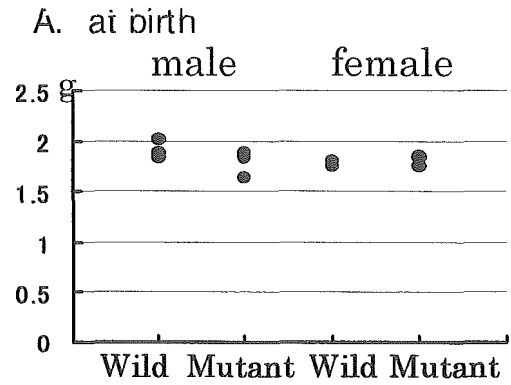


図 6. TgCAGmBD6-1 マウスの亀背
生後 6 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスは、進行性の亀背を示した (矢印)。

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7)。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。

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8)。

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9)。

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10)。

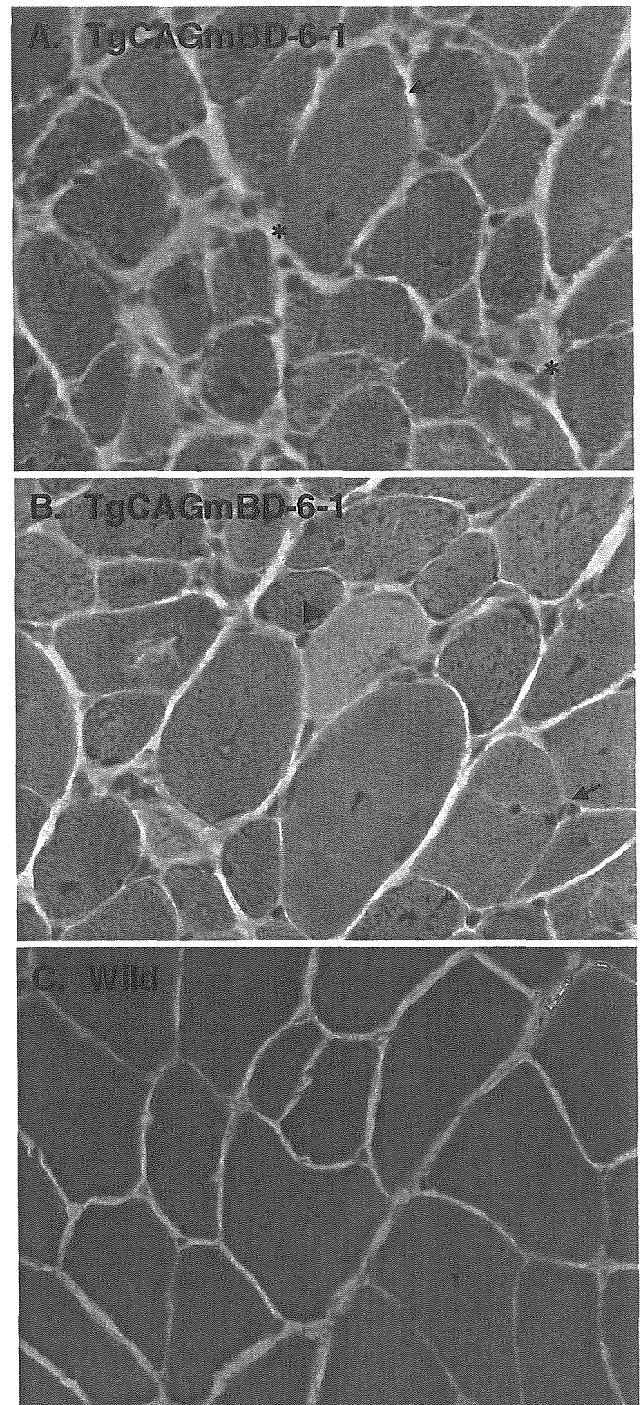


図7. TgCAGmBD6-1 マウスの筋病理所見

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。

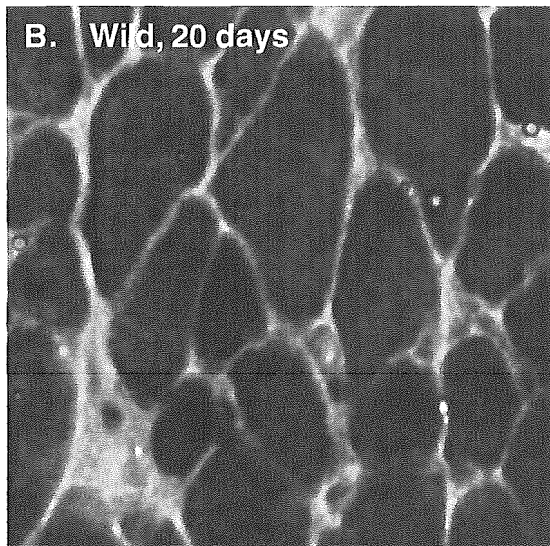
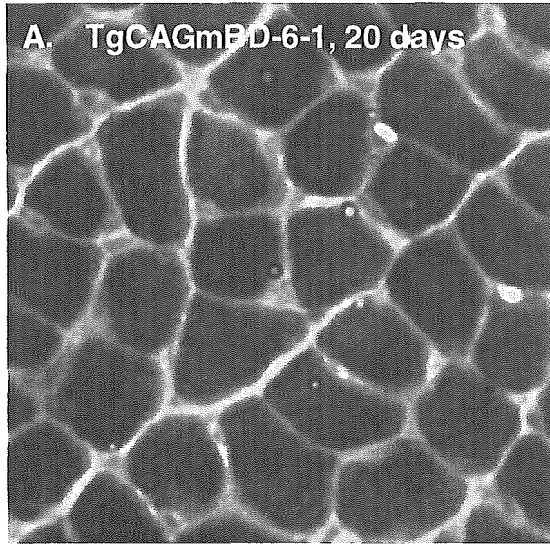


図 8. 生後 20 日の筋病理所見

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。

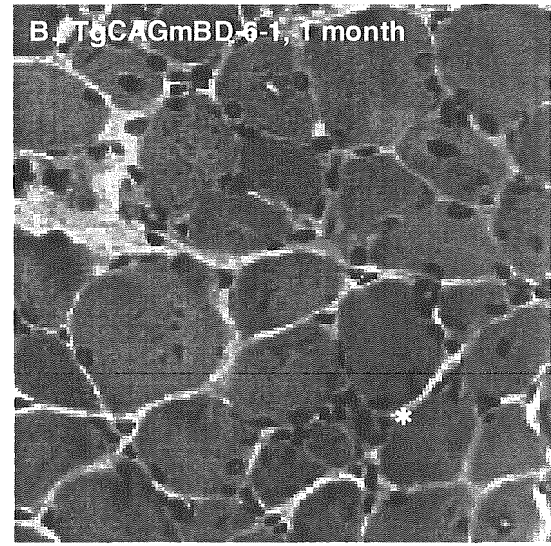
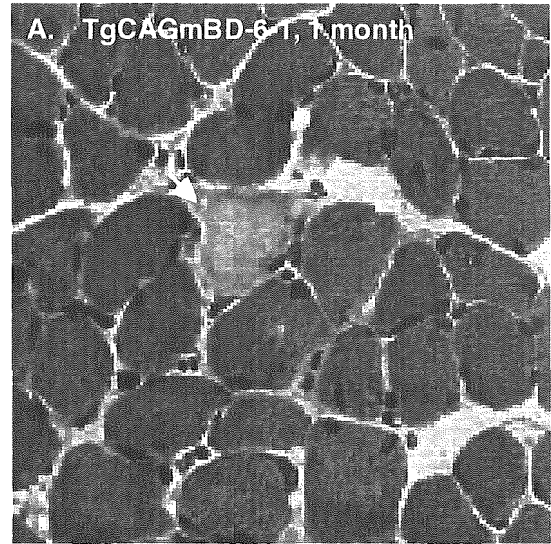


図 9. 生後一ヶ月の筋病理所見

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。

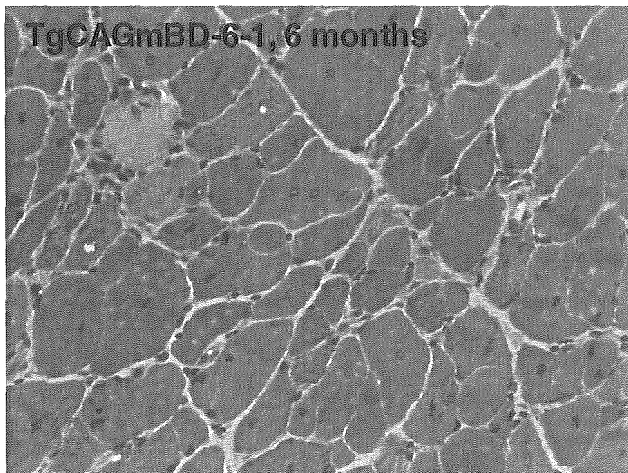


図 10. 生後六ヶ月の筋病理所見

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 11A 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 11B 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。

8) TgCAGmBD6-1 マウスの Evans Blue dye 染色

TgCAGmBD6-1 マウスの筋線維膜の破壊により Evans Blue dye の取り込みの亢進した筋線維の存在が明瞭に示された(図 12)。他の筋ジストロフィーモデルマウスと共通の所見である。

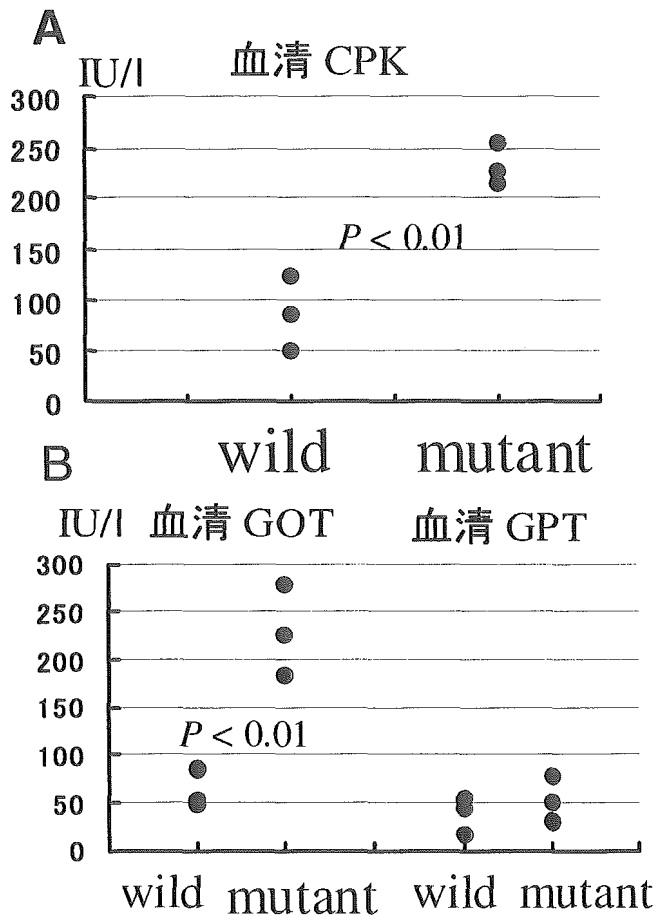


図 11. TgCAGmBD6-1 マウスの血清所見

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、血清 GOT、血清 GPT を測定した。TgCAGmBD6-1 マウスの血清クレアチンキナーゼ活性、血清 GOT は、有意に高値であった ($p < 0.01$)。

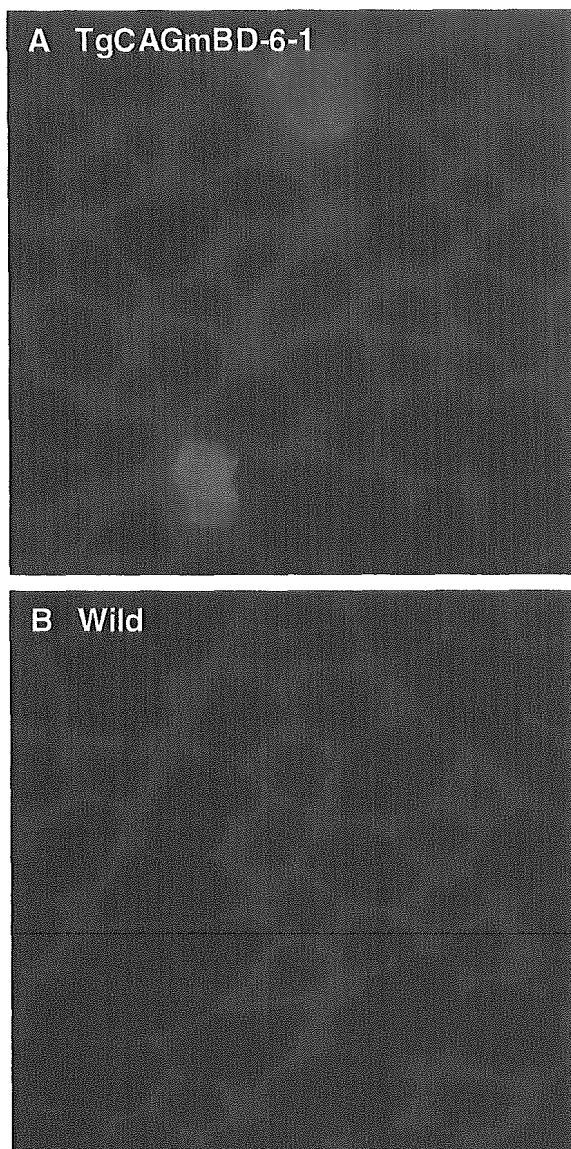


図 12. Evans Blue Dye 染色

PBS に溶解した 10mg/ml の Evans Blue Dye を、0.1ml/10g 体重、腹腔内に注射し、16 時間後に骨格筋を摘出した。生後 2 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスにおいて、取り込みの亢進した筋線維が認められた。膜の透過性の亢進を示しており、筋ジストロフィーにみられる所見である。

9) 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 12)。

10) Tg CAGmBD6-1 マウスのジストグリカン、ラミニンの分布

次に、ジストグリカン、ラミニンの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グリカン、ラミニンが明瞭に示され、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 13, 14)。

11) Tg CAGmBD6-1 マウスのカルパイン-3 の分布

ジストロフィン関連蛋白のほかにも、蛋白分解酵素であるカルパイン-3 の異常が、肢体型筋ジストロフィーの原因となることが知られており、我々は、カルパイン-3 の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、筋原線維に沿って存在するカルパイン-3 が明瞭に示された (図 15)。

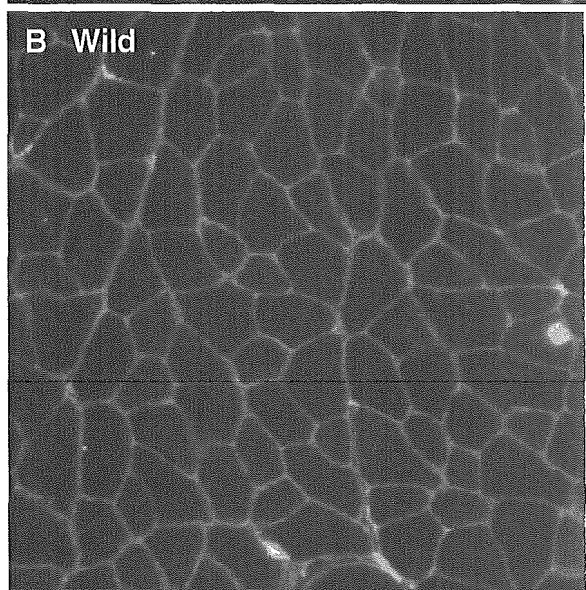
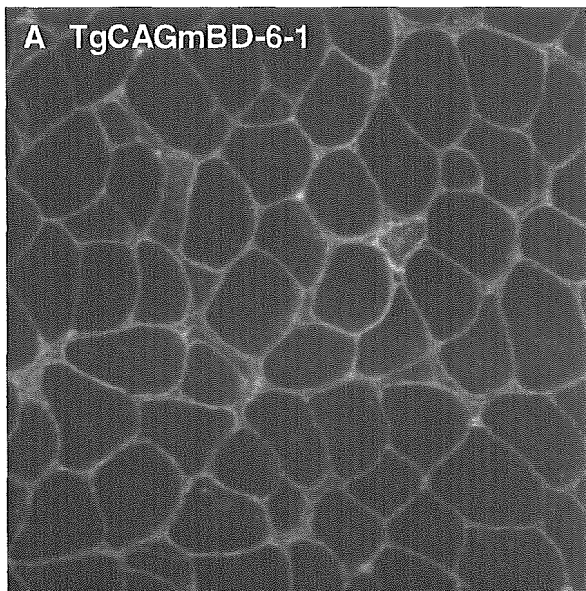


図 13. TgCAGmBD6-1 マウスのジストロフィンの分布

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。

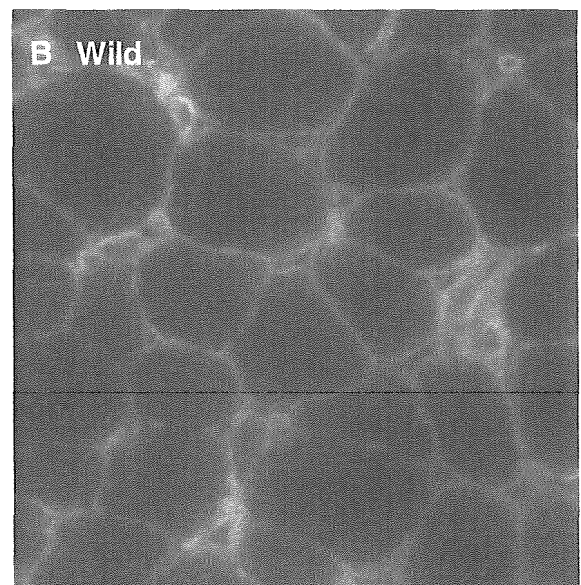
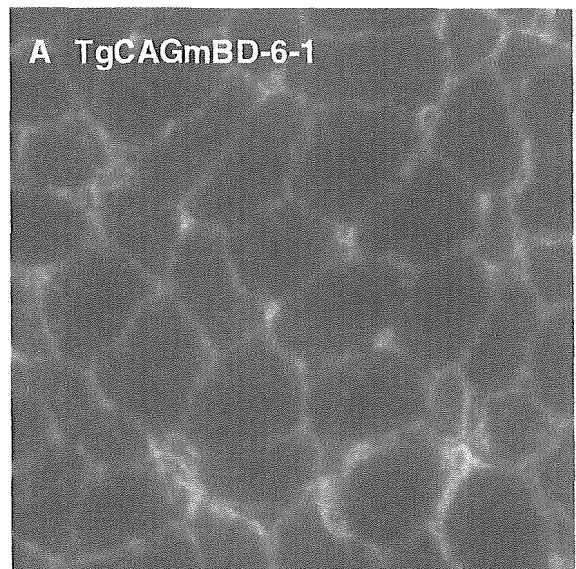


図 14. TgCAGmBD6-1 マウスのラミニンの分布

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ラミニンが明瞭に示された。

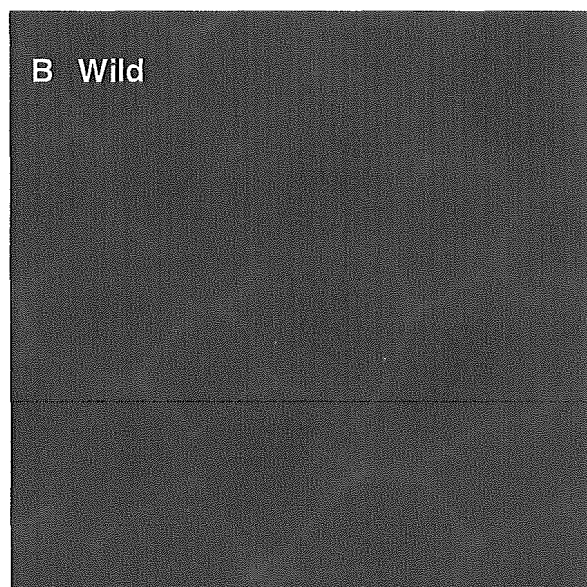
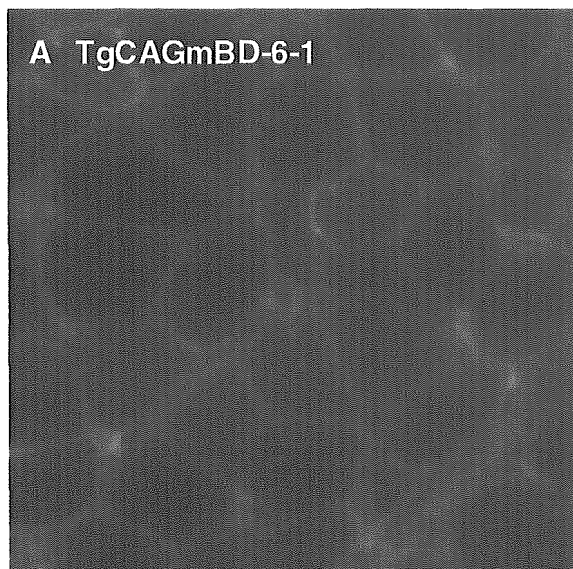


図 15. TgCAGmBD6-1 マウスの α -ジストログリカンの分布

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 α -ジストログリカンが明瞭に示された。

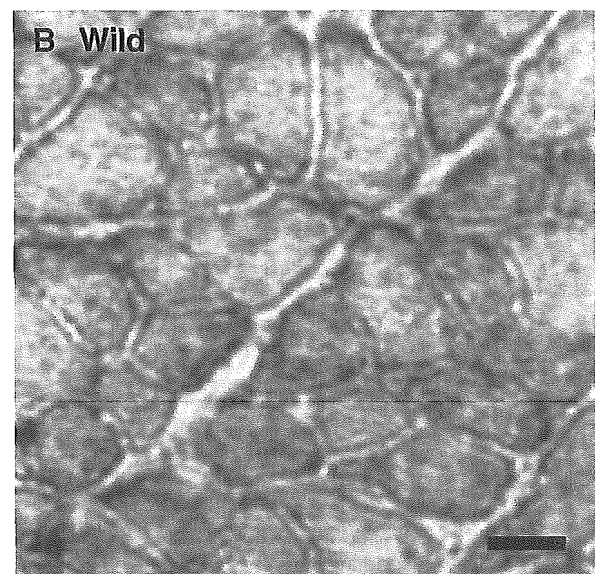
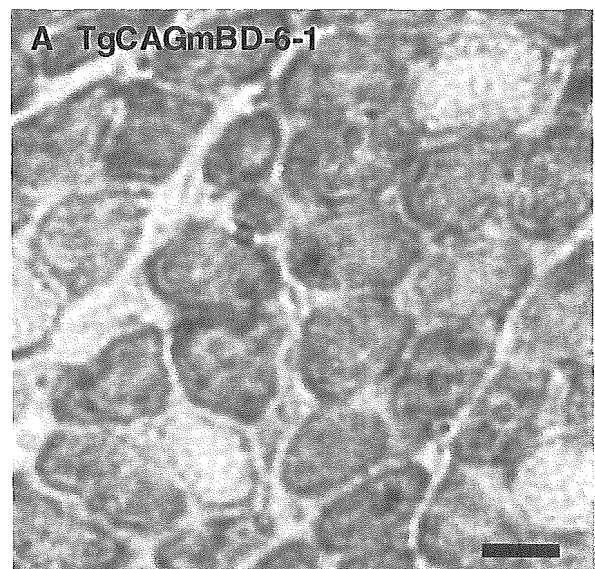


図 16. TgCAGmBD6-1 マウスのカルパイン-3の分布

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、筋原線維に沿って存在するカルパイン-3が明瞭に示された。

12) Tg CAGmBD6-1 マウスの神経系の評価

TgCAGmBD6-1 マウスの神経系の病理についても評価した。TgCAGmBD6-1 マウスの脊髄前角の運動ニューロンの数や形態には、野生型との間に相違を認めなかった(図 17)。

13) TgCAGmBD6-2 マウスの所見

生後数ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウスでは、Tg CAGmBD6-1 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。しかし、生後一年の TgCAGmBD6-2 マウスは、様々な部位の骨格筋において、変性線維や中心核線維が、少数、認められた。同月齢の野生型マウスでは、そのような線維は認められなかった(図 18)。

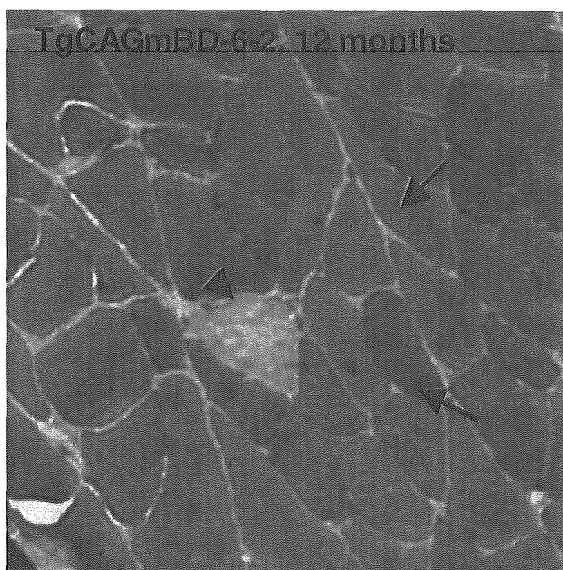


図 18. 生後 12 ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウスの筋所見 生後 12 ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウスの腓腹筋には、HE 染色において、筋線維の壊死や再生の所見、中心核線維が、少数認められた。

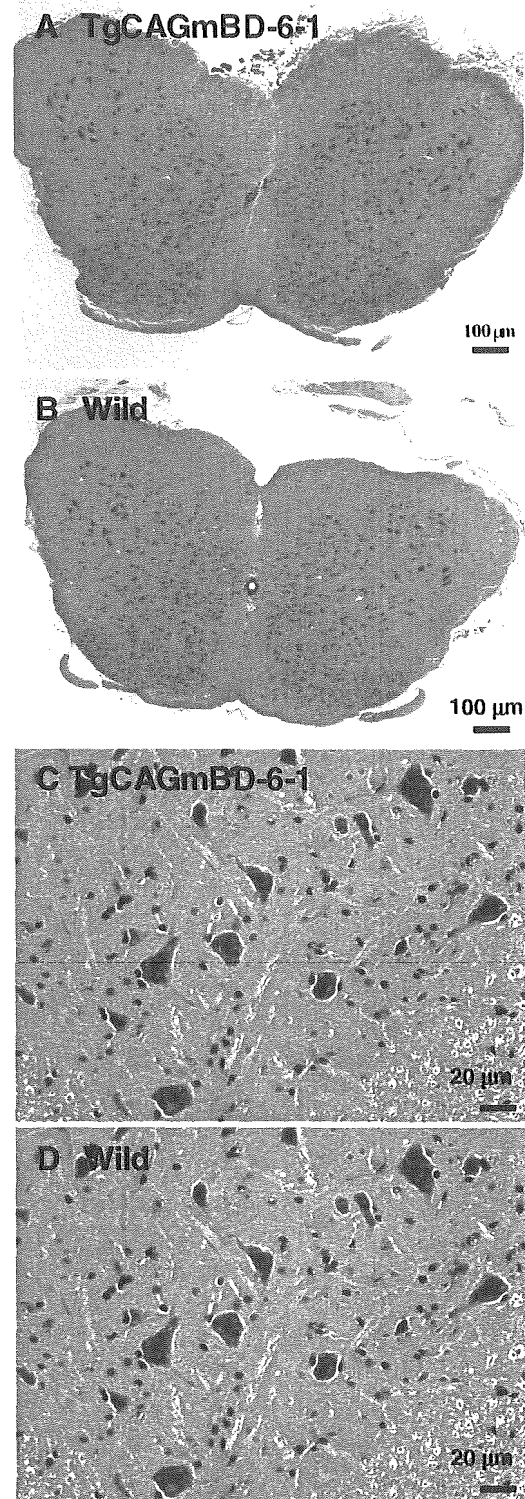


図 17. TgCAGmBD6-1 マウスの 脊髄の HE 染色 Tg CAGmBD6-1 マウスの脊髄を HE 染色にて評価した。脊髄前角の運動ニューロンの数や形態には、TgCAGmBD6-1 マウスと野生型との間に相違を認めなかった

14) Tg CAGmBD6 マウスでの NCAM の分布

我々は、生後一ヶ月の TgCAGmBD6-1 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、TgCAGmBD6-1 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 19)。

また、生後 1 年の野生型マウスでは、少数の筋線維が NCAM 陽性であったが、生後一年の TgCAGmBD6-2 マウスでは、多くの筋線維が NCAM 陽性であり、TgCAGmBD6-1 マウスと共通の所見が得られた。

15) Tg CAGmBD6 マウスでの I κ B α の分布とアポトーシスの所見

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、筋線維での I κ B α の分布を評価した。免疫組織染色において、生後 1 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスと生後 12 ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウスにおいて、I κ B α の蓄積している筋線維が多数存在することが明らかとなった (図 20)。このような I κ B α の蓄積は、LGMD2A 型の筋ジストロフィー症やカルpain 3 欠損マウスに認められる所見であり、これらの症例やマウスでは、I κ B α の蓄積がアポトーシスに関与すると報告されている。TgCAGmBD6 マウスにおいても、連続切片の評価により、I κ B α 陽性の筋線維の中に、活性型カスパーセ 3 の抗体に染まる線維が存在した (図 21)。

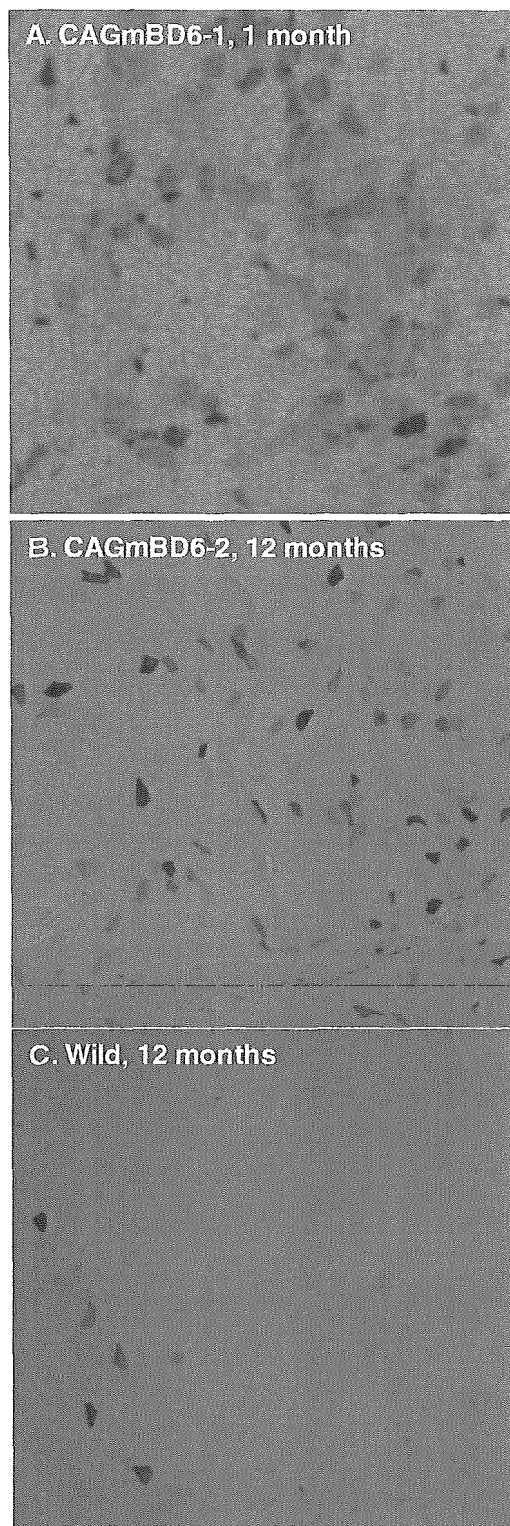


図 19. TgCAGmBD6 マウスの NCAM の分布
生後 1 ヶ月の Tg CAGmBD6-1 マウスや生後 12 ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウスにおいて、細胞質全体に NCAM の存在する筋線維が高頻度に認められた。生後 12 ヶ月の野生型マウスでは、NCAM 陽性の筋線維はわずかであった。

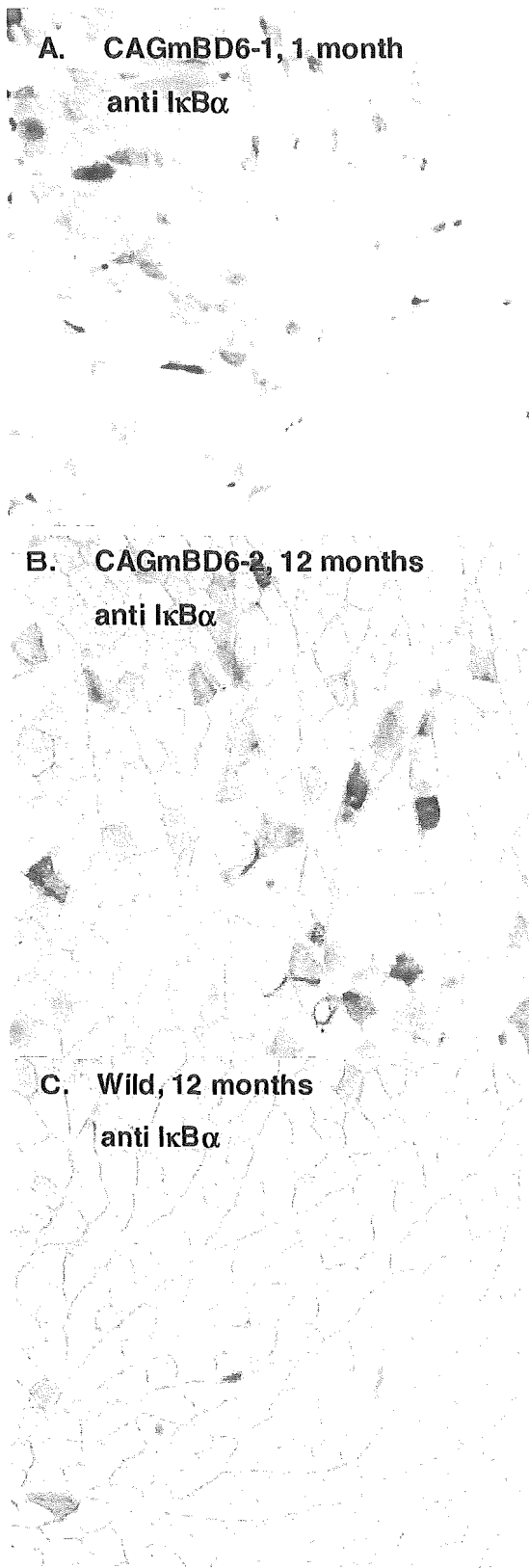
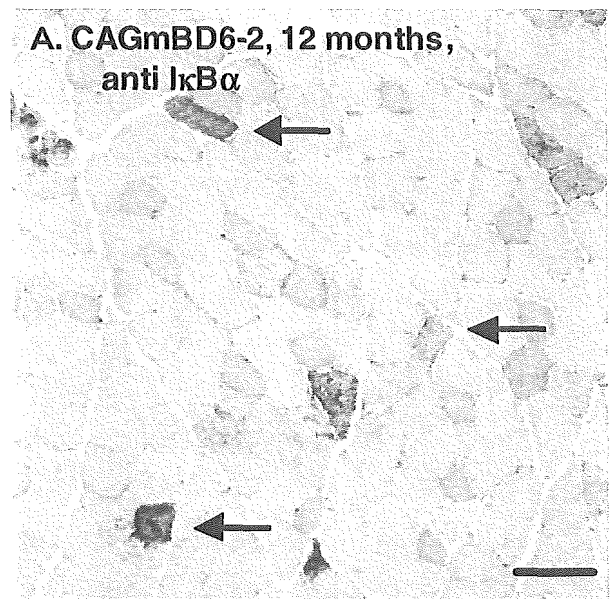


図 20. TgCAGmBD6 マウスの IκBα の分布

生後 1 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスや生後 12 ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウスにおいて、IκBα の濃染する筋線維が高頻度に認められた。生後 12 ヶ月の野生型マウスでは、IκBα 陽性の筋線維はわずかであった。



B. CAGmBD6-2, 12 months,
anti cleaved caspase-3

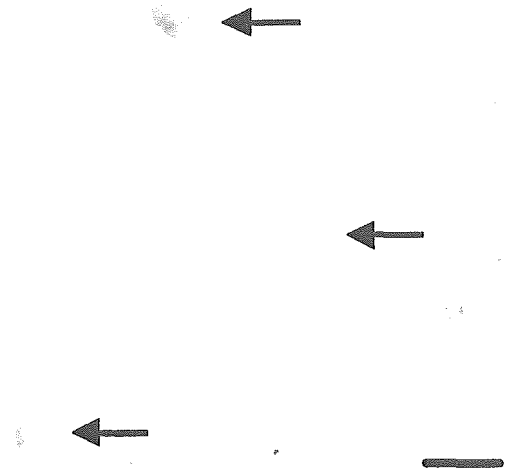


図 21. IκBα 陽性線維の caspase-3 活性

生後 12 ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウスにおいて、IκBα の蓄積した筋線維のいくつかにおいて、アポトーシスに関わる caspase-3 の活性型の存在が示された。

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。

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。

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。また、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。

我々は、これら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、NF- κ B 系について免疫組織学的に評価した。興味深いことに、TgCAGmBD6-1 マウスにおいても TgCAGmBD6-2 マウスにおいても、I κ B α の異常に蓄積した筋線維が多数認められた。I κ B α の分解に関わるカルパイン 3 の変異や欠損によって、ヒトやマウスで筋ジストロフィーをきたすことが知られており、*in vitro* においても、I κ B α の過剰発現が筋原細胞のアポトーシスをもたらすことが知られている。我々も、免疫組織学的に活性型カスパーゼ 3 の存在を示すことができ、同様の機序の働いていることを支持している。

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。さらに今回、我々は、その機序に NF- κ B 系の関与することを示唆する所見をえた。

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、気管支喘息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。その機序には、NF- κ B 系の異常が関与することが示唆された。

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)

分担研究報告書

Gタンパク質共役型受容体を介した生体制御機構の解析

分担研究者 石井 聡 東京大学大学院医学系研究科生化学分子生物学講座 講師

研究要旨

血小板活性化因子(Platelet-activating Factor; PAF)は血小板凝集や白血球の活性化をはじめとする多彩な生理活性を示す脂質メディエーターである。PAFは、細胞膜上のGタンパク質共役型受容体に作用することで生理活性を示す。本研究室で作製したPAF受容体欠損(PAFR-KO)マウスの解析から、我々はPAFが急性呼吸窮迫症候群(ARDS)やアナフィラキシー、虚血再灌流障害をはじめとする様々な疾患に関与することを示してきた。本年度はPAFが関与する疾患をさらに解明することを目的として、PAFR-KOマウスを用いて気管支喘息モデルと骨粗鬆症モデルを解析したので、本稿ではその結果を報告する。

さらにPAF受容体と相同性が高いGタンパク質共役型受容体(TDAG8)がプロトンに反応して細胞内シグナル伝達を惹起する「pHセンサー」であることを発見したので、併せてここに報告する。

1. 気管支喘息の増悪因子としてのPAF

1-A. 研究目的

PAFが気道過敏性、気道収縮、気道からの粘液の分泌など、多くの気管支喘息の症状と似た病態をヒトや動物に惹起できることは以前から知られていた。また喘息患者では健常人とは異なり、肺胞洗浄液中にPAFが含まれる。喘息患者の気道には活性化した好酸球や肥満細胞が存在しており、*in vitro*の実験から推察するとこれらの細胞がPAFを産生していることが考えられる。しかもPAFは好酸球の強力な化学走性因子であり、脱顆粒も引き起こすことから好酸球浸潤を伴う炎症を増悪化するポテンシャルを持つ。以上のことから、長い間PAFは喘息の病態に関係す

ると考えられてきた。

PAFR-KOマウスを使って、我々はPAFが肺のアナフィラキシー反応に深く関与することを示してきた。このことはPAFが肺でのアレルギーの初期相に働くメディエーターであることを示唆している。しかしながら喘息に伴うアレルギー誘導型の気道過敏性や慢性炎症、すなわち肺でのアレルギーの遅延相に関するPAFの重要性についてはPAFR-KOマウスを使った検討は未だされていない。そこでマウスの喘息モデルを用いて検討することとした。

1-B. 研究方法

喘息モデルの作製

8-15 週齢の BALB/c に戻し交配したマウスに、卵白アルブミン (OVA) への感作 (0 日目と 14 日目に 50 μ g を腹腔投与) と経気道的な反復曝露 (10 mg/ml の生理食塩水溶液を 23 日目から 8 日間、2 日おきに 1 時間の間隔を挟んで 30 分 \times 3 回) を施し、好酸球浸潤性の気道炎症を伴う喘息様症状を惹起した。

血清と肺胞洗浄液の調製

麻酔下のマウスの大腿動静脈を切断して採血した。室温で 1 時間凝固させた後に遠心し、回収した血清を -80°C で保存した。脱血死したマウスの気管を切開してカニューレを挿入した。開胸後に 1 ml \times 2 回の PBS で肺胞洗浄を行った。回収した洗浄液を遠心後、上清は -80°C で保存した。沈殿した細胞は 0.1% BSA を含む冷生理食塩水に懸濁し、チュルク液で染色後に血球計数盤で濃度を求め、回収した細胞数を算出した。うち、一部の細胞をサイトスピンにかけ、ディフクイック染色の後に顕微鏡観察を行い、細胞の形態をもとに好酸球、リンパ球、マクロファージ/単球、好中球の割合を算出した。

肺ホモゲネートの調製

全肺を 1 g 当たり 8 ml の PBS 中でホモゲナイズし、18,000 \times g 遠心後の上清を回収した。

ELISA アッセイ

血清中の総 IgE と OVA 特異的 IgE、IgG1 のタイターは、適度に希釈後に ELISA 法で測定した。肺胞洗浄液中の IL-4、IL-5、IL-13、そしてシステイニルロイコトリエン (ロイコトリエン C₄/D₄/E₄ の総称) の濃度もまた ELISA 法で測定した。肺ホモゲネートに含まれる IL-5 と IL-13 の濃度も肺胞洗浄液と同様に ELISA 法で測定した。

肺の組織学的解析

組織学的解析用の肺は肺胞洗浄をせずに取り出し、空気で膨らませた状態で 10% ホルマリン含有 PBS 中に浸けて固定した。パラフィン包埋後、左右の肺葉について 3 μ m 厚の切片を上部、中部、下部の計 3 枚ずつ調製し、HE 染色または PAS 染色を施した。

炎症細胞が肺へ浸潤したレベルは HE 染色した左右の肺葉の切片について、ブラインドで 0 点から 5 点の半定量的なスコア化を行い、両者の和をその個体の点数とした。

杯細胞の過形成のレベルは、PAS 染色した切片で観察された気道 (16-29 個/匹) について、やはりブラインドで 0 点から 4 点の半定量的なスコア化を行い、気道一つ当たりの平均値をその個体の点数とした。

気道過敏性測定

麻酔したマウスに気道切開、カニューレ挿入、開胸を施し、100% 酸素で 2.5 Hz の人工換気を行った。生理食塩水またはメタコリンの生理食塩水溶液 (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/ml) をネブライザーでエアロゾル化し、マウスに 2 分間ずつ吸引させた。一回換気量は 8 ml/kg、呼気終末陽圧は 3 cmH₂O の条件下で、各エアロゾルを吸引後 1 分で気道内圧と流量を測定し、肺抵抗を算出した。気道の反応性は生理食塩水エアロゾル吸引後の肺抵抗を 2 倍にするのに必要なエアロゾルに含まれるメタコリン濃度 (EC₂₀₀) で表し、この値は実験データを内挿することによって求めた。

表1 肺胞洗浄液中の細胞数と分画

処理	n	総細胞数 (× 10 ⁵)	細胞分画 (%)			
			好酸球	リンパ球	マクロファージ/単球	好中球
野生型 SAL	4	1.6 ± 0.1	0.0 ± 0.0	2.7 ± 1.5	97.2 ± 1.5	0.1 ± 0.0
PAFR-KO SAL	4	2.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	2.6 ± 1.2	97.0 ± 1.4	0.3 ± 0.2
野生型 OVA	7	40.9 ± 6.3	69.1 ± 3.0	17.7 ± 2.3	12.2 ± 1.9	1.0 ± 0.2
PAFR-KO OVA	7	47.3 ± 4.1	63.5 ± 1.4	21.0 ± 2.0	13.7 ± 1.3	1.7 ± 0.5

データは平均 ± 標準誤差を表す。SAL：生理食塩水処理群；OVA：抗原感作/曝露群。

ムスカリン受容体結合実験

4 匹分 (雌雄 2 匹ずつ) の肺をホモゲナイズし、800 × g の遠心上清を 123,000 × g でさらに超遠心分離した。得られた沈殿を懸濁し、140,000 × g でもう一度超遠心を行った。この沈殿を懸濁し、100 μg 分のタンパク質に相当する量を種々の濃度 (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 nM) の [N-メチル-³H]スコポラミン (ムスカリン受容体非特異的アンタゴニスト) と、25°C で 90 分間結合させた。GF/C グラスフィルターでこの反応液をろ過した後、フィルターに吸着した放射能を測定して総結合量とした。非特異的結合は 20 μM のメタコリンの存在下で同様の実験を行って測

定して求めた。総結合量から非特異的結合量を差し引いて特異的結合量を算出した。

(倫理面への配慮)

マウスの扱い方については東京大学動物実験倫理委員会の規定に従った。

1-C. 研究結果

抗原 (OVA) 特異的 IgE 及び IgG1 は抗原に感作/曝露したマウスの血清にのみ検出された。また抗原感作/曝露マウスでは、総 IgE 濃度は生理食塩水処理のマウスに比べ約 6 倍上昇していた。しかし野生型マウスと PAFR-KO マウスの間では有意な差は認められなかった (データ略)。

表2 肺における Th2 サイトカインとシステニルロイコトリエンのレベル

処理	肺胞洗浄液 (pg/ml)					肺ホモゲネート (pg/g 肺)		
	IL-4	IL-5	IL-13	システニルロイコトリエン	n	IL-5	IL-13	n
野生型 SAL	12.0 ± 3.8	5.0 ± 0.0	1.5 ± 0.0	15 ± 0	4	N.D.	N.D.	-
PAFR-KO SAL	9.1 ± 0.9	5.0 ± 0.0	2.2 ± 0.5	15 ± 0	4	N.D.	N.D.	-
野生型 OVA	66.4 ± 15.4	53.8 ± 19.9	248.0 ± 45.2	239 ± 45	10	393 ± 32	2,152 ± 203	13
PAFR-KO OVA	32.7 ± 5.7	20.7 ± 6.0	156.4 ± 30.2	192 ± 26	10	388 ± 27	1,747 ± 101	14

データは平均 ± 標準誤差を表す。SAL：生理食塩水処理群；OVA：抗原感作/曝露群；N.D.：未検査。

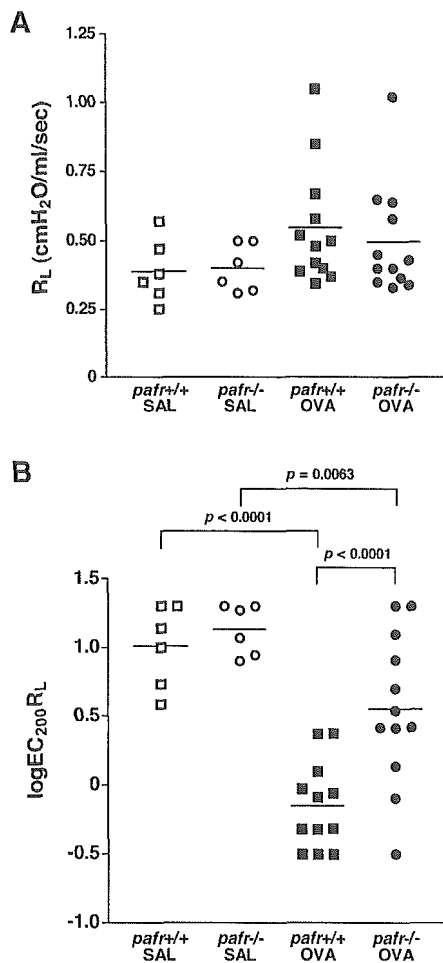


図2 PAF受容体依存的気道過敏性の惹起。(A) 気道抵抗のベースライン。生理食塩水のエアロゾルを吸引させた後に測定した各個体の気道抵抗値 (R_L) を示す。水平線は各群の平均値を示す。(B) メサコリンに対する気道反応性。各個体について、Aに示したベースライン気道抵抗値を2倍に上昇するのに必要なメサコリンの濃度 ($EC_{200}R_L$) を対数で表す。水平線は各群の平均値を示す。

性は約4倍の上昇にとどまり、野生型マウスに比べ有意に抑制されていた。

上述の PAFR-KO マウスにおける気道過敏性の抑制のメカニズムを調べる試みとして、ムスカリン受容体に対するリガンド結合実験を行った。種々の濃度の放射能ラベルしたムスカリン受容体アンタゴニスト(スコポラミン)を、抗原に感作/曝露したマウスから調製した細胞膜画分と結合させた。その結果、野生型マウスと PAFR-KO マウスはともに同等の最大結

合量 [B_{max} (fmol/mg タンパク質): 42.7 ± 2.7 と 44.8 ± 1.8 ; 平均±標準誤差 $n = 3$, $p = 0.54$, t 検定] と親和性 [K_d (nM): 237 ± 15 と 197 ± 19 ; 平均±標準誤差 $n = 3$, $p = 0.16$, t 検定] を示すことが明らかとなった。

1-D. 考察

PAF はマクロファージ/単球、好中球と同様に好酸球の化学走性因子である。しかも、これらの細胞は全て PAF を産生することが報告されている。したがって、PAF/PAF 受容体は気管支喘息に伴う気道炎症の惹起に参与すると考えられてきた。しかしながら、予想に反して我々の喘息モデル実験において肺胞洗浄液中の細胞を見ると、PAFR-KO マウスでは炎症細胞の肺への浸潤に異常は認められなかった。これを裏付けるように、肺切片を組織学的に解析した結果、やはり PAFR-KO マウスにおける炎症像は野生型マウスのものであった。以上の結果から、PAF は喘息時の気道炎症には必須ではないことが示唆された。同様に、PAFR-KO マウスでは血清中の OVA 特異的 IgE 及び IgG1 レベルや肺胞洗浄液中の Th2 サイトカインレベルに異常が観察されなかったことから、喘息時の液性免疫反応や Th2 細胞のサイトカイン産生反応に対し PAF は影響を及ぼさないことが示唆された。

気道過敏性は気管支喘息の主要な症状である。メカニズムは不明であるが、PAF はヒトや動物に気道過敏性を惹起することが知られている。PAF 受容体欠損が喘息時の気道過敏性惹起に及ぼす影響を探るため、今回喘息様症状に陥った PAFR-KO マウスの気道過敏性を測定し