

- 6). 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.
- 7). 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.
- 8). 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.
- 9). Nagase T, Uozumi N, Ishii S, Kita Y, Yamamoto H, Ohga E, Ouchi Y, Shimizu T. A pivotal role of cytosolic phospholipase A₂ in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Nature Medicine** 2002; 8: 480-484. (新聞各紙誌上にて紹介される)
- 10). 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). ロイコトリエン研究：最近の進

歩. 第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (発表者：長瀬隆英、教育講演), 2004.

2). アレルギーの臓器特異性と臓器過敏性：気道領域. 第 54 回日本アレルギー学会総会 (発表者：長瀬隆英、シンポジウム), 2004.

3). Roles of lipid mediators in respiratory diseases. 第 42 回日本呼吸器学会総会 (発表者：長瀬隆英、Leading Lecture), 2002.

4). 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 (発表者：長瀬隆英、熊谷賞受賞講演), 2002.

5). 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ィア. 第 52 回日本アレルギー学会総会 (発表者：長瀬隆英、シンポジウム), 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 番号： 特願 2003-034885

発明者：栗原裕基、大内尉義、長瀬隆英、山口泰弘

発明の名称：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

出願人：財団法人くまもとテクノ産業財団

出願日：平成 15 年 2 月 13 日

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

炎症性疾患における defensin の役割に関する研究
分担研究者 栗原裕基 東京大学 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 β -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 β -defensin の一群を明確にした。
- 2) 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。その機序に NF- κ B 系の関与が推定された。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. 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。

さらに、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、抗菌ペプチドがその候補である。

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。

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。 α -defensin と β -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 α -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、 β -defensin としては、human β -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 β 1 も β -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 β -defensin としては、mouse β -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。我々は、ヒトおよびマウスに発現している β -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た。

我々は、先にマウスゲノム上の mBD-3 遺伝子近傍に、新規の β -defensin 遺伝子を同定して mouse β -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 β -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、我々は、 β -defensin と病態との関わりの可能性について検討した。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。

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。

また、我々の研究と同時期に、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。例えば、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) ヒト新規 β -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。 β -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、 β -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 β -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 β -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 β -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 β -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 β 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 β -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、 β -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。 β -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 β -defensin -12 ペプチドの化学合成

我々は、mouse β -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 5×10^7 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 β -defensin 濃度は、それぞれ 2 μ g/ml, 20 μ g/ml, 200 μ 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、 β -defensin 20 μ 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、 β -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 μ 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 β 1 : 5'端, TCTGGCTTGCAAGTCTTTC
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, TGAATTTGGAGATGTGTCTG

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。

PCR は、25 μ l 中に 0.5 μ l の逆転写産物を混ぜ、Taq polymerase (TAKARA)を用いて、94 °C 40 秒、60 °C 30 秒、72 °C 1 分にて 30 サイクル行った。G3PDH の増幅も

コントロールとして 25 サイクル行った。

気道系に発現する mBD-3, mBD-4, mBD-6 の PCR については、同様にイントロンをはさむ特異的なプライマーを

mBD-6 : 5'端, TCATGAAGATCCATTACCTG

3'端-TGTGCATATTCACGAAGAAG

mBD-4 :

5'端, CTTTCAGTCATGAGGATCCATTACCTTC

3'端, GGAGCAAATTCTGGCAATTTATTCATC

のごとく作製した。

PCR は、Advantage-HF2 PCR kit (Clontech) を用いて、94 °C 15 秒、68 °C 3 分にて 35 サイクル施行した。

6) トランスジーン の 作 製

PCR により得た 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)。

具体的には、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。

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。

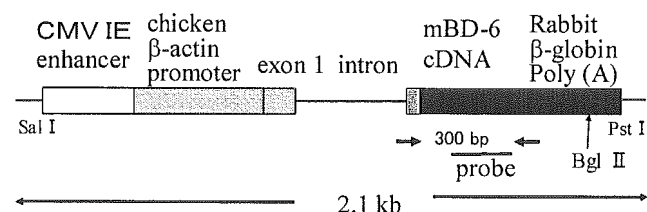


図 1 トランスジーン の 構 成.

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、サザンブ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

我々は、サザンブロット法により、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 BglII により切断し、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。サザンブ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。

上記 DNA フラグメントを、random primed DNA labeling kit (Roche) を用いて、 $[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ によりラベルし、ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech) を用いて、60 $^{\circ}\text{C}$ 、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) トランスジーン の 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 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。

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 $^{\circ}\text{C}$ 40 秒、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 分、30 サイクルの条件で施行した。

5) mBD-6 抗血清の作製

前記と同様に化学的に合成した C 端より 40 残基からなる 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。

6) 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 、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。

7) 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。

8) 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。

9) 血清クレアチンキナーゼ活性の測定

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。

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、一晚反応させた。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% 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)、抗 I κ B 抗体 (Santa Cruz) と 4°C、一晚反応させた。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。

(倫理面への配慮)

ヒト RNA 採取用手術検体の使用にあたっては、研究の内容について文書および口頭にて主治医より本人に説明し、書面にて同意を得たのち行われた。本研究は、通常の術式にしたがって採取された組織の一部を研究目的に使用するものであり、診療上の支障となることは一切ないよう配慮した。また、個人情報についても、病名および術式以外は研究者に伝わらぬよう配慮した。

なお、この研究は、手術を行った三井記念病院の倫理委員会の承認を事前に得たうえで行われた。

また、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) 新規 human β -defensin 遺伝子の同定

ヒトゲノムの塩基配列を解析することにより、我々は β -defensin をコードしうる配列が新たに複数存在することを見出し、

RT-PCR により、2つの遺伝子について実際の発現を確認した。これらの新規の β -defensin は、既知の β -defensin と共通した特異的なシステインモチーフを保っており、human β -defensin-5 (hBD-5) および human β -defensin-6 (hBD-6) と命名した。

2) 新規 mouse β -defensin 遺伝子の同定

ヒトゲノムと同様にマウスゲノムの塩基配列を解析することにより、マウスにおいても β -defensin をコードする配列が新たに複数存在することを見出した。RT-PCR により、5つの遺伝子について実際の発現を確認した。これらの新規の β -defensin は、既知の β -defensin と共通した特異的なシステインモチーフを保っており、mouse β -defensin-11 (mBD-11), mouse β -defensin-12 (mBD-12), mouse β -defensin-14 (mBD-14), mouse EP2c (mEP2c),

mouse EP2e (mEP2e) と命名した。なお、mEP2c, mEP2e は、EP2 ファミリーと総称されるヒト HE2 β 1 のホモログであるためこのように命名した。なお、mBD-11 は、NCBI database の defb11 gene (AJ437648) と同一であり、mBD-12 および mEP2e は、NCBI database 上の RIKEN's full-length cDNA sequence (AK020311 および AK020333) と同一の遺伝子と思われる。

さらに、mBD-11 と類似した配列をもつ mouse β -defensin-34 (mBD-34) も、少ないながらも実際に発現していることが RT-PCR により明らかとなった。また、PCR 増幅によりマウスのこれらの遺伝子には多くのスプラスヴァリアントの存在することが

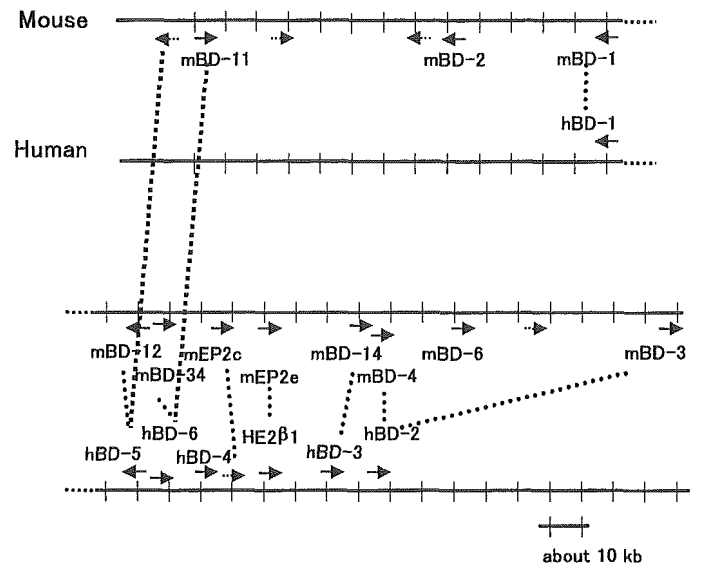


図2 Gene cluster of mouse and human β -defensin genes

明らかとなった。mBD-12 遺伝子には2つ、mEP2 遺伝子には6つのスプラスヴァリアントが存在し、そのうち、特に mEP2 遺伝子では4種類のヴァリアントが β -defensin に特徴的なシステインモチーフを保っている。

3) マウスとヒトの β -defensin の比較

β -defensin 遺伝子は、ヒトあるいはマウスのクロモソーム8上に大きな遺伝子クラスターを形成している。ヒトとマウスのクラスターを比較すると、 β -defensin 遺伝子の位置と方向はゲノム上でよく保たれていることが明らかとなった(図2)。しかし、hBD-4に相当するマウス遺伝子は存在せず、逆に mBD-2, 6 に相当するヒト遺伝子は存在しない。

また、mEP2c, mEP2e に相当するヒト遺伝

子はゲノム上に存在するものの、精巢上体での発現は確認できなかった。ヒトの HE2 遺伝子とマウス EP2 遺伝子には複数のスプラスヴァリエントがある。そして、相当するゲノム配列は保たれているが、共通した mRNA 前駆体が、種によって異なったスプライシングを受けるようである。

4) mBD-12 の抗菌活性

mBD-12 の抗菌活性を確認するために、ペプチドを化学合成により作製し、その抗菌活性を mBD-6、HNP-1 と比較した。なお、HNP-1 は、ヒト好中球顆粒中に存在する α -defensin である。mBD-6 および mBD-12 の抗菌活性は 20 $\mu\text{g/ml}$ で有意に HNP-1 より強かった (Student's *t* test, $p < 0.01$) (図 3A)。既に報告されているヒト β -defensin の有効な濃度は 5 - 60 $\mu\text{g/ml}$ であるから、これらの抗菌活性は他の既に報告された β -defensin に相当するものである。また、mBD-6 および mBD-12 の抗菌活性は、他の多くの β -defensin と同様に、高濃度の NaCl により有意に低下した (Student's *t* test, $p < 0.01$) (図 3B)。

5) β -defensin の組織分布

RT-PCR により hBD-5 および hBD-6 は、脳、気管、肺、心、肝、腎、骨格筋などの主要な臓器での発現は認められず、精巢上体に特異的に発現していることが明らかとなった(図 4A)。この発現パターンは、既に報告されていた hBD-4 と同一であった。以前の報告は、

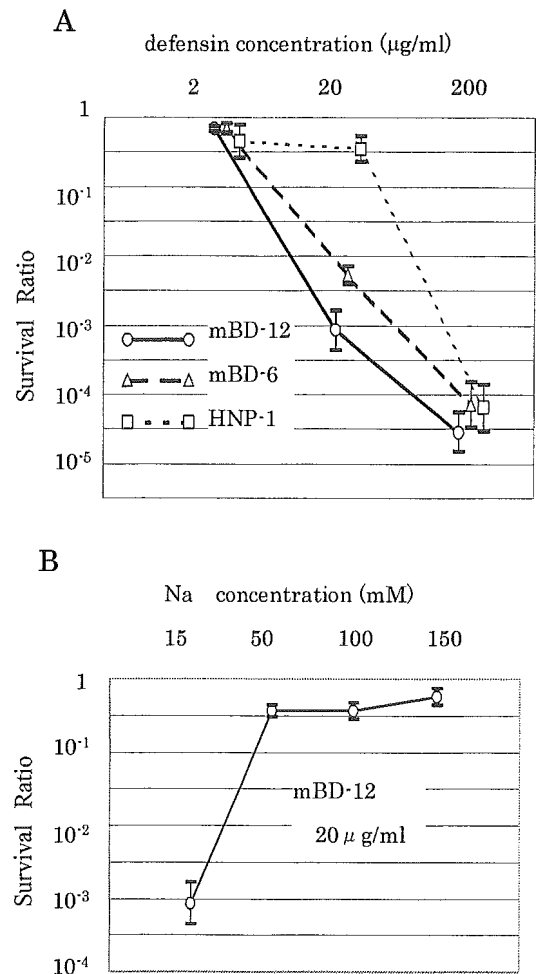


図 3 defensin 投与下で生存した菌のコロニー数のコントロールとの比を Survival Ratio とした。Log₁₀ Survival ratio の平均と標準誤差を図に示す。A. mBD-6 (△)、mBD-12 (○)とも 20 $\mu\text{g/ml}$ で有意な抗菌活性を示す。B. mBD-12, は、50mM 以上の塩濃度で有意な抗菌作用の低下を認めた。

hBD-4 の主要な発現を精巣に認めると報告しているが、我々の結果は、hBD-4 の発現が、精巣ではなく精巣上体であることをより正確に示している。HE2β1 の発現も今まで十分に評価されていなかった。我々の RT-PCR では、ヒト精巣上体でのみ HE2α1 に相当する 546-bp の PCR 産物と HE2β1 に相当する 470-bp の PCR 産物が認められ、HE2 の発現も精巣上体に局限していることが示された。

次に、mouse β-defensin の発現を評価するために、オス ICR マウスの腸、胃、肝、腎、心、脳、食道、舌、肺、気管、骨格筋、精巣上体、精巣の全 RNA を抽出した。mouse β-defensin の RT-PCR により、mBD-11、mBD-12、mEP2c、mEP2e の発現は、精巣上体に局限しており、mBD-3 と mBD-14 の発現は、食道、舌など幅広い組織に認められることが明らかとなった (図 4B)。

mBD-34 や mEP の他のヴァリエントについても、やはり精巣上体に局限したシグナルが得られた (図 4B)。しかし、これらのシグナルはたいへん弱い。mBD-34 や mEP ヴァリエントの発現量は、精巣上体においても微量と思われる。

また、RT-PCR を利用して、mBD-3、mBD-4、mBD-6 の発現を評価した。これらのアイソフォームは、食道、舌、気管に発現を認めた (図 4C)。また、mBD-6 は骨格筋にも発現を認めた。

興味深いことに、ヒトおよびマウスのゲノム上の遺伝子の位置が、発現パターンの特徴をよく反映していることが明らかとなった。すなわち、mBD-14 と mEP2e を境に、精巣上体に特異的に発現するアイソフォー

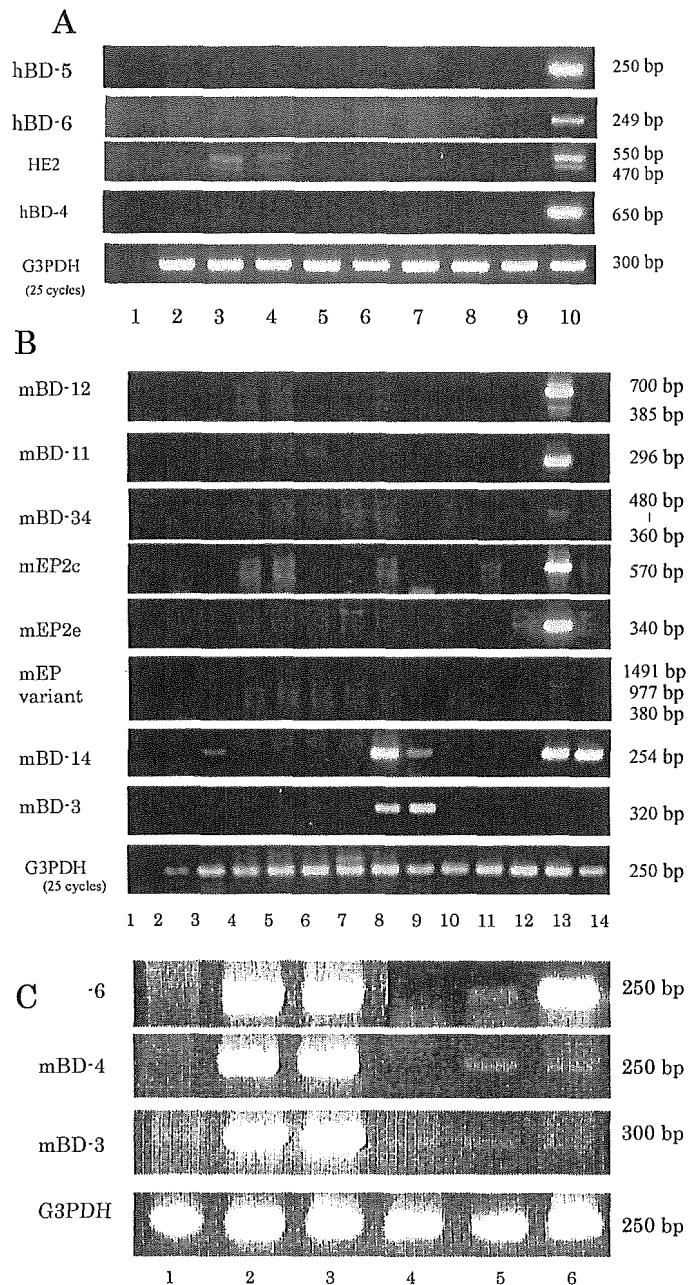


図 4 β-defensin の RT-PCR

A. 1. cDNA なし 2. 脳 3. 気管 4. 肺 5. 心臓 6. 肝 7. 腎 8. 骨格筋 9. 精巣 10. 精巣上体

B. 1. cDNA なし 2. 腸 3. 胃 4. 腎 5. 肝 6. 心臓 7. 脳 8. 食道 9. 舌 10. 肺 11. 気管 12. 骨格筋 13. 精巣上体 14. 精巣

C. 1. 腸 2. 食道 3. 舌 4. 肺 5. 気管 6. 骨格筋

ムのクラスターと食道、舌を中心に多彩な組織に発現するアイソフォームのクラスターが存在する。境界に位置する mBD-14 のみ舌、食道に加えて精巣、精巣上体にも大量に発現していることも興味深い。

6) 遺伝子改変マウスの作製

次に、mBD-6 を過剰発現する遺伝子改変マウスを作製した。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、トランスジーンへの挿入が確認され、2 系統において、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 5)。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 3 ヶ月以内に死亡したが、死亡原因は不明であった。

7) TgCAGmBD6 マウスにおける mBD-6 過剰発現の解析

トランスジーンを発現を、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。トランスジーンを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 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 6)。

次に、我々は、蛋白レベルでの mBD-6 の

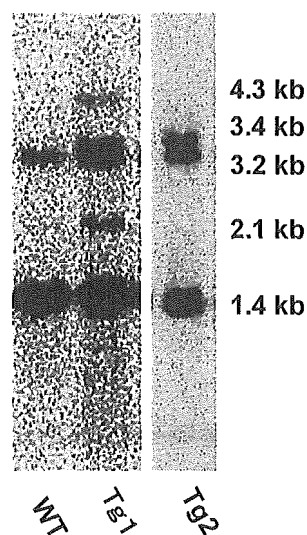


図 5. トランスジーンへのサザンブロット

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と思われる 2.1 kb のシグナルと約 4.3 kb と 3.4 kb のシグナルを認めた。TgCAGmBD6-2 マウス (Tg2) では、約 3.4 kb の位置にのみトランスジーンによるシグナルを認めた。

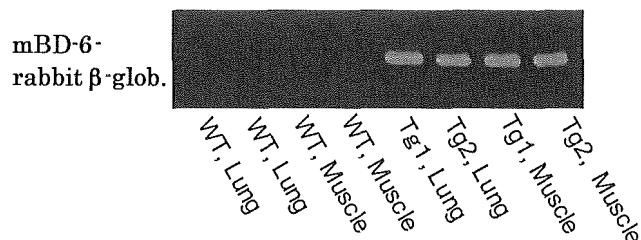


図 6. RT-PCR によるトランスジーン発現解析.

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 300 bp のトランスジーンによるシグナルが認められた。

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 7 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。

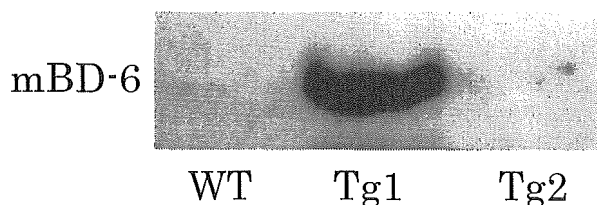


図 7. ウエスタンブロットによる mBD-6 ペプチド過剰発現の確認。

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。

8) 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。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 8)。TgCAGmBD6-1 のほとんどは、生後 8-11 ヶ月後に死亡した。

9) 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 9)。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。

10) 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

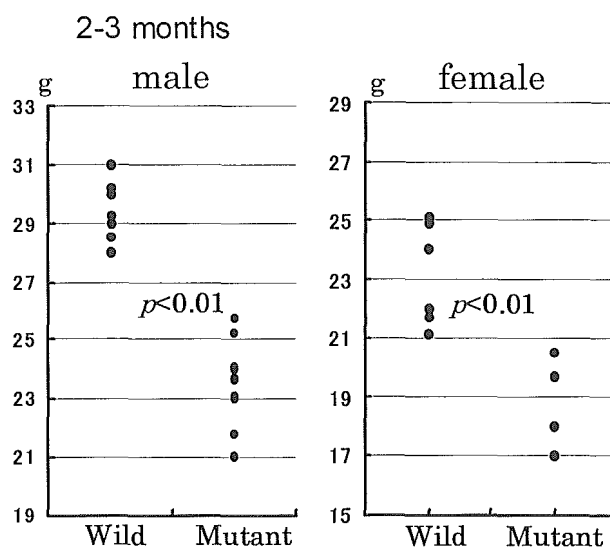


図 8. TgCAGmBD6-1 マウスの体重。

各時期の TgCAGmBD6-1 マウス (Mutant) の体と比較した。●は、各個体の体重を示す。



図 9.
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)。

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。

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 11)。

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 12)。

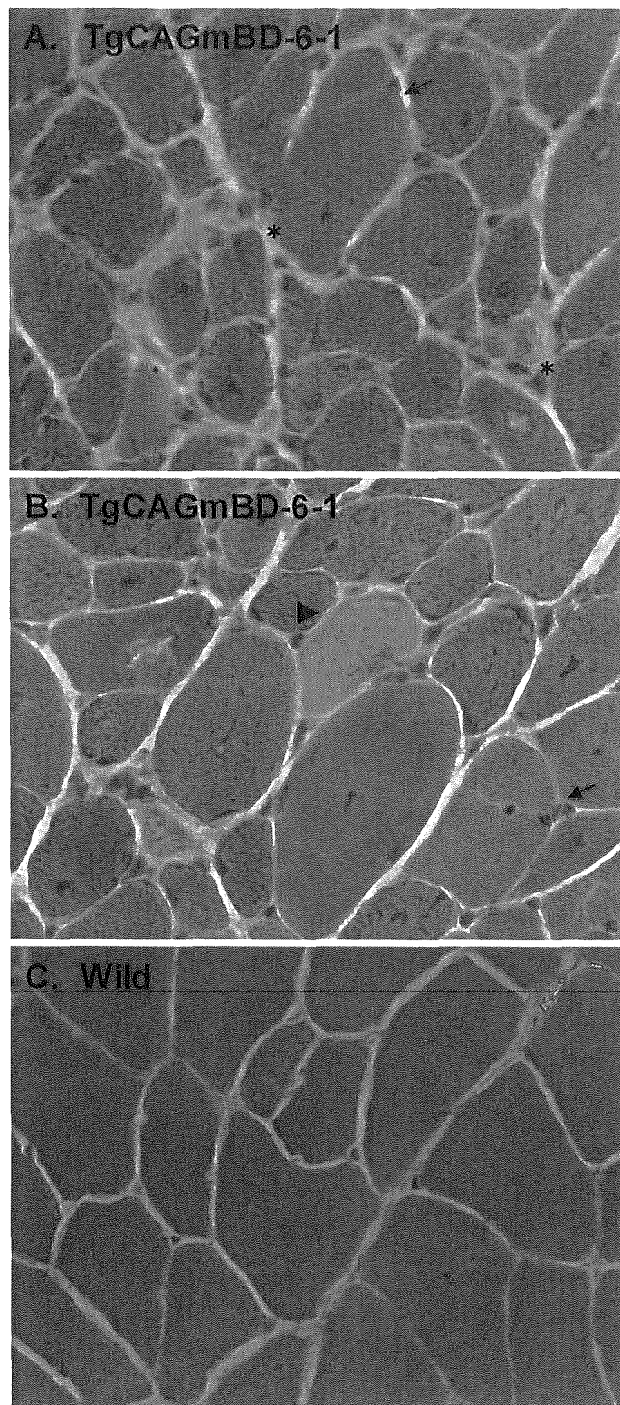


図 10. TgCAGmBD6-1 マウスの筋病理所見

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。

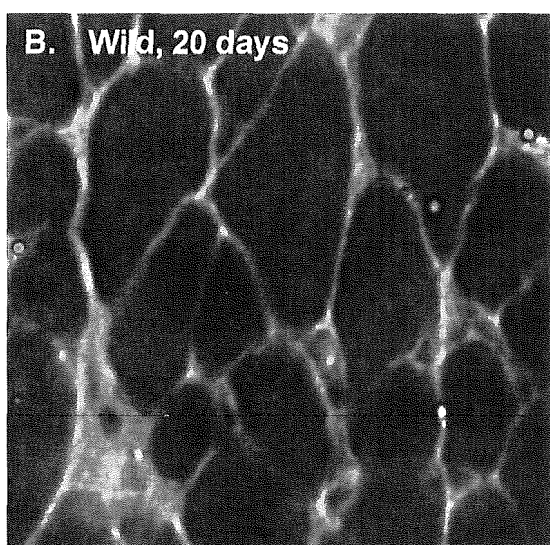
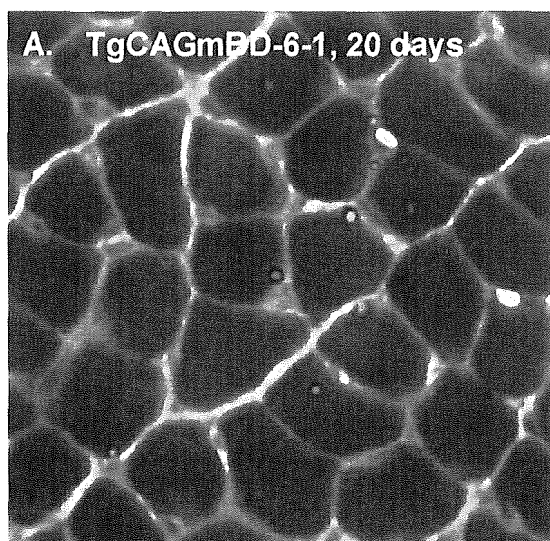


図 11. 生後 20 日の筋病理所見

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。

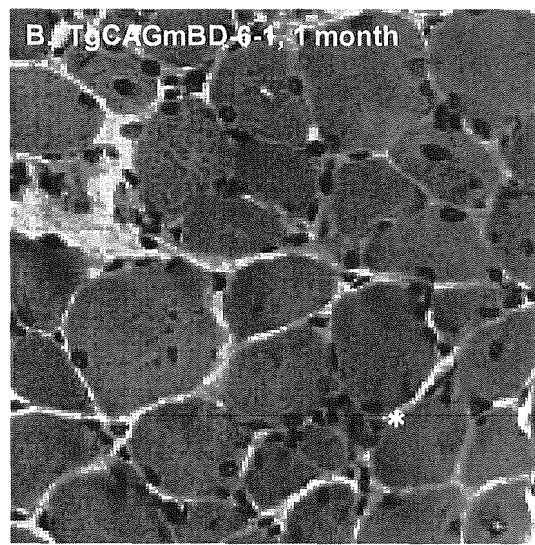
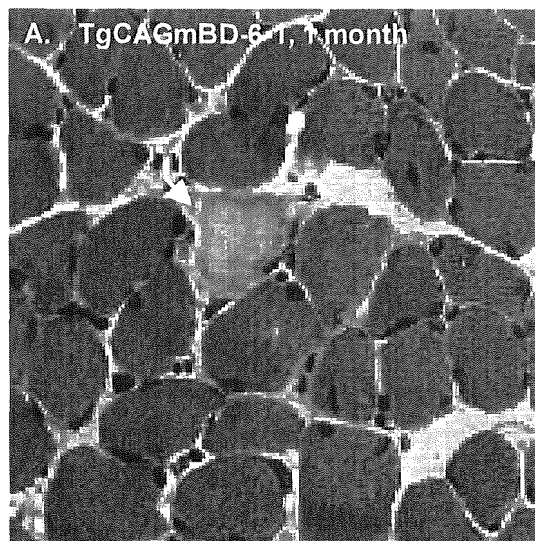


図 12. 生後一ヶ月の筋病理所見

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。

11) 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13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 ($p < 0.01$)。

12) 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14)。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。

13) Tg CAGmBD6-1 マウスのジストロフィン ジストグリカン、ラミニンの分布

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、ジストロフィン、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、これらの分子が筋膜に沿って存在することが明瞭に示され、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15, 16, 17)。

14) 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、

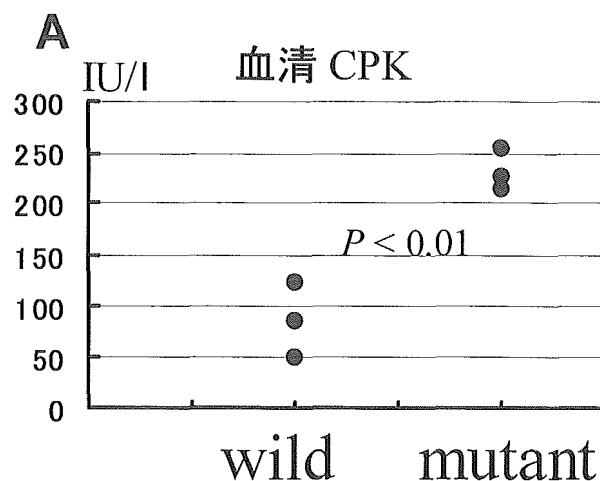


図13. TgCAGmBD6-1 マウスの血清所見

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 ($p < 0.01$)。

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18)。

15) 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。

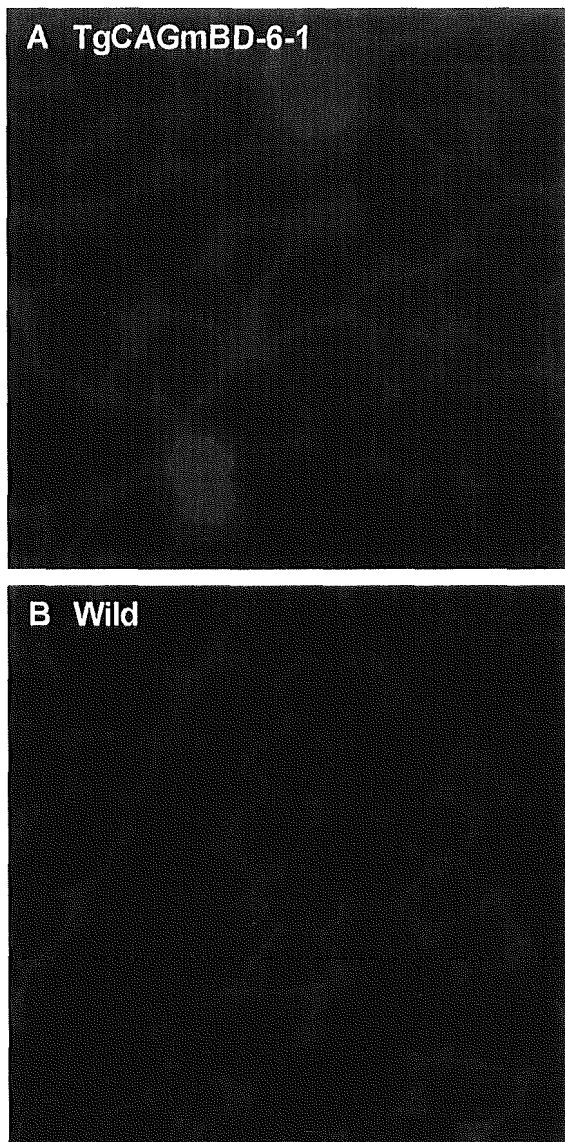


図 14. Evans Blue Dye 染色

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。

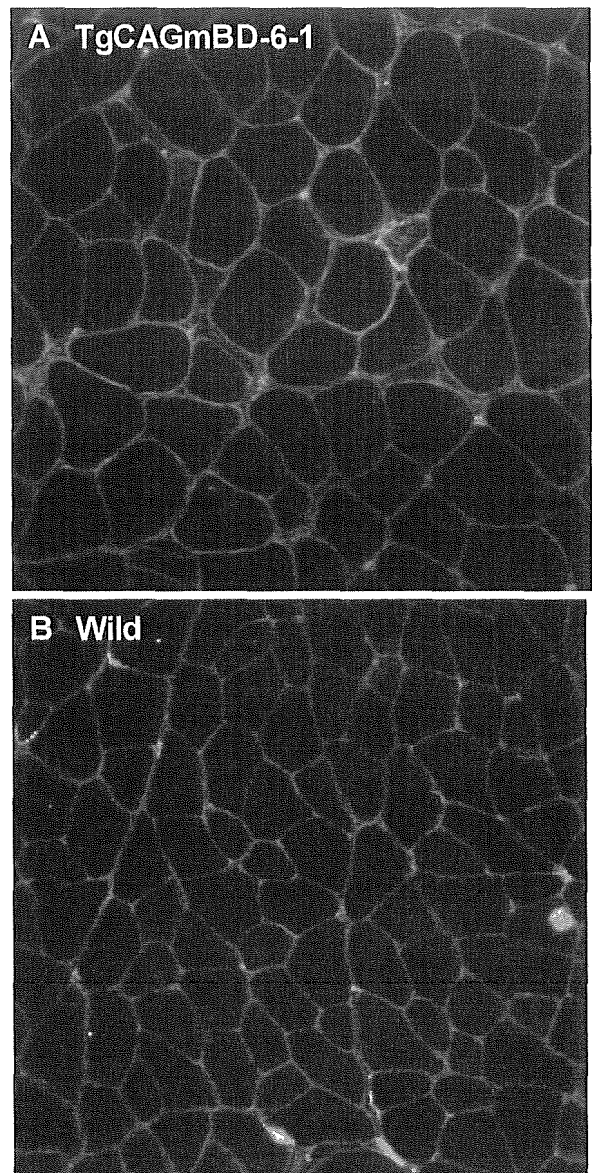


図 15. TgCAGmBD6-1 マウスのジストロフィンの分布

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。

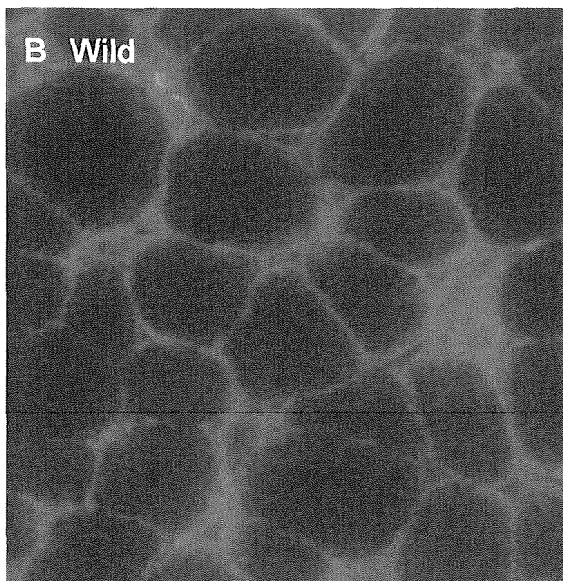
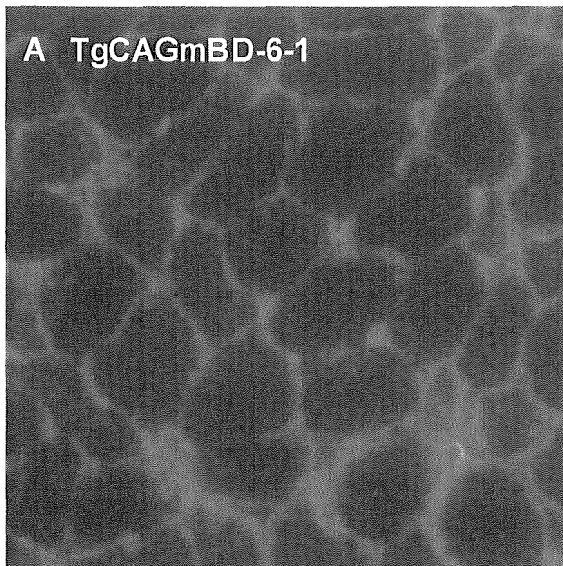


図 16. TgCAGmBD6-1 マウスのラミニンの分布

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。

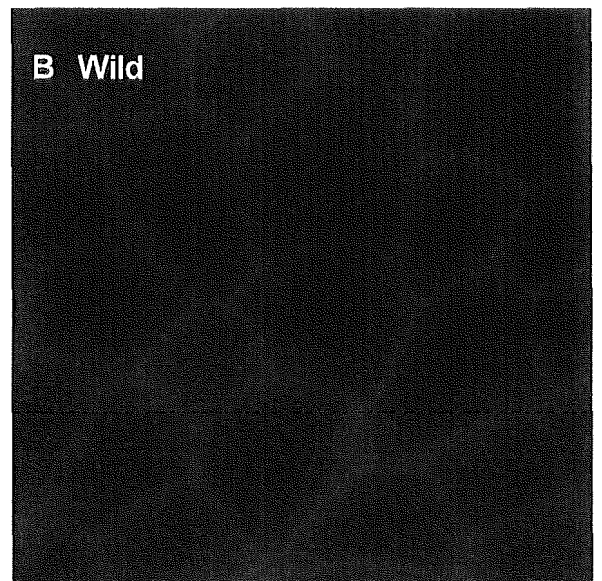
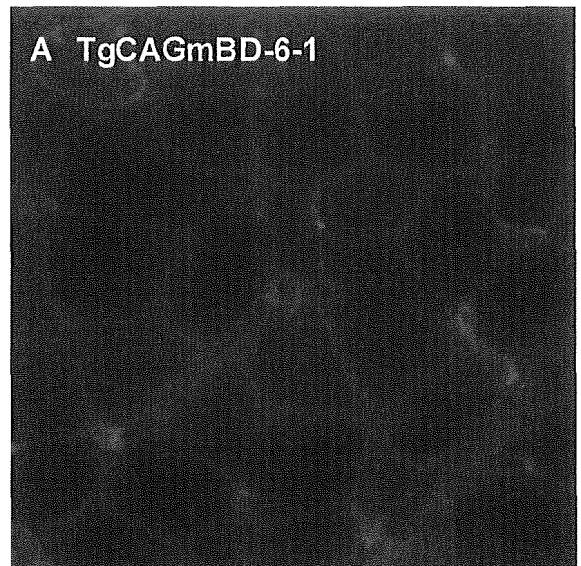


図 17. TgCAGmBD6-1 マウスの α -ジストログリカンの分布

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。

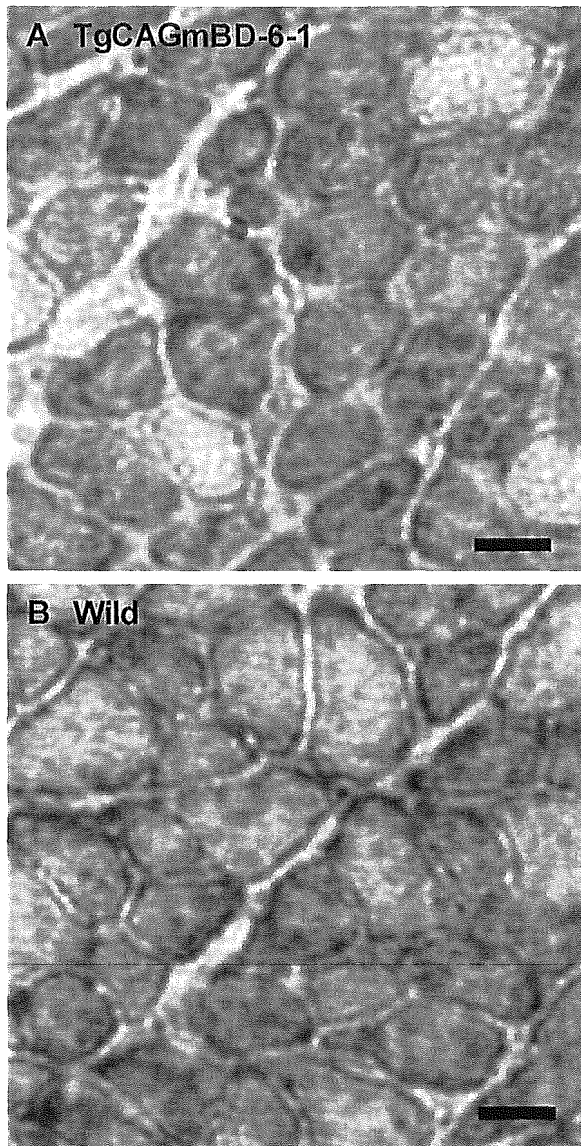


図 18. TgCAGmBD6-1 マウスのカルパイン-3の分布

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。

16) 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、神経筋接合部に局限して存在する。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 20)。

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。

17) 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、TgCAGmBD6-1 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。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パイン-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。

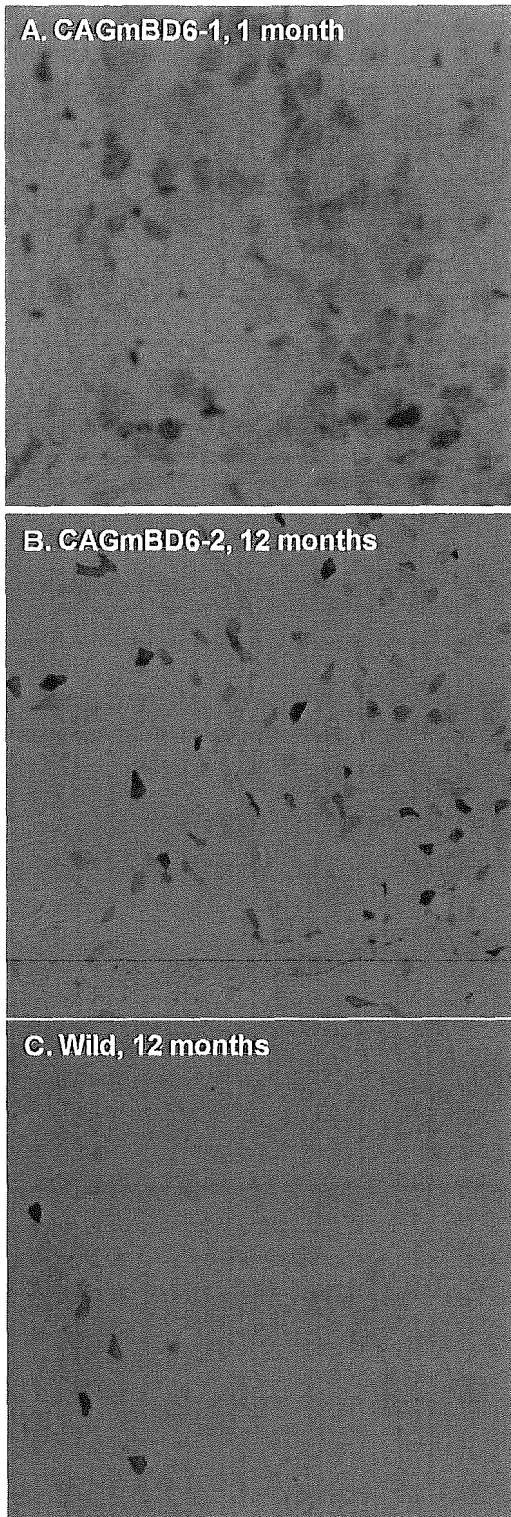


図 20. TgCAGmBD6 マウスの NCAM の分布
 生後 1 ヶ月の Tg CAGmBD6-1 マウスや生後 12 ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウスにおいて、細胞質全体に NCAM の存在する筋線維が高頻度に認められた。生後 12 ヶ月の野生型マウスでは、NCAM 陽性の筋線維はわずかであった。

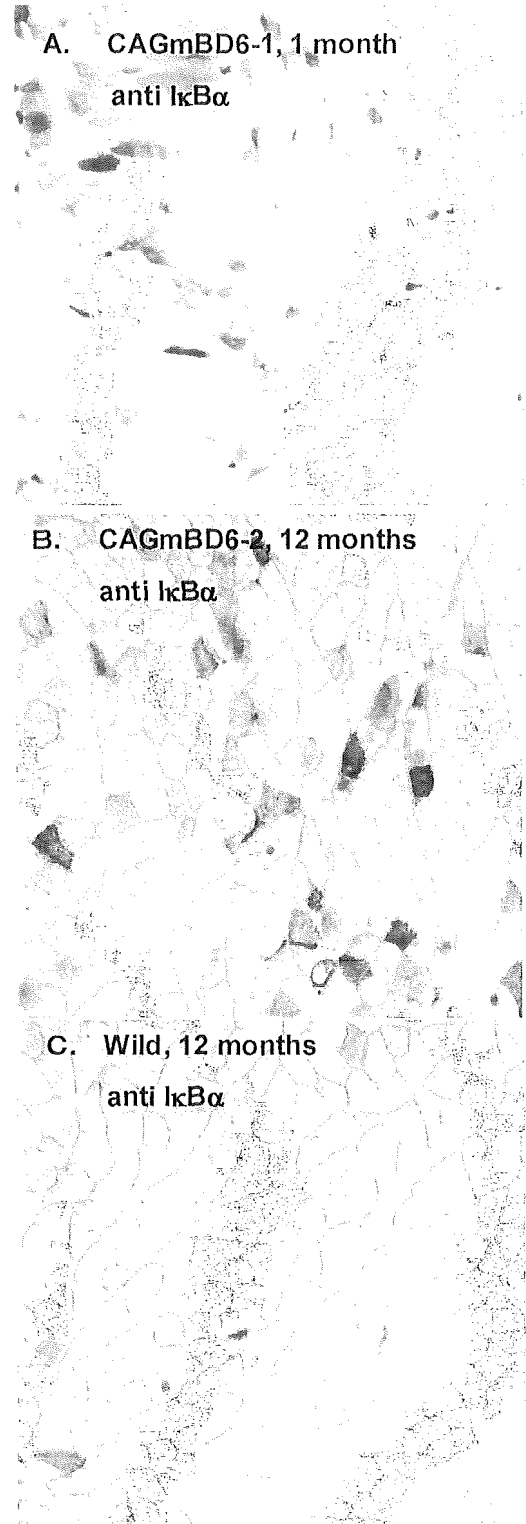


図 21. TgCAGmBD6 マウスの IκBα の分布
 生後 1 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスや生後 12 ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウスにおいて、IκBα の濃染する筋線維が高頻度に認められた。生後 12 ヶ月の野生型マウスでは、IκBα 陽性の筋線維はわずかであった。