

で採取された48名分の健常人SNPデータを使用した(図15)。

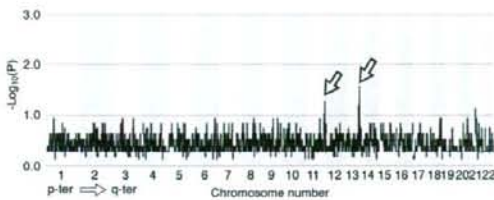


図15 旭川地方のサルコイドーシス解析。有意水準には届いていないが、2つのピークが認められる。これらのピークは従来報告されているBTNL2遺伝子やANXA11遺伝子の位置とは異なっている。

症例数が十分でないこと、コントロールとして東京地方で採取されたDNAを用いていることより、いまだ十分な結果ではない。症例数を増やして約100名の解析とし、また旭川地方で採取された健常人DNAをコントロールとして使用して行くことにより、より精緻な解析を行う必要がある。

D. 考察

我々はHH法を用いてGWASを行う手法を確立し、それを用いてサルコイドーシス、COPDの疾患遺伝子解析を施行している。

HH法を用いたGWASでは、MRCAの存在を仮定している。逆に言うと、そのような存在を仮定できるような集団をcaseとして解析を行うことが必要である。

MRCA が存在する最も有名な例は「下戸の遺伝子」(ALDH2 の変異遺伝子:アルコール代謝機能が低下する)である。「酒が飲めない人」は東洋人に限られる。「下戸の遺伝子」は中国で生じ、地域で広がったものだからである(Goeddel et al. Hum Genet 88:344, 1992)。日本には弥生時代に渡来人がもたらした。日本に入って2000年程度

という新しい遺伝子だが、現日本人に高率に見いだされる(Shibuya et al. Am J Hum Genet 43:741, 1988)。特殊な状況(「下戸の遺伝子」ではアルコール摂取)のみで明確になる遺伝子は通常の生活では選択を受けないため、集団内に広がりやすい。同様に、加齢に伴って生じる疾患の遺伝子は生殖による選択を受けにくいいため、集団中に広がっている可能性がある。HH法によるGWASは300世代(4500-6000年前)のMRCAを検出することができるため、数多くの疾患が解析対象となると思われる。MRCAの存在を担保するため、extreme phenotype(極端な表現型)、移民後に成立した集団などを考慮に入れ、caseとなる集団を選択するのが望ましいと考えられる。

北海道の集団は、明治以降の移民によって成立したため、このような解析の対象となりうると考えられる。サルコイドーシスの解析は、そのような試みの一つである。

E. 結論

我々は、HH法によるGWASを確立し、それを実際に応用しつつある。現在の連鎖解析、SNPを用いたGWASでは、疾患遺伝子の集団内での頻度が0.01以下の遺伝子、即ち珍しくはないが非常に多いわけでもない、我々が日常目にする多くの疾患は解析対象から外れてしまう。HH法によるGWASにより、これらの疾患も疾患遺伝子解析の対象となって行くことが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Inoue A, Kobayashi K, Usui K,

Maemondo M, Okinaga S, Mikami I, Ando M, Yamazaki K, Saijo Y, Genma A, Miyazawa H, Tanaka T, Ikebuchi K, Nukiwa T, Morita S and Hagiwara K. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol* in press.

2. Ishihara Y, Hagiwara K, Zen K, Huqun, Hosokawa Y and Natsuhara A. A case of Pulmonary Alveolar Microlithiasis with an intra-genetic deletion in SLC34A2 detected by a genome-wide SNP study. *Thorax* in press.

3. Azuma A, Hagiwara K. and Kudoh S. Basis of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis in Japanese patients. *Am J Respir Crit Care Med* 177:1397-8, 2008.

4. Miyazawa H, Tanaka T, Nagai Y, Matsuoka M, Sutani A, Udagawa K, Zhang J, Hirama T, Murayama Y, Koyama N, Ikebuchi K, Nagata M, Kanazawa M, Nukiwa T, Takenoshita S, Kobayashi K and Hagiwara K. Peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based detection test for gefitinib-refractory T790M epidermal growth factor receptor mutation. *Cancer Sci* 99:595-600, 2008.

5. Koyama N, Zhang J, Huqun, Miyazawa H, Tanaka T, Su X and Hagiwara K. Identification of IGFBP-6 as an effector of the tumor suppressor activity of SEMA3B.

Oncogene 27:6581-9, 2008.

6. Miyanaga A, Gemma A, Ando M, Kosaihiro S, Noro R, Minegishi Y, Kataoka K, Nara M, Okano T, Miyazawa H, Tanaka T, Yoshimura A, Kobayashi K, Iwanami H, Hagiwara K, Tsuboi E and Kudoh S. E-cadherin expression and epidermal growth factor receptor mutation status predict outcome in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Oncol Rep* 19:377-83, 2008.

7. Koyama N, Nagata M, Hagiwara K and Kanazawa M. Survival of a patient with pulmonary *Cunninghamella bertholletiae* infection without surgical intervention. *Respirology* 13:309-11, 2008.

8. Soma T, Takaku Y, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, Uematsu K and Nagata M. Inhibitory effect of budesonide alone and in combination with formoterol on IL-5 and RANTES production from mononuclear cells. *Int Arch Allergy Immunol* 146 Suppl 1:22-7, 2008.

9. Kobayashi T, Takaku Y, Yokote A, Miyazawa H, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M and Nagata M. Interferon-beta augments eosinophil adhesion-inducing activity of endothelial cells. *Eur Respir J* 32:1540-7, 2008.

10. Miyazawa H, Kato M, Awata T, Kohda M, Iwasa H, Koyama N, Tanaka T, Huqun, Kyo S, Okazaki Y and Hagiwara K. Homozygosity haplotype allows a

genomewide search for the autosomal segments shared among patients. *Am J Hum Genet* 80:1090-102, 2007.

11. Huqun, Izumi S, Miyazawa H, Ishii K, Uchiyama B, Ishida T, Tanaka S, Tazawa R, Fukuyama S, Tanaka T, Nagai Y, Yokote A, Takahashi H, Fukushima T, Kobayashi K, Chiba H, Nagata M, Sakamoto S, Nakata K, Takebayashi Y, Shimizu Y, Kaneko K, Shimizu M, Kanazawa M, Abe S, Inoue Y, Takenoshita S, Yoshimura K, Kudo K, Tachibana T, Nukiwa T and Hagiwara K. Mutations in the SLC34A2 gene are associated with pulmonary alveolar microlithiasis. *Am J Respir Crit Care Med* 175:263-8, 2007.

12. Tanaka T, Nagai Y, Miyazawa H, Koyama N, Matsuoka S, Sutani A, Huqun, Udagawa K, Murayama Y, Nagata M, Shimizu Y, Ikebuchi K, Kanazawa M, Kobayashi K and Hagiwara K. Reliability of the peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based test for epidermal growth factor receptor mutations integrated into the clinical practice for non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* 98:246-52, 2007.

13. Kobayashi T, Takaku Y, Kikuchi I, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M. and Nagata M. Eosinophils do not enhance the trans-basement-membrane migration of neutrophils. *Int Arch Allergy Immunol* 143 Suppl 1:38-43, 2007.

14. Kikuchi I, Kikuchi S, Kobayashi T,

Takaku Y, Hagiwara K, Kanazawa M. and Nagata M. Theophylline attenuates the neutrophil-dependent augmentation of eosinophil trans-basement membrane migration. *Int Arch Allergy Immunol* 143 Suppl 1:44-9, 2007.

15. Sutani A, Nagai Y, Udagawa K, Uchida Y, Koyama N, Murayama Y, Tanaka T, Miyazawa H, Nagata M, Kanazawa M, Hagiwara K and Kobayashi K. Gefitinib for non-small-cell lung cancer patients with epidermal growth factor receptor gene mutations screened by peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Br J Cancer* 95:1483-9, 2006.

16. Kushiya M, Saito K, Kikuchi I, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M. and Nagata M. Differential effects of salbutamol and montelukast on eosinophil adhesion and superoxide anion generation. *Int Arch Allergy Immunol* 140 Suppl 1:17-22, 2006.

17. Koyama N, Jinn Y, Takabe K, Yoshizawa M, Usui Y, Inase N, Miyake S, Yoshizawa Y, Hagiwara K and Kanazawa M. The characterization of gefitinib sensitivity and adverse events in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 26:4519-25, 2006.

18. Kikuchi I, Kikuchi S, Kobayashi T, Hagiwara K, Sakamoto Y, Kanazawa M and Nagata M. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am J Respir*

Cell Mol Biol 34:760-5, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

[取得済み特許]

1. 特許第 4216266(2008.11.14 登録)萩原弘一 長井良昭 宮澤 仁志 高感度な既知変異遺伝子検出方法、および EGFR 変異遺伝子検出方法.

非小細胞肺癌の約30%に見られるEGFR遺伝子変異を、肺癌診療で確定診断のために採取される細胞診レベルの標本の一部を用いて検出する手法を提供。点突然変異、小欠失の高感度検出法として他遺伝子にも適応可能な手法として特許取得。三菱メディエンスへ技術移転。実用化済。臨床検査として年間施行件数 10,000 件余。

2. 特許第 4059517(2008.3.12 登録)萩原弘一 ホモ接合指紋法による同祖領域判定方法、同祖領域判定装置、及び遺伝子スクリーニング方法.

少数例の患者全ゲノム SNP データから、劣性遺伝子を効率的に同定する手法を提供。肺胞微石症責任遺伝子の同定に成功(業績論文 11)。トミーデジタルバイオロジーに技術移転。東北化学薬品にライセンスング。

[指定国移行済み特許]

1. 11/988812(2008.1.14 移行:米国)Koichi HAGIWARA HOMOEOLOGOUS REGION DETERMINING METHOD BY HOMOJUNCTION FINGERPRINT METHOD, HOMOEOLOGOUS REGION JUDGING DEVICE, AND GENE SCREENING METHOD.

上記特許 2. の指定国移行.

[PCT 出願済み特許申請]

1. PCT/JP2007/062368 公開番号 WO

2008/018240 萩原弘一 ホモ接合ハプロタイプ法(科学技術振興機構:JST 特許出願支援制度対象).

患者全ゲノム SNP データから、優性・劣性遺伝子双方を効率的に同定する手法を提供。Marfan 症候群家系で有効性を確認(業績論文 10)。全ゲノム関連解析用にアルゴリズムを拡張(論文執筆中)。トミーデジタルバイオロジーに技術移転。東北化学薬品にライセンスング。

[国内申請中]

1. 特願 2006-311855(2006.11.17 申請)神田将和 岩佐泰靖 萩原弘一 岡崎康司 逆ホモ接合マッピング法による同祖領域の抽出方法および遺伝子スクリーニング方法.

取得済み特許 2. の拡張法(共同出願).

炎症性肺疾患の病態における生理活性ペプチドの関与に関する研究

研究分担者	栗原裕基	東京大学	教授
研究協力者	山口泰弘	東京大学	助教
研究協力者	山本寛	東京大学	助教

研究要旨

- 1) 抗菌ペプチド Human β -defensin-3 は、他の defensin と比較しても、有意に強い細胞傷害性を有し、その作用が、抗腫瘍効果として、個体レベルでも確認された。Human β -defensin-3 の新たな生理的機能を示唆するとともに、治療薬としての可能性も期待される。
- 2) 血管拡張性ペプチドであるアドレノメデュリンの減少が、気道過敏性を増強することが、アドレノメデュリン遺伝子改変マウスを用いた気管支喘息モデルにより明らかとなった。
- 3) アドレノメデュリンの減少したマウスにおいては、卵白アルブミンによる抗原感作後に気道平滑筋細胞の過形成性変化が増強していた。

A. 背景・抗菌ペプチド defensin・

自然免疫の中核として、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。ヒトの代表的な抗菌ペプチドとして、defensin や cathelicidin が知られている。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もつ。このシステイン配列の相違から、 α -defensin と β -defensin の二つのサブファミリーに分類されている。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。

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。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。現在、さらに human β -defensin-25, -26, -27, -28, -29, -118 などの発現が報告されている。

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る。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、それぞれ mouse EP2e (mEP2e)、mouse β -defensin-12 (mBD-12)、mouse β -defensin-11 (mBD-11) を報告した。

hBD-3 は、ヒトの皮膚から単離されたが、気道系や食道、好中球、胎盤、男性生殖器等など、幅広い組織での発現が確認されている。その特性として、hBD-3 は、高濃度の Na 存在下でも殺菌作用を示すと報告されている。そのほか、グラム陽性球菌に対しても強い抗菌活性を示すことも特徴である。

一方、defensin が、抗菌活性とともに、哺乳類細胞自身に作用し、炎症の制御因子として機能しうることが報告されてきた。具体的には、細胞増殖の促進、サイトカイン分泌の促進、ヒスタミン分泌の促進、炎症細胞の遊走など様々な機能が報告されている。

さらに、高濃度の defensin が細胞傷害性を有することも、主に HNP-1 について報告されている。我々は、defensin のなかでも、hBD-3 が、他のアイソフォームと比較して、有意に強い細胞傷害性を有することを見出した。この強い細胞傷害性をもとに、hBD-3 の抗腫瘍作用としての新しい生理的機能について検討した。

B. 研究方法 ·hBD-3 の抗腫瘍効果·

1) defensin 合成ペプチド

hBD-1, hBD-2, hBD-3 および HNP-1 の合成ペプチドは、ペプチド研究所より購入し、0.001% 酢酸溶液に 2 mg/ml の濃度で溶解した。

hBD-3 のマウスホモログである mBD-14 のシグナルペプチド切断部位を、hBD-3 から類推し、C 端より 45 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確認した。mBD-14 合成ペプチドは、0.01% 酢酸溶液に 20 mg/ml の濃度で溶解した。培養細胞に投与する実験においては、さらに滅菌蒸留水にて 10 倍に希釈して利用した。

2) 抗菌活性の測定

上記の defensin ペプチドの抗菌活性を Harwig により記載された colony count assay に基づいて確認した。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 defensin 合成ペプチドを含む培地と混合し、37 度で 2 時間培養した。この最終的な菌液の塩濃度は 15mM であり、 β -defensin 濃度は、それぞれ 2 μ g/ml, 20 μ g/ml に調整した。コントロールとして、0.001% 酢酸溶液のみを加えた菌液を用意した。2 時間の培養後、10 倍ずつ希釈して trypticase soy agar plates にまき 37 $^{\circ}$ 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、その菌数のコントロールとの比を生存率として計算した。

3) 細胞培養

ヒト肺癌由来の A549 細胞は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより購入した。細胞は、25 U/ml ペニシリン、25 µg/ml ストレプトマイシン (Invitrogen) および、10 % (v/v) 非働化済ウシ胎仔血清 (FCS) を含む DMEM 培地にて培養した。

マウス肺癌由来の Lewis lung carcinoma 細胞 (LLC) 細胞は、RIKEN バイオリソースセンターより購入した。細胞は、同様に、25 U/ml ペニシリン、25 µg/ml ストレプトマイシン (Invitrogen) および、10 % (v/v) 非働化済ウシ胎仔血清を含む DMEM 培地にて培養した。

4) ヨウ化プロピジウム(PI) による細胞死の評価

細胞膜傷害による細胞死を観察するために、培地を propidium iodide (PI) と Hoechst 33342 を含む DMEM 培地に置換して染色した。死細胞の割合は、培養皿中央の 0.43mm² 内の PI 陽性細胞を、同視野で、Hoechst 33342 に染まる核の総数で割ることにより判定した。

5) 細胞総数の測定

3.38cm² の well 中に 1x10⁵ 個/ml の A549 細胞懸濁液 1ml を、上記の hBD-3 合成ペプチド、あるいは相当量の 0.001 % 酢酸溶液を含む培地で培養した。48 時間後、トリプシン/EDTA 溶液にて細胞を剥離し、10 % (v/v) 非働化済ウシ胎仔血清を含む DMEM 培地にて細胞を回収し、直ちに、その細胞懸濁液中の細胞数を測定した。細胞数の測定には、コールター・カウ

ンター (ベックマン・コールター株式会社) を使用した。

7) マウスへの腫瘍細胞の接種と、mBD-14 合成ペプチドの持続皮下投与

生後 3ヶ月の雄の C57BL/6J マウスをケタミンおよびキシラジンにて麻酔後、背部の皮下に 1x10⁶ 個の LLC 細胞を接種した。9日後に、ケタミンおよびキシラジンにて麻酔後、皮下の腫瘍塊の触知を確認し、その後、腫瘍塊近傍の背部皮下に 4.17 mg/ml の mBD-14 合成ペプチド含有 PBS を充填した持続投与ポンプあるいは、相当量の 0.01% 酢酸含有 PBS を充填した持続投与ポンプを埋め、10日後に腫瘍を摘出し、重量を測定した。持続投与ポンプとしては、ALZET MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2002 (DURECT) を用いた。本ポンプでは、0.5µl/h の流速で、充填した溶液が皮下に投与されるため、50µg/日の mBD-14 合成ペプチドが皮下に投与される。

(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。実験は、深麻酔下で施行し、腫瘍摘出時には、深麻酔下で放血もしくは全採血することにより安楽死をえた。本実験は、東京大学動物実験実施規則および東京大学動物実験実施マニュアルに準じている。

また、ケタミンの使用については、麻薬研究者免許証を取得しており、適正な使用のもと、東京都知事に使用量を届け出ている。

C. 研究結果 -hBD-3 の抗腫瘍効果-

1) defensin 合成ペプチドの抗菌活性

使用した抗菌ペプチドの抗菌活性を、Harwig により記載された colony count assay により確認した。Defensin 含有培地での2時間の培養後、大腸菌数は有意に減少しており、その殺菌作用が確認された。生存した菌数をコントロールと比較した生存率を図1に示すが、20 µg/ml の濃度で、hBD-2, hBD-3, mBD-14 は、有意な抗菌活性を示した ($p < 0.01$)。大腸菌の生存率からは、hBD-2 が、hBD-3, mBD-14 と比較して有意に強い抗菌活性を示した。

一方、いずれの defensin においても、2 µg/ml の濃度では、コントロールと比較して、大腸菌の生存率に有意な差はなく、その抗菌活性は確認されなかった。また、以前の実験にて、使用した HNP-1 合成ペプチドも 20 µg/ml にて有意な抗菌活性を示すことが確認されており、その活性は、本実験での hBD-3, mBD-14 の抗菌活性とほぼ同等であった。

2) hBD-3 の細胞膜傷害性

我々は、短時間の hBD-3 刺激による細胞膜の傷害を PI 染色により評価した。10 分間の hBD-3 刺激により、多くの A549 細胞で、PI の取り込みが認められ、急性の細胞膜傷害を示す所見がえられた。PI 陽性細胞の割合は、hBD-3 濃度に比例して直線的に増加した。70 µg/ml 以上の hBD-3 では、統計学的に有意な差をもって細胞傷害性が示された(図2)。

hBD-3 の細胞傷害性を他のヒト defensin と比較すると、hBD-3 の細胞傷害性は、既に報告のある HNP-1 と比較しても有意に強かった。hBD-1 や hBD-2 で

は、200 µg/ml においても、PI 陽性細胞は惹起されなかった。また、hBD-3 のマウスホモログである mBD-14 は、hBD-3 と同様の強い細胞傷害性を示した(図3)。

より長時間の hBD-3 刺激の影響を観察するために、100 µg/ml の hBD-3 を含む 10% (v/v) FCS 含有培地で培養し、PI 染色陽性細胞の割合を経時的に評価した。hBD-3 刺激 30 分後には、多くの細胞が PI 陽性を呈しているが、その後、PI 染色陽性の細胞の割合はゆるやかに上昇し続けた(図4)。FCS が、hBD-3 の細胞傷害性を完全に阻害することもなかった。

次に、より低濃度の hBD-3 に長時間暴露させることによる、A549 細胞への影響を評価した。

20 µg/ml の hBD-3 存在下で、10% (v/v) FCS 含有培地で A549 細胞を培養し、12 時間後に評価したところ、コントロールと比較して、有意な PI 陽性細胞の増加が認められた(図5)。

さらに、5 µg/ml あるいは、20 µg/ml の hBD-3 含有培地で 48 時間、培養した A549 細胞の総細胞数も、コントロールより有意に少ないことが確認された(図6)。

3) 個体における mBD-14 の抗腫瘍効果

C57BL6/J マウスの皮下に接種した LLC 細胞の腫瘍塊近傍で、mBD-14 ペプチドを持続皮下投与した。9 日後に、腫瘍を摘出し、その重量を評価した結果、mBD-14 投与マウスから摘出した腫瘍はコントロール群と比較して有意に小さいことが明らかとなった(図9)。

また、mBD-14 ペプチドを持続投与したマウスにおいても、肉眼的に明らかな、正常組織の破壊像は認められなかった。

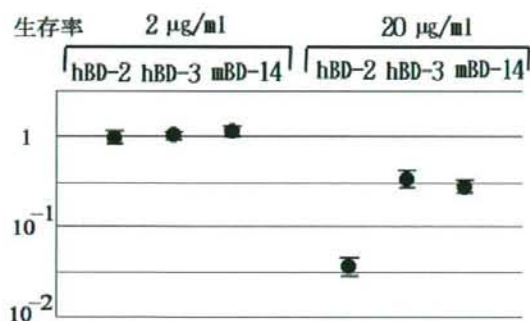


図 1 defensin 合成ペプチドの抗菌活性
hBD-2, hBD-3, mBD-14 とも、20 µg/ml で有意な抗菌活性を示した ($p < 0.01$)。生存率は、control に対する、培養後の菌数の比を示す。20 µg/ml での抗菌活性は、hBD-2 が有意に強かった。バーは、標準誤差を示す。

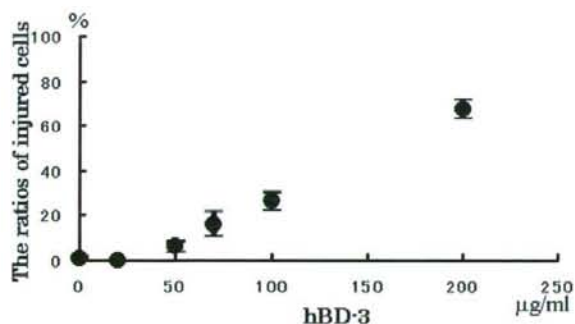


図 2. 10 分間の hBD-3 刺激後の PI 取り込みと hBD-3 濃度依存性

10 分間の hBD-3 刺激により、多くの A549 細胞において PI 取り込みが惹起された。injured cells の割合は、hBD-3 の濃度に比例して直線的に増加した。バーは、標準誤差を示す。

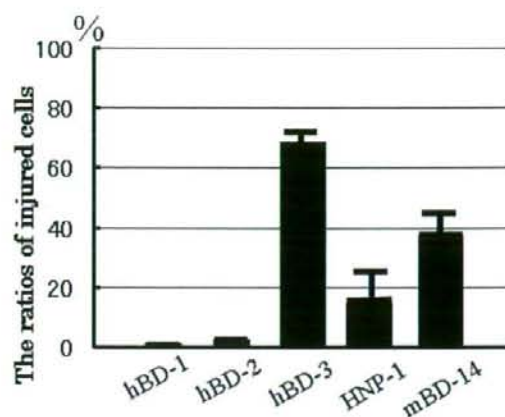


図 3. ヒト defensin (200 µg/ml) の細胞傷害性の比較

hBD-3 の細胞傷害性は、他のヒトβ-defensin や HNP-1 よりも有意に強かった。hBD-3 のマウスホモログである mBD-14 もまた、著明な細胞傷害を惹起した。バーは、標準誤差を示す。

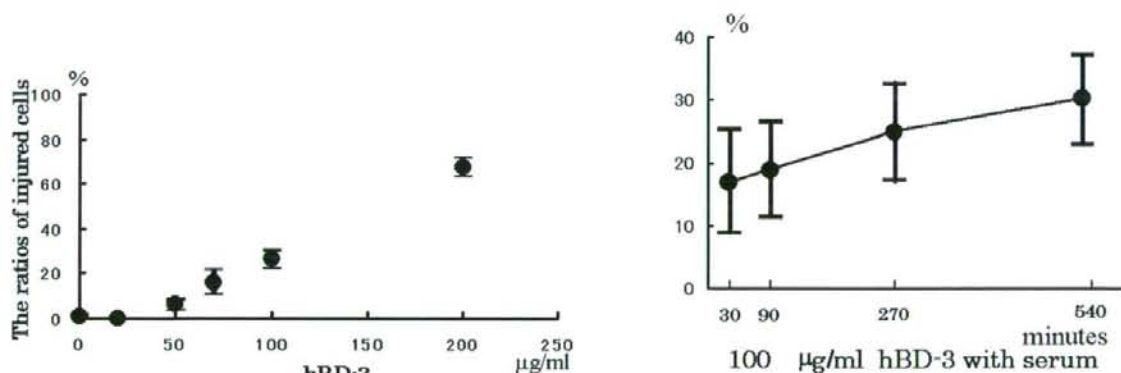


図 4. hBD-3 による細胞傷害の経時変化

100 µg/ml の hBD-3 を含む 10% (v/v) FCS 含有 DMEM 培地下で、A549 細胞を培養した。30 分後には、約 20% の細胞が、PI 陽性像を示し、その後、90 分、270 分、540 分後には、PI 陽性細胞は少しずつ増加した。バーは、標準誤差を示す。

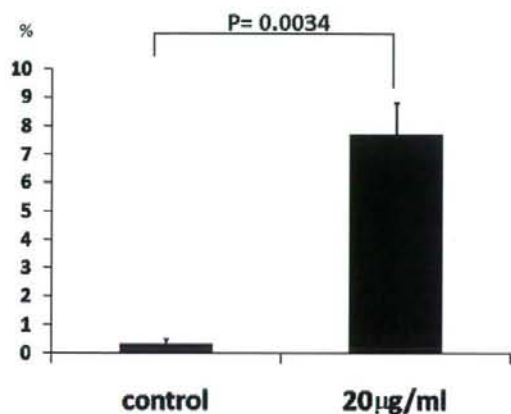


図 5. 12 時間の hBD-3 との共培養により惹起される PI 陽性細胞数

12 時間の共培養では、20 µg/ml の hBD-3 存在下で、有意に多くの A549 細胞が、PI 染色陽性像を示した ($p < 0.01$)。バーは、標準誤差を示す。

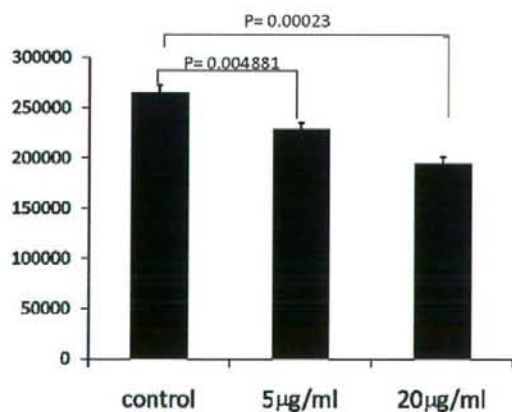


図 6. 48 時間の hBD-3 存在下での培養による細胞数の減少

5 µg/ml あるいは 20 µg/ml の hBD-3 の存在下で、A549 細胞を 48 時間培養した後の総細胞数を比較した。hBD-3 の存在下で、総細胞数は有意に減少していた ($p < 0.01$)。バーは、標準誤差を示す。

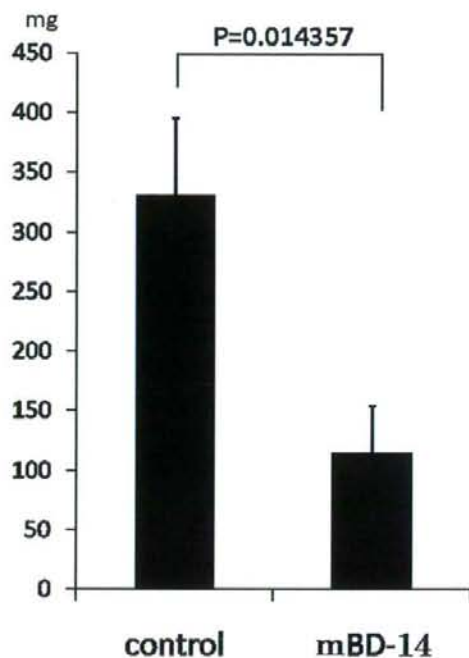


図 7. mBD-14 投与マウスの腫瘍の重量

LLC 細胞を皮下に接種したマウスに対して、mBD-14 を持続皮下投与し、9 日後に腫瘍塊の重量を比較した。mBD-14 投与マウスで、腫瘍塊の重量は有意に低値であった。バーは、標準誤差を示す。

D. 背景・アドレノメデュリン・

Adrenomedullin (ADM) は近年ヒト褐色細胞腫の組織から単離された生理活性ペプチドである。ADM はヒトにおいては 52 残基のアミノ酸からなり、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin-gene-related-peptide, CGRP) や calcitonin, amylin と同じスーパーファミリーに属する。ADM の最も重要な生理作用は血管拡張性の強力な降圧作用である。ADM の発現はさまざまな臓器に認められるが、とりわけ副腎髄質や心房、そして肺に豊富に存在する。また、ADM は血中にも多く含まれている。McLatchie らが最近、以前から orphan receptor として知られていた calcitonin-receptor-like receptor (CRLR) が receptor-activity-modifying protein (RAMP) 2 の存在下に ADM 受容体として機能していると報告した。RAMP には RAMP1, RAMP2, RAMP3 という 3 つの isoform が存在し、このうち RAMP2、RAMP3 が CRLR の存在下に ADM 特異的な受容体として機能することがわかっている。RAMP2、RAMP3 の発現は肺できわめて強いことが示されており、ADM が肺において何らかの重要な役割を果たしていることが推測される。

ヒトの肺における ADM の作用を示す臨床成績としては、喘息患者において一秒量と血漿中の ADM の濃度が逆相関する、すなわち気管支喘息が重症なほど血漿中の ADM 濃度が高いとの報告がある。このことは気管支喘息と関連する気道収縮や低酸素状態が代償的に ADM の分泌量を増やす可能性を示唆している。

ADM には平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖を抑制する効果のあることが知られており、内因性の ADM が気管支喘息における気道収縮や低酸素状態に対して保護的に分泌されているとした場合、ADM を補充することで気道過敏性や喘息罹患気道の構造的変化、つまり気道リモデリングを抑制できる可能性もある。気道リモデリングの抑制は気管支喘息の難治化・重症化を防ぎ、結果として喘息死の減少に寄与するかもしれない。

今回、我々は、ADM の遺伝子改変マウスを用いた気管支喘息モデルの、生理学的、生化学的検討を行った。

E. 方法 -アドレノメデュリン遺伝子改変マウスを用いた気管支喘息モデル-

1) ADM 遺伝子改変マウス

ADM 遺伝子欠損マウスは Shindo らによって確立された。本マウスにおいては、proadrenomedullin gene の exon1、2、3、および exon4 の一部が、ネオマイシン耐性遺伝子に置換されている。本マウスを C57/BL6 系に 5 回以上 backcross した後に実験に供した。遺伝子型は生後 4 週に PCR 法により確認した。マウスは室温 23°C、自動明暗サイクル用照明にて管理した。実験には、8~12 週齢の ADM 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体とその野生型同腹仔を用いた。実験に供したマウスの体重は以下のとおりであり、各群間で有意な差はなかった。[saline-treated $AM^{+/+}$, 30.18 ± 0.76 g; saline-treated $AM^{+/-}$, 30.36 ± 0.82 g; OVA-treated $AM^{+/+}$, 29.00 ± 1.28 g; OVA-treated $AM^{+/-}$, 29.79 ± 0.79 g]

2) 気管支喘息モデルマウスの作製

アレルギー性気管支喘息モデルとして、卵白アルブミン(ovalbumin; OVA)による抗原感作、吸入負荷を施行した。抗原感作として、実験第 1 日目および第 8 日目に、aluminum hydroxide (2mg/ml)を含む生理食塩水に溶解した OVA 0.1mg を 0.5ml 腹腔内に投与した。第 13 日目、第 14 日目、1% OVA 溶液を 60 分間、18×11×11cm のプラスチック製容器内で吸入させた。吸入器は Omron 社の NE-U17 を用いた。この吸入器による吸入粒子径はおおよそ 1~7 μ m であった。なお、コントロール群には、同様の方法で saline を腹腔内投与、および吸入させた。実験第 15 日目に、気道過敏性試験、気管支肺胞洗浄液の採取、肺組織の採取などを施行した。

3) 肺抵抗・肺エラスタンスの測定

pentobarbital sodium 25mg/kg、ketamine hydrochloride 25mg/kg を腹腔内投与することによりマウスを麻酔し、また筋弛緩を得るために pancuronium bromide 0.3mg/kg の腹腔内投与を行った。マウスの前頸部を皮切して気管前面を露出した後、気管を切開し、内径 1mm、長さ 8mm の金属カニューラを挿入して気道を確保した。このカニューラを小動物用人工呼吸器(model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA)の回路に接続した。呼吸条件として、一回換気量 10ml/kg、換気回数 150/分、PEEP 2cmH₂O、FIO₂ 1.0 を用いた。続いて腹壁を切開し、両側の横隔膜を広範囲に開窓、開胸した。実験中、マウスの体温を維持するために heating pad を用いた。気管カニューラの側孔に接続した piezoresistive

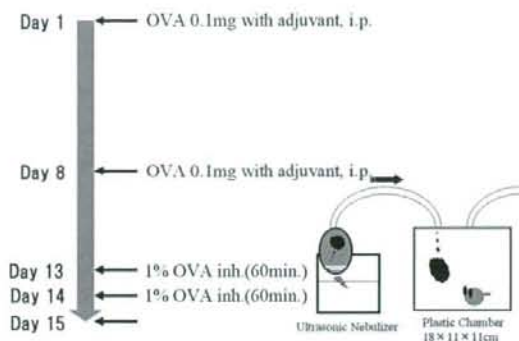


図 8. 気管支喘息モデルマウス作製の手順

microtransducer (Endevco 8510B-2, San Juan Capistrano, CA)を用いて気道内圧(Ptr)を、また Fleisch pneumotachograph (model no. 00000, Metabo SA, Lausanne, Switzerland)にて気流($\frac{dV}{dt}$)を、それぞれ測定した。換気

量(V)は気流値($\frac{dV}{dt}$)の積分により算出した。解析ソフトは ANADAT 5.1 (Montreal, Canada)を用いた。

4) メサコリンによる非特異的気道反応性の検討

非特異的気道収縮アゴニストである methacholine (MCh)を aerosol 吸入投与し、反応性を検討した。1 回換気量の 3 倍量の深吸気を 2 回行わせた後、超音波ネブライザー(Ultra-Neb100, DeVilbiss, Somerset, PA)を用いて aerosol を作製し、吸入ラインより投与した。はじめに baseline 測定として saline 吸入を 2 分間行った。吸入終了 1 分後から 10 秒間の tidal ventilation の間に気道内圧、気流をサンプリングした。引き続き

て MCh 吸入負荷(0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, and 80 mg/ml) をそれぞれの吸入濃度について 2 分間ずつ行い、吸入終了 1 分後から 10 秒間の tidal ventilation の間に気道内圧、気流を同様にサンプリングした。なお、肺抵抗が baseline の 2 倍に増加するのに要する MCh 濃度を EC₂₀₀R_L と定義し、気道反応性の指標とした。

5) 気管支肺胞洗浄液の採取と解析

マウスを深麻酔下で脱血死させた後、気管カニューラより PBS 1ml を 5 回注入・回収した。得られた気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)(おのおの 4.5ml, 回収率 90%)を、遠心分離(450g, 10 分間)し、細胞成分より細胞数・細胞分画を測定した。上清は、-80℃で凍結保存した。この上清より BALF 蛋白濃度を、bovine serum albumin (BSA) を対照として Bradford 法により測定した。

6) 気管支肺胞洗浄液の生化学的評価

BALF の IgE 濃度は、精製抗マウス IgE capture モノクローナル抗体(mAb) (BD PharMingen)を PBS で 2μg/ml に調製し、ELISA plate(Corning Glass Works, Corning, NY)を用いて、IgE に対する ELISA plate を作製し、スタンダードおよび BALF サンプルと反応させた後、精製ビオチン化抗マウス IgE 抗体、ペルオキシダーゼ結合 streptoavidin、発色基質を反応させ、波長 405nm における吸光度を測定した。

BALF 中の Cys-leukotriene (LTC₄/D₄/E₄)は、EIA kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)を用いて測定した。同様に BALF 中の IL-4, 5, IFN- γ を ELISA kit (Pierce Biotechnology, Inc.)を用いて測定した。IL-13 の濃度についても ELISA kit (Genzyme TECHNE)を用いて測定した。

7) 血清 OVA 特異的 IgE 抗体の測定

OVA 特異的 IgE 測定は前述の IgE 測定と同様に行った。すなわち、精製抗マウス IgE capture モノクローナル抗体(mAb) (BD PharMingen)を ELISA plate(Corning Glass Works, Corning, NY)に載せ吸着させた。スタンダードおよび血清サンプルを反応させた後、精製ビオチン化 OVA を反応させ、ペルオキシダーゼ結合 streptoavidin、発色基質により測定した。

8) 血清 OVA 特異的 IgG1 抗体の測定

OVA を ELISA plate(Corning Glass Works, Corning, NY)に載せ吸着させた。スタンダードおよび血清サンプルを反応させた後、HRP-conjugated anti-mouse IgG1 (BD PharMingen) を反応させ、発色基質により測定した。

9) 肺組織のサンプリング

深麻酔下でマウスを脱血死させた後、肺を摘出した。摘出した肺は用手的に 20cmH₂O 圧の気道内陽圧をかけて拡張し、一方の肺の主気管支を絹糸で結紮した。摘出した拡張肺は 10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定した。パラフィン包埋したブロックを sagittal slice、4μm 厚に薄切し、組織標本を作製した。もう一方の摘出肺は、-80℃で凍結し、肺組織中の adrenomedullin 量測定に供した。

10) 肺組織中 adrenomedullin の定量

methacholine (MCh)を aerosol 吸入させる前後で得た肺組織中の ADM を Adrenomedullin[1-50] (Mouse) RIA kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc.)を用いて定量した。0.1M の酢酸 1.0ml に組織を加え、100℃で 10 分間温浴させた。氷冷後ホモジナイズし、さらに 4℃、13,000g で 5 分間遠心分離した後、上清を RIA 測定に用いた。

ADM 含有量は組織単位湿重量あたりで表記した (ng/g wet tissue)。

11) 肺組織標本の形態学的解析

肺組織標本に対して、好酸球浸潤の程度を評価するために Luna 染色を、気道分泌・杯細胞の多寡を評価するために PAS と Alcian Blue の重染色を行った。好酸球浸潤の程度、気道過分泌・杯細胞の増生の程度について半定量的に評価するために、各染色による陽性細胞の数を 0-3 (0=none to 3=abundant) に分けて顕微鏡下にスコアリングを行った。スコアリングは 2 人の実験者により盲検法で行った。なお、本スコアリングの手法を検証したところ、実験者の間(inter)でも、あるいはスコアリングの施行間(intra)においても、variance は 5%未満であり、有意ではなかった。

さらに得られた組織標本に対して Masson's trichrome 染色を行い、気道の形態学的解析を行った。全てのスライドを光学顕微鏡下にくまなく観察し、膜性細気管支のみを注意深く抽出した。これらをデジタル写真に収め、解析に用いた。各々の関心領域を digitizing tablet を用いてコンピューター上に入力し、各種の測定を Image J software (version 1.37v, National Institutes of Health, USA) を用いて行った。測定は以下について施行した。

1) 基底膜周囲長 : Pbm

基底膜が取り囲む領域の面積 : Abm

2) 平滑筋層の外周囲長 : Psm

平滑筋層の外縁で取り囲まれる領域の面積 : Amo

3) 気道の内周縁長 : Pi

気道内腔の面積 : Ai

4) 上皮細胞層の面積 : Ae = Abm - Ai

平滑筋層の面積 : Asm = Amo - Abm

サンプリングした気道のサイズを標準化するために Abm で除した値 Ae/Abm, Asm/Abm, Ai/Abm を気道領域の面積として解析に用いた。

5) 気道長径 : DL および気道短径 : Ds
また、以下の条件を満たすすべての気道は除外した(78/144)。

Ds/DL < 0.6, 境界不鮮明

結果、144 個中 66 個の気道を解析に用いることにした。極力細胞外基質を除外するため、気道平滑筋層の外縁は精確に追跡し、途中で途絶している場合には滑らかに基底膜面まで追跡した。この途絶部分の長さが Pbm の 10%を超える場合にはこの気道断面を評価の対象から除外した。同様の方法を用いて、免疫組織学的染色を行った標本に対しても評価を行った。

12) α -smooth muscle actin の免疫組織染色

気道平滑筋を正確に同定するために α -smooth muscle actin に対する免疫染色を行った。組織標本を脱パラフィン、水和処理後、pH6.0 に調製した 0.01M のクエン酸バッファーに浸して 121°C で 15 分間加圧熱処理し抗原を賦活化した。一次抗体として、抗マウス α -smooth muscle actin 抗体 (DAKO Cytomation) を用い、ENVISION+TM/HRP kit for Mouse (DAKO Cytomation, Cat. K4000, CA) と反応させ、さらに正常マウス血清と 60 分間反応させた。この反応生成物を組織標本にアプラインし、3,3'-diaminobenzidine (DAB) で発色させた。コントロールとして、マウス IgG2a 陰性コントロール (DAKO Cytomation, Cat. X0943, CA) を用いて同様の反応を行った。

13) 統計

実験データの解析には one-way ANOVA または nonparametric Kruskal-Wallis test を

用いた。検定は有意水準 5%で行った。誤差は標準誤差(standard error: SE)により表記した。データの management のために Microsoft Excel 2003 を、統計学的解析のため、Dr. SPSS II (SPSS Japan Inc., version 14.0, Japan) を用いた。

F. 結果 - アドレノメデュリン遺伝子改変マウスを用いた気管支喘息モデル-

1) MCh による非特異的気道反応性

非特異的気道収縮物質である MCh の吸入により、肺抵抗・肺エラスタンスは濃度依存的に上昇した。各群において、生理食塩水吸入後の肺抵抗・肺エラスタンスに有意差は認められなかった。MCh 吸入後の肺抵抗を MCh の濃度に対してプロットしたものが図 9 である。

OVA により感作された mutant 群では、明らかに inflexion point が左方に偏位しており、第 4 濃度(2.5 mg/ml)と第 5 濃度(5 mg/ml)においては saline 吸入群より明らかな肺抵抗の上昇が認められた(* $P < 0.05$)。さらに、第 5 濃度(5 mg/ml)においては野生型群と比べても有意に肺抵抗が上昇していた(* $P < 0.05$)。

気道反応性の指標である $EC_{200}R_L$ について検討したところ、OVA により感作された群では saline 群と比べて有意に低かった(図 10)。また、OVA 感作群で野生型、mutant を比較すると、mutant 群において有意に $EC_{200}R_L$ が低値(* $P < 0.05$)であり、mutant の喘息モデルマウスにおいては MCh 気道過敏性が有意に亢進していることが示唆された。

2) 気管支肺胞洗浄液の解析

気管支肺胞洗浄液の細胞数・細胞分画を表 1 に示した。OVA 感作群の好酸球分画の有意な増多が認められた($P < 0.05$)が、野生型群と mutant 群の間に有意な差は認めら

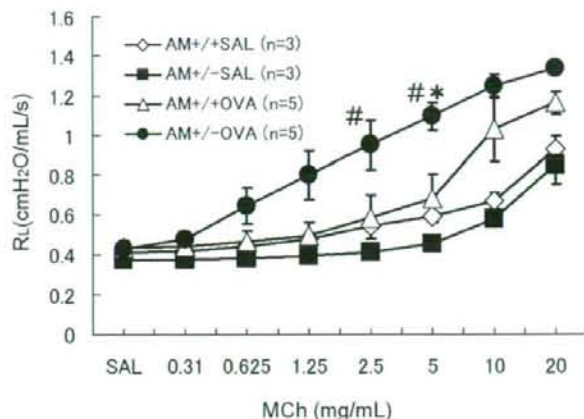


図 9. Methacholine (MCh) dose response curves for lung resistance (R_L) in the wild type and the heterozygous adrenomedullin (ADM) mutant mice. SAL, saline. OVA, ovalbumin. # $P < 0.05$ compared with the R_L in the same MCh dosage of $AM^{+/+}$ SAL group. * $P < 0.05$ compared with the R_L in the same MCh dosage of $AM^{+/+}$ OVA group.

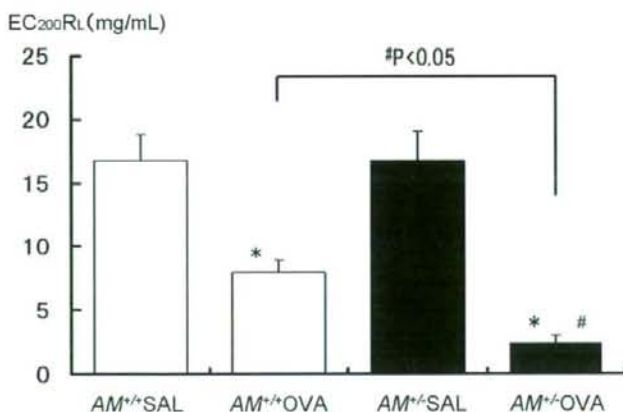


図 10. $EC_{200}R_L$, Concentration of MCh required to increase R_L to 200% of baseline values. (n=3 for each $AM^{+/+}$ group, n=5 for each $AM^{+/-}$ group) * $P < 0.05$ compared with the value of corresponding SAL group. # $P < 0.05$ compared with the value of $AM^{+/+}$ OVA group.

saline-treated $AM^{+/+}$, 16.81 ± 2.01 mg/ml (n=3);
 saline-treated $AM^{+/-}$, 16.73 ± 2.34 mg/ml (n=3);
 OVA-treated $AM^{+/+}$, $7.95^* \pm 0.98$ mg/ml (n=5);
 OVA-treated $AM^{+/-}$, $2.41^* \pm 0.63$ mg/ml (n=5),

表 1. Total cell counts and cell fractions in BALF in each experimental group

	TCC ($\times 10^4$)	M ϕ (%)	Lym (%)	Eos (%)	PMN (%)
<i>AM</i> ^{+/+} Saline (n=5)	4.94 \pm 1.91	96.02 \pm 2.82	4.32 \pm 2.67	0.02 \pm 0.00	0.26 \pm 0.21
<i>AM</i> ^{+/-} Saline (n=5)	4.82 \pm 0.54	91.96 \pm 2.51	7.24 \pm 2.25	0.10 \pm 0.00	0.82 \pm 0.48
<i>AM</i> ^{+/+} OVA (n=5)	40.20 \pm 18.22 [#]	70.58 \pm 15.00	2.84 \pm 1.87	25.88 \pm 14.88 [#]	0.72 \pm 0.45
<i>AM</i> ^{+/-} OVA (n=6)	21.13 \pm 8.75 [#]	60.02 \pm 12.41	4.00 \pm 1.60	35.30 \pm 12.84 [#]	0.70 \pm 0.28

Values are means \pm SE, TCC: Total Cell Count, M ϕ : Macrophages, Lym: Lymphocytes, Eos: Eosinophils, PMN: Polymorphonuclear cells

[#]P<0.05 compared with the saline group in the same strain of animals.

表 2. Biochemical analysis of BALF

	TP (μ g/ml)	IgE (ng/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	LT C4/D4/E4 (pg/ml)
<i>AM</i> ^{+/+} Saline (n=5)	45.05 \pm 12.38	5.30 \pm 0.85	218.5 \pm 17.1	17.0 \pm 3.8	1492.4 \pm 129.0	5.07 \pm 0.76
<i>AM</i> ^{+/-} Saline (n=5)	43.35 \pm 6.96	4.44 \pm 0.92	166.8 \pm 28.2	10.2 \pm 1.2	1548.4 \pm 119.2	0.87 \pm 0.47
<i>AM</i> ^{+/+} OVA (n=9)	82.47 \pm 23.60	70.58 \pm 15.00	117.4 \pm 28.7	41.8 \pm 14.6	1353.0 \pm 66.6	4.60 \pm 2.97
<i>AM</i> ^{+/-} OVA (n=7)	69.64 \pm 14.72	60.02 \pm 12.41	108.5 \pm 23.0	23.9 \pm 7.1	1624.3 \pm 119.2	2.23 \pm 1.34

Values are means \pm SE, TP: Total Protein, IgE: Immunoglobulin E, IL-4: Interleukin-4, IL-5: Interleukin-5, IFN- γ : Interferon- γ , LT C4/D4/E4: Leukotriene C4/D4/E4

表 3. Immunoreactivity analysis of serum

	OVA-specific IgG1 (U/ml)	OVA-specific IgE (U/ml)
<i>AM</i> ^{+/+} Saline	N.D.	N.D.
<i>AM</i> ^{+/-} Saline	N.D.	N.D.
<i>AM</i> ^{+/+} OVA	5578.4 \pm 4513.1 (n=6)	N.D.
<i>AM</i> ^{+/-} OVA	1879.6 \pm 1389.3 (n=7)	N.D.

Values are means \pm SE, N.D.: not detected

れなかった。また、BALF 中の液性因子について表 2 に示す。BALF 中総蛋白濃度、総 IgE 濃度、IL-4、IL-5、IL-13、IFN- γ 、LTC4/D4/E4 の濃度については、野生型群と mutant 群の間で有意な差はみられなかった。

3) 血清 OVA 特異的 IgE 抗体、血清 OVA 特異的 IgG1 抗体の測定

血清中の OVA 特異的 IgG1 抗体、OVA 特異的 IgE 抗体の測定結果を表 3 に示す。抗原暴露によって、OVA 特異的 IgG1 の血清抗体価は上昇したが、野生型群と mutant 群の間に有意な差は認められなかった。OVA 特異的 IgE の測定も試みたが、いずれも検出感度以下であった。

4) 肺組織 adrenomedullin の定量

肺組織中に含まれる ADM 量を RIA 法により測定した結果を図 11 に示す。MCh 吸入負荷を行う前の ADM の量を比較すると、mutant 群では野生型と比べて有意に低値であった ($^{\dagger}P<0.01$)。MCh の吸入により各群とも有意に ADM の上昇が見られた ($^{\#}P<0.01$) が、MCh 吸入負荷後の ADM 量を比較すると、mutant 群で有意に低値であった ($^*P<0.01$)。

5) 肺組織標本の半定量的解析

HE 染色標本では (図 12)、OVA 感作群で単核細胞、好酸球の気道周囲への浸潤が顕著に認められた。しかし野生型群と mutant 群の間に明らかな差は見られなかった。

Luna 染色標本では、OVA 感作群で顕著な好酸球浸潤を気道周囲に認めたが、その程度は野生型群と mutant 群の間に有意な差が認められなかった (図 13)。

PAS/Alcian blue 重染色標本では OVA 処置群できわめて強く染色されており、気道過分泌・杯細胞の過形成が示唆された。

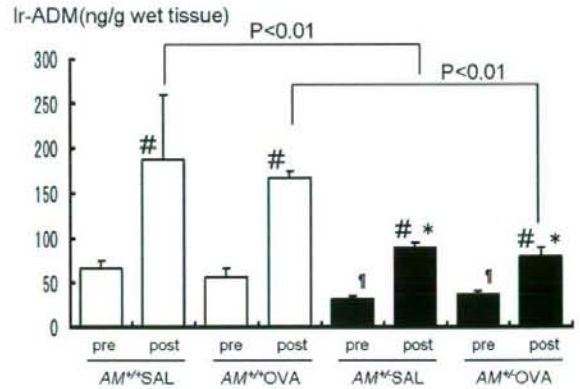


図 11. Immunoreactive (Ir-) ADM in the lung before and after MCh challenge (RIA). Number of samples is as follows; pre-inhalation SAL groups are 5, pre-inhalation OVA groups are 6, and post-inhalation groups are all 3. $^{\dagger}P<0.01$ compared with the pre-inhalation value of AM^{+/+}. $^*P<0.01$ compared with the post-inhalation value of AM^{+/+} group. $^{\#}P<0.01$ compared with the pre-inhalation value.

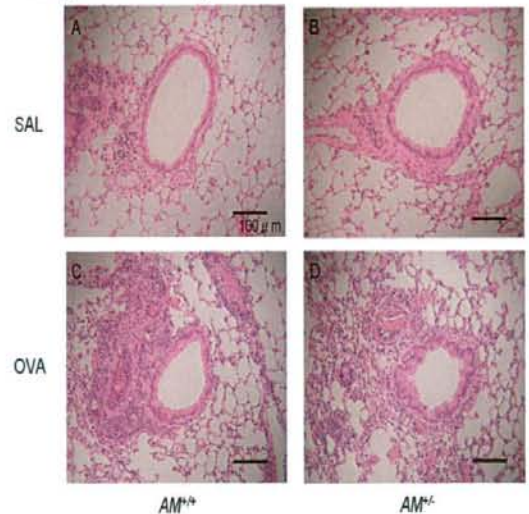


図 12. Photomicrographs of small airways and lung parenchyma from (A) saline-treated wild type, (B) saline-treated ADM mutant, (C) OVA-treated wild type, (D) OVA-treated ADM mutant mice.

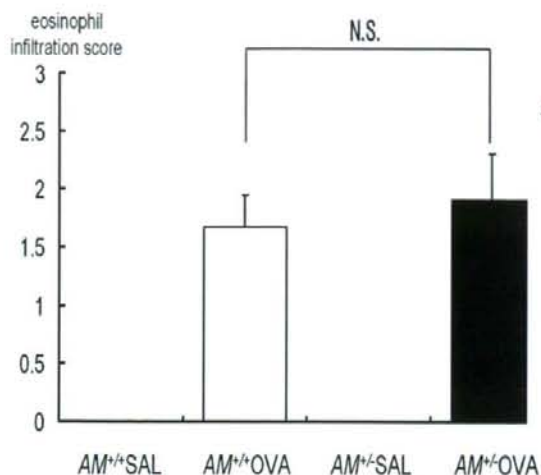


図 13. Semi-quantitative assessment of eosinophil infiltration around the airways (n=12 for each group).

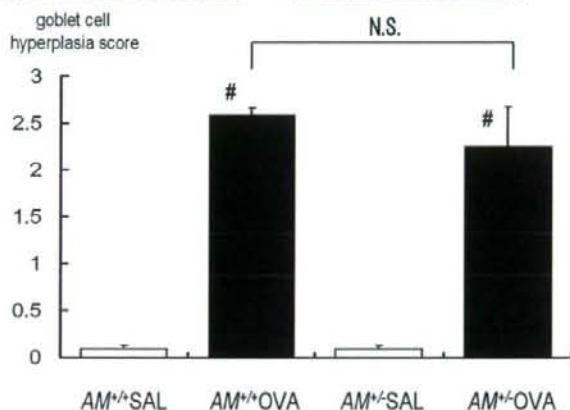
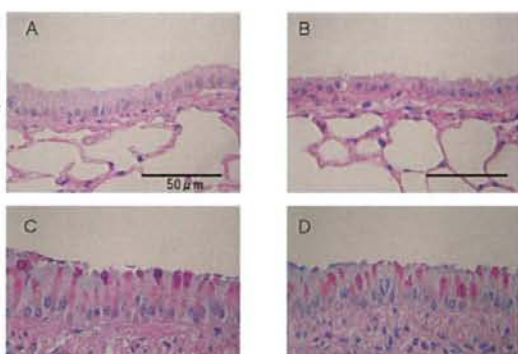


図 14 Photomicrographs of bronchial wall stained by PAS/Alcian blue co-stain (n=12 for each group). Goblet cells hyperplasia is apparent in C and D (above). Semi-quantitative assessment of goblet cell hyperplasia and airway hypersecretion of wild type and mutant mice with OVA inhalation challenge (below).

[#]P<0.05 compared with the saline group.

OVA 負荷により野生型、mutant いずれの群においても杯細胞の過形成が生じたが、その程度については両群間で有意な差が認められなかった(図 14)。

6) 肺組織標本の形態学的解析

抽出した 66 の気道成分(AM^{+/+}SAL: n=16, AM^{+/+}OVA: n=14, AM^{+/-}SAL: n=10, AM^{+/-}OVA: n=26)に対して、別記の方法で形態計測を行った。OVA で感作した mutant マウスの気道内腔面積(Ai/Abm)は OVA 感作マウスで有意な狭小化を認めた(P=0.007)。しかし野生型と比較して有意な狭小化は認めなかった(P=0.20) (図 15)。

また、上皮細胞層の面積(Ae/Abm)も同様に、OVA 感作マウスで有意な肥厚を認めた(P=0.00007)が、mutant 群と野生型の間で有意な差は認められなかった (P=0.20) (図 16)。

一方で、OVA で感作した mutant マウスの気道平滑筋領域の面積(Asm/Abm)は非感作マウスのそれと比較して有意に大きかった(P=0.00007)。また、OVA 感作 mutant マウスの気道平滑筋領域の面積は野生型のそれと比べて有意に高値であった(P=0.0001) (図 17)。

この気道平滑筋領域の細胞数 Nuclear Cell Count (NCC) をカウントし、Pbm² で補正して評価した。細胞数(NCC/Pbm²)は OVA 感作マウスで有意に増加しており(P=0.0019)、また mutant 群の細胞数は野生型と比較して有意に増加していた(P=0.012) (図 18)。

また、 α -smooth muscle actin に対する免疫組織化学染色を行った結果を図 19 に示す。OVA 感作マウスにおいては、mutant mouse の気道平滑筋層の面積が野生型と比較して有意に増大していた(P=0.0004)。

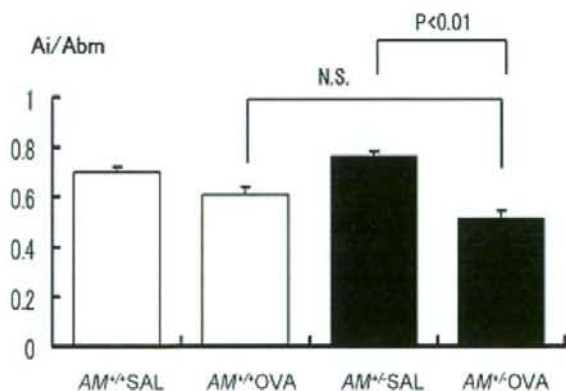


図 15. Area of internal airway lumen (Ai/Abm) following OVA- or SAL- inhalational challenge (AM^{+/+}SAL: n=16, AM^{+/+}OVA: n=14, AM^{-/-}SAL: n=10, AM^{-/-}OVA: n=26). Ai/Abm indicates the standardized internal airway lumen area by Abm. P values are shown where significant (P<0.05). N.S.: not significant.

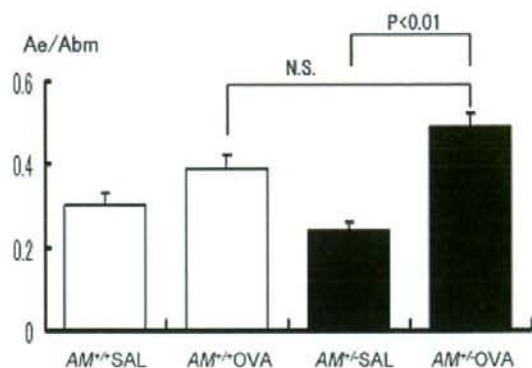


図 16. Area of airway epithelial cell layer (Ae/Abm) following OVA- or SAL- inhalational challenge (AM^{+/+}SAL: n=16, AM^{+/+}OVA: n=14, AM^{-/-}SAL: n=10, AM^{-/-}OVA: n=26). Ae/Abm indicates the standardized area of airway epithelial cell layer by Abm. P values are shown where significant (P<0.05). N.S.: not significant.

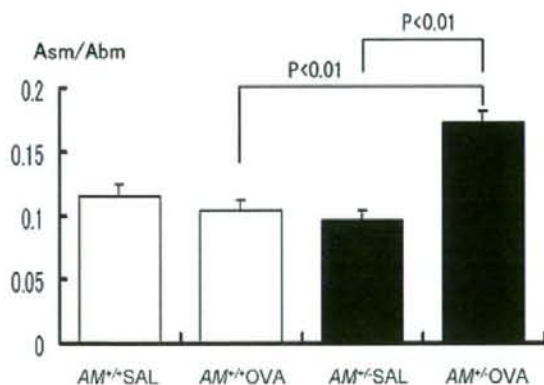


図 17. Area of airway smooth muscle cell layer (Asm/Abm) following OVA- or SAL- inhalational challenge (AM^{+/+}SAL: n=16, AM^{+/+}OVA: n=14, AM^{-/-}SAL: n=10, AM^{-/-}OVA: n=26). Asm/Abm indicates the standardized area of airway smooth muscle cell layer by Abm. P values are shown where significant (P<0.05).

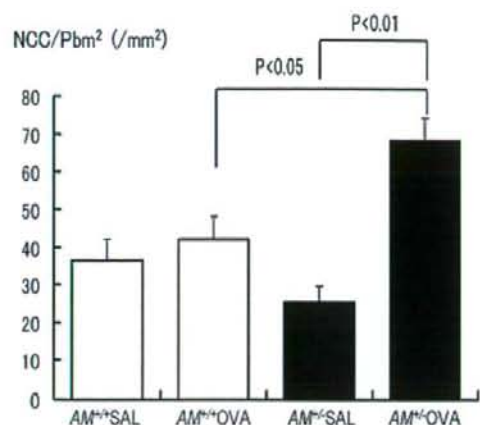


図 18. NCC/Pbm² around the respiratory bronchioles following OVA- or SAL-inhalational challenge (AM^{+/+}SAL: n=16, AM^{+/+}OVA: n=14, AM^{-/-}SAL: n=10, AM^{-/-}OVA: n=26). NCC/ Pbm² indicates the standardized nuclear cell count by Abm. P values are shown where significant (P<0.05).

G. 考察

我々は、ヒト defensin の中でも、hBD-3 が際立った細胞傷害性を示すことを見出し、その抗腫瘍効果を個体レベルでも確認した。

また、我々は、血管拡張性ペプチドであるアドレノメデュリンの遺伝子改変マウスを用いて、アドレノメデュリンの減少が、気道過敏性の亢進を促進させ、そのメカニズムのひとつとして、気道平滑筋の過形成の促進が関与している可能性を見出した。

これまで、我々は、抗菌ペプチド defensin の新しいアイソフォームを同定するとともに、その過剰発現マウスを用いて、過剰な defensin が、炎症の一因子として、様々な炎症性疾患の病態生理に関与する可能性を検討してきた。実際、mBD-6 過剰発

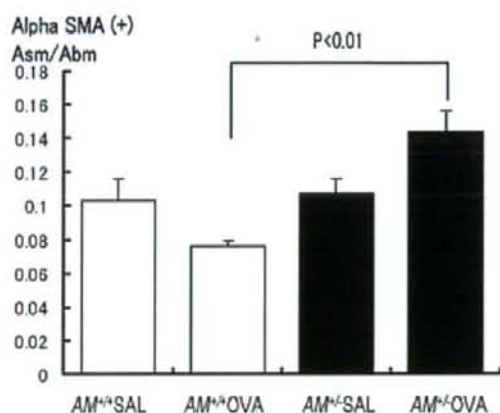
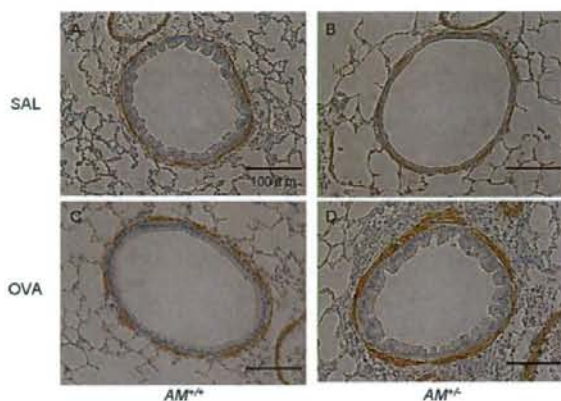


図 19. Photomicrographs of small airways and lung parenchyma from (A) saline-treated wild type, (B) saline-treated ADM mutant, (C) OVA-treated wild type, (D) OVA-treated ADM mutant mice after OVA- or SAL-inhalational challenge. Specimens were stained with anti- α -SM actin antibody immunohistochemically. Scale bar, 100 μ m (above). Area of airway smooth muscle cell layer (Asm/Abm) following OVA- or SAL- inhalational challenge in the immunohistochemically stained sections with anti- α -SM actin antibody (AM^{+/+}SAL: n=16, AM^{+/+}OVA: n=14, AM^{-/-}SAL: n=10, AM^{-/-}OVA: n=26). P values are shown where significant (P<0.05) (below).