

炎症性腸疾患における内因性抗菌ペプチドの 病態への関与と治療応用の研究

課題番号 11694231

平成11～13年度科学研究費補助金
基盤研究(B)研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 高 後 裕
(旭川医科大学医学部教授)

研究組織

研究代表者

高後 裕 旭川医科大学医学部教授

研究分担者

アンドレ ウォレットカリフォルニア大学医学部教授

マイケル セルステッド カリフォルニア大学医学部教授

藤本 佳範 旭川医科大学医学部助手

奥村 利勝 旭川医科大学医学部助手

綾部 時芳 旭川医科大学医学部助手

蘆田 知史 旭川医科大学医学部助手

斉藤 浩之 旭川医科大学医学部助手

研究経費

平成 11 年度 2900 千円

平成 12 年度 2600 千円

平成 13 年度 2600 千円

研究成果

はじめに

生体は種々の内因性抗菌物質を生成し、生体防御因子として皮膚創傷面や粘膜、消化管管腔に分泌することが知られている。近年、これらの内因性抗菌物質には分子量の比較的小さいペプチドが存在することが明らかとなった。特に消化管においては、Paneth cell が分泌する α -defensin, および PR-39 が強い抗菌作用を有しており、消化管管腔における細菌感染防御の重要な役割を占めていることが動物実験で明らかとなっている。またこれらの物質は、抗菌作用のほか免疫担当細胞の chemoattractant としての作用、粘膜上皮細胞の吸収・分泌機能を調節する作用、細胞間物質の生成を促進する作用などが明らかとなり、情報伝達物質としても機能していることが明らかとなってきている。

本研究では臨床患者材料と分子生物学的および細胞免疫学的手法を用いてヒトの炎症性腸疾患における内因性抗菌ペプチドの発現量および異常の有無について検索し、これを明らかにすることを目的とした。また、これらの物質は生体内に既に存在する物質であることから臨床応用が比較的安全であると考えられる。そこでこれらの物質がヒトの治療薬としての応用の可能性について明らかにする目的で計画された。

この分野の研究は、本邦においては専門家が少なく、カリフォルニア大学アーバイン校の医学部病理学および分子生物学・微生物学講座における研究実績が世界的に抜群であったため、この両教室と様々な情報交換を行い研究を共同して遂行することが必要であった。そこで本研究課題は、平成11年度国際学術交流研究経費(基盤 B 研究 国 11694231)として申請され承認されたものである。従って、本研究経費の大部分は、研究組織に挙げた研究者および研究に従事する大学院生のカリフォルニア大学への派遣旅費、およびカリフォルニア大学の研究者の旭川医科大学への招聘旅費として使用された。

共同研究活動とその内容

平成 11 年度

平成 11 年 9 月 6 日-平成 11 年 9 月 12 日の期間, 旭川医科大学医学部助手蘆田 知史, 斉藤 浩之がカリフォルニア大学アーバイン校に派遣され, マウスにおける小腸 crypt の単離精製法と, これより放出される抗菌ペプチドの活性測定法, およびその精製法についてウオレット教授の指導を受け, この方法のヒトへの応用の可能性について検討した。次いで, 平成 11 年 11 月 2 日-平成 11 年 11 月 8 日の期間, 旭川医科大学医学部教授高後 裕, 旭川医科大学医学部助手藤本 佳範, 旭川医科大学医学部大学院本村 且がカリフォルニア大学アーバイン校に派遣され, マウスにおける PR-39 の生物活性とその遺伝子構造について研究成果を報告し, ヒトの腸管における相同遺伝子産物の発現の可能性とその探索法について打ち合わせを行った。同時に, ヒトにおける小腸 crypt の単離法について, その問題点を報告した。次いで, 平成 12 年 1 月 19 日-平成 12 年 1 月 27 日の期間, カリフォルニア大学医学部教授アンドレ ウオレットが旭川医科大学に派遣され, ヒト小腸の単離 crypt の精製法について旭川医科大学の研究者と協同で実験を行い, その方法を確立した。また, 同時に, マウスにおける小腸 crypt から放出される α -defensin の分泌刺激となる物質の同定法について報告を行った。

これらの研究活動により確立したヒト小腸 crypt 分離の方法の概要を図 1 に示した。この方法を用いると, ヒト小腸の新鮮手術材料および内視鏡生検材料から, 抗菌ペプチドの放出を観察できるヒト小腸 crypt の精製が可能であった(図 2)。

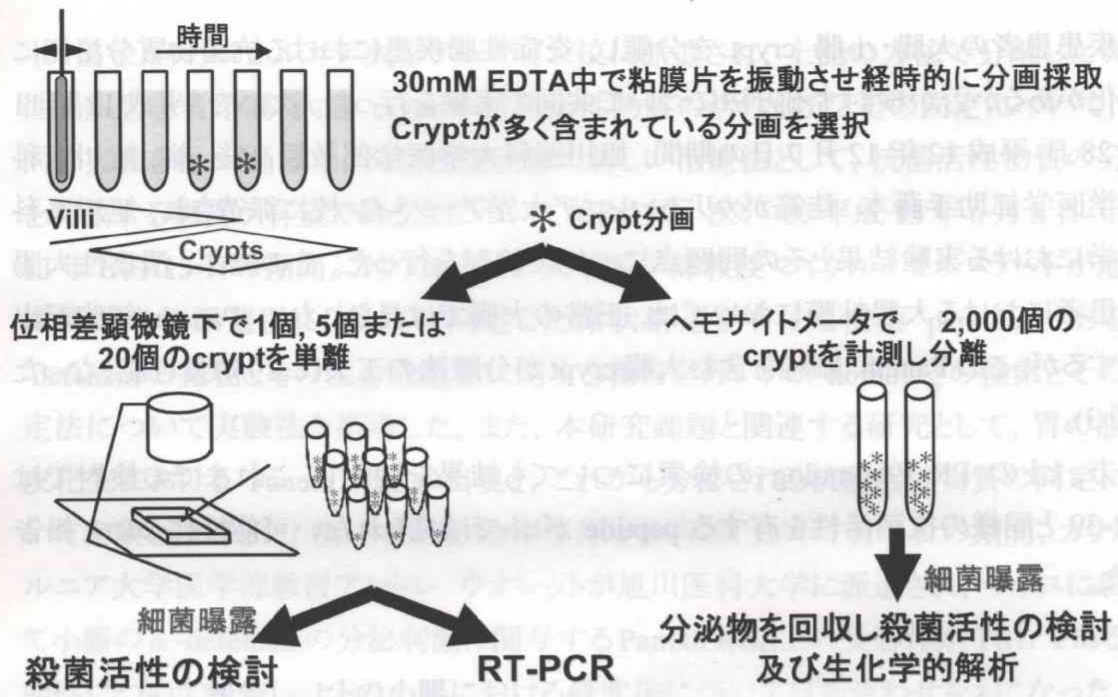


図1 ヒト小腸 crypt の分離精製法

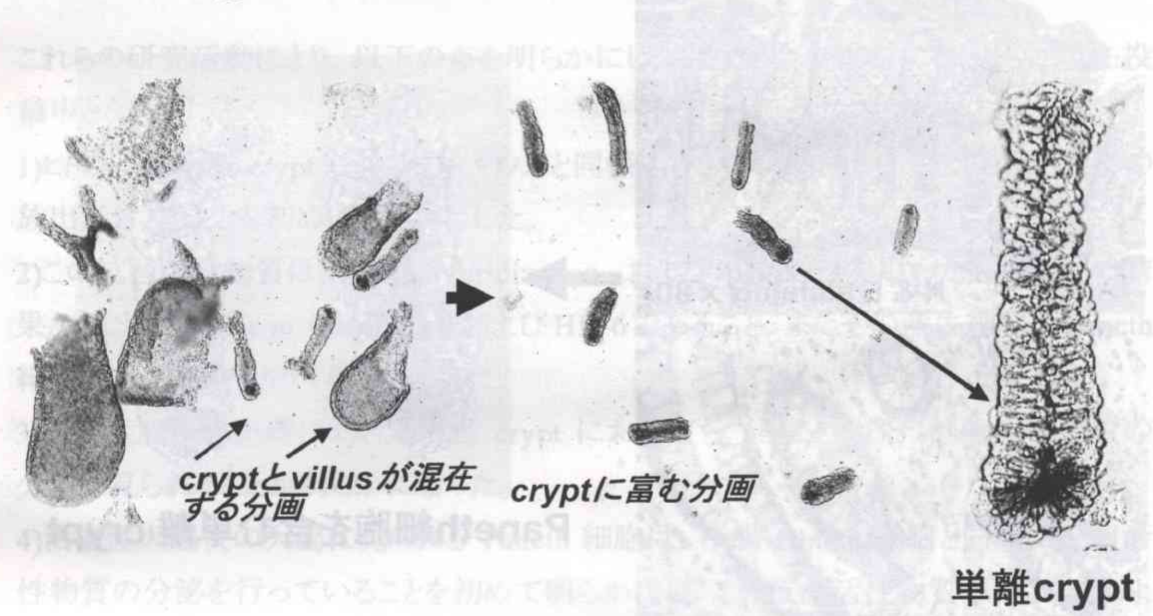


図2 ヒト小腸から分離した crypt

また、本研究に関連して
平成12年度
平成12年8月22日-平成12年8月31日の期間、カリフォルニア大学医学部教授ア
ンドレ ウオレットが旭川医科大学に派遣され、平成11年度の研究において確立した
ヒト小腸 crypt 分離法を用いて旭川医科大学で施行された正常ヒト小腸 crypt におけ
る抗菌活性物質の測定結果について検討を行った。また、この方法を用いて炎症性

腸疾患患者の大腸・小腸 crypt を分離し、炎症性腸疾患における抗菌物質分泌能に変化があるか否か検討する方法について共同で実験を行った。次いで、平成12年11月28日-平成12年12月7日の期間、旭川医科大学医学部教授高後 裕、旭川医科大学医学部助手藤本 佳範がカリフォルニア大学アーバイン校に派遣され、旭川医科大学における実験結果とその問題点について検討を行った。その結果、潰瘍性大腸炎患者における大腸粘膜においては、正常の大腸では見られない Paneth 細胞が出現するが、この Paneth 細胞を含む大腸 crypt が分離法の工夫により精製可能となった(図3)。

一方、ヒトの PR-39homolog の検索についても結果を検討し、これまでの検討では PR-39 と同様の抗菌活性を有する peptide がヒトでは見られない可能性について報告した。

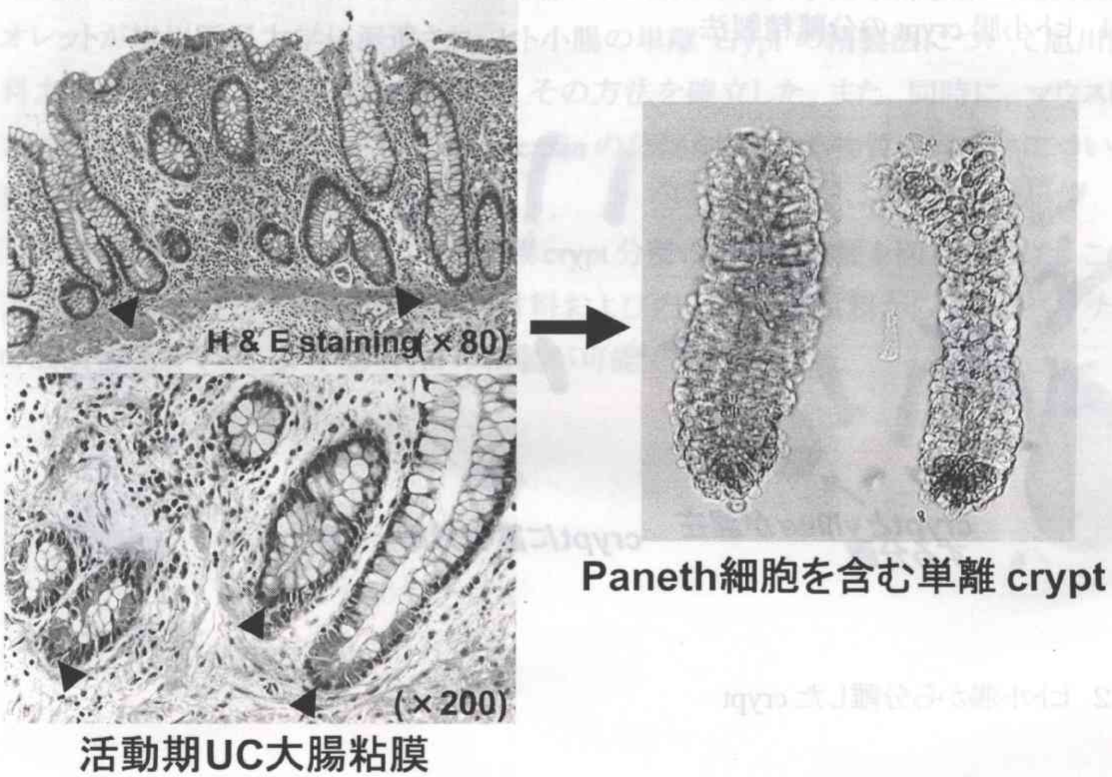


図3 潰瘍性大腸炎患者大腸粘膜からの crypt の分離

平成13年度

平成13年4月29日-平成13年5月7日の期間、旭川医科大学医学部教授高後 裕、旭川医科大学医学部助手藤本 佳範、旭川医科大学医学部大学院井内 康之、鈴

木 昌子がカリフォルニア大学アーバイン校に派遣され、上記の方法で分離した炎症性腸疾患患者小腸・大腸 crypt の抗菌活性物質の活性測定とその同定について、共同で実験を行った。また、炎症性腸疾患の新しい治療法として、抗菌活性物質の分泌を刺激する物質が有望である点について検討した。次いで、平成 13 年 6 月 8 日-平成 13 年 6 月 13 日の期間、カリフォルニア大学医学部教授マイケル セルステッドが旭川医科大学に派遣され、新規に同定した環状構造を有する抗菌 peptide である θ -defensin の発現とその生合成過程に関する報告を行い、ヒト homolog の検索とその同定法について実験法を指導した。また、本研究課題と関連する研究として、胃の腸上皮化生における Paneth 細胞の出現と、これから分泌される抗菌活性物質の同定について実験を指導した。次いで平成 13 年 7 月 4 日-平成 13 年 7 月 9 日の期間、カリフォルニア大学医学部教授アンドレ ウオレットが旭川医科大学に派遣され、マウスにおいて小腸の α -defensin の分泌刺激に関与する Paneth 細胞上の受容体が TRL である可能性について報告し、ヒトの小腸における研究法について打ち合わせをおこなった。

これらの研究活動により、以下の点を明らかにし、関連学会で報告するとともに現在投稿中となっている。

- 1)ヒトの正常小腸 crypt においてもマウスと同様、LPS の刺激によって抗菌活性物質の放出がおこることを初めて明らかにした。
- 2)この抗菌活性物質は、in situ hybridization、および単離 crypt を用いた RT-PCR の結果からヒト α -defensin である HD-5 および HD-6 であること、またその産生細胞は Paneth 細胞であることを初めて明らかにした。
- 3)炎症性腸疾患患者における小腸 crypt においても、正常と同様に抗菌活性物質の分泌が見られることが明らかになった。
- 4)潰瘍性大腸炎の大腸に見られる Paneth 細胞は、小腸 Paneth 細胞と同様に抗菌活性物質の分泌を行っていることを初めて明らかにし、この抗菌活性物質が HD-5 および HD-6 である可能性が示唆されている。

また、本研究に関連して

- 5)ヒト胃に見られる腸上皮化生粘膜の Paneth 細胞も小腸と同様に抗菌活性物質の分泌を行っていることを初めて明らかにし、この物質は H.Pylori 菌に対しても抗菌活性を示すこと、この物質は HD-5 および HD-6 である可能性が同様に示唆されている。

今後の展望

これらの研究結果から、炎症性腸疾患患者においても腸管における抗菌ペプチドの分泌活性は失われていないことが明らかになった。しかし、小腸の粘膜自体が広汎に障害される Crohn 病においては、抗菌ペプチドの量的不足が生じていることが予想される。また、大腸粘膜が障害される潰瘍性大腸炎においては、正常では見られない Paneth 細胞の出現と抗菌活性物質の分泌が認められることが明らかとなった。これらの結果から、炎症性腸疾患の治療として内因性抗菌 peptide 自体の投与は有望といえるが、recombinant protein を得ることが困難であるとされている。従って小腸および大腸粘膜の Paneth 細胞からの抗菌活性物質分泌を刺激する物質の投与は、抗菌物質の量的不足を考慮すると合目的的といえる。また、緩解の維持や発症のリスクの高い健康人における発症の予防として有用である可能性がある。現在研究者らはある物質がこのような活性を有し臨床応用可能であることを見いだし特許申請を予定している。

研究業績

1. Regulation of intestinal α -defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense.
2. CL Wilson, AJ Ouellette, DP Satchell, T Ayabe, YS Lopez-Boad, JL Stratman, SJ Hultgren, LM Matrisian, WC Parks. *Science* 286 113-117, 1999.
3. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. T Ayabe, DP Satchell, CL Wilson, WC Parks, ME Selsted, AJ Ouellette. *Nature Immunology* 1, 113-118, 2000.
4. The calcium-activated potassium channel, MIPCA1, is Paneth cell specific in mouse small intestinal epithelium and functions in the secretory response. T Ayabe, S Ghansai, KG Chandy, D Darmoul, AJ Ouellette. *Gastroenterology*, 118 suppl 659, 2000.
5. Mouse Paneth cell secretory response to in vitro microbial infection. T Ayabe, DP Satchell, CL Wilson, WC Parks, ME Selsted, Auellette. *Gastroenterology*, 118 suppl 3812, 2000.
6. Processing and activation of α -defensins in mouse intestinal Paneth cells. T Ayabe, DP Satchell, H Tanabe, SJ Hagen, CL Wilson, AJ Ouellette. *Gastroenterology*, 120 suppl , 986, 2001
7. PI3-kinase p85a is a target molecule of proline-rich antimicrobial peptide to suppress proliferation of ras-transformed cells. K Tanaka, Y Fujimoto, M Suzuki, Y Suzuki, T Ohtake, H Saito, Y Kohgo. *Jpn J. Cancer Res*, 92 959-967, 2001