

坂本憲穂 論文内容の要旨

主 論 文

Differential effects of alpha- and beta-defensin on cytokine production
by cultured human bronchial epithelial cells
(ヒト気道上皮細胞からのサイトカイン産生における、デフェンシンの作用)

Noriho Sakamoto, Hiroshi Mukae, Takeshi Fujii, Hiroshi Ishii, Sumako Yoshioka,
Tomoyuki Kakugawa, Kanako Sugiyama, Yohei Mizuta, Jun-ichi Kadota,
Masamitsu Nakazato, Shigeru Kohno

American Journal of Physiology
– Lung Cellular and Molecular Physiology (Article in Press)

長崎大学大学院医学研究科新興感染症病態制御学系専攻
(指導教授：河野 茂 教授)

緒 言

デフェンシンは、様々な微生物に対して抗菌作用を持つペプチドで、ヒト以外にも哺乳類や鳥類、昆虫などの生物にも存在し、自然免疫において重要な役割を果たしていると考えられている。ヒトでは α 型と、 β 型に分けられ、 α 型では主に好中球より産生されるhuman neutrophil peptide (HNP)-1~4と小腸のPaneth cellなどに存在するhuman defensin (HD)-5,6が同定され、 β 型は気道を含む上皮に発現するhuman beta defensin (HBD)-1~4が知られている。最近の報告により、これらのデフェンシンが抗菌作用以外にも樹状細胞やT細胞に対する走化性、肥満細胞からのヒスタミン遊離、細胞障害性などの様々な作用を有することが明らかとされている。我々は、デフェンシンがびまん性汎細気管支炎を始めとした肺疾患患者の気管支肺胞洗浄液(BALF)中で増加し、好中球遊走能を有するIL-8と相関することを報告した。一方、気道上皮細胞は様々な刺激により各種サイトカインを産生し肺疾患に関与することが報告されており、 α -デフェンシンのなかでは、HNP-1が気道上皮細胞からのサイトカイン産生を促すことが報告されている。また、 β -デフェンシンのなかでは、HBD-2が様々な刺激により気道上皮からの産生が亢進し、各種肺疾患のBALF中で増加することが報告されている。このような背景をもとに、我々は、今回デフェンシンが直接気道上皮細胞のサイトカイン産生に影響するかどうかを検討した。

方 法

細胞：切除肺から培養された、ヒト気道上皮細胞(HBECs)を用いた。

デフェンシン： α -デフェンシンとしてhuman neutrophil peptide-1 (HNP-1)

β -デフェンシンとしてhuman beta defensin-2 (HBD-2)を用いた。

刺激：各デフェンシンを0-50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調整し刺激を行った。

デフェンシン刺激の後、RANTES, TNF- α , GM-CSF, IL-1 β , MCP-1, IL-8, TGF- β 1, VEGFのmRNA発現をRNase protection assay (RPA)を用いて検討した。また、培養上清中のGM-CSF, IL-1 β , IL-8, TGF- β 1の蛋白レベルをELISA法により検討した。IL-1 β に関してはIL-1 β 抗体を用いて免疫染色も行った。転写因子(NF- κ B)に関しては、electrophoretic mobility shift assay (EMSA)法を、細胞障害性の検討ではalamar blue reduction assayを行った。

結 果

1. サイトカインのmRNA発現の検討では、 α -デフェンシンがIL-8, IL-1 β の発現を濃度依存性に亢進させていた。 β -デフェンシンはmRNA発現に影響を与えなかった。
2. 培養上清中サイトカインの検討では、 α -デフェンシンによるIL-8産生のみが増加した。 β -デフェンシンはサイトカイン産生に影響を与えなかった。
3. mRNAの発現量と上清中の蛋白量に乖離がみられた α -デフェンシンによるIL-1 β の産生に関しては、抗IL-1 β 抗体を用いた免疫細胞染色により気道上皮細胞における発現を確認した。
4. 転写因子の検討では、 α -デフェンシンによりNF- κ Bの活性化が見られた。
5. 細胞障害性の検討では、20 $\mu\text{g/ml}$ 以上の α -デフェンシン、50 $\mu\text{g/ml}$ の β -デフェンシンで細胞障害性が認められた。

考 察

今回の検討により、 α -デフェンシンがヒト気道上皮細胞からのIL-8産生・放出を促進させ、IL-1 β のmRNAおよび細胞内の蛋白の発現を促進させること、 α -デフェンシンがNF- κ Bの活性化を促すこと、 α , β -デフェンシンともに高濃度で細胞障害性を有することが確認された。IL-8は好中球遊走能を有し、さらに好中球からの α -デフェンシン放出を促進させることもわかっている。 α -デフェンシンがヒト気道上皮細胞からのIL-8の産生を促進させることは、炎症局所に好中球を遊走させ、遊走した好中球が更にデフェンシンを放出するという、炎症のポジティブフィードバックを引き起こし、炎症の持続、拡大につながる可能性が示唆される。IL-1 β は様々な免疫反応で重要な働きをしていることが明らかになっている。mRNAの発現が α -デフェンシンで増強されており、in vivoの環境においては α -デフェンシンに関連してIL-1 β も炎症に関与している可能性が示唆された。転写因子であるNF- κ Bに関しては、IL-8やIL-1 β の産生に関与することが知られており、今回の我々の結果は α -デフェンシンによる気道上皮細胞からのIL-8やIL-1 β の産生亢進はNF- κ Bを介している可能性を示すと考えられた。細胞障害性の検討では、 α , β -デフェンシンともに高濃度で細胞障害性を示した。このことは、デフェンシンが肺炎などの初期に抗菌作用を示す反面、それが過剰に産生された場合には逆に気道上皮細胞を障害し、肺の傷害の原因となっている可能性も示している。

今回の我々の検討により、 α , β -デフェンシンが気道上皮に対して異なった作用を有していることが明らかとなり、中でも α -デフェンシンが気道上皮からのサイトカイン産生を介して炎症の持続、拡大に関与している可能性が示された。