

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790672

研究課題名（和文）プロテオミクスにより同定されたヒト好中球ペプチドの腸管炎症への影響の検討

研究課題名（英文）【The effect of human neutrophil peptides on intestinal inflammation as determined by proteomics approaches】

研究代表者

上村 修司 (KANMURA SHUJI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60448561

研究成果の概要（和文）：Human neutrophil peptides (HNPs) 1-3は、低濃度では腸管上皮細胞株に対し細胞増殖作用を示すが、高濃度の条件では細胞障害作用を示した。また、HNPs1-3は腸管上皮細胞からのinterleukin-8 (IL-8)、vascular endothelial growth factor (VEGF)と intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の発現を亢進させた。さらにHNPs1-3を投与したDSS誘発マウス腸炎モデルは、HNPs1-3非投与群と比較し、有意に体重や腸管長が減少し、高い組織学的大腸炎活動性を示した。これらの結果からHNPs1-3が、腸管上皮細胞に作用し炎症性サイトカインの産生を促進させ、大腸炎を悪化させている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Human neutrophil peptides (HNPs) 1-3 promoted proliferation of epithelial cell lines at low peptide concentrations; however, higher peptide concentrations inhibited cellular proliferation. And, treatment with HNPs resulted in the increase expression of interleukin-1 (IL-8), vascular endothelial growth factor (VEGF) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) from epithelial cell lines. Additionally, after administration of HNPs to DSS-induced mouse IBD model, high histological colitis score, weight loss, and shortening of the large intestine were observed as compared to non-treated mice. These results suggest that HNPs increase the expression of proinflammatory cytokines in intestinal epithelial cells and exacerbates experimental colitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度			
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

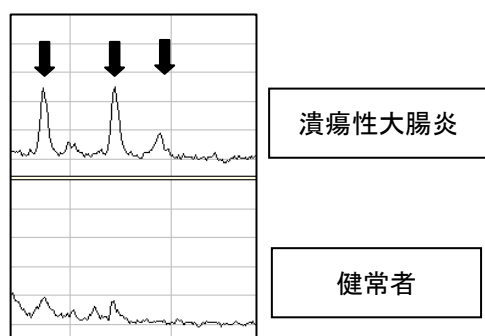
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：(1)ディフェンシン (2)炎症性腸疾患 (3)腸管免疫 (4)抗菌ペプチド  
(5)プロテオミクス (6)潰瘍性大腸炎 (7)サイトカイン (8)好中球

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト好中球ペプチド(human neutrophil peptides 1-3: HNPs1-3)は、細菌や真菌などに対し抗微生物作用を有する alpha-defensin 属の抗菌ペプチドのひとつであり、主に好中球アズール顆粒内に存在する。Alpha-defensin 属には、HNPs1-4 と小腸パネート細胞内に存在する human defensin(HD)-5,6 が同定されている。我々は網羅的プロテオーム解析により活動期の潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis : UC)において HNP1-3 が高発現することを報告した(Inflamm Bowel Dis 2009;15:909-17)。

・潰瘍性大腸炎と健常者血清中 HNPs 発現の比較(下図)



UC を含む炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease : IBD) は腸管に炎症が持続する疾患群で、病因や増悪因子に関わる分子学的機序には未だ不明な点が多いが、近年の研究により腸内細菌叢と、それに対する宿主の免疫異常が疾患の発症や病態の悪化に関与していると考えられている。

HNPs1-3 は抗微生物作用のみでなく、T 細胞や樹状細胞に対する走化性作用 (J Clin Invest 1989;84:2017-20. J Biol Chem 1996;271:2935-40) を有しており、自然免疫において重要な役割を果たしている (Toxicology 1994;87:131-49)。また、HNPs は自然免疫に関わるだけではなく、気道上皮細胞に対する増殖抑制や直接障害作用も認められている (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005;288:508-13)。そのため、HNPs1-3 が UC の発症や病態進展に関わっている可能性が考えられるが、腸管炎症と HNP1-3s の関連の報告はなく、詳細な機序や影響は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

HNPs1-3 の腸管上皮細胞に対する作用の報告は無く、その詳細は不明のままである。そこで本研究では、HNPs1-3 により腸管上皮細胞を刺激し、細胞増殖への影響や各種サイトカイン産生能を検討した。また、腸管組織に対する炎症反応や効果を検討するため、IBD モデル動物に HNP1-3 を投与し、腸炎への影響を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) HNPs1-3 の腸管上皮細胞への影響：

ヒト大腸癌細胞株として Caco-2 と HT-29 を、添加 HNPs として Hycult biotechnology 社の

natural human neutrophil defensin 1-3 を用いた。HNP<sub>s</sub>1-3 を 0~100  $\mu$ g/ml の範囲の濃度で Caco-2 と HT-29 に添加し、24 時間後に TetraColor ONE assay により細胞増殖を測定した。また、HNPs を添加した 6 時間後の細胞から RNA を抽出し、Affimetrix 社の方法に従い RNA を調整後、Human Genome Focus Array により網羅的遺伝子発現の解析を行った。DNA マイクロアレイ法で有意差のあった炎症性サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム定量 RT-PCR (QPCR) 法により検証した。さらに添加 24 時間後の培養上清も採取して、上清中の炎症性サイトカイン群の濃度を ELISA 法にて測定した。

## (2) HNP<sub>s</sub>1-3 の実験腸炎マウスモデルへの影響：

UC モデルのひとつである DSS 誘発マウス腸炎モデルを用い、in vivo での HNPs の影響を検討した。DSS を自由飲水開始後から、30  $\mu$ g の HNPs を連日腹腔内投与した。7 日目に屠殺し HNP<sub>s</sub> 非投与群と①死亡率、②組織学的大腸炎スコア、③大腸組織中のサイトカイン濃度を比較した。

## 4. 研究成果

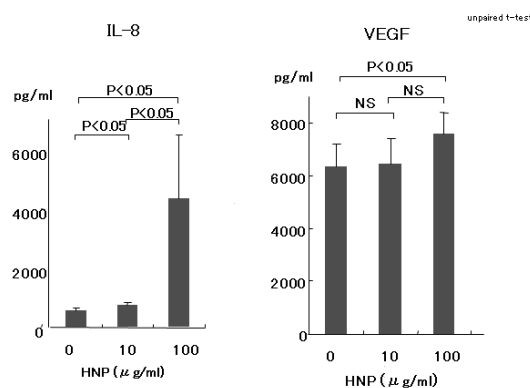
### (1) HNP<sub>s</sub>1-3 の腸管上皮細胞への影響：

HNP<sub>s</sub>1-3 は 10  $\mu$ g/ml までは Caco-2 と HT-29 の増殖を促進させたが、50  $\mu$ g/ml 以上になると細胞増殖阻害作用を呈し、かつ細胞毒性も認めた。これらの結果から過剰な HNPs は腸管上皮細胞を直接傷害している可能性

が示唆された。

Affimetrix 社の GeneChip を用いた解析では、HNPs 投与群で有意差をもって発現強度が上昇した 12 遺伝子を指摘できた。それらの遺伝子の中で、特に interleukin-8 (IL-8)、vascular endothelial growth factor (VEGF) と intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) は、HNPs 添加細胞において高発現を示すことを QPCR 法で確認できた。また、HNPs 添加後の培養上清中の IL-8 と VEGF のタンパク質濃度は、非添加群と比較し有意に上昇していた (下図)。

### HNPIはヒト上皮細胞からのIL-8とVEGF産生を誘導する



## (2) HNP<sub>s</sub>1-3 の実験腸炎マウスモデルへの影響：

DSS 誘発マウス腸炎モデルを用いた検討では、HNPs を投与した群は、非投与群と比較し体重や大腸の腸管長の減少が著しく、また腸管炎症の病理学的スコアが高値であった。

また、腸管から抽出したタンパク質を用いた検討では、投与群で IL-6 と IFN  $\gamma$  が上昇する傾向であった。

これらの結果から、HNPs は腸管上皮に対しサイトカインや接着因子の発現を促し、腸管の慢性炎症に深く関わっている可能性が示唆

された。さらに、HNPを制御できる方法が発見できれば、慢性腸炎を改善することができる可能性があり、今後も検討を続ける予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. 上村修司、宇都浩文、寄山敏男、坪内博仁. プロテオーム解析にもとづくIBDの診断 IBD research. 2010;4:288-293. (査読無)
2. Uto H, Kanmura S, Takami Y, Tsubouchi H. Clinical proteomics for liver disease: a promising approach for discovery of novel biomarkers. Proteome Sci. 2010; 31: 70. (査読有)
3. Kanmura S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Sasaki F, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver SO, Tsubouchi H. The complement component C3a fragment is a potential biomarker for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol. J Gastroenterol. 2010;45:459-67 (査読有)
4. 上村修司、宇都浩文、坪内博仁. 炎症性腸疾患の新規治療を探る 「プロテオーム解析からの治療戦略とは？」分子消化器病 2009;6:123-127 (査読無)
5. Kanmura S, Uto H, Numata M, Hashimoto S, Moriuchi A, Fujita H, Oketani M, Ido A, Kodama M, Ohi H, Tsubouchi H. Human Neutrophil Peptides 1-3 are useful biomarkers in patients with ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis. 2009;15:909-17. (査読有)

[学会発表] (計3件)

1. 指宿和成、寄山敏男、橋元慎一、上村修司、前田拓郎、有馬志穂、岩下祐司、隈元亮、佐々木文郷、山路尚久、瀬戸山仁、船川慶太、藤田浩、井戸章雄、坪内博仁 Human neutrophil peptide は腸管上皮細胞の IL-8、ICAM-1 発現を亢進させる JDDW2010、横浜市 2010年10月13~16日
2. 指宿和成、寄山敏男、上村修司、前田拓郎、有馬志穂、岩下祐司、隈元亮、佐々木文郷、橋元慎一、山路尚久、瀬戸山仁、船川慶太、藤田浩、井戸章雄、坪内博仁 Human neutrophil peptide は腸管上皮細胞の IL-8、ICAM-1 発現を亢進させる 第47回日本消化器免疫学会総会、大津市 2010年7月8日
3. 上村修司、宇都浩文、佐々木文郷、橋元慎一、瀬戸山仁、船川慶太、寄山敏男、井戸章雄、坪内博仁 腸管上皮細胞のサイトカイン発現における Human neutrophil peptides 1-3 の作用 第46回日本消化器免疫学会総会、松山市 2009年7月23日

[図書] (計1件)

- 1, Sakiyama T, Uto H, Kanmura S, Tsubouchi H. Neutrophils: Lifespan, Functions and Roles in Disease. Nova Science Publishers Inc. Published in: United States. Published: December 2010, 405 (375-386)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 修司 (KANMURA SHUJI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60448561