

論 文 要 旨

Human neutrophil peptide-1 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis

〔 *Human neutrophil peptide-1* はデキストラン硫酸塩誘導腸炎を悪化させる 〕

橋元 慎一

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

Human Neutrophil Peptide(HNP)は、炎症に伴い好中球のアズール顆粒から分泌される。また、HNP-1、-2、-3 のアミノ酸配列は相同性が極めて高く、同一の作用を有すると考えられている。我々はプロテオーム解析により HNP-1、-2、-3 が潰瘍性大腸炎(UC)患者血中に増加することを見出し、血漿 HNP-1-3 は UC の診断や治療効果予測マーカーとして有用である可能性を報告している。しかし、HNP-1-3 と UC の病態との関連はいまだ明らかでない。本研究では HNP-1 が大腸炎モデルマウスの病態に及ぼす作用およびメカニズムについて検討した。

【材料および方法】

(1)8 週齢の BALB/c マウスに 4%デキストラン硫酸塩(DSS)を 7 日間自由飲水で投与し、大腸炎を誘導した。DSS 投与 4 日目から 6 日目まで HNP-1(100 μ g/body/day)もしくは PBS を連日腹腔内投与した。DSS 投与 7 日後に体重、腸管長径、DAIスコア、病理スコア、および腸組織培養上清中のサイトカイン濃度を評価した。また、腸粘膜内のマクロファージを抗 F4/80 抗体で免疫染色し、2 群間で比較した。腸粘膜増殖は抗 Ki-67 抗体による免疫染色で評価した。

(2)8 週齢の SCID マウスに 3%DSS を 7 日間自由飲水で投与した。BALB/c マウスと同様に DSS 投与 4 日目から 6 日目まで HNP-1(100 μ g/body/day)もしくは PBS を連日腹腔内投与し、DSS 投与 7 日後に体重、腸管長径、DAI スコア、病理スコア、腸粘膜内マクロファージ、腸組織培養上清中のサイトカイン濃度、および腸粘膜増殖を評価した。

(3) ヒト大腸癌細胞株(HT-29)の培養液中に HNP-1(5-200 μ g/ml)もしくは PBS を添加し、HT-29 の細胞増殖を Tetracolor ONE、DNA 合成能を BrdU の取り込み率で評価した。また、HNP-1(100 μ g/ml)を HT-29 の培養液中に添加し、フローサイトメーターを用いて細胞死を評価した。

【結 果】

(1)BALB/c マウスに DSS を投与すると大腸炎が誘導され、体重は減少、腸管長径は短縮し、DAI スコア及び病理スコアは異常を呈したが、HNP-1 投与群では PBS 投与群と比較して、その変化が顕著であった。また、腸管培養上清中の IFN γ と TNF α 濃度は PBS 投与群と比較して HNP-1 投与群で有意に上昇し、IL-1 β 濃度も高い傾向を示した。腸粘膜内のマクロファージ数は、PBS 投与群と比較して HNP-1 投与群で有意に増加していた。一方、2 群間で腸粘膜増殖に

差はなかった。

(2)SCID マウスでは、HNP-1 投与群と PBS 投与群の 2 群間で DSS 投与後の体重、腸管長径の変化に差を認めなかったが、HNP-1 投与群は PBS 投与群と比較して DAI スコア、病理スコアは有意に異常高値を示した。また、HNP-1 投与群では腸管培養上清中の IL-1 β 濃度は有意に高値であった。さらに、HNP-1 投与群では PBS 投与群と比較して腸粘膜内のマクロファージ数が有意に増加していたが、腸粘膜増殖は 2 群間で差がなかった。

(3)大腸癌細胞株 HT-29 に HNP-1 を 24 時間添加した場合、HNP-1 濃度が 100 μ g/ml 以上では PBS 投与と比較して有意に細胞数は減少し、BrdU 取り込み率も低下した。また HNP-1 (100 μ g/ml) を添加した場合、添加 18 時間以降で有意に細胞死が増加した。

【結論及び考察】

UC 患者血中に増加する HNP が病態に及ぼすメカニズムは十分明らかになっていない。今回の検討で、HNP-1 が UC の動物モデルと考えられている DSS 腸炎マウスの粘膜障害を悪化させることを明らかにした。さらに、HNP-1 は腸炎モデルにおける腸管内の炎症性サイトカインレベルを増加させたことから、HNP-1 はサイトカインの産生亢進を介して UC 患者の病態を増悪させると考えられた。また、リンパ球の欠損した SCID マウスにおいても HNP-1 が DSS 腸炎を悪化させ、腸粘膜内のマクロファージ数を増加させ、腸管からの IL-1 β の産生を亢進させた。HNP はマクロファージやリンパ球などの走化性を亢進し、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 等の炎症性サイトカイン発現を亢進させると報告されているが、SCID マウスを用いた本研究での解析から、HNP-1 は T 細胞非依存的に炎症性サイトカイン産生亢進を介して腸炎を増悪させるメカニズムを有することを明らかにした。一方、HNP は細胞障害作用を有することが報告されており、今回の検討でも HNP-1 が大腸由来細胞の細胞死を誘導することを示した。しかし、今回の検討で明らかにした細胞障害性を誘導する培養液中の HNP-1 濃度は、UC 患者で検出される濃度と比較し著しく高濃度であること、腸炎モデルでは抗 Ki-67 抗体による免疫染色で評価した細胞増殖に HNP-1 は影響しなかったことから、DSS 腸炎においては HNP-1 の直接的な腸粘膜細胞障害作用は関係しない可能性があると考えられた。

以上のことから、HNP-1 は UC 患者においては直接的な細胞障害や細胞増殖抑制ではなく、炎症性サイトカインを増加させることで大腸炎を増悪させると考えられ、T 細胞非依存的なメカニズムも存在することが示唆された。

(Inflammatory Bowel Diseases, 2011 (in press))

論文審査の要旨

報告番号	総研第 152 号		学位申請者	橋元 慎一
審査委員	主査	上村裕一 教授	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	松山隆美 教授	副査	金蔵拓郎 教授
	副査	上野真一 准教授	副査	東美智代 講師

Human neutrophil peptide-1 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis
(Human neutrophil peptide-1 はデキストラン硫酸塩誘導腸炎を悪化させる)

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) は難治性疾患の一つで、本邦における患者数は年々増加し 10 万人を超え、その病態解明や新しい治療法の創出が急務である。学位申請者らはプロテオミクス解析により Human Neutrophil Peptide (HNP) -1、-2、-3 が UC 患者血中に増加することを見出し、血漿 HNP-1~3 は UC の診断や治療効果予測マーカーとして有用であることを報告している。

HNP は炎症に伴い好中球のアズール顆粒から分泌され、抗菌ペプチドとして作用することや、気道上皮細胞に対して細胞障害作用を有することが知られているが、HNP-1~3 と UC の病態との関連ははまだ明らかでない。本研究では HNP-1 が UC モデルマウスの病態に及ぼす作用及びそのメカニズムを解析し、HNP と UC の病態との関連を明らかにすることを目的とした。In vivo の検討では、8 週齢の BALB/c マウスに 4%、リンパ球の欠損した SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disease) マウスに 3% デキストラン硫酸塩 (DSS) を 7 日間自由飲水で投与し、大腸炎を誘導した。DSS 投与 4 日目から 6 日目まで HNP-1 (100 μ g/body/day) もしくは PBS を連日腹腔内投与した。DSS 投与 7 日後の体重、腸管長径、DAI (Disease Activity Index) スコア、病理スコア、および腸組織培養上清中のサイトカイン濃度を評価した。また、腸粘膜内のマクロファージを抗 F4/80 抗体による免疫染色、腸粘膜増殖を抗 Ki-67 抗体による免疫染色により評価した。In vitro の検討では、ヒト大腸癌細胞株 (HT-29) に HNP-1 (0-200 μ g/ml) を添加し、HNP-1 による細胞障害および細胞死を評価した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

(1) HNP-1 は BALB/c マウスにおける DSS 大腸炎の粘膜障害を増悪させた。また、HNP-1 非投与群と比較して、HNP-1 投与群では腸粘膜のマクロファージは増加し、腸培養上清中の TNF α と IFN γ は有意に高値で、IL-1 β も高い傾向であった。

(2) HNP-1 は SCID マウスにおける DSS 大腸炎の粘膜障害を増悪させた。また、SCID マウスにおいて HNP-1 投与群は非投与群と比較して腸培養上清の IL-1 β は高値となった。

(3) HNP-1 は高濃度では大腸癌細胞株 HT-29 の細胞死を誘導した。

UC の動物モデルである DSS 大腸炎マウスを用いた検討で、HNP-1 はマクロファージや炎症性サイトカインの増加を介して、DSS 大腸炎の粘膜障害を増悪させた。また、SCID マウスでも HNP-1 は DSS 大腸炎を増悪させたことから、HNP-1 は T 細胞非依存的に腸炎を悪化させ、血中 HNP-1-3 が増加する UC 患者において好中球、マクロファージなどの自然免疫系細胞の活性化が病態を悪化させる可能性が示唆された。

本研究は、潰瘍性大腸炎における粘膜障害に HNP-1 が関与することを明らかにし、そのメカニズムを解明した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 152 号		学位申請者	橋元 慎一
審査委員	主査	上村裕一 教授	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	松山隆美 教授	副査	金蔵拓郎 教授
	副査	上野真一 准教授	副査	東美智代 講師
<p>主査および副査の5名は、平成23年11月28日、学位申請者 橋元 慎一君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) HNP-1はヒトとマウスでは同じか。 (回答) HNPはヒト固有のペプチドであり、マウスには存在せず、HNPと相同する遺伝子も同定されていない。</p> <p>質問2) DSS腸炎によるマウスのHNP-1濃度は調べたか。また、マウスのHNP-1抗体は存在するか。 (回答) マウスにはHNP-1は存在しないので、マウスでは測定感度以下となる。したがって、マウスのHNP-1抗体はない。また、HNP-1と同じくデフェンシンに属するマウスのクリプチジンなどは測定していない。</p> <p>質問3) HNP-1は低い濃度では抗菌活性を有し、高い濃度では粘膜を障害するのか。 (回答) 低濃度では抗菌作用で腸内細菌からの刺激を防御するが、過剰にHNP-1が存在すると粘膜障害作用に働くと考えられる。</p> <p>質問4) SCIDマウスの腸組織培養で、培養12時間後の培養上清中TNFαを測定したか。 (回答) 今回は培養24時間後のみ検討し、培養12時間には測定していない。</p> <p>質問5) 腸粘膜Ki-67免疫染色で上皮細胞中の陽性細胞の割合は評価したか。 (回答) 評価していない。</p> <p>質問6) DSS腸炎モデルはCrohn病ではなく潰瘍性大腸炎のモデルとして考えてよいか。 (回答) 潰瘍性大腸炎のモデルの一つと考えられている。</p> <p>質問7) HNP-1は潰瘍性大腸炎の病態において、原因なのか増悪因子なのか。 (回答) HNP-1単独投与では腸炎を誘導しないことから、HNP-1は増悪因子と考えている。</p> <p>質問8) SCIDマウスでマクロファージが変化しているが、HNP-1の作用はマクロファージ特異的なのか。 (回答) マクロファージだけではなく好中球やリンパ球にも作用することが報告されている。</p> <p>質問9) TNFαがSCIDマウスの腸組織培養上清で上昇しなかった理由は何か。 (回答) TNFαが分泌されるためにはT cellの存在、もしくはT cellからの刺激が必要で、SCIDマウスではそれが欠如しているためと考えられる。</p> <p>質問10) 細胞障害の評価に大腸癌細胞を使用した理由はなぜか。 (回答) 正常細胞のcell lineが存在しなかったため、大腸癌細胞のcell lineを使用した。</p> <p>質問11) 白血球除去療法で白血球を吸着するメカニズムはどのようなものか。 (回答) 補体のC3がピーズに吸着され、活性化好中球に発現した接着因子Mac-1がC3に結合することで活性化した好中球が除去されることが報告されている。</p> <p>質問12) SCIDマウスではMPO(Myeloperoxidase)活性が上昇していないので好中球は関与しないのか。 (回答) HNP投与群におけるMPO活性は、有意差はないものの高値であり、好中球の関与はあると考えている。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問 1 3) 潰瘍性大腸炎の病態と HNP との関連をどのように考えるか。

(回答) 病態の原因は十分明らかではないが、免疫異常が潰瘍性大腸炎の発症に関連し、腸内細菌に対する好中球や HNP が過剰に反応した場合には、高濃度の HNP などが潰瘍性大腸炎の粘膜障害の増悪因子となっていると考えられる。

質問 1 4) 腸炎が強いほうが腸粘膜細胞増殖は強いと予想されるが、HNP-1 投与の有無で差がない理由はなぜか。

(回答) 腸炎が強く誘導された腸粘膜では粘膜剥離も強く、剥離した腸粘膜内の細胞増殖を十分評価できなかったことで、有意差が出なかった可能性がある。また、HNP-1 が腸粘膜細胞の増殖を一部抑制した可能性も否定できないが、十分な検討はできていない。

質問 1 5) HNP-1 を吸着させる治療は可能か。

(回答) 抗体を用いた治療法が考えられるが、既に臨床応用されている白血球除去療法を用いて好中球や HNP を除去する方が現実的と考える。

質問 1 6) 実験腸炎の病理スコアリングは潰瘍性大腸炎の病理分類である Matts 分類とは異なるのか。

(回答) 潰瘍性大腸炎の Matts 分類とは異なり、実験腸炎の病理スコアは陰窩消失の程度を評価している。

質問 1 7) DSS 腸炎と潰瘍性大腸炎の病理学的相違点はなにか。

(回答) DSS 腸炎の病理所見は潰瘍性大腸炎と類似しているが、潰瘍性大腸炎では粘膜層にびらん潰瘍を認め、偽ポリポーシスの所見を呈するのに対し、DSS 腸炎では粘膜層のびらんが主体である点などが異なる。

質問 1 8) DSS 腸炎で HNP-1 投与群では陰窩膿瘍が多かったか。

(回答) DSS 腸炎では陰窩膿瘍は認めなかった。

質問 1 9) 病理標本で腸粘膜に好中球の浸潤は認められたか。

(回答) HE 標本での検討では、好中球の浸潤を認めたが、HNP 投与の有無で好中球浸潤には明らかな差は無かった。

質問 2 0) 以前の報告では潰瘍性大腸炎患者と HNP-1~3 の報告であったが、今回、HNP-1 に着目した理由はなぜか。

(回答) HNP1-3 の構造はほぼ同一である点、大腸癌に対する細胞増殖の検討で HNP-1、-2、-3 の比較で細胞障害に差がなかったことから機能的には同一であると判断し、HNP-1 のみを用いて検討した。

質問 2 1) BALB/c マウスで 4%DSS、SCID マウスで 3%DSS にした理由はなぜか。

(回答) マウスの系統で DSS の感受性が異なるため、まず SCID マウスに対し 3~5% の DSS を投与し、腸炎の程度を評価した。SCID マウスに DSS を 4% 投与すると腸炎が強くなったため、DSS 濃度を 3% にして検討した。

質問 2 2) 各個体に対する DSS の投与量は測定したか。

(回答) マウスのケージ毎に DSS が入った水を設置したため、各個体の DSS 摂取量は測定していない。

質問 2 3) 白血球除去療法が海外で普及しない理由はなぜか。

(回答) 日本で開発された治療法であり、海外では有用性が十分明らかにされていないことと、コストがかかる点が主な理由と考えられる。

質問 2 4) DSS 濃度 4% が潰瘍性大腸炎の病態を反映するのに良い投与量なのか。

(回答) 今までの報告では、DSS 濃度 4% が急性腸炎モデルとして最もよく用いられている。

質問 2 5) 今回の論文の結論から潰瘍性大腸炎に対する将来的な治療への展開はどんなことが考えられるか。

(回答) 今回の検討では、潰瘍性大腸炎と HNP-1 との関連を明らかにしたが、HNP-1 の制御を潰瘍性大腸炎の治療にどのように応用するかは今後の課題と考える。

質問 2 6) 臨床で潰瘍性大腸炎、Crohn 病、ベーチェット病の鑑別は容易か。

(回答) 鑑別困難例も存在するが、大部分は腸炎の連続性と局在、潰瘍の形態で鑑別可能である。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。