

氏 名 (本籍)	わた 渡 なべ 辺 かず 和 ひろ 宏
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2 3 7 0 号
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	Resistin-like molecule beta (RELM β), a colonic epithelial secretory protein, exhibits antimicrobial activity (大腸上皮分泌タンパクである Resistin-like molecule beta (RELM β) は抗菌作用を有する)

(主 査)

論文審査委員	教授 佐々木 巖	教授 笹野 公伸
	特命教授 佐藤 成	

論文内容要旨

背景目的

自然免疫物質である抗菌ペプチド（抗菌タンパク）は、従来、昆虫などの下等生物において感染防御の中心的役割を果たしていることが分かっていたが、近年、獲得免疫系を有する哺乳類にも抗菌ペプチドが存在することが明らかとなった。しかしながら、生体内で最も細菌の多い部位である大腸上皮を主な局在とする抗菌ペプチドはいままで発見されていなかった。Resistin-like molecule beta (RELM β) は2001年に Steppan らが新規に同定した大腸上皮分泌タンパクである。小川・福島らは、無菌マウスに通常のマウスの糞便を経口投与することによって（すなわち、無菌状態の大腸上皮が腸内細菌に曝露されることで）、大腸上皮における RELM β の発現が著しく上昇することを示した。また、北山・福島らは、潰瘍性大腸炎患者の大腸上皮における RELM β の発現が、Crohn 病患者の大腸上皮や大腸癌患者の健常な大腸上皮における発現と比べて有意に低下することを示した。RELM β の機能は未知であったが、これらの特徴のある発現パターンから、RELM β が大腸上皮において何らかの生体防御作用を有していると私は予測した。さらに、データベース検索にて、RELM β のアミノ酸構造が、既知の抗菌ペプチド（抗菌タンパク）と共通性があることを見だし、RELM β の機能として生体防御機能の中でもとくに抗菌作用を予測した。本研究の目的は、ヒト RELM β が腸内細菌に対して抗菌作用を有するという仮説の検証、ヒト便中の RELM β の存在様式の検討、および RELM β の発現誘導因子の検討である。

方法

(1) 抗菌活性試験: 17 株の代表的な腸内常在菌・病原菌を対象に、寒天培地法にて抗菌活性の有無をスクリーニングした。抗菌活性を示す濃度を詳細に確認するために、液体培地法にて *S. aureus* (JCM 2413), *E. coli* (JCM 5491), 臨床検体から分離した 5 株の MRSA を対象に検討した。

(2) 形態学的検討: RELM β を含む液体培地と *S. aureus* または *E. coli* 共培養した後、これらの細菌に対して抗 RELM β 抗体を用いた蛍光免疫光顕をおこない、RELM β の細菌に対する binding reactivity を検討した。また、免疫電顕をおこない、RELM β が及ぼす細菌の形態学的変化を検討した。

(3) ヒト便中の RELM β の濃度・構造の検討: 5 名の健常人の便を対象に、抗 RELM β 抗体を用いた Western blot を行った。濃度の分かっている Recombinant RELM β をコントロールとし、スタンダード直線を作り、ヒト便中の RELM β の濃度を半定量した。また、RELM β タンパクはシステインを多く含んでおり、ジスルフィド結合による多量体の形成が予測されたため、

非還元条件と還元条件で Western blot を行い、構造の違いを検討した。

(4) RELM β 発現の検討:大腸上皮細胞株 LS174T に対して、細菌(熱非活性化した *S. aureus* または *E. coli*)、または、細菌構成成分(ペプチドグリカン、リポポリサッカライド、ムラミルジペプチド)を投与し、Western blot または定量 RT-PCR 法にて、経時的な RELM β の発現量の変化を検討した。

結 果

(1) MRSA を含む *S. aureus* に対してのみ RELM β は濃度依存性、pH 依存性に抗菌活性を示した。(2) 免疫光顕では、*S. aureus* のみで、RELM β の細菌への binding reactivity を認めた。免疫電顕では、*S. aureus* の表面に本タンパクが多数付着し、中心体の出現などの細胞破壊の像が認められた。(3) ヒト便中で RELM β は豊富に存在しており、*in vitro* で抗菌活性を示す濃度に匹敵した。RELM β の濃度は個人差があり、抗菌作用を示し始める濃度から、ほぼ完全に *S. aureus* を死滅させる濃度までの幅があった。非還元状態では RELM β は 3 量体、6 量体に相当する部位 (27 kDa, 54 kDa) に 2 本の band を認め、還元状態では 1 量体 (9 kDa) に相当する部位のみに band を認めた。(4) LS174T 細胞株では、熱非活性化した *S. aureus*、ペプチドグリカン、リポポリサッカライドの刺激で、RELM β の発現の増加を認めた。熱非活性化した *E. coli* では、Western blot でのみ、ごくわずかな発現の増加が確認できた。

まとめ・考察

(1) 結腸上皮からの分泌を主とする抗菌タンパクを初めて同定した。(2) MRSA に対しても強力な抗菌作用を有しており、今後、感染症に対する新規薬剤としての臨床応用が期待できる。(3) 免疫電顕では、接着による細胞膜透過性の変化が推察され、既存の抗生物質とは異なる作用機序を有すると考えられた。(4) RELM β の発現は、特定の細菌あるいは細菌構成成分の刺激によって上昇を認めた。ヒト便中での RELM β の濃度に個人差があることを考えると、本知見は、たとえば、腸内で *S. aureus* が過剰に増えたときに、RELM β の発現が上昇することで *S. aureus* の増殖を抑えるというようなシステム、すなわち、宿主側が RELM β の産生を直接制御することで腸内細菌の恒常性を保持する、というフィードバックシステムの存在を推察させる。従来、腸内細菌叢に影響を及ぼす因子として、プロバイオティクス、プレバイオティクス、抗生物質といった外界の因子が知られていたが、RELM β などの抗菌タンパク(抗菌ペプチド)は、生体自身が産生する腸内細菌叢の調節因子であるという仮説が想起された。

審査結果の要旨

近年、自然免疫物質である抗菌ペプチド（抗菌タンパク）は、昆虫などの下等生物のみならず、獲得免疫系を有する哺乳類にも存在することがわかってきた。しかしながら、生体内で最も細菌の多い部位である大腸上皮を主な局在とする抗菌ペプチドはいままで明らかではなかった。この研究は、Resistin-like molecule beta (RELM β) というヒト大腸上皮に特徴的に発現するタンパクに、strain-selective な抗菌作用があることを初めて示したものである。さらに、RELM β の発現誘導に細菌成分が関与していることを示し、抗菌タンパク RELM β が、腸内細菌叢の維持に関わっている可能性を考察している。抗菌活性の検討では、RELM β が濃度依存性、pH 依存性に *Staphylococcus aureus* および、methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) に対して抗菌作用を示すことを明らかにしている。耐性菌である MRSA に対して抗菌活性を有するという知見は、感染症に対する新規薬剤としての臨床応用を強く期待させるものである。この研究ではさらに、免疫光顕、免疫電顕を用いて、RELM β が *S. aureus* に及ぼす形態学的変化が考察されており、抗菌活性機序の解明に向けて大きな手がかりとなる知見となっている。また、実際に、ヒト便中の RELM β の量を半定量することによって、ヒト便中で RELM β は *in vitro* で抗菌活性を示す濃度に匹敵するほど豊富に存在していることや、RELM β の濃度に個人差があることが示された。さらに、この研究では、RELM β の発現誘導因子についても詳細な検討がなされており、大腸上皮細胞株である LS174T 細胞株において、熱非活性化した *S. aureus*、ペプチドグリカン、リポポリサッカライドの刺激で、RELM β mRNA およびタンパクの発現が増加することを示した。考察においては、RELM β が腸内細菌叢の維持の役割を担っているという可能性を示している。従来、腸内細菌叢に影響を及ぼす因子として、プロバイオティクス、プレバイオティクス、抗生物質といった外界の因子が知られていたが、生体自身が産生する RELM β などの抗菌タンパク（抗菌ペプチド）が腸内細菌叢の調節因子であるという仮説は、研究結果に基づいたものであり合理的、かつ、独創的である。また、近年の知見で、RELM β が潰瘍性大腸炎患者で発現が低下すること、また、潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢が、健常人と比べて異なるパターンを示すことから、RELM β と潰瘍性大腸炎の病態について考察されている。この研究は、新規抗菌タンパクの同定にとどまらず、抗菌スペクトラム、発現誘導様式、形態学的特徴などが詳細に検討されており、今後、腸内細菌叢の維持システム、潰瘍性大腸炎の病態との関係、新規薬剤への応用など、多分野への応用・発展の基礎となりうる内容であり、審査の結果、十分に学位に値すると判断する。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。