



Title	腸管モデル細胞における α -defensin5分泌と排出系トランスポーター発現との関連性に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	保田, 元気
Citation	北海道大学. 博士(臨床薬学) 甲第14412号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/81673
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Genki_Yasuda_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（臨床薬学） 氏名 保田 元気

学位論文題名

腸管モデル細胞における α -defensin 5 分泌と
排出系トランスポーター発現との関連性に関する研究

小腸陰窩底部のパネート細胞を介して分泌される抗菌ペプチド、 α -defensin 5 は病原微生物の排除と腸内細菌叢の共生に深く関与する。また、腸管モデル細胞である Caco-2 細胞における α -defensin 5 曝露は炎症性サイトカインである Interleukin-8 (IL-8) の分泌を増加させることから、生体内の防御機構として重要な役割を果たしていることが考えられる。

その一方で、経口抗がん薬は Caco-2 細胞における α -defensin 5 発現に影響を及ぼすことから副作用や病態との関連が示唆されているが、これらの報告は α -defensin 5 発現のみの評価であり、 α -defensin 5 分泌に関しては検討されていない。一方で、小腸上皮細胞に発現する排出系トランスポーターの一つである P-glycoprotein (P-gp) は薬物等の異物の排出に関与する。この排出系トランスポーターの異物排除の働きは、腸管の免疫機能と協調して働くことが推察されるが、排出系トランスポーターと腸管免疫機能との関連性についての報告は少ないのが現状である。

以上の背景から Caco-2 細胞において α -defensin 5 の分泌を測定することができれば、 α -defensin 5 の分泌が炎症性腸疾患等の病態に及ぼす影響や腸管免疫機能と排出系トランスポーターとの関連性を検討することが可能となる。そこで本研究では腸管免疫機能の評価する指標として腸管粘膜を防御する α -defensin 5 と主要な排出系トランスポーターである P-gp の発現量および輸送機能との関連性について明らかにすることを目的とした。

初めに、Caco-2 細胞が α -defensin 5 を分泌するか否かを明らかにするため、培養条件の検討を行った。セルバンクの異なる Caco-2 細胞においてグルコース輸送担体の輸送活性が異なることから、各セルバンクの Caco-2 細胞間で様々な遺伝子発現量が異なることが推察される。そこで American Type Culture Collection (ATCC)、Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)、RIKEN の 3 種の Caco-2 細胞を用いることとした。また、ヒト小腸刷子縁膜において Alkaline phosphatase (ALP) が発現しており、Caco-2 細胞の培養日数の経過に伴い、ALP 活性の増加が報告されている。そこでまず培養日数の経過が ALP 活性に及ぼす影響を検討した結果、いずれの Caco-2 細胞においても細胞播種から培養日数の経過に伴い ALP 活性は上昇した。また 14 日以降に横ばいとなり、細胞分化を生じることが明らかとなった。

次に、培養日数の経過が α -defensin 5 分泌に及ぼす影響を検討した結果、DSMZ および RIKEN の Caco-2 細胞においては細胞播種から 14 日後に横ばい傾向となったが、ATCC の

Caco-2 細胞における α -defensin 5 分泌量は培養日数の経過に伴い直線的に増加した。以上の結果より、いずれのセルバンクの Caco-2 細胞において α -defensin 5 が分泌されることが明らかとなった。また、ATCC の Caco-2 細胞における α -defensin 5 分泌量に直線性が見られたことから、以降の検討には ATCC の Caco-2 細胞を用いることとした。

前述のとおり、 α -defensin 5 は IL-8 発現量に影響を及ぼすことから、培養日数の経過に伴う α -defensin 5 分泌変動と IL-8 および Tumor necrosis factor (TNF) - α mRNA 量との関連に着目した。その結果、IL-8 および TNF- α mRNA 量は培養日数の経過に伴い上昇し、 α -defensin 5 分泌と同様の傾向を示した。したがって、これらサイトカイン発現変動と α -defensin 5 分泌が関連している可能性が示された。そこでさらにサイトカイン発現変動に α -defensin 5 が関与するかを検証した。ヒト回腸内における α -defensin 5 濃度は 6~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることから、18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように調整し、 α -defensin 5 の処理後 24 時間後におけるサイトカインの mRNA 量を測定した。その結果、 α -defensin 5 曝露は IL-8 および TNF- α mRNA 量を上昇させた。これらの結果より、Caco-2 細胞において α -defensin 5 はサイトカイン発現量に関連することが示唆された。

次に、Caco-2 細胞における α -defensin 5 分泌が腸管免疫機能との関連が示唆される P-gp の発現量・輸送能に及ぼす影響を明らかにすべく、Caco-2 細胞の培養日数が P-gp 発現量に及ぼす影響を検討した。その結果、細胞播種から 21 日以降において *mdr1* mRNA 量および P-gp タンパク質発現量は上昇した。これまでに、 α -defensin 5 分泌が培養日数の経過に伴い上昇することが示されている。そこで α -defensin 5 の P-gp 発現変動への関与を明らかにするため、18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -defensin 5 処理後 24 時間後における P-gp 発現量を測定した結果、 α -defensin 5 曝露は *mdr1* mRNA 量および P-gp タンパク質発現量を上昇させた。P-gp 発現はサイトカイン発現に影響を受けることから、 α -defensin 5 曝露時における P-gp 発現変動にサイトカイン発現が関与する可能性がある。

最後に、 α -defensin 5 曝露時における P-gp の機能変動を明らかにすべく、P-gp の基質として Rhodamine 123 を用いて細胞内蓄積量を測定した。その結果、 α -defensin 5 曝露は Caco-2 細胞内の Rhodamine123 蓄積量を有意に低下させたことから、P-gp の機能亢進が示唆された。以上の結果から、 α -defensin 5 曝露時における P-gp の機能亢進は P-gp 発現増大によるものであること、 α -defensin 5 は P-gp の発現および機能と協調して異物排除の働きをする可能性が示された。