



Title	炎症性腸疾患患者におけるPaneth細胞形態異常とDysbiosisの関連
Author(s)	長島, 一哲
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13458号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13458
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/91645">http://hdl.handle.net/2115/91645</a>
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2472
File Information	Kazunori_Nagashima.pdf



[Instructions for use](#)

# 学位論文

炎症性腸疾患患者における

Paneth 細胞形態異常と Dysbiosis の関連

(Relationship between Morphological Alteration of Paneth Cells and

Dysbiosis in Patients with Inflammatory Bowel Disease)

2019 年 3 月

北海道大学

長島一哲



# 学位論文

炎症性腸疾患患者における

Paneth 細胞形態異常と Dysbiosis の関連

(Relationship between Morphological Alteration of Paneth Cells and  
Dysbiosis in Patients with Inflammatory Bowel Disease)

2019 年 3 月

北海道大学

長島 一哲



## 目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	9 頁
結果	17 頁
考察	32 頁
結論	35 頁
謝辞	36 頁
利益相反	37 頁
引用文献	38 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Kazunori Nagashima, Kiminori Nakamura, Takehiko Katsurada, Yuu Shimizu, Yuki Yokoi, Shinsuke Otagiri, Kana Yamanashi, Kenji Kinoshita, Reizo Onishi, Naoya Sakamoto, Tokiyoshi Ayabe

The relation between a morphological alteration of Paneth cell and Dysbiosis in Inflammatory Bowel Disease patients

Journal of Crohn's and Colitis (under review)

申請者は以下の学会発表を行った。

Kazunori Nagashima, Takehiko Katsurada, Kenji Kinoshita, Tetsuhito Muranaka, Hiroo Hata, Satoshi Takeuchi, Rio Homma, Tomoko Mitsuhashi, Yoshito Komatsu, Naoya Sakamoto

Two case report of colitis with immune checkpoint inhibitor

ESMO Asia, 2017/11/17~11/19, Singapore

## 要 旨

【背景と目的】炎症性腸疾患 (IBD)は、腹痛、下痢、下血を主症状として、比較的若年者に生じる慢性炎症性疾患である。クローン病 (Crohn's disease; CD) , 潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis; UC) に大別され、CD は口腔から肛門まで全消化管に全層性炎症を生じ、UC では大腸粘膜に炎症を生じる。世界全体で症例数は増加傾向であり、以前は稀であったアジアでも近年患者数は急速に増加している。本邦の厚生労働省難治性疾患克服事業の特定疾患に指定され、その登録者数は増加しており、CD で 4 万人、UC で 17 万人を越え、UC については米国に次いで世界第 2 位となった。IBD の病態は未だ原因不明であり、治療に難渋することも多い。IBD の確定的な病因・病態はいまだ明らかとなっていないが、遺伝的素因を背景として腸内環境、すなわち腸内細菌叢と腸管免疫が関連すると考えられており、腸内細菌叢では占有率や多様性が変化する dysbiosis が、腸管免疫では Paneth 細胞が深く関わっていることが知られている。Paneth 細胞は小腸陰窩基底部に存在し、感染刺激に反応して抗菌ペプチドなどを放出する腸管自然免疫のキープレーヤーである。また、Paneth 細胞では多くの CD 感受性遺伝子が発現し、その遺伝子変異と Paneth 細胞の顆粒形態との関係が報告された。CD 患者組織中では、顆粒形態異常を伴う Paneth 細胞異型が存在すること、殺菌活性の大部分を占める抗菌ペプチド、 $\alpha$ -defensin をコードする mRNA 発現が低下していること、Paneth 細胞異型の割合が再手術率と相関することなどが報告されており、CD における Paneth 細胞の重要性が示唆されている。しかし、Paneth 細胞の異常は腸管炎症の波及による二次的変化であるという報告も認められ、その評価は未だ定まっていない。一方、UC 患者と Paneth 細胞との関連については既報が少なく、詳細は未だ不明である。本研究の目的は、生検検体を用いた Paneth 細胞の顆粒径の測定が、病理学的評価として利用可能かを検証するとともに、同時に同一患者から採取した便検体で腸内細菌 16S rRNA 解析を行うことによって、炎症性腸疾患における Paneth 細胞と腸内細菌叢の関係を明らかにすることである。

【対象と方法】北海道大学病院で診療中の CD 患者、UC 患者 20 例ずつを対象とし、内視鏡生検検体、便検体を採取した。また、Control 群として、ボランティア 20 名より便検体を採取すると共に、非 IBD20 名の内視鏡生検検体を用いた。内視鏡生検検体は HE 染色および HD5 (Human defensin 5)免疫染色を用いて、顆粒に注目して Paneth 細胞の形態について病理学的評価を行い、便検体は腸内細菌 16S rRNA 解析を行った。

【結果】HE 染色では CD 群は、Control 群および UC 群に比べて Paneth 細胞の顆粒径が有意に短縮し、さらに、Paneth 細胞の異型細胞割合が有意に多かった。HD5 免疫染色では Paneth 細胞顆粒特異的に染色され、Paneth 細胞中の顆粒が占める割合は CD 群で有意に低下しており、HE 染色での評価と相関が認められた。

CD 群の腸内細菌叢は Control 群に比べ  $\alpha$  多様性が有意に低下し、また  $\beta$  多様性で類似度が低い dysbiosis を認めた。また、Firmicutes, Clostridiales, Ruminococcae, *Faecalibacterium* が有意に減少し、Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriaceae, *Bacteroides* が増加していた。一方、UC 群では Control 群に比べて  $\beta$  多様性で類似性が低下していた。また、Clostridiales, Lachnospiraceae, *Faecaribacterium*, *Coprococcus* が有意に減少し、Bacilli, Lactobacillales が有意に増加していた。CD 群では、Paneth 細胞の顆粒径と Clostridiales の占有率に有意な正の相関を認めた。UC では Paneth 細胞の形態と腸内細菌叢に相関を認めなかった。

【考察】「評価可能な Paneth 細胞」の基準を設けて、HE 染色した生検検体で顆粒径の測定を行うことによって、Paneth 細胞の顆粒径が CD 群で有意に小さいという形態変化を見出した。また、CD 群では、Paneth 細胞の異型割合が高いという既報と同様の結果が得られた。UC では、病理学的評価において Control 群と有意差を認めなかった。HD5 免疫染色では、Paneth 細胞中の顆粒が占める面積割合において、CD 群では有意に小さくなっており、HE 染色のものと相関が得られた。本研究で、CD 群、UC 群では、Control 群と比較して細菌の多様性と占有率が変化する dysbiosis が生じていた。CD 群では  $\alpha$  多様性が低下し、また、Firmicutes, Clostridiales, Ruminococcaceae, *Faecalibacterium* の占有率が低下、Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriaceae, *Bacteroides* の占有率が上昇しており、少数の日本人の解析において既報と同様の結果が得られたことは有意な所見である。UC 群で占有率が低下していた Lachnospiraceae, *Faecaribacterium*, *Coprococcus*, 上昇していた Bacilli, Lactobacillales は UC において既報と同様の結果が得られた。本研究で示した UC での Clostridiales の占有率についてはこれまで報告はなかった。CD, UC ともに低下していた Clostridiales は regulatory T-cell (Treg) の誘導に重要であることが知られており、IBD の病態に影響を与えている可能性が考えられた。さらに、占有率が減少していた Ruminococcaceae, および、*Faecaribacterium* は *Clostridium* cluster IV に所属し、酪酸を産生し、*Coprococcus* は *Clostridium* cluster XIVa に所属しており、上記同様 Treg を誘導することが報告されている。IBD では、このような腸管炎症の改善に寄与する細菌が減少していることが強く示唆された。本研究で、CD 群において Paneth 細胞の顆粒径と dysbiosis との間に相関関係を初めて示したことは、CD において Paneth 細胞と腸内細菌叢が強く関連していることを示唆している。本研究では、CD 群で生検検体中の Paneth 細胞顆粒径が短縮すると Clostridiales の占有率が低下し、また、Shannon index, Simpson index が低下するという相関傾向を示し、Paneth 細胞の形態異常と dysbiosis の関係が初めて明らかとなった。Paneth 細胞は顆粒中に  $\alpha$ -defensin を有し腸内細菌叢と密接な関係が知られている。また、CD 感受性遺伝子である *XBPI* や *ATG16L1* の変異が Paneth 細胞の形態異常を生じることが報告されて

いる。さらに、IBD 以外の疾患、肥満、虚血再還流モデル、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease) などにおいて、Paneth 細胞の異常が腸内細菌叢の破綻、つまり dysbiosis を生じることがコンセンサスとなってきた。本研究で認められた Paneth 細胞の形態異常が抗菌ペプチド合成不全を引き起こし、その結果として腸内細菌叢の多様性低下および Treg 誘導性細菌群減少という dysbiosis が生じたのではないかと推測している。このメカニズムを究明するためには、さらなる解析が必要である。一方、UC 群では、dysbiosis を認めたが、Paneth 細胞の形態に相関関係を認めなかった。このことは、UC では Paneth 細胞の形態異常以外に dysbiosis に寄与する主要因があり、dysbiosis の原因が CD と異なる可能性が考えられた。

**【結論】** 本研究では、CD 群、UC 群ともに dysbiosis を認めたが、CD 群でのみ Paneth 細胞の顆粒形態異常を認め、その異常は dysbiosis と相関していた。このことにより、CD において Paneth 細胞が病態に強く関与していることが確認された。今後、さらに症例を集積して病型、疾患活動性、治療効果などと比較検討することで、Paneth 細胞の形態評価による CD の簡便な経時的病勢把握を行える可能性がある。また、IBD には CD か UC か診断困難な症例もあるが、Paneth 細胞の形態評価を行うことで、診断の一助となり、IBD 診療への貢献が期待できる。

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

5-ASA	: 5-aminosalicylic acid
6-MP	: 6-mercaptopurine
ANOVA	: analysis of variance
ATG16L1	: autophagy-related 16-like 1
AZA	: azathioprine
CAI	: clinical activity index
CD	: Crohn's disease
CDAI	: Crohn's disease activity index
DAB	: diamino benzidine
DNA	: deoxyribonucleic acid
HD5	: human defensin 5
HE	: hematoxylin and eosin
IBD	: inflammatory bowel disease
LefSe	: linear discriminant analysis effect size
NOD2	: nucleotide-binding and oligomerization domain 2
OUT	: operational taxonomic units
PBS	: phosphate-buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
PE	: phycoerythrin
rRNA	: ribosomal ribonucleic acid
TNF	: tumor necrosis factor
Treg	: regulatory T cell
UC	: Ulcerative colitis
XBP	: X-box binding protein

## 緒 言

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease; IBD)には、主にクローン病 (Crohn's disease; CD) , 潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis; UC) に大別される。

CDは下痢や腹痛、発熱を主症状として、20歳代から40歳代の若年者に好発する慢性炎症性腸疾患である。病変は、主に小腸や大腸を中心に全消化管に非連続性病変を生じ、縦走潰瘍や、敷石像など特徴的な潰瘍病変、腸管狭窄、瘻孔を呈する (Torres et al., 2017)。未だ原因不明な疾患であるため治療に難渋することが多く、本邦の厚生労働省難治性疾患克服研究事業の特定疾患に指定されている。その患者登録数は現在4万人を超えている (Ueno et al., 2017)。また、以前はアジアでは稀な疾患であったが、欧米のみでなくアジアでも近年患者数は急速に増加している (Prideaux et al., 2012)。

UCは下痢、粘血便を主症状とし、30歳代から40歳代に好発する慢性炎症性腸疾患である。一般的に直腸から発症し、連続して全大腸に進展する粘膜障害を認め、病勢の進行によって消化管出血や潰瘍病変を認めるようになる (Ungaro et al., 2017)。CDと同様に、各種治療法が開発されているものの、未だ原因不明な疾患であるため治療に難渋することが多い。本邦の厚生労働省難治性疾患克服研究事業の特定疾患に指定され、その患者登録数は約17万人を超えており (Ueno et al., 2017)、米国について世界第2位となるまで増加している (図1)。

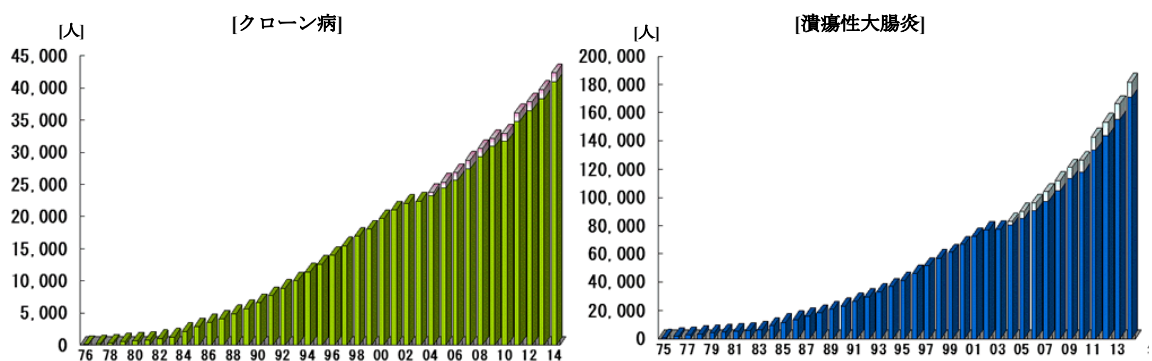


図1: 本邦におけるCD患者、UC患者の医療受給者証交付件数の推移

CD、UCの特定疾患登録者証所持者数は増加傾向となっている (公益財団法人難病医学研究財団難病情報センターホームページ)。

IBDの確定的な病因・病態はいまだ明らかとなっていないが、遺伝的素因を背景として腸内環境、すなわち腸内細菌叢と腸管自然免疫が関連すると考えられている (Shouval and Rufo, 2017; Wehkamp and Stange, 2010) (図2)。

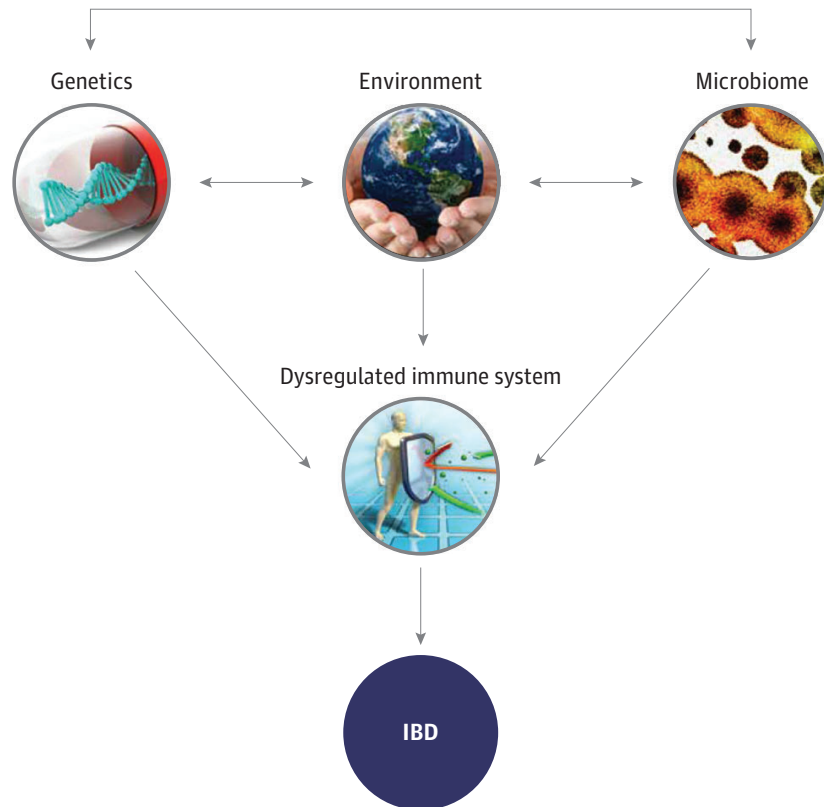


図 2: IBD の発症因子

炎症性腸疾患は遺伝子，環境因子，腸内細菌叢，免疫因子など多因子が発症に関わると考えられている (Shouval and Rufo, 2017).

IBD の発症には特定の菌種が関与しているという報告もあるが(Chiodini et al., 1984; Darfeuille-Michaud et al., 1998; Matsuda et al., 2000; Ohkusa et al., 2002; Roediger et al., 1993; Strauss et al., 2011; Swidsinski et al., 2002)，腸内細菌の占有率や多様性が変化する dysbiosis が大きく関与すると考えられている(Manichanh et al., 2012; Sartor and Mazmanian, 2012)。腸管免疫には，腸上皮細胞間タイトジャンクションによる物理的防御機構，自然リンパ球による腸上皮細胞の活性機構，腸上皮細胞の抗菌ペプチドによる殺菌，粘液による防御機構などに代表される自然免疫がある(Brown et al., 2013)。その中で，腸上皮細胞の一系統である Paneth 細胞が腸内細菌叢に深く関わっていることが知られている(Nakamura et al., 2016)。Paneth 細胞は小腸陰窩基底部に存在する粘膜上皮細胞であり， $\alpha$ -defensin やリゾチームなど抗菌物質を多く含むエオジン好性の顆粒を有し，感染刺激に反応して抗菌ペプチドなどを放出する腸管自然免疫のキープレイヤーである(Ayabe et al., 2000; Ouellette, 2010)。なかでも  $\alpha$ -defensin は小腸内腔に分泌され，腸内細菌叢の組成を制御していることが知られている(Hayase et al., 2017)。また，Paneth 細胞では細菌抗原認識に関わる *NOD2*，オートファジーに関わる *ATG16L1*，粗面小胞体ストレス応答に関わる *XBPI* などの CD 感受性遺伝子が発現



し、その遺伝子変異と Paneth 細胞の顆粒形態との関係が報告された (Cadwell et al., 2008; Hugot et al., 2001; Kaser et al., 2008; Ogura et al., 2001). CD 患者組織中では、顆粒形態異常を伴う Paneth 細胞が存在し、 $\alpha$ -defensin をコードする mRNA 発現が低下していること (Wehkamp et al., 2005), Paneth 細胞異型の割合が再手術率と相関することなどが報告されており (Liu et al., 2017; VanDussen et al., 2014), CD における Paneth 細胞の重要性が示唆されている (Liu et al., 2016). しかし、Paneth 細胞の異常は腸管炎症の波及による二次的変化であるという報告も認められ (Simmonds et al., 2014), その評価は未だ定まっていない. 一方、UC 患者と Paneth 細胞との関連については、結腸手術検体で異所性 Paneth 細胞が出現することが報告されているが (Zilbauer et al., 2011), 詳細は未だ不明である.

本研究の目的は、生検検体を用いた Paneth 細胞の顆粒径の測定が病理学的評価として臨床的に利用可能かを検証するとともに、同時に同一患者から採取した便検体で腸内細菌 16S rRNA 解析を行うことによって、炎症性腸疾患における Paneth 細胞と腸内細菌叢の関係を明らかにすることである.

# 方法

## 1. 対象と検体採取方法

北海道大学病院で診療中の CD 患者，UC 患者とした。各症例は，「厚生労働省難治性疾患等研究事業『難治性炎症性腸管障害に関する治療研究』（鈴木班）：潰瘍性大腸炎・クローン病 診断基準・治療指針」の診断基準を満たし，文書を用いた十分な説明を受けた後，同意が得られる症例とした。除外基準として，小腸・大腸に広範な切除歴があること，抗生剤を投与されていることを設けた。各 20 例ずつを対象とした（表 1）。

表 1: 各群の背景

	Control群	CD群	UC群
症例数	20	20	20
平均年齢 (range)	35.3 (23-46)	30.2 (14-68)	34.3 (15-76)
男性/女性	13 / 7	12 / 8	8 / 12
平均CDAI (range)	-	107.1 (15-265)	-
平均CAI (range)	-	-	4.4 (0-14)
CDの蒙特リオール分類 (%)			
小腸型/小腸大腸型	-	7 (35) / 13 (65)	-
UCの蒙特リオール分類 (%)			
全大腸炎型/左側大腸炎型	-	-	19 (95) / 1 (5)
治療薬 (%)			
5-ASA/SASP	-	14 (70)	12 (60)
Prednisolone	-	0 (0)	1 (5)
AZA/6MP	-	5 (25)	9 (45)
anti TNF $\alpha$ antibody	-	14 (70)	8 (40)

表 2: CDAI

1.	過去1週間の水様または泥状便の回数	×2 = *1
2.	過去1週間の腹痛評価の合計 (下記スコアで腹痛の状態を毎日評価し、7日分を合計する) 0=なし、1=軽度、2=中等度、3=高度	×5 = *2
3.	過去1週間の一般状態評価の合計 (下記スコアで一般状態を毎日評価し7日分を合計する) 0=良好、1=やや不良、2=不良、3=かなり不良、4=極めて不良	×7 = *3

4.	クローン病に起因すると推定される症状または所見 1) 関節炎または関節痛 2) 皮膚または口腔内病変(壊疽性膿皮症または結節性紅斑など) 3) 虹彩炎またはブドウ膜炎 4) 裂肛、痔瘻または肛門周囲腫瘍 5) その他の瘻孔 6) 過去1週間 100° F(37.8°C)を超える発熱	× 20 = *4
5.	下痢に対するロペミンまたはオピオートの服用 0=なし、1=あり	× 30 = *5
6.	腹部腫瘍 0=なし、2=疑いあり、5=あり	× 10 = *6
7.	ヘマトクリット: 男(47-ヘマトクリット値) 女(42-ヘマトクリット値)	× 6 = *7
8.	体重: 100 × (1-体重/標準体重)	= *8
CDAI = *1 + *2 + *3 + *4 + *5 + *6 + *7 + *8		

表 3: CAI

<b>1. 一日の排便回数</b>	<b>スコア</b>	<b>4. 評価者による症状に関する一般状態</b>	<b>スコア</b>
0-2	0	きわめて良好	0
3-4	1	良好	1
5-6	2	良い	2
7-9	3	普通	3
10以上	4	不良	4
<b>2. 血便頻度</b>	<b>スコア</b>	<b>5. 腹部の圧痛</b>	<b>スコア</b>
0%	0	なし	0
1-50 %	1	軽度, 限局	1
50-99 %	2	軽度, 中等範囲	2
100 %	3	高度, 反跳痛	3
<b>3. 腹痛/腹痙攣</b>	<b>スコア</b>	<b>6. 夜間排便, 失禁, 止痢剤の使用</b>	<b>スコア</b>
なし	0	あり	各1
軽度	1	なし	0
中等度	2		
高度	3		
CAI = 1. + 2. + 3. + 4. + 5. + 6.			

被験者は下部消化管内視鏡検査時に Step Biopsy として、回腸末端の肉眼的正常部位から生検鉗子 (FB-230U, OLYMPUS, Tokyo, Japan) を用いて生検検体を 2 片採取した。採取した検体は直ちにホルマリン固定し、薄切を行った後に HE 染色を行った。CD 群では 20 例に内視鏡下生検を行い、UC 群では緊急手術となった 2 例を除き、18 例に内視鏡下生検を行い評価した。Control 群として北海道大学病院病理部に保存されている小腸疾患がなく炎症性腸疾患ではない患者 20 例の小腸生検検体を利用した。

また、内視鏡前処置として腸管洗浄剤を服用させた際に、最初に排出される便の一部を、採便シート、滅菌ヘラを用いて密閉容器に採取した。採取した便検体は-30°Cフリーザーで冷凍保存した。十分な検体量が得られた CD 群 19 例、UC 群 7 例の便検体を利用した。Control 群として、問診で既往歴のない健常ボランティア 20 名を募り、排便時に便検体を上記の方法で採取した。

## 2. Paneth 細胞の形態評価

### 2-1. HE 染色

生検検体を 40 g/l formaldehyde saline (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で固定, paraffin で包埋した. 薄切し 5  $\mu$ m 厚の切片を作成した.

HE (Wako Pure Chemical Industries) で染色された内視鏡生検検体中の観察可能な Paneth 細胞を評価した. ただし, 生検検体中の Paneth 細胞は検体の薄切の影響を受けるため, 評価可能な Paneth 細胞として, ①: Paneth 細胞が基底膜と接していること, ②: Paneth 細胞が管腔と接していること, ③: Paneth 細胞の核が明瞭に観察できること, ④: Paneth 細胞の細胞膜を明瞭に観察できること, ⑤: Paneth 細胞の隣接する細胞の核を観察できることという 5 つの基準を設け, それら全てを満たす Paneth 細胞を評価対象とした (図 3).

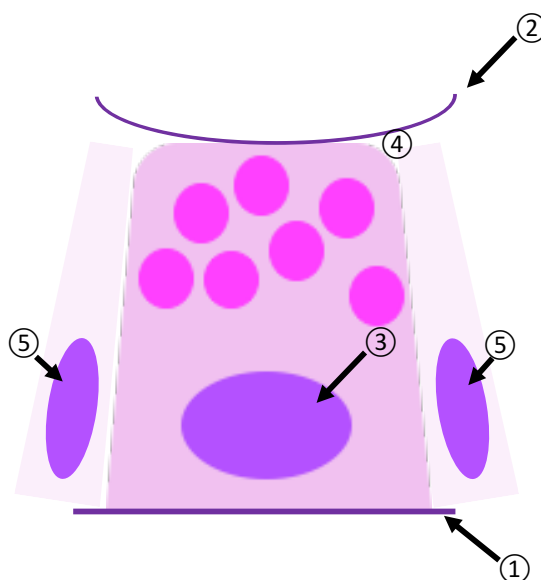


図 3: 評価可能な Paneth 細胞の 5 つの基準

①: Paneth 細胞が基底膜と接していること, ②: Paneth 細胞が管腔と接していること, ③: Paneth 細胞の核が明瞭に観察できること, ④: Paneth 細胞の細胞膜を明瞭に観察できること, ⑤: Paneth 細胞の隣接する細胞の核を観察できること

プレパラートを光学顕微鏡 (DP21, OLYMPUS, Tokyo, Japan) を用いて, 1000 倍の倍率で観察を行った. 評価可能な Paneth 細胞を観察し, 正常細胞数, 異型細胞数をカウントした. 異型細胞については Cadwell らの分類を踏襲し, 正常な細胞を D0, 異常のある顆粒を有する細胞を D1, 顆粒が 10 個の以下の細胞を D2, 顆粒形態が不明瞭な細胞を D3 とした (Cadwell et al., 2008) (図 4). 異型細胞数を評価可能な Paneth 細胞数で割った値  $((D1+D2+D3)/(D0+D1+D2+D3)*100)$  を, 1 症例の

Paneth 細胞異型割合とした。

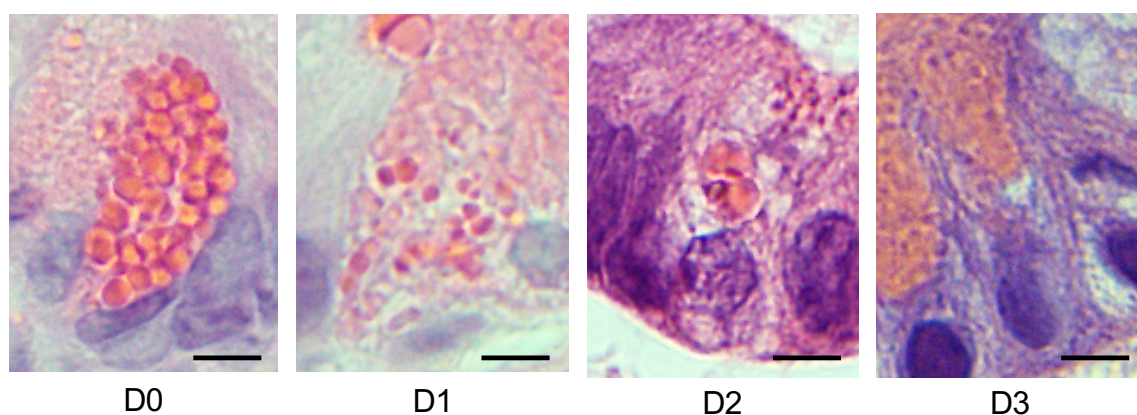


図 4: Paneth 細胞の異型細胞の分類

D0: 正常な細胞, D1: 異常のある顆粒を含む細胞, D2: 顆粒が 10 個以下の細胞, D3: 顆粒形態が不明瞭な細胞と定義された. スケールバーは 5  $\mu\text{m}$  を示す.

また、画像解析ソフト (WinROOF Version 5, Mitani Corporation, Fukui, Japan)を用いて、Paneth 細胞顆粒の近似円の直径を求め、顆粒径とした。評価可能な Paneth 細胞中に含まれる全顆粒を測定し、その顆粒径の平均値をとることで、1 症例の代表値とした。

## 2-2. HD5 免疫染色

パラフィン包埋切片を 100% キシレンに 5 分間 3 回浸漬することにより脱パラフィンし、100%, 100%, 95%, 80%, 70%, 50%エタノールに順次各 3 分間浸漬したのち精製水に 3 分間 2 回浸漬することにより親水化した。その後、抗原賦活化液 pH9 (Nichirei, Tokyo, Japan)に浸漬し、オートクレーブで加圧加熱処理 (105°C, 20 分)により抗原賦活化を行った。次に、3%過酸化水素処理 (室温, 15 分間)にて内因性ペルオキシダーゼ除去し、5%ヤギ血清 (Sigama-Aldrich, St. Louis, MO, USA)でブロッキング処理 (室温, 30 分間) 後、自然免疫教室で樹立したラビットモノクローナル抗 HD-5 抗体 (No.3)を 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で一次抗体反応 (4°C, 一晚)を行った。次にヒストファインシンプルステイン MAX-PO(R) (Nichirei, Tokyo, Japan)を反応 (室温, 30 分間)させ、その後、DAB 基質 (Nichirei, Tokyo, Japan)により発色・検出した。最後に、脱水・透徹処理を行い、マリノール (Muto pure chemicals, Tokyo, Japan)にて切片を封入した。

得られた標本は、HE 染色と同様に評価可能な Paneth 細胞を選別し、細胞中に染色された顆粒が占める面積の割合を測定した ((細胞中の染色された面積)/(細胞の面

積)\*100). その平均値を求め, 1 症例の代表値とした.

### 3. 腸内細菌叢解析方法

採取した便検体 200 mg より, QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilgen, Germany)を用いて genomic DNA を抽出した. 抽出した DNA の濃度を, 260nm の吸光度を元に吸光度計 (Nanodrop 2000 spectrometer, Thermofischer scientific, Waltham, MA, USA)を用いて測定した.

抽出した DNA より, ユニバーサルプライマーセット (Bakt 341F; 5-cctacgggnggcwgcag, Bakt 805R; 5-gactachvgggtatctaacc)を用いて 16S rDNA の V3-V4 領域を増幅した(Herlemann et al., 2011). PCR 反応は 12.5 ng の DNA, 200 nM の各プライマー, 1x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA)を含む 25  $\mu$ L の反応液に対し, 95°C3 分および 95°C30 秒, 55°C30 秒, 72°C30 秒の 25 サイクル, 72°C5 分の条件で行った. その後, PCR 産物を磁気ビーズ (AMPure XP beads, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)を用いて精製した. 精製した PCR 産物に対して, 3' および 5'末端に 8 bp のバーコード配列を含むシーケンスアダプター (Nextera XT Index Kit v2 Set B, Illumina, San Diego, CA, USA)を付加した. PCR 反応は, 5  $\mu$ L の PCR 産物, 5  $\mu$ L の各プライマー, 1 x KAPA HiFi HotStart ReadyMix を含む 50  $\mu$ L の反応液に対して, 95°C3 分, および 95°C30 秒, 55°C30 秒, 72°C30 秒の 8 サイクル, 72°C5 分の条件で行った. 各増幅産物を磁気ビーズを用いて精製した後, その濃度を蛍光光度計 (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて定量し, 4 nM に調製した. 各増幅産物溶液を 4  $\mu$ L ずつ混合し, amplicon library を作製した. その後, library の濃度を定量 PCR により測定し (KAPA Library Quantification Kit Lightcycler 480 qPCR Mix, Kapa Biosystems), 4 pM に調製した. その後, 5%の control library (PhiX Control v3, Illumina) を添加した後, MiSeq 600-cycle v3 kit (Illumina)を用いてシーケンスを行った.

シーケンス後に得られた Illumina pair-end reads FASTQ file からの Operational taxonomic unit (OTU) 分類および多様性の解析は, QIIME (version 1.9.1)のパイプラインを用いて行った(Caporaso et al., 2010). アダプターシーケンスと低品質塩基のトリミングは BBtools パッケージ (<http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>)に含まれる BBDuk を用いて, pair-end 配列のアセンブリは BBmerge を用いて行った. また, キメラ配列の除去は UCHIME を用いて行った (Edgar et al., 2011). OTU の分類には UCLUST を用い, Greengenes データベース (ver. 13\_8)上の reference 配列に対する相同性が 97%以上の OTU を, 門, 綱, 目, 科および属の 5 つの階層に分類した. 群間の比較として LefSe 解析を行った. これは, 菌の占有率から線形判別分析を行い, それぞれの群に寄与度の高い菌を求める方法である. また, 腸内細菌叢の  $\alpha$  多様性と  $\beta$  多様性を解析した.  $\alpha$  多様性指数として Shannon index および Simpson index を用いた. これらは, 種の数, 比率に基づいており, 両者とも index が高いほど多様性が高



いこと意味する。β多様性の解析として unweighted UniFrac distance を用いて行った。これは系統学的に個々間の比較を行い、distance が大きいほど類似性が低いことを意味する。

#### **4. 統計的解析**

得られたデータについて、統計解析ソフト (Graphpad PRISM5.0, GraphPad software Inc, San Diego, USA)を用いて統計解析を行った。3群比較の際には One way-ANOVA 検定および事後検定として Turkey's multiple analysis を行った。相関解析として、Pearson's correlation coefficients test を行った。95%信頼区間として、P 値が 0.05 未満を統計学的有意差とした。

#### **5. 倫理指針**

本研究は、「ヘルシンキ宣言 (2013 年 10 月修正)」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号)」を遵守し研究プロトコルが作成された。作成された研究計画は、北海道大学病院自主臨床研究事務局で審査され、病院長の承認が得られ (No.016-0192)、対象者からは書面による同意を得た。

## 結果

### 1. CD 群では Paneth 細胞の顆粒径が有意に短縮していた。

生検検体の HE 染色において、Control 群ではエオジン好性の顆粒をもつ Paneth 細胞を認め、Paneth 細胞中の顆粒はエオジンで均等に染色され、明瞭に確認された。一方、CD 群ではエオジンに染まる顆粒が確認されるものの、顆粒は明らかに縮小し、大小不同が認められた。UC 群では Control 群と比べて、顆粒形態に大きな違いは認めなかった (図 5)。

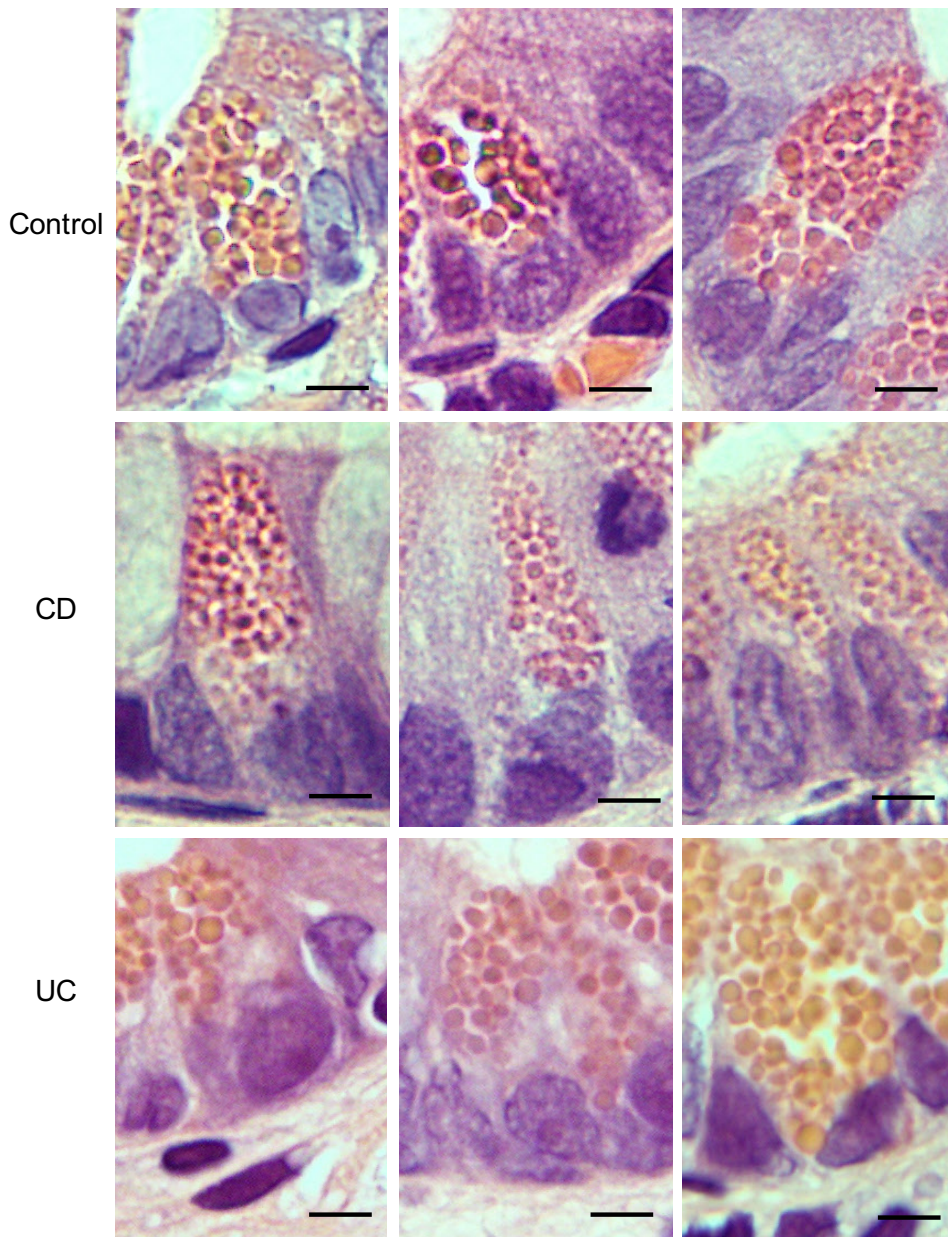


図 5: 各群検体の HE 染色における Paneth 細胞の代表像

複数視野における Paneth 細胞の代表例を示した。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$  を示す。

評価可能な Paneth 細胞は, Control 群で  $23.8 \pm 15.0$  個, CD 群で  $19.2 \pm 4.9$  個, UC 群で  $18.1 \pm 4.7$  個認めた ( $P=0.19$ ). Paneth 細胞の顆粒径を計測すると Control 群で  $1.33 \pm 0.09 \mu\text{m}$ , CD 群で  $1.17 \pm 0.11 \mu\text{m}$ , UC 群で  $1.29 \pm 0.13 \mu\text{m}$  であり, CD 群は Control 群および UC 群に比較して顆粒径が有意に短縮していた (vs. Control 群:  $P=0.0005$ , vs. UC 群:  $P=0.0139$ ). UC 群の顆粒径は, Control 群と有意差を認めなかった (図 6).

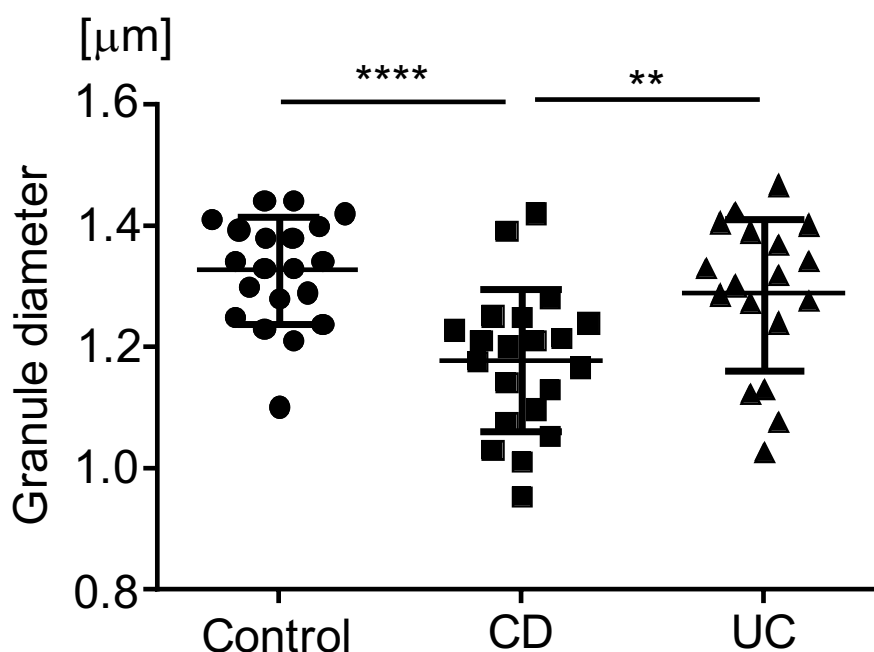


図 6: Paneth 細胞の顆粒径についての 3 群間比較

各群における Paneth 細胞顆粒径のドットプロット. CD 群では, Control 群, UC 群と比較して顆粒径が有意に短縮していた (Control;  $n=20$ , CD;  $n=20$ , UC;  $n=18$ , Bar は平均 $\pm$ 標準偏差を示す). \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*\*;  $p < 0.001$ .

## 2. CD 群では Paneth 細胞の異型細胞割合が有意に高かった。

既報に準じて異型細胞を評価したところ、Control 群において D0: 85.4%, D1: 14.2%, D2: 0%, D3: 0.4%であった。CD 群において D0: 29.9%, D1: 63.7%, D2: 1.1%, D3: 5.2%であり、UC 群において D0: 71.3%, D1: 26.9%, D2: 0.5%, D3: 1.0%であった (図 7)。

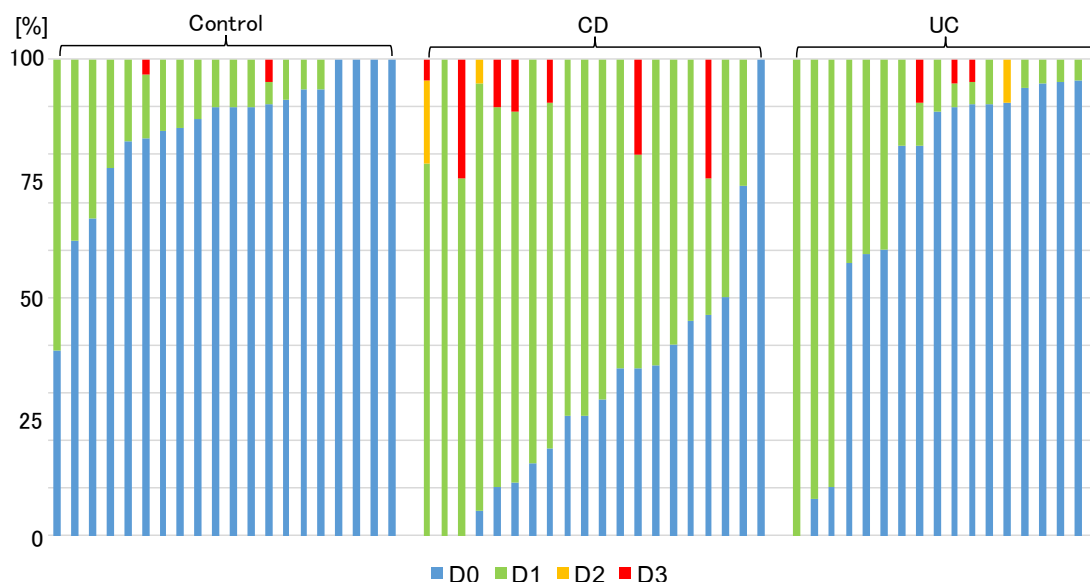


図 7: CD 群各症例における Paneth 細胞異型割合の積み上げグラフ

各症例における全 Paneth 細胞中に占める D0, D1, D2, D3 細胞の割合を示した。CD 群では、異型細胞の割合が大きかった。

異型細胞割合  $((D1+D2+D3)/(D0+D1+D2+D3)*100)$ は、それぞれ Control 群で  $15.2 \pm 14.9\%$ 、CD 群で  $69.5 \pm 25.9\%$ 、UC 群で  $28.4 \pm 32.9\%$ であり、CD 群は Control 群、UC 群に比べ有意に高かった (vs. Control 群:  $P = 0.0001$ , vs. UC 群:  $P = 0.0012$ ) (図 8)。これに対して、Control 群と UC 群の間には有意な違いを認めなかった。

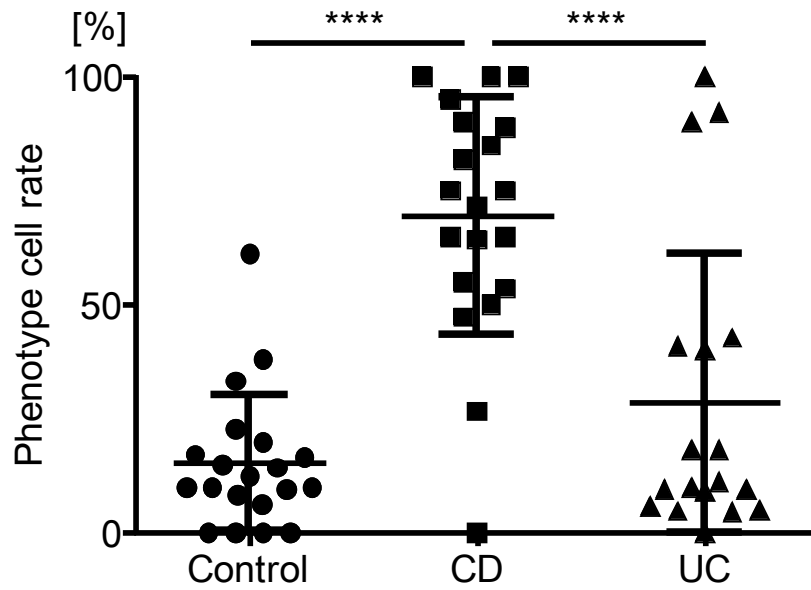


図 8: Paneth 細胞異型の割合についての 3 群間比較

各群における Paneth 異型細胞割合のドットプロット。CD 群では、Control 群、UC 群と比較して有意に Paneth 異型細胞の割合が大きかった (Control; n = 20, CD; n = 20, UC; n = 18, Bar は平均±標準偏差を示す)。 . . \*\*\*\*; P < 0.001.

### 3. HD5 免疫染色において、CD 群では顆粒/細胞面積比は低下していた。

上記二つの検討で有意差のあった CD 群について、HE 染色の顆粒内に HD5 が含まれているか確認するため、HD5 免疫染色を行った。Paneth 細胞の顆粒的に染色された (図 9)

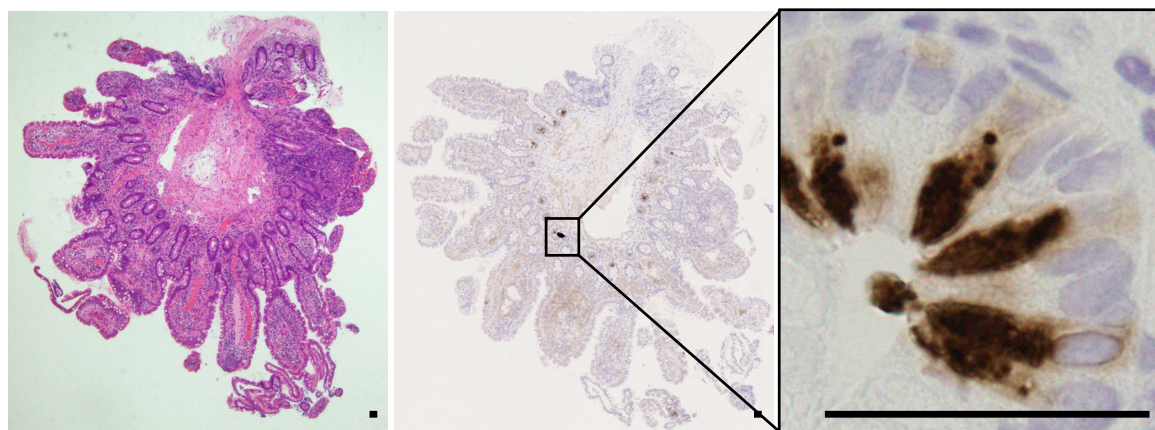


図 9: HD5 免疫染色の代表像

HD5 免疫染色では Paneth 細胞顆粒が特異的に染色された。スケールバーは  $40\ \mu\text{m}$  を示す。

HD5 免疫染色では顆粒径の測定は困難であり、Paneth 細胞中に含まれる顆粒体積の近似として、一つの Paneth 細胞面積中に顆粒が占める面積の割合を求めた ( $(\text{Paneth 細胞中の染色された面積}) / (\text{Paneth 細胞の面積}) * 100$ )。評価可能な Paneth 細胞が認められた Control 17 例、CD 19 例で測定すると、Control 群で  $49.8 \pm 10.9\%$ 、CD 群で  $33.1 \pm 11.3\%$  であり、CD 群で有意に低下していた ( $P = 0.0018$ ) (図 10)。

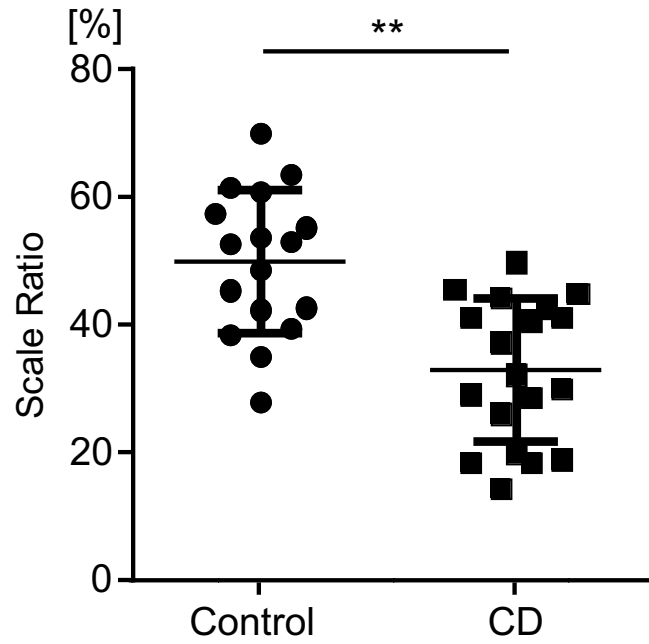


図 10: HD5 免疫染色における Control 群, CD 群の Paneth 細胞面積に占める全顆粒面積の割合

CD 群では, Control 群に比べ, Paneth 細胞中の顆粒が占める面積が低下していた (Control; n = 18, CD; n = 19, Bar は平均±標準偏差を示す). \*\*, P < 0.01

4. HE 染色においても、CD 群では顆粒/細胞面積比は低下しており、HD5 免疫染色の結果と相関が認められた。

HD5 免疫染色と HE 染色との関係を調べるため、HE 染色でも同様に、顆粒/細胞面積比を測定した。CD 群で  $37.5 \pm 5.1\%$  で、Control 群で  $25.6 \pm 4.7\%$  であり、CD 群では Control 群に比べて有意に低かった ( $P < 0.0001$ ) (図 11)。

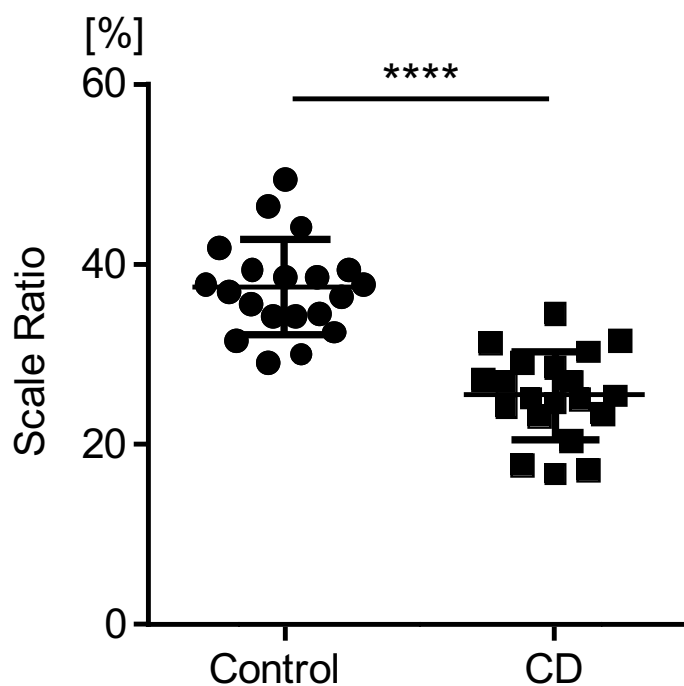


図 11: HE 免疫染色における Control 群、CD 群の Paneth 細胞面積に占める全顆粒面積の割合

Control 群に比べ、CD 群では Paneth 細胞中の顆粒が占める面積が低下していた (Control;  $n = 20$ , CD;  $n = 20$ , Bar は平均  $\pm$  標準偏差を示す). \*\*\*\*;  $P < 0.001$

HD5 免疫染色と、HE 染色での顆粒/細胞面積比を比較すると正の相関が得られた ( $r = 0.4101$ ,  $P = 0.0130$ ) (図 12)。



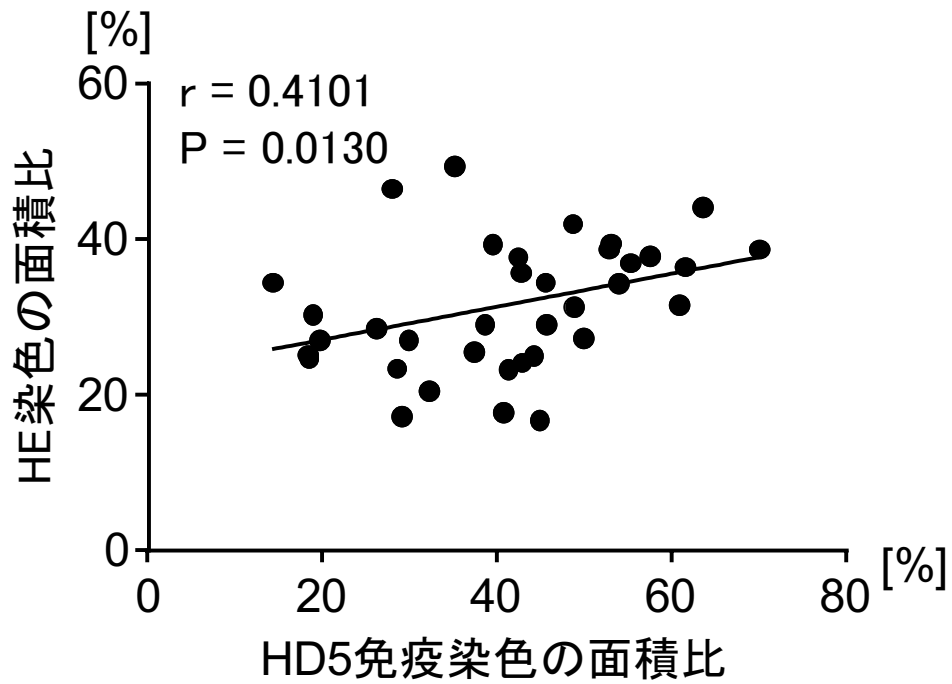


図 12: Paneth 細胞面積に占める全顆粒面積の割合について HE 染色での計測値と HD5 免疫染色での計測値の相関解析

HE 染色での測定値と、HD5 免疫染色での測定値では正の相関が認められた (Control 群, CD 群 (n = 37)).

## 5. CD群, UC群では Dysbiosis が生じており, UC群でも Clostridiales の占有率が低下していた.

門レベルでの解析において, Firmicutes の占有率は Control 群で  $59.86 \pm 2.31\%$ , CD 群で  $46.31 \pm 3.70\%$ , UC 群で  $54.63 \pm 6.02\%$  であり, CD 群では Control 群と比較し有意に低下していた ( $P=0.0118$ ). これに対して, Proteobacteria の占有率は Control 群で  $1.68 \pm 0.18\%$ , CD 群で  $12.31 \pm 3.16\%$ , UC 群で  $4.18 \pm 1.01\%$  であり, CD 群は Control 群と比較し有意に上昇していた ( $P=0.0018$ ) (図 13).

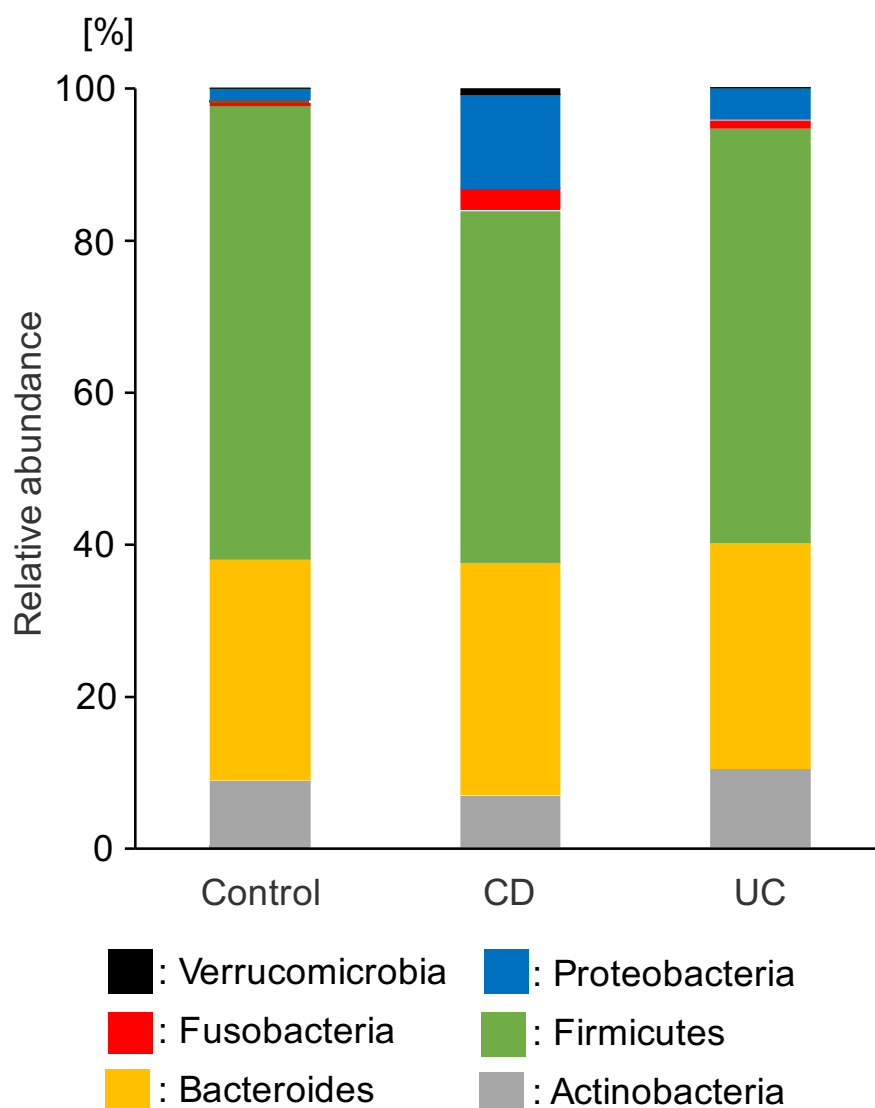


図 13: 3 群の門レベルでの腸内細菌叢の解析

各群における, 各 phylum の占有率の積み上げグラフを示す (Control;  $n=20$ , CD;  $n=19$ , UC;  $n=7$ ). 図は各群における症例の腸内細菌叢における平均値を示す. CD 群では, Control 群に比べ, Firmicutes の占有率が有意に低下し, Proteobacteria の占有率が有意に上昇していた.

$\alpha$ 多様性指数である Shannon index の平均値 (範囲) は, Control 群で 5.22 (4.51-6.35), CD 群で 4.51 (2.18-6.20), UC 群で 4.52 (2.98-5.23)であり, CD 群は Control 群と比較して有意に低下していた (図 14A). また, 他の  $\alpha$ 多様性指数である Simpson index において, Control 群で 0.94 (0.88-0.98), CD 群で 0.88 (0.61-0.97)および UC 群で 0.87 (0.70-0.95)であり, Shannon index と同様に, CD 群は Control 群と比較し有意に低下していた (図 14B). また, unweighted UniFrac distance に基づく  $\beta$ 多様性解析において, Control の同一群内における菌叢の類似性は, CD 群および UC 群と比べ有意に高かった (図 14C, D). また, CD 群における菌叢の類似性は, UC 群と比べ有意に高かった (図 14E).

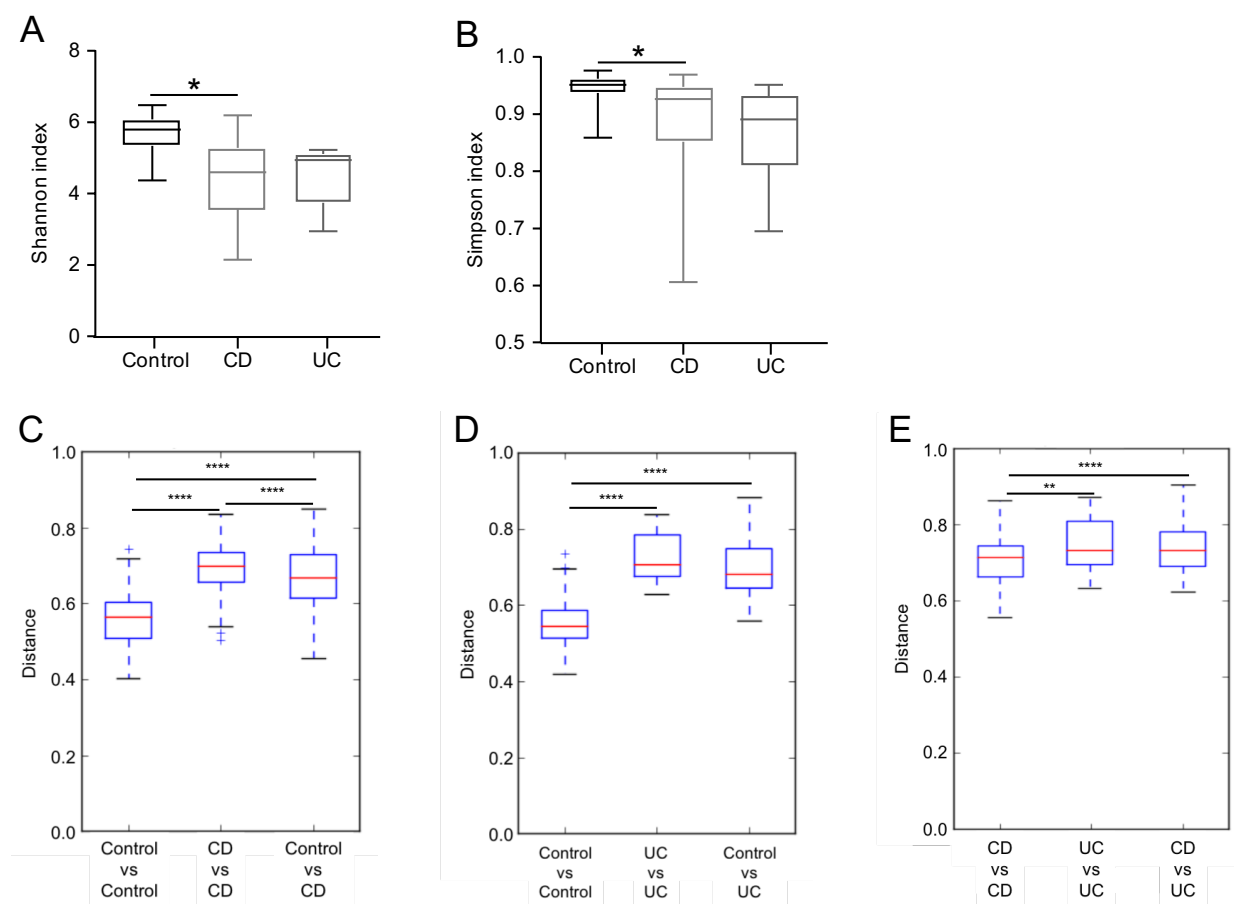


図 14: 3 群における腸内細菌叢の  $\alpha$  多様性,  $\beta$  多様性の解析

各群における Shannon index (A)および Simpson index (B)の比較. CD 群は, Control 群に比べ, Shannon index, Simpson index が有意に低かった.

また, Control 群 (n = 20) および CD 群 (n = 19) (C), Control 群および UC 群 (n = 7) (D), CD 群および UC 群 (E)における群内および群間での unweighted UniFrac distance の比較を行った. Control 群内の菌叢の類似性は, CD 群および UC 群のものとは有意に高かった. また, CD 群内における菌叢の類似性は, UC 群と比べ有意に高かった. \*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01, \*\*\*\*: p < 0.0001.

LefSe method による Control 群と CD 群の菌叢間における系統学的特徴の解析において、Control 群では phylum level において Firmicutes が、class level において Clostridia が、order level において Clostridiales が、family level において Ruminococcaceae が、genus level において *Faecaribacterium* が増加していた。一方、CD 群では phylum level において Proteobacteria が、class level において Gammaproteobacteria が、order level において Enterobacteriales が、family level において Enterobacteriaceae および Bacteroidaceae が、genus level において *Bacteroides* が増加していた (図 15A)。同様に Control 群と UC 群の菌叢を比較すると、Control 群では class level において Clostridia が、order level において Clostridiales が、family level において Lachnospiraceae が、genus level において *Faecaribacterium*, および *Coprococcus* が増加していた。一方で UC 群では class level において Bacilli が、order level において Lactobacillales が増加していた (図 15B)。さらに、CD 群と UC 群の菌叢を比較すると、CD 群では family level において Veillonelaceae および Clostridiaceae が増加していた。一方で、UC 群では phylum level において Bacteroidetes が、class level において Bacteroidia が、order level において Bacteroidales が、family level において Bacteroidaceae が、genus level において *Bacteroides* が増加していた (図 15C)。

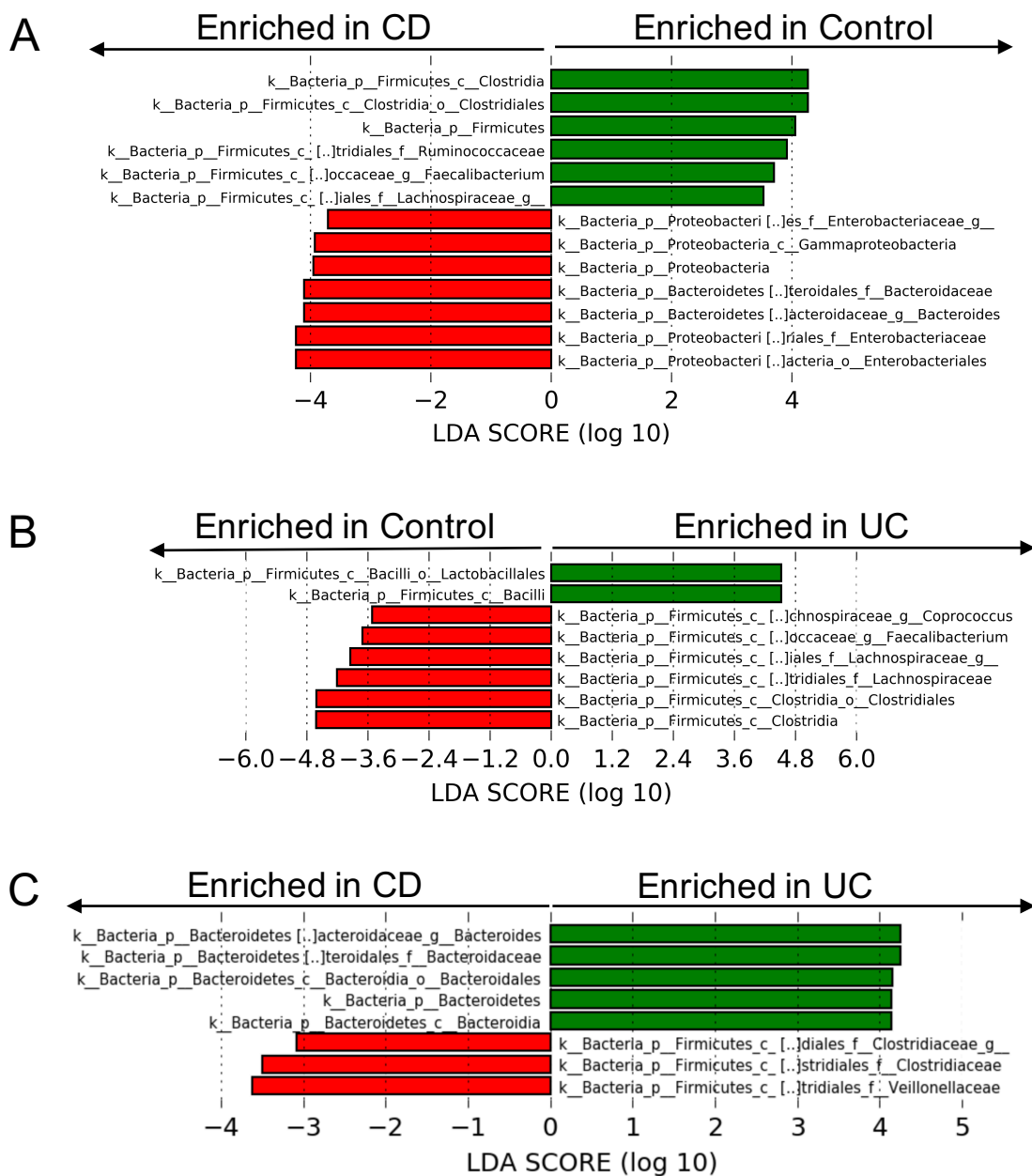


図 15: Control 群 (n=20)および CD 群 (n=19)間 (A), Control 群および UC 群 (n=7)間 (B), CD 群および UC 群間 (C)における LefSe 解析  
 占有率 3.0%以上の分類群に対し解析を行った. 各群において有意な増加が見られる分類群 (Linear discriminant analysis (LDA) score  $\geq 2.0$ )を抽出した. Control 群と比較して, CD 群および UC 群では, 異なる内容の dysbiosis を生じていた.

## 6. CD 群において Paneth 細胞の顆粒径と, dysbiosis に相関関係を認めた.

CD 群では, Paneth 細胞の顆粒径が大きくなるほど Shannon index および Simpson index が上昇し, 腸内細菌の多様性が増す正の相関傾向が見られた (図 16).

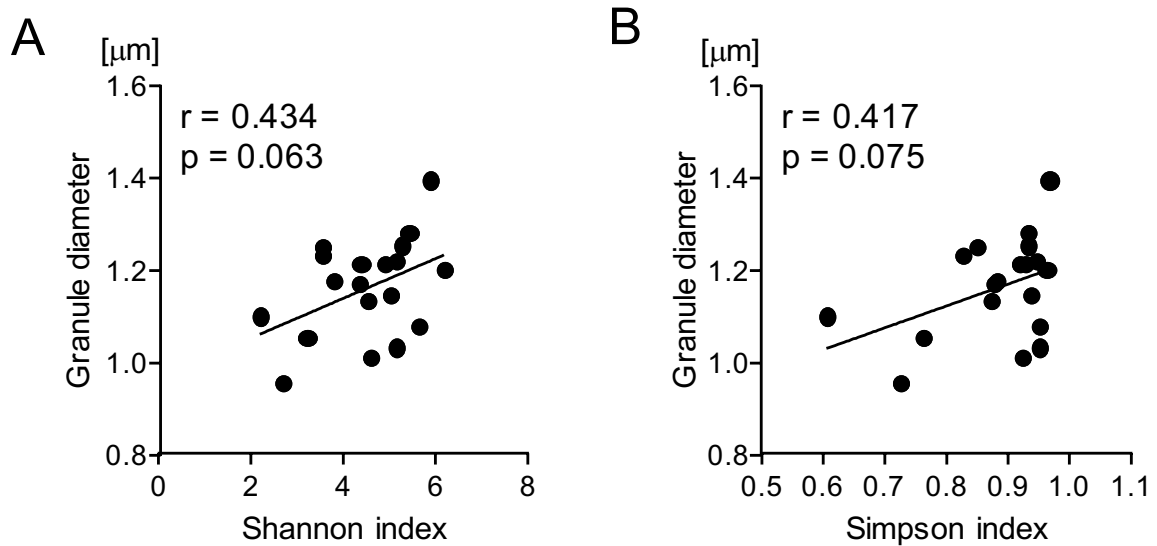


図 16: CD 群における Paneth 細胞の顆粒径と  $\alpha$  多様性の比較

CD 群 (n=19)の各症例における Paneth 細胞の顆粒径と Shannon index (A)および Simpson index (B)との相関解析を行った. 顆粒径は, それぞれに対して, 正の相関傾向を認めた.

さらに, LefSe において抽出された細菌の占有率と顆粒径を比較すると, CD 群では Paneth 細胞の顆粒径と, 腸内細菌叢の Clostridiales の占有率に有意な正の相関を認めた ( $r = 0.478, P = 0.0385$ ). また, 顆粒径と Firmicutes および Ruminococcaceae の占有率に正の相関傾向を認めた (それぞれ  $r = 0.4142, P = 0.0778$ ,  $r = 0.3921, P = 0.0969$ ) (図 17). 一方, UC 群では顆粒径と細菌叢の占有率に相関を認めなかった (表 4).

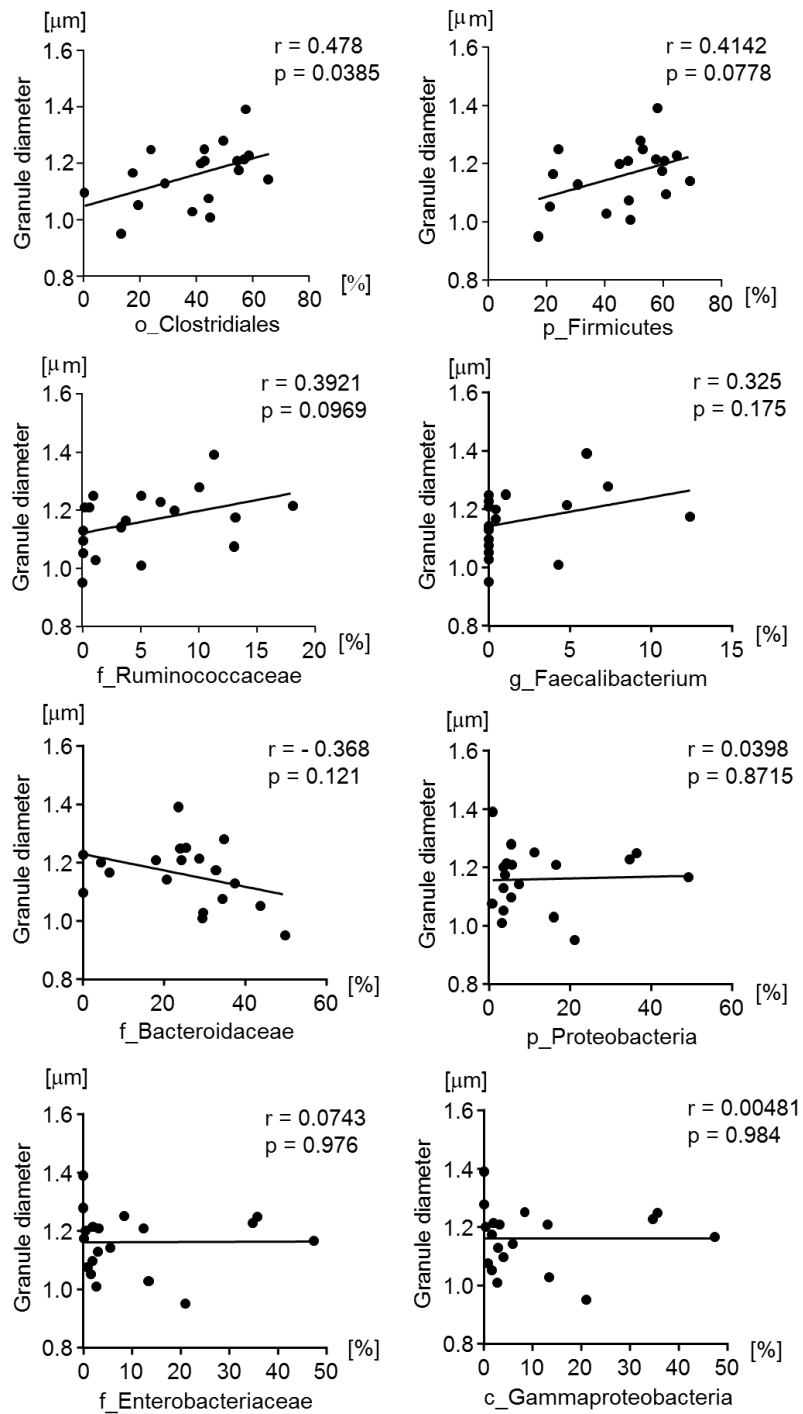


図 17: CD 群における Paneth 細胞の顆粒径と、腸内細菌叢の比較

CD 群 (n = 19) の各症例における Paneth 細胞の顆粒径と、Control 群 (n = 20) および CD 群間における LeFSe 解析で抽出された分類群の占有率との相関解析を行った。顆粒径は、Clostridiales の占有率に正の相関を認めた。

表 4: UC 群における Paneth 細胞顆粒径と腸内細菌叢組成の比較

Taxa enriched in Control group	Relative abundance			Correlation	
	Control	UC	p value	r	p value
o_Clostridiales	55.9±2.6	34.3±1.6	<b>&lt;0.001</b>	-0.459	0.300
c_Clostridia	55.9±2.6	34.9±2.3	<b>&lt;0.001</b>	-0.459	0.300
f_Lachnospiraceae	33.8±2.9	16.8±3.4	<b>&lt;0.001</b>	-0.210	0.652
g_Faecalibacterium	6.7±1.0	2.6±2.6	<b>0.022</b>	-0.381	0.399
g_Coprococcus	4.0±0.6	1.1±0.5	<b>0.001</b>	0.020	0.966

Taxa enriched in UC group	Relative abundance			Correlation	
	Control	UC	p value	r	p value
o_Lactobacillales	0.9±0.4	17.7±7.2	<b>&lt;0.001</b>	0.305	0.506
c_Bacilli	1.0±0.4	17.8±7.2	<b>&lt;0.001</b>	0.305	0.506



## 考 察

IBD では腸内細菌叢の変化がみられることが報告されており、bacterial overgrowth や CD および UC 特異的な、または、両者共通な dysbiosis が知られている (Kostic et al., 2014; Nishino et al., 2018; Sartor and Mazmanian, 2012; Turpin et al., 2018). 特に CD では、病因・病態と dysbiosis の関与が示されていることから、腸内細菌叢の組成に影響を与える Paneth 細胞の異常が関わっていると推測されるが、詳細は未だ明らかになっていなかった。本研究は、患者小腸粘膜の病理学的評価と、便中の腸内細菌を解析することで、CD における Paneth 細胞と腸内細菌叢の関連を明らかにし、さらに日常診療の内視鏡検査において簡便に実施可能で、低侵襲な経時的病態評価の可能性を示した。

通常の下部消化管内視鏡検査で採取できる検体量には限りがあり、また検体の薄切の際に方向が不均一になるなど影響を受けやすいことが知られている。そのため、本研究では新たに「評価可能な Paneth 細胞」の基準を設け、Paneth 細胞の形態評価を行った。従来、手術標本を用いた研究によって異型を示す Paneth 細胞の出現が予後に関わることが報告されていることから (Liu et al., 2017; Wehkamp et al., 2005), 生検検体を用いて Paneth 細胞の形態を評価することで、即時かつ経時的な病勢把握につながることを期待出来ると考えたからである。また、既報で報告されている異型細胞の評価方法 (Cadwell et al., 2008) では、D2, D3 の定義が明瞭なのに対して、D0 と D1 の境界が不明瞭で主観に左右されやすい問題点があった。そこで、本研究では異型細胞の割合に加えて、より客観的で簡便な新しい評価方法として HE 染色で判別可能な顆粒径の測定を行うことによって、Paneth 細胞の顆粒径が CD 群で有意に小さいという形態変化を見出だした。この HE 染色での顆粒形態の変化は、HD5 免疫染色と相関を認め、HD5 についての病理学的評価を HE 染色で簡易に行える可能性が示唆された。また、CD 群において Paneth 細胞顆粒径が大きいほど腸内細菌の多様性が増加し、さらに Clostridiales の占有率が増加することを明らかにした。これに対して、既報に準じた異型 Paneth 細胞割合については CD 群でその割合が有意に大きく、Paneth 細胞の顆粒形態異常が起きていることが確認できたものの、この異型細胞割合と腸内細菌との間には相関を認めなかった。一方、Liu ら (Liu et al., 2014) は生検検体でも手術組織と同様の評価が可能であり、時期を変え複数回採取しても類似の結果が得られると報告している。彼らは試料として「Jumbo」生検鉗子を用いて複数の生検検体を採取し、既報に準じた異型細胞割合を評価していた。本研究では、より侵襲の低い生検試料を用いて、新たに適切な基準を設けることで、腸内環境の客観的な評価を行うことが可能であり、通常の内視鏡生検検体を用いて顆粒径を測定し Paneth 細胞を評価できることを初めて示した。本法の有用性を確認する

ためには、今後さらに症例を集積して、経時的な評価を行う必要がある。

本研究で、CD群、UC群では、Control群と比較して細菌の多様性と占有率が変化する *dysbiosis* が生じていた。CD群では  $\alpha$  多様性が低下し、また、Firmicutes, Clostridiales, Ruminococcaceae, Faecalibacterium の占有率が低下、Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriaceae, Bacteroides の占有率が上昇しており、少数の日本人の解析において既報と同様の結果が得られたことは有意な所見である (Gevers et al., 2014; Kostic et al., 2014; Strauss et al., 2011; Willing et al., 2010)。UC群で占有率が低下していた Lachnospiraceae, Faecaribacterium, Coprococcus, および、上昇していた Bacilli, Lactobacillales は既報と同様の結果が得られた (Frank et al., 2007; Kostic et al., 2014; Nishino et al., 2018; Wang et al., 2014)。本研究で示したUCでの Clostridiales の占有率低下についてはこれまで報告はなかった。CD, UCともに低下していた Clostridiales は Treg の誘導に重要であることが知られており (Furusawa et al., 2013), IBD の病態に影響を与えている可能性が考えられた。さらに、占有率が減少していた Ruminococcaceae, および Faecaribacterium は Clostridium cluster IV に所属し、酪酸を産生し、Coprococcus は Clostridium cluster XIVa に所属しており、上記同様 Treg を誘導することが報告されている (Nishino et al., 2018)。IBD では、このような腸管炎症の改善に寄与する細菌が減少していることが強く示唆された。

本研究で、CD群において Paneth 細胞の顆粒径と *dysbiosis* との間に相関関係を初めて示したことは、CDにおいて Paneth 細胞と腸内細菌叢が強く関連していることを示唆している。Liu ら (Liu et al., 2016) は小児 CD 患者の手術検体における Paneth 細胞異型と腸内細菌叢の変化と比較し、異型細胞が多い CD 患者群では Shannon index が低下し、Faecalibacterium, Ruminococcaceae の占有率が低下すると報告した。今回の検討ではCD群で生検検体中の Paneth 細胞顆粒径が短縮すると Clostridiales の占有率が低下し、また、Shannon index, Simpson index が低下することを示し、Paneth 細胞の形態異常と *dysbiosis* の関係を初めて明らかにした。Paneth 細胞は顆粒中に  $\alpha$ -defensin を有し、腸内細菌叢と密接な関係が知られている。また、CD 感受性遺伝子である *XBPI* や *ATG16L1* の変異が Paneth 細胞の形態異常を生じることが報告されている (Cadwell et al., 2008; Kaser et al., 2008)。さらに、IBD 以外の疾患においても、肥満者や虚血再還流モデルおよび移植片対宿主病 (graft-versus-host disease) などで、Paneth 細胞の異常が腸内細菌叢の破綻、つまり *dysbiosis* を生じることがコンセンサスとなってきている (Eriguchi et al., 2012; Grootjans et al., 2011; Hodin et al., 2011; Raetz et al., 2013)。本研究で認められた Paneth 細胞の形態異常が抗菌ペプチド合成不全を引き起こし、その結果として腸内細菌叢の多様性低下および Treg 誘導性細菌群減少という *dysbiosis* が生じた可能性が示唆される。このメカニズムを究明するためには、さらなる解析が必要である。一方、UC群では、Paneth 細胞の形態変化と *dysbiosis* に相関関

係を認めなかった。このことは、UC では Paneth 細胞の形態異常以外に dysbiosis に寄与する主な要因があり、dysbiosis の原因が CD と異なる可能性が考えられた。

本研究の Limitation としては、単施設で症例数が少ないこと、腸管内に分泌されて機能してる defensin 自体を評価できていないこと、Paneth 細胞の評価に長時間を要すること、IBD 以外の炎症性腸疾患を評価していないことが挙げられる。今後の症例の集積、評価方法の改善が望まれる。

本研究では、CD 群、UC 群ともに dysbiosis を認めたが、CD 群でのみ Paneth 細胞の顆粒形態異常を認め、その異常は dysbiosis と相関していた。このことにより、CD において Paneth 細胞が病態に強く関与していることが確認された。今後、さらに症例を集積して病型、疾患活動性、治療効果などと比較検討することで、Paneth 細胞の形態評価による CD の簡便な経時的病勢把握を行える可能性がある。また、IBD には CD か UC か診断困難な症例もあるが、Paneth 細胞の形態評価を行うことで、診断の一助となり、IBD 診療への貢献が期待できる。

## 結 論

### ① 本研究によって得られた知見.

- ・通常の生検検体でも，Paneth 細胞の評価は可能であった.
- ・CD では Paneth 細胞の顆粒径が短縮していた.
- ・CD と UC では，異なる dysbiosis が起きていた.
- ・CD において，顆粒径と dysbiosis に相関関係を認めた.

### ② 新知見の意義

手術が行われていない症例でも Paneth 細胞の評価を行うことができ，CD の病態において，Paneth 細胞の形態異常と Dysbiosis が強く関連していると考えられた．また，UC の病態においては，Paneth 細胞形態異常の他に Dysbiosis に寄与する要因がある可能性があると考えられた．

### ③ 今後どのような研究が展開されうるか

さらに症例を集積し，病型，疾患活動性，治療効果などと比較検討することで，Paneth 細胞の形態評価による CD の簡便な経時的病勢把握を行える可能性がある．また，IBD には CD か UC か診断困難な症例があり，Paneth 細胞の形態評価による CD と UC の鑑別診断体系の確立に向けた研究が可能となる．

### ④ 今後の課題

Paneth 細胞の抗菌ペプチドの中で最も殺菌作用があり，腸内細菌叢を制御すると考えられている  $\alpha$ -defensin のさらなる研究が望まれる．特に，既報や，本研究のような組織中の  $\alpha$ -defensin の評価のみならず，実際作用する腸管中に分泌された  $\alpha$ -defensin の評価が必要と考えられる．

## 謝 辞

研究の機会を与えていただき、全ての面において御指導・御助言をいただきました北海道大学大学院 医学研究院 消化器内科学分野 坂本直哉教授、北海道大学 先端生命科学研究院 生命機能科学部門 細胞生物科学分野 自然免疫研究室 綾部時芳教授に深く感謝いたします。

また、実際に研究を遂行するにあたり、親身に御指導・御支援いただきました北海道大学 先端生命科学研究院 生命機能科学部門 細胞生物科学分野 自然免疫研究室 中村公則准教授、清水由宇先生、北海道大学病院 光学医療診療部 桂田武彦助教、北海道大学大学院 医学研究院 消化器内科学分野 大西礼造臨床客員講師には感謝の念に堪えません。厚く御礼申し上げます。

検体採取でご協力いただいた北海道大学病院 消化器内科 木下賢治先生、山梨香菜先生、小田切信介先生、また、検体解析でご指導いただきました先端生命科学研究院 生命機能科学部門 細胞生物科学分野 自然免疫研究室 横井友樹先生に深謝いたします。

最後に、本研究に貴重な検体を提供していただきました患者様、およびボランティアの皆様、検体回収にご協力いただきました病院職員の方々に深く感謝いたします。

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2000). Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature immunology* 1, 113-118.

Brown, E.M., Sadarangani, M., and Finlay, B.B. (2013). The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature immunology* 14, 660-667.

Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., et al. (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456, 259-263.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* 7, 335-336.

Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Thayer, W.R., Merkal, R.S., and Coutu, J.A. (1984). Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences* 29, 1073-1079.

Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 1405-1413.

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194-2200.

Eriguchi, Y., Takashima, S., Oka, H., Shimoji, S., Nakamura, K., Uryu, H., Shimoda, S., Iwasaki, H., Shimono, N., Ayabe, T., et al. (2012). Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins. *Blood* 120, 223-231.

Frank, D.N., St. Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human

inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13780-13785.

Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446.

Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L.A., Vazquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., Schwager, E., Knights, D., Song, S.J., Yassour, M., et al. (2014). The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 15, 382-392.

Grootjans, J., Hodin, C.M., de Haan, J.J., Derikx, J.P., Rouschop, K.M., Verheyen, F.K., van Dam, R.M., Dejong, C.H., Buurman, W.A., and Lenaerts, K. (2011). Level of activation of the unfolded protein response correlates with Paneth cell apoptosis in human small intestine exposed to ischemia/reperfusion. *Gastroenterology* 140, 529-539.e523.

Hayase, E., Hashimoto, D., Nakamura, K., Noizat, C., Ogasawara, R., Takahashi, S., Ohigashi, H., Yokoi, Y., Sugimoto, R., Matsuoka, S., et al. (2017). R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. *The Journal of Experimental Medicine*.

Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jurgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., and Andersson, A.F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME journal* 5, 1571-1579.

Hodin, C.M., Verdam, F.J., Grootjans, J., Rensen, S.S., Verheyen, F.K., Dejong, C.H., Buurman, W.A., Greve, J.W., and Lenaerts, K. (2011). Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals. *J Pathol* 225, 276-284.

Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.-P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599.

Kaser, A., Lee, A.H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., et al. (2008). XBP1 links ER stress to intestinal



inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743-756.

Kostic, A.D., Xavier, R.J., and Gevers, D. (2014). The Microbiome in Inflammatory Bowel Diseases: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology* 146, 1489-1499.

Liu, T.-C., Gao, F., McGovern, D.P.B., and Stappenbeck, T.S. (2014). Spatial and Temporal Stability of Paneth Cell Phenotypes in Crohn's Disease: Implications for Prognostic Cellular Biomarker Development. *Inflammatory bowel diseases* 20, 646-651.

Liu, T.C., Gurram, B., Baldrige, M.T., Head, R., Lam, V., Luo, C., Cao, Y., Simpson, P., Hayward, M., Holtz, M.L., et al. (2016). Paneth cell defects in Crohn's disease patients promote dysbiosis. *JCI insight* 1, e86907.

Liu, T.C., Naito, T., Liu, Z., VanDussen, K.L., Haritunians, T., Li, D., Endo, K., Kawai, Y., Nagasaki, M., Kinouchi, Y., et al. (2017). LRRK2 but not ATG16L1 is associated with Paneth cell defect in Japanese Crohn's disease patients. *JCI insight* 2, e91917.

Manichanh, C., Borrueal, N., Casellas, F., and Guarner, F. (2012). The gut microbiota in IBD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 9, 599.

Matsuda, H., Fujiyama, Y., Andoh, A., Ushijima, T., Kajinami, T., and Bamba, T. (2000). Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 15, 61-68.

Nakamura, K., Sakuragi, N., Takakuwa, A., and Ayabe, T. (2016). Paneth cell alpha-defensins and enteric microbiota in health and disease. *Bioscience of microbiota, food and health* 35, 57-67.

Nishino, K., Nishida, A., Inoue, R., Kawada, Y., Ohno, M., Sakai, S., Inatomi, O., Bamba, S., Sugimoto, M., Kawahara, M., et al. (2018). Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology* 53, 95-106.

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with

susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603.

Ohkusa, T., Sato, N., Ogihara, T., Morita, K., Ogawa, M., and Okayasu, I. (2002). *Fusobacterium varium* localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *J Gastroenterol Hepatol* 17, 849-853.

Ouellette, A.J. (2010). Paneth cells and innate mucosal immunity. *Current opinion in gastroenterology* 26, 547-553.

Prideaux, L., Kamm, M.A., De Cruz, P.P., Chan, F.K.L., and Ng, S.C. (2012). Inflammatory bowel disease in Asia: A systematic review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27, 1266-1280.

Raetz, M., Hwang, S.H., Wilhelm, C.L., Kirkland, D., Benson, A., Sturge, C.R., Mirpuri, J., Vaishnava, S., Hou, B., Defranco, A.L., et al. (2013). Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN-gamma-dependent elimination of Paneth cells. *Nature immunology* 14, 136-142.

Roediger, W.E., Duncan, A., Kapaniris, O., and Millard, S. (1993). Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 104, 802-809.

Sartor, R.B., and Mazmanian, S.K. (2012). Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol Suppl* 1, 15-21.

Shouval, D.S., and Rufo, P.A. (2017). The Role of Environmental Factors in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases: A Review. *JAMA Pediatr* 171, 999-1005.

Simmonds, N., Furman, M., Karanika, E., Phillips, A., and Bates, A.W. (2014). Paneth cell metaplasia in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children. *BMC Gastroenterology* 14, 1-6.

Strauss, J., Kaplan, G.G., Beck, P.L., Rioux, K., Panaccione, R., Devinney, R., Lynch, T., and Allen-Vercoe, E. (2011). Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflamm Bowel Dis* 17, 1971-1978.

Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., et al. (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122, 44-54.

Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., and Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet* 389, 1741-1755.

Turpin, W., Goethel, A., Bedrani, L., and Croitoru MdcM, K. (2018). Determinants of IBD Heritability: Genes, Bugs, and More. *Inflamm Bowel Dis* 24, 1133-1148.

Ueno, F., Nakayama, Y., Hagiwara, E., Kurimoto, S., and Hibi, T. (2017). Impact of inflammatory bowel disease on Japanese patients' quality of life: results of a patient questionnaire survey. *Journal of gastroenterology* 52, 555-567.

Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P.B., Peyrin-Biroulet, L., and Colombel, J.-F. (2017). Ulcerative colitis. *The Lancet* 389, 1756-1770.

VanDussen, K.L., Liu, T.C., Li, D., Towfic, F., Modiano, N., Winter, R., Haritunians, T., Taylor, K.D., Dhall, D., Targan, S.R., et al. (2014). Genetic variants synthesize to produce paneth cell phenotypes that define subtypes of Crohn's disease. *Gastroenterology* 146, 200-209.

Wang, W., Chen, L., Zhou, R., Wang, X., Song, L., Huang, S., Wang, G., and Xia, B. (2014). Increased Proportions of Bifidobacterium and the Lactobacillus Group and Loss of Butyrate-Producing Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 398-406.

Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., et al. (2005). Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18129-18134.

Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2010). Paneth's disease. *Journal of Crohn's & colitis* 4, 523-531.

Willing, B.P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A.F., Lucio, M., Zheng, Z., Järnerot, G.,

Tysk, C., Jansson, J.K., and Engstrand, L. (2010). A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 139, 1844-1854.e1841.

Zilbauer, M., Jenke, A., Wenzel, G., Goedde, D., Postberg, J., Phillips, A.D., Lucas, M., Noble-Jamieson, G., Torrente, F., Salvestrini, C., et al. (2011). Intestinal alpha-defensin expression in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 17, 2076-2086.