HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	パネト細胞増殖因子としてのR-Spondin1と抗菌ペプチドを用いた腸内エコロジーシステムの制御法［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	早瀬, 英子
Description	配架番号：2311
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12570号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66099
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Eiko_Hayase_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　　早瀬英子

学 位 論 文 題 名

パネト細胞増殖因子としてのR-Spondin1と抗菌ペプチドを用いた腸内エコロジーシステムの制御法

(Regulation of intestinal microbial ecology system using Paneth-cell growth factor R-Spondin1 and antimicrobial peptides)

【背景と目的】

ヒトは腸内細菌叢を内蔵している生命体であり，数兆もの微生物が常在細菌叢を形成し宿主の代謝や免疫において重要な役割を担っている。小腸に存在するパネト細胞は様々な抗菌ペプチドを分泌する腸内細菌叢制御因子である。中でもα-defensinという抗菌ペプチドは腸管内で約70%の殺菌活性を占めている。同種造血幹細胞移植は造血器疾患における根治療法の一つであるが，移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) が重要な合併症である。急性GVHDはドナー由来のT細胞がレシピエント由来のアロ抗原を認識することにより活性化し組織傷害をもたらす病態である。消化管は急性GVHDの標的臓器であり，腸幹細胞とパネト細胞が標的となる。GVHDによるパネト細胞の消失は抗菌ペプチドの分泌低下をもたらし腸内細菌叢の異常である腸管dysbiosisを引き起こす。腸管dysbiosisはGVHDのみならず代謝性疾患やアレルギー，炎症性腸疾患など様々な病態や疾患に関連することが報告されている。現在，腸管エコシステム保護に対する治療ストラテジーはプレバイオティクス/プロバイオティクス，菌叢移植を用いた“bacteriotherapy”等であり，dysbiosis の原因となっている抗菌ペプチド濃度の低下を回復させる、より根本的なアプローチはこれまで存在しなかった。

今回我々は腸管エコシステムを保護する新たな治療法として，*in vitro*でパネト細胞の分化を誘導することが報告されているR-Spondin1 (R-Spo1) と抗菌ペプチドα-defensinに注目し，著明な腸管dysbiosisを来すマウスのGVHDモデルを用いて，遺伝子組換えR-Spo1製剤と遺伝子組換えα-defensin製剤 (crytdin-4; Crp4) の腸管dysbiosisに対する有効性を検証した。

【材料と方法】

Naïveマウスに R-Spo1 を投与後に小腸切片を作製し，H&E 染色および免疫染色にてパネト細胞数をカウントする。パネト細胞からのα　defensin 産生を評価するため，糞便中のα　defensin 濃度を ELISA 法で測定する。糞便から抽出した DNA の 16S rRNA 領域のシーケンスによって腸内細菌叢を評価する。さらに，GVHD マウスモデルで R-Spo1 を投与し，GVHD によるパネト細胞の減少，α　defensin 分泌の減少，腸管 dysbiosis の予防ができるかを検証する。遺伝子組換え Crp4 を経口投与し，糞便の 16S rRNA のシーケンスを行い腸管 dysbiosis が予防できるかを検証する。

【結果】

Naïveマウスへの R-Spo1 の投与はマウスの腸幹細胞を刺激し，パネト細胞への分化を誘導することでパネト細胞を増殖させ，パネト細胞から分泌されるα　defensin 濃度を糞便中で有意に上昇させた。R-Spo1 によって増加したパネト細胞は pro-α　defensin を活性型に転換するために必要

な matrix metalloproteinase-7 も有しており, 殺菌活性のあるα　defensin を有する成熟したパネト細胞と考えられた。16S rRNA 領域のシーケンスによって, naïve マウスでは R-Spo1 によりα-defensin 分泌が増加しても，腸内細菌叢の構成が有意な変化を来たさず，Simson index と Shannon index を用いた多様性解析でも，腸内細菌叢の多様性が有意な変化を来さないことを確認した。

マウスの同種骨髄移植後のGVHDでは，腸幹細胞とパネト細胞が傷害され，著明な腸管dysbiosisを来すが，移植前後にR-Spo1を3日ずつ静脈注射したところ，腸上皮細胞の破壊が抑制され,移植後の腸幹細胞とパネト細胞数が有意に増加した。さらに，R-Spo1はGVHDによる傷害からパネト細胞を保護することにより，糞便中のα　defensin濃度を有意に増加させた。腸内細菌量はR-Spo1治療の有無に関わらず有意な変化を認めなかったが，R-Spo1治療により腸内細菌叢の構成はGVHD群と比較し, 有意に正常腸内細菌叢に近づいており, 菌の多様性も有意に回復していた。R-Spo1による腸管dysbiosisの予防により，R-Spo1投与マウスでは腸管と脾臓でドナーT細胞の浸潤や増殖が有意に抑制され，有意にGVHDが抑制され，生存率が改善した。

最後に，遺伝子組換えCrp4を移植後に経口投与し腸内細菌叢の制御が可能かどうかを検証した。遺伝子組換えCrp4の投与によって腸内細菌量は有意な変化を認めなかった。糞便の16S rRNAのシーケンスを行い腸内細菌叢の構成を比較したところ，Crp4投与によりGVHDによる腸管dysbiosisが改善し，腸内細菌叢の多様性も改善していた。しかし，腸管dysbiosisの改善効果はCrp4投与を中止して11日間経過すると消失し，腸内細菌叢の多様性の改善も消失した。遺伝子組換えCrp4による移植後の生存率改善も移植4週目時点までは認められたが，その後は消失した。遺伝子組換えCrp4の経口投与は移植早期では腸管dysbiosisの改善と一致してドナーT細胞の小腸や肝臓, 脾臓の浸潤を有意に抑制した。

【考察】

R-Spo1はWnt/β-cateninシグナル伝達を介して腸幹細胞の増殖を促し陰窩細胞の過形成を誘導するが，本研究ではR-Spo1が強力なパネト細胞増殖作用を持つことを見出した。さらにNaïveマウスに対するR-Spo1投与は，α-defensinの産生を増加させる作用があることが確認できたが，短期投与では有意な腸内細菌叢の変化は認めなかった。パネト細胞由来のα-defensinを含む抗菌ペプチドは元々共生腸内細菌に対しては最小限の殺菌活性しか有さないため，その分泌量が増加した場合も腸内細菌叢を変化させることなく宿主との共生関係を維持できていると考えられた。

パネト細胞が著明に傷害されるマウスのGVHDモデルでは，R-Spo1がコントロールと比較してGVHDによる傷害からパネト細胞を保護し，糞便Crp4濃度を有意に回復させることを確認した。さらに，R-Spo1はGVHDに起因する腸管dysbiosisを抑制し，GVHD死亡率を低下させた。R-Spo1がGVHDを改善したメカニズムは, 腸管粘膜バリア機能の保護と腸管dysbiosis抑制による局所の炎症性サイトカインの産生やドナーT細胞の活性化の抑制であると考えられた。腸管dysbiosisの抑制作用はR-Spo1と遺伝子組換えCrp4の両方において認められたが，R-Spo1の効果がCrp4より強かった。これはR-Spo1がCrp4以外の他の抗菌ペプチドの産生も増加させていることと，腸幹細胞や上皮細胞傷害に対する保護効果を有していることが理由であると考えられた。

【結論】

腸管エコシステムを保護する新たな治療法として，R-Spo1や遺伝子組換えα-defensin製剤は腸管dysbiosisに対する有効な生理的治療アプローチである。これらは腸管エコシステムを生理的に制御する新しい治療アプローチであり，糖尿病，膠原病，アレルギー，がん等，腸管dysbiosisが関連する様々な医療分野への波及効果が期待できる。