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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　　早瀬　英子

主査　教授　大場雄介
審査担当者　副査　教授　豊嶋崇徳
副査　教授　佐藤典宏
副査　教授　橋野　聡

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)

申請者は腸管エコシステムを保護する新たな治療法としてR-Spondin1 (R-Spo1) と抗菌ペプチドα-defensinに注目し，腸内菌共生バランスの失調（腸管dysbiosis）を来す移植片対宿主病（graft-versus-host disease, GVHD）モデルを用いてR-Spo1と遺伝子組換えα-defensin (crytdin-4; Crp4) の有効性を検証した。本研究ではR-Spo1のパネト細胞増殖作用とα-defensinの増加作用を確認した。GVHDマウスでは，R-Spo1がパネト細胞を保護し，糞便Crp4濃度を回復させ，dysbiosisを抑制した。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dysbiosis抑制であると考えられた。遺伝子組換えCrp4もdysbiosisの抑制作用が認められた。

審査にあたり，まず副査の佐藤教授からGVHDによる腸幹細胞やパネト細胞の傷害は既知の事実かと質問があり，申請者は自身のグループから初めて報告し現在は既知の事実であると回答した。R-Spo1はどのように同種免疫反応を抑制するのかと質問があり，申請者は腸幹細胞やパネト細胞を介して間接的に抑制すると回答した。α-defensinはどのような物質かと質問があり，申請者は短いペプチドであり，細菌膜に穴をあけて殺菌し，グラム陽性・陰性両方に作用するが共生菌には作用が弱いと説明した。GVHDの主症状である下痢は何に起因するかと質問があり，主に腸上皮傷害に起因すると回答した。副査の橋野教授からは内因性にR-Spo1やα-defensinが存在するかと質問があり，申請者はいずれも内因性に存在するがR-Spo1は分泌細胞が現時点で不明であると回答した。R-Spo1は腸幹細胞以外にも作用するかと質問があり，R-Spo1はLgr4, 5を発現する細胞に作用すると回答した。R-Spo1の長期間投与後の変化について質問があり，長期間投与の実験は未施行だがR-Spo1のknock-inマウスでは腸管の延長・肥厚のみが報告されたと説明した。R-Spo1は腸管以外のドナーT細胞も抑制するかと質問があり，腸管GVHDを抑制することで全身性GVHDへの移行を抑制すると回答した。GVHDモデルでのR-Spo1投与時期の決定方法について質問があ

り，申請者は自身の研究グループでの検証で今回のスケジュールが最も有効であったと回答した。抗癌剤前処置の場合ではR-Spo1のGVHD抑制効果はあるかと質問があり，抗癌剤による腸管傷害にもR-Spo1が有効であるため恐らく抑制できると回答した。腸幹細胞やパネト細胞がドナー由来である可能性について質問があり，宿主由来と考えられると回答した。GVHDマウスの死因について質問があり，GVHDの腸上皮傷害に伴う感染症で死亡すると回答した。主査の大場教授からはR-Spo1のノックアウトマウスは存在するかと質問があり，申請者は胎生致死であると回答した。Dysbiosisを来す菌の由来はどこかと質問があり，マウスはSPF飼育下であったため外来菌種ではなく元々腸管内に少数存在する菌の異常増殖であったと回答した。Germ-freeマウスに対するR-Spo1のGVHD抑制効果について質問があり，申請者はgerm-freeマウスではR-Spo1のdysbiosis抑制作用は消失し腸上皮保護作用によりGVHDが改善する可能性があると回答した。R-Spo1はパネト細胞を特異的に分化誘導するのか質問され，申請者は系統追跡実験からパネト細胞は特異的に分化誘導されていると回答した。α-defensinの細胞外分泌に必要なマトリックスメタロプロテアーゼ7（matrix metalloprotease-7, MMP-7）はパネト細胞以外の細胞にも発現しているかと質問があり，申請者はパネト細胞にのみ発現するが，R-Spo1投与マウスではα-defensinよりもMMP-7の発現の方が強い細胞もあると回答した。制御性T細胞を測定したかと質問があり，申請者は以前に測定しAllo群とR-Spo1群で差を認めなかったと回答した。そのデータに関して主査の大場教授より学位論文への追記を指示された。超解像顕微鏡の使用動機ついて質問があり，申請者はR-Spo1によるパネト細胞の脱顆粒像を評価するために行ったと回答した。最後に副査の豊嶋教授からヒトのGVHDにおいてR-Spo1やα-defensinは有効と思うかと質問があり，申請者はヒトの抗菌ペプチドや腸内細菌叢の変化を検証し最適な投与時期を見出すことが重要と回答した。後輩に今回の研究をどのようにつなげるかと質問があり，腸内細菌叢の改善に伴う腸内代謝産物の変化に関する研究につなげたいと回答した。

この論文は、R-Spo1がパネト細胞増殖因子作用を有していること、腸管GVHDからパネト細胞を保護し、抗菌ペプチドα-defensin分泌を介して腸管dysbiosisを抑制することを見出したものであり、今後実臨床での使用や他の疾患への応用が期待されるものである。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研究に対する姿勢や取得単位の状況なども含めて、申請者は博士（医学）の学位を受ける資格を有すると判定した。