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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12570
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70376
Type	doctoral thesis
File Information	Eiko_Hayase.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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)

2017 年 3 月

北海道大学

早瀬英子

学　位　論　文

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)

2017 年 3 月

北海道大学

早瀬英子

目次

発表論文目録および学会発表目録 ・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1頁
緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2頁
略語表 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5頁
実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6頁
実験結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17頁
考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36頁
総括および結論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 42頁
謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44頁
引用文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の成果の一部は以下の論文として投稿中である。

1. Eiko Hayase, Daigo Hashimoto, Kiminori Nakamura, Clara Noizat, Reiki Ogasawara, Shuichiro Takahashi, Hiroyuki Ohigashi, Satomi Matsuoka, Takahide Ara, Emi Yokohata, Tomohiro Yamakawa, Ko Ebata, Takeshi Kondo, Rina Hiramine, Tomoyasu Aizawa, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Hiroshi Mori, Ken Kurokawa, Kazuma Tomizuka, Tokiyoshi Ayabe, and Takanori Teshima

R-Spondin1 restores intestinal microbial ecosystem by stimulating Paneth-cell production of α-defensins

雑誌名 Science Translational Medicine
現在投稿中

本研究の成果の一部は以下の学会で発表した

1. Eiko Hayase, Daigo Hashimoto, Kiminori Nakamura, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Ken Kurokawa, Tokiyoshi Ayabe, and Takanori Teshima

R-spondin1 promotes Paneth cell growth, maintains intestinal microbial ecology, and ameliorates GVHD

57th ASH Annual Meeting and Exposition, 2015年12月5-8日, 米国オーランド

2. Eiko Hayase, Daigo Hashimoto, Kiminori Nakamura, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Ken Kurokawa, Tokiyoshi Ayabe, and Takanori Teshima

R-spondin1 promotes Paneth cell growth, maintains intestinal microbial ecology, and ameliorates GVHD

The 7th JSH International Symposium, 2016年5月13-14日, 日本, 兵庫県

緒言

ヒトは腸内細菌叢を内蔵している生命体である[1]。消化管は飲食物や微生物など常に外界から刺激を受けている粘膜免疫の主要な部位であり，消化管内には数兆もの細菌からなる常在細菌叢が存在し，宿主の代謝や免疫において重要な役割を担っている[2,3]。*Firmicutes* 門や *Bacteroidetes* 門はヒトやマウスにおいて腸内細菌叢の約 90%を占める共生菌である[4-6]。共生菌は宿主の代謝や免疫等に影響し，健康維持において必須の存在である[4,5,7]。腸幹細胞は腸上皮細胞や分泌系細胞に分化し，増殖と分化の間のバランスによって腸管ホメオスタシスを維持している[8]。消化管は粘膜上皮および粘液層による物理的なバリアによって細菌の侵入を防ぎ，さらに，抗菌ペプチドを管腔内に分泌することによって病原性細菌の増殖を抑制し，正常な常在菌叢を維持している。パネト細胞は小腸に存在し，小腸陰窩基底部で腸幹細胞と隣接して存在し腸幹細胞のニッチを形成する[9]と同時に，様々な抗菌ペプチドを管腔内に分泌する重要な腸内細菌叢制御因子である[10]。特にパネト細胞が分泌するα-defensin は腸管における主要な抗菌ペプチドであり，病原菌に対しては殺菌活性を有するが共生菌には活性が低いという選択的抗菌活性を有している。また，α-defensin はパネト細胞から放出される抗菌ペプチドのうち約 70%の殺菌活性を占めており，腸内細菌叢構成の重要な調節因子である[6,11-13]。一方，感染症に対して用いられる抗菌薬は病原性細菌と共生菌を区別できないため病原性細菌のみならず共生菌も減少させ腸内細菌叢を乱す（腸管 dysbiosis）[14,15]。腸管 dysbiosis は病原性細菌の増殖，腸内細菌の多様性の低下，有益な共生菌の喪失によって特徴づけられる。近年，肥満やアレルギー性疾患，多発性硬化症，自己免疫性関節炎，1 型糖尿病，急性後天性免疫不全ウイルス感染症，炎症性腸疾患，移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) など様々な病態や疾患に腸管 dysbiosis が関連することが報告されている[4,16-21]。

同種造血幹細胞移植は造血器悪性腫瘍や骨髄不全症，先天性代謝疾患などにおける根治療法の一つであるが，同種造血幹細胞移植後に発症する GVHD や感染症は患者の生存を脅かし，生活の質を低下させる重要な合併症である[22]。GVHD は大きく急性と慢性に分けられ，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り，消化管は急性 GVHD の代表的な標的臓器である。移植前処置である全身放射線照射や抗癌剤，消化管 GVHD による

消化管傷害は全身の GVHD の増悪につながることもあり，しばしば致死的である[22]。

小腸陰窩基底部に存在する腸幹細胞とそのニッチであるパネト細胞は GVHD の標的であり，パネト細胞の消失による抗菌ペプチドの産生障害は，造血幹細胞移植後の腸管 dysbiosis に繋がる[14,23-26]。すなわち，腸幹細胞ニッチシステムの破綻による腸管ホメオスタシスの破綻が GVHD の病態形成に関連する。GVHD により病的状態となった腸内細菌叢，つまり腸管 dysbiosis は，リポ多糖類を始めとする pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を産生し，腸管バリア機能の減弱によるバクテリアルトランスロケーションによって生体内へと侵入し，自然免疫系を刺激することによりさらに炎症反応を助長し消化管傷害を重症化させる[23]。つまり，GVHD によって腸内細菌叢が変化するだけではなく，腸内細菌叢の変化も GVHD の重症度に直接影響していると考えられる[14,23,27]。そのため腸管 dysbiosis を予防もしくは改善することは GVHD の治療法としても有望である。しかしながら，現在の腸管 dysbiosis に対する治療戦略はプレバイオティクス/プロバイオティクスや菌叢移植を用いた“bacteriotherapy”であり，宿主側の腸管エコシステムを標的とした，より生理的なアプローチはこれまで存在しなかった。

腸上皮細胞のターンオーバーはわずか3日程度であり，腸管粘膜によるバリア機能を保つためには持続的に腸幹細胞から腸上皮細胞が再生され続ける必要がある。腸上皮細胞の増殖の調節にはWnt/β-cateninシグナルが大きく関わっている[28]。Wnt作動薬であるR-Spondin1 (R-Spo1) は2005年に腸管上皮の成長因子として報告され，これまで化学療法や放射線照射によって傷害された腸上皮細胞の再生を促進する作用があることが示されている[29,30]。R-Spo1はleucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor (Lgr) 5を介して腸幹細胞の分化を促進し，マウスの移植モデルにおいてGVHDから腸幹細胞を保護し全身性にGVHDを改善する[24,31]。一方でWnt/β-cateninシグナルは*in vitro*において腸幹細胞のパネト細胞への分化も担っていることが報告されている[29,32-34]。

我々は，腸管 dysbiosis が関連する疾患において，パネト細胞による抗菌ペプチドの産生を保つことが，腸管エコシステムを保護する治療アプローチとして利用可能か否かを検討することとした。特に本研究では，著明な腸管 dysbiosis を来すことが報告されているマウスの GVHD モデルを用いて，*in*

vitro でパネト細胞の分化を誘導することが指摘されている R-Spo1 と抗菌ペプチドの中でも病原性細菌に対する抗菌活性の高いα-defensin の効果を検証した。その結果，*in vivo* において R-Spo1 がパネト細胞増殖因子であることを世界で初めて証明し，さらに R-Spo1 による抗菌ペプチドα-defensin の産生増加や，遺伝子組換えα-defensin 製剤の経口投与が腸管 dysbiosis の予防に対して有効であることを示した。

こうしたパネト細胞増殖因子や抗菌ペプチドを用いた，新たな腸管 dysbiosis 治療法は，様々な dysiosis 関連疾患に苦しむ患者に幅広い恩恵をもたらすと考えられる。

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。

Crp1	cryptdin-1
Crp4	cryptdin-4
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	estrogen receptor
FCS	fetal calf serum
GVHD	graft-versus-host disease
H&E	hematoxylin and eosin
HLA	human a-lactalbumin
IL-22	interleukin-22
IRES	internal ribosome entry site
Lck	lymphocyte protein tyrosine kinase
Lgr	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor
MMP	matrix metalloproteinase
OTUs	operational taxonomic units
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PERMANOVA	permutational multivariate analysis of variance
RBC	red blood cell
Reg3	regenerating islet-derived protein 3
RFP	red fluorescent protein
R-Spo1	R-Spondin1
TMB	3,3’,5,5’-tetramethylbenzidine
TNF	tumor necrosis factor

実験方法

マウス

7週齢の雌のC57BL/6 (B6: H-2^b)，B6D2F1 (H-$2^{b/d}$)，DBA/2 (H-2^d) マウスを日本クレア (Tokyo, Japan) から購入し，同様のBALB/c (H-2^d) マウスを日本チャールズリバー (Yokohama, Japan) から購入した。本学の動物実験施設に搬入後最低1週間の期間をおき8週齢以上のマウスを本実験に使用した。さらに下記の遺伝子組換えマウスを使用した。

B6-*Lgr5-enhanced green fluorescent protein (EGFP)-internal ribosome entry site (IRES)-cre-estrogen receptor^{T2} (ER^{T2})* (B6-*Lgr5-EGFP-creER^{T2}*)[35]

Lgr5陽性細胞にEGFPと，タモキシフェンのみに結合するように改変された変異型エストロゲンレセプターであるER^{T2}とcreリコンビナーゼの融合蛋白$creER^{T2}$を発現しているマウスである。タモキシフェンを投与すると，Lgr5陽性細胞において$creER^{T2}$は核内に移行し，creリコンビナーゼによるloxP認識配列を標的とした遺伝子再構成が生じる。Lgr5を発現する細胞がEGFPで標識されているため，Lgr5を発現する腸幹細胞の定量に使用した。Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入した。

B6.*Cg-Gt(ROSA)26Sor$^{tm14(CAG-tdTOMATO)Hze/J}$* (B6-*R26^{Tomato}*)[36]

LoxP認識配列の間にあるSTOP配列が，その下流にある蛍光色素tdTOMATOの発現を抑制しているB6マウスである。Creリコンビナーゼが作用すると，遺伝子再構成によってSTOP配列が消失し，CAGプロモーターによってtdTOMATOが発現する。Jackson Laboratoryから購入した。

B6.*Cg-Tg[lymphocyte protein tyrosine kinase (Lck)-cre]548Jxm/J* (B6-*Lck-cre*)[37]

T細胞に特異的に発現するLckプロモーター下に，creリコンビナーゼを発現するB6マウスである。T細胞のみでloxP認識配列を標的とした遺伝子再構成が生じる。Jackson Laboratoryから購入した。

B6-*Lgr5-EGFP-creER^{T2}*×B6-*R26^{Tomato}*

雌のB6-*R26^{Tomato}*マウスと雄のB6-*Lgr5-EGFP-creER*を交配させて作製した。Lgr5陽性細胞にEGFPを発現する。タモキシフェンを投与すると，Lgr5陽性細胞でred fluorescent protein (RFP)であるtdTOMATOが発現され，RFPは細胞が分裂してもLgr5の発現が低下しても保たれる。Lgr5陽性腸幹細胞とその腸幹細胞から分化した細胞がRFP陽性となるため，免疫染色によって腸管細胞からのパネト細胞分化を評価するために使用した。

B6D2F1-*Lgr5-EGFP-creER^{T2}*

雌のDBA/2と雄のB6-*Lgr5-EGFP-creER^{T2}*を交配させて作製した。Lgr5を発現する腸幹細胞を定量するために使用した。

B6-*Lck-cre*×B6-*R26^{Tomato}*

雌のB6-*R26^{Tomato}*と雄のB6-*Lck-cre*を交配させて作製した。T細胞に特異的にRFPを発現するため，移植後のドナーT細胞の追跡のために使用した。

これらのマウスは本学の動物実験施設にて繁殖飼育し8週齢以上のマウスを本実験に使用した。本研究のために実施した動物実験と遺伝子組換え実験については，北海道大学動物実験に関する規程と北海道大学遺伝子組換え実験の安全管理規定に従い，動物実験（承認番号: 12-01016）と遺伝子組換え実験（承認番号: 24(30)）の承認の上実施した。

試薬

遺伝子組換えヒトR-Spo1はヒトR-Spo1をコードするcDNAを含むpcDNA3.1/Intron constructを遺伝子導入したChinese Hamster Ovary細胞を培養し，酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) とウエスタンブロットでヒトR-Spo1レベルを評価し，カラムを用いて純化したものを協和発酵キリン株式会社より提供を受け使用した[29,30]。

遺伝子組換えcryptdin-4 (Crp4)（α-defensinのサブタイプの1つ）はhuman α-lactalbumin (HLA; GenBank accession No. NM002289) とCys-less HLAを組み込んだベクターpCOLA-Crp4をE. coli BL21 (DE3) に導入・培養し，Bugbuster protein extraction reagent (Novagen, Madison, WI) を用いて抽出した。遺伝子組換えCrp4は共同研究者である北海道大学理学部の平峰里奈，北海道大学先端生命科学研究院先端融合科学研究部門生命分子科学分野の相沢智康准教授より精製された[38]。

タモキシフェン，ストレプトマイシン，メトロニダゾールはSigma Aldrich (St Louis, MO) より購入し，アンピシリンとバンコマイシンはWako (Osaka, Japan) より購入した。

マウスの骨髄移植モデル

レシピエントとして 8～12 週齢の雌の B6D2F1 (H-2$^{b/d}$) またはB6D2F1-*Lgr5-EGFP-creER^{T2}* (H-2$^{b/d}$)マウスを使用し，syngeneic 群のドナーマウスには B6D2F1 (H-2 $^{b/d}$), allogeneic 群のドナーマウスには B6 (H-2^{b})を使用した。ドナーT 細胞の追跡のための実験では，B6-*Lck-cre*×B6-*R26^{Tomato}* (H-2^{b})

マウスをドナーとして B6 (syngeneic 群)と B6D2F1 マウス (allogeneic 群) に移植した。レシピエントマウスに，前処置として 4 時間以上間隔をあけて 2 回，計 12～13 Gy の全身放射線照射を行った。放射線照射装置は MBR-1520R-3 (HITACHI, Tokyo, Japan) を使用し，管電圧 125 kV，管電流 15 mA，照射台の位置を 500 mm に設定し，フィルター 0.5 mm Al + 0.2 mm Cu を用いた。移植グラフトの作製は次のように施行した。まずドナーマウスをイソフルランで麻酔した上で安楽死させ，脾臓と下腿を採取した。脾臓はディッシュ上で滅菌したスライドガラスですりつぶし，RPMI-1640 (Sigma Aldrich) + 4% fetal calf serum (FCS) の培養液でスライドガラスを洗い，その後 50 ml チューブに 70 μm cell strainer を介して脾細胞が懸濁した培養液を移した。4℃, 300 g で 5 分間遠心し，上清を破棄した。沈殿した細胞を red blood cell (RBC) lysis buffer (555899; BD Biosciences, Tokyo, Japan) 2 ml で懸濁し室温で 2 分静置して赤血球を溶血させ，20 ml の培養液を加えた。4℃，300 g で 5 分間遠心し，上清を破棄した。沈殿した細胞を培養液で懸濁し，血球計算盤を用いて細胞数をカウントした。次に，採取した下腿からメスを用いて筋肉を外し，大腿骨と脛骨の両端をはさみで切断し，25 G 針と 1 ml シリンジを使って培養液で骨髄をディッシュ上に押し出した。10 ml シリンジと 18 G 針を使ってディッシュ上で骨髄液を懸濁し，それから 50 ml チューブに 70 μm cell strainer を介して骨髄液を移した。4℃，300 g で 5 分間遠心し，上清を破棄した。沈殿した細胞を RBC lysis buffer 2 ml で懸濁し室温で 2 分静置して赤血球を溶血させ，20 ml の培養液を加えた。4℃，300 g で 5 分間遠心し上清を破棄した。沈殿した細胞を培養液で懸濁し，血球計算盤を用いて細胞数をカウントした。レシピエントマウス 1 匹あたり脾細胞 5×10^6 と骨髄細胞 5×10^6 をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS) 250 μl に懸濁した。2 回目の放射線照射から 2 時間以上間隔をあけて，グラフトを尾静脈より輸注した。

レシピエントマウスは特定病原体除去環境下でオートクレーブ滅菌した酸性水 (pH 2.5) を用いて飼育し，移植後の生存率は毎日確認した。GVHD の臨床的重症度の評価はスコアリングシステム[39]を用いて週 2 回以上評価した（表 1)。グラフト輸注日を day 0 とし，R-Spo1 は移植の day -3～-1 と day +1～+3 に 100 μg を PBS 100 μl に希釈して 1 日 1 回尾静脈より輸注した。Crp4 は day +3～+7 に滅菌水 150 μl に Crp4 125 μg を溶解したものを 1 日 2 回経口ゾンデにて麻酔下に経口投与した。抗菌薬による腸内殺菌の実験ではストレプトマイシン，メトロニダゾール，アンピシリン，バンコマイシンの 4 剤の抗菌薬を, 移植 day -7 から飲水ボトルに 1 g/L の濃度で加え自由飲水させた。

表 1: Assessment of Clinical GVHD in Transplanted Animals[39]

Criteria	Grade 0	Grade 1	Grade 2
Weight loss	<10%	>10% to <25%	>25%
Posture	Normal	Hunching noted only at rest	Severe hunching impairs movement
Activity	Normal	Mild to moderately decreased	Stationary unless stimulated
Fur texture	Normal	Mild to moderate ruffling	Severe ruffling/poor grooming
Skin integrity	Normal	Scaling of paws/tail	Obvious areas of denuded skin

免疫組織学的評価

病理学的評価のための固定液として蛍光免疫染色を行う検体には4%パラホルムアルデヒドを用い，ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin; H&E) 染色を観察する検体には10%中性緩衝ホルマリン (062-01661;Wako) を用いた。4%パラホルムアルデヒドは次の様に調整した。1リットルの三角フラスコに500 mlの蒸留水を入れガスにかけ温め，スターラーで勢いよく混ぜ, 40 gのパラホルムアルデヒド (104005; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を入れた。ここに蒸留水に溶いた水酸化ナトリウムを少しずつ加え白濁した溶液が透明になった時点で止め, フラスコを氷中で急冷した。$Na_2HPO_4/12H_2O$ 28.7 gと$NaH_2PO_4/2H_2O$ 2.98 gを500 mlの蒸留水に溶かし0.2 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) を作製し，氷で冷やした。8%パラホルムアルデヒドと0.2 Mリン酸ナトリウム緩衝液を等量ずつ混ぜ，濾紙で濾して完成した4%パラホルムアルデヒドを冷蔵保存し１ヶ月以内に使用した。

腸管検体はパネト細胞を観察するために胃から大腸肛門側まで一塊にして取り出した後，結合組織や脂肪組織を外し，上部・中部・下部に3等分した。内腔を10%中性緩衝ホルマリンまたは4%パラホルムアルデヒドで洗い，縦に切開した後, 口側が内側かつ内腔が外側となるように細い棒に腸管を巻き付け, 10%中性緩衝ホルマリンまたは4%パラホルムアルデヒドで一晩固定してSwiss role標本を作製した。翌日にパラフィン包埋し，切片を作製し，

H&E染色，蛍光免疫染色を施行した。パラフィン包埋，切片作製，H&E染色は札幌総合病理研究所に外注依頼した。

蛍光免疫組織染色には，一次抗体として rabbit anti-lysozyme (A0099; Dako Japan, Kyoto, Japan)，rat anti-cryptdin-1 (Crp1;77-R63)，rabbit anti-matrix metalloproteinase (MMP)-7 (D4H5; Cell Signaling Technology Japan, Tokyo, Japan)，chicken anti-EGFP (ab13970; Abcam, Tokyo, Japan)，rabbit anti-RFP (ab34771; Abcam)を使用した。二次抗体は Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (A11034; Invitrogen, Carlsbad, CA)，Alexa Fluor 488 goat anti-chicken IgG (A11039; Invitrogen)，Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (A31572; Invitrogen)，Alexa Fluor 555 goat anti-rat IgG (A21434; Invitrogen)，Alexa Fluor 647 goat anti-rat IgG (A21247; Invitrogen) を使用した。札幌総合病理研究所に外注依頼し作製した未染標本を脱パラフィン処理（100％キシレンに 5 分 ×3 回，100%エタノールに 3 分 ×2 回，95%エタノールに 3 分 ×1 回，80%エタノールに 3 分 ×1 回，70%エタノールに 3 分 ×1 回，水に 3 分 ×2 回，PBS に 3 分 ×1 回）し，ビーカーに抗原賦活化溶液 (S2031; Dako) と脱パラフィン処理した標本を入れてオートクレーブを用いて抗原賦活化（105℃, 20 分）した。室温まで冷ました後，PBS で洗った。ブロッキングはブロックエース粉末 (X0907; Yukijirushi, Tokyo, Japan) 4 g を蒸留水 100 ml で溶解したもので正常ヤギ血清 (X0907; Dako) を 10 倍希釈したものを使用し，このブロッキング溶液を切片にのせ 30 分おいた。その後，PBS で洗浄した。一次抗体は Tris-bufferd saline を用いて rabbit anti-lysozyme は 1:200，rat anti-Crp1 は 1:50，rabbit anti-MMP-7 は 1:100，chicken anti-EGFP は 1:500，rabbit anti-RFP は 1:400 に希釈した。この一次抗体を切片に 100 µl のせ, 4℃で一晩おいた。翌日 PBS で標本を洗浄した。二次抗体は Tris-bufferd saline を用いて 1:200 に希釈した。切片に 100 µl のせ，室温で遮光し 1 時間おいた。PBS で洗浄した後，PBS + 0.1% bovine serum albumin で 1 µg/ml に調整した 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (D1306; Invitrogen) を切片に 100 µl のせ, 室温で遮光し 15 分おいた。PBS で洗浄した後，フルオロゲル (17985-10; Electron Microscopy Sciences, Tokyo, Japan) を用いてカバーガラスで切片を封入した。

H&E染色を行った標本は光学顕微鏡 (BX50; Olympus, Tokyo, Japan) に装着したデジタルカメラ (DP20; Olympus) を用いて撮影した。蛍光免疫染色を行った標本はKeyence BZ-X700蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) または共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000D; Olympus)，超解像度顕微鏡 (SD-OSR; Olympus) を用いて撮影した。

パネト細胞は陰窩内の好酸性顆粒を有する細胞と定義し，パネト細胞数は 10 陰窩中の好酸性顆粒を有する細胞数の平均値として評価した。EGFP 陽性細胞数や RFP 陽性細胞数も同様に 10 陰窩中の EGFP 陽性細胞数や RFP 陽性細胞数の平均値として評価した。

腸管粘膜固有層のリンパ球分離

小腸と大腸を採取し，盲腸を取り除いた。乾燥を防止し壊死細胞を減らすため, PBS を湿らせた濾紙の上で冷却しながら腸管から脂肪組織とパイエル板を取り除いた。小腸を 4 分割，大腸を 2 分割し，小腸と大腸から便を押し出し，腸管を長軸方向に切り開いた。小腸，大腸に分けて complete medium (PBS + 2% FCS) 15 ml 入りの 50 ml チューブに入れ 15 秒間 vortex を行った。Complete medium を排液し，再度小腸，大腸を新しい complete medium 15 ml 入りのチューブに入れ 15 秒間 vortex を行った。この処理を 2 回くり返した。0.5 M DL-dithiothreitol (43819; Sigma Aldrich) 50 µl + 5M EDTA 65 µl + 1 M HEPES solution buffer (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) 62.5 µl + complete medium 25 ml に小腸と大腸を入れ，振盪しながら 20 分間，37℃で培養した。溶液を排液し，小腸と大腸を 5M EDTA 65 µl + 1 M HEPES solution buffer 62.5 µl + complete medium 25 ml 入りのチューブに入れた。振盪しながら 40 分間, 37℃で培養した。溶液を排液し，小腸と大腸を complete medium で濯いだ後，0.3 mg/ml type IV collagenase + 培養液 (RPMI + 10% FCS) 入りのディッシュの中に入れ，できるだけ小さくなるようにハサミでサンプルを刻んだ。45 分間，37℃で培養した後，シリンジを用いて小腸と大腸サンプルをホモジナイズし，70 µm cell strainer を介して新しいチューブに移した。上記の方法でチューブ内に回収した粘膜固有層の細胞懸濁液を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

フローサイトメトリー解析

Fluorescein isothiocynate，phycoerythrin，phycoerythrin-Cy7，peridinin-chlorophyll protein-Cy5.5，allophycocyanin，allophycocyanin-Cy7 標識モノクローナル抗体を Pharmingen (San Diego, CA) または eBioscience (San Diego, CA) から購入し使用した。

少なくとも 300,000 の生細胞を 200 倍希釈した上記の標識抗体で 4℃暗所下に 30 分静置し反応させ，FACSCantoII (BD Biosciences, Tokyo, Japan) と FlowJo software (Tree Star, OR) を用いて解析した。また，腸管粘膜固有層の細胞数をカウントするために，腸管粘膜固有層の細胞懸濁液 50 µl に対し，

counting beads (C36950; Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) 10 µl (0.104～0.108×10^5 beads) を加え, CD45陽性細胞数をFACSCantoIIとFlowJo softwareを用いて解析した。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

移植マウスの糞便は，マウスを1匹ずつ個別のケージに分け飼育し，翌日に24時間分をケージ内より回収した[25,40]。回収した糞便は自然乾燥させた後，bead beater-type homogenizer (Beads Crusher µT-12, TAITEC, Koshigaya, Japan)を用いて粉砕し，ELISA施行日までは-80℃で凍結保存した。

ELISAは次の様に施行した。粉砕した糞便をPBSに懸濁し，4℃で1時間vortexした。20,000 gで20分間遠心分離を行い，上清100 µlをCrp1とCrp4測定に使用した[25,40]。上清100 µlをCrp1モノクローナル抗体とCrp4モノクローナル抗体でコートされたウェルに入れ，25℃で2時間インキュベートした。洗浄後，0.5 mg/mlのビオチン化抗体100 µlを加え，25℃で1時間インキュベートした。その後Streptavidin-HRP (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ) 100 µlをウェルに加え，25℃で1時間インキュベートした。洗浄後，3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 発色基質を加え, 25℃で30分間培養した。反応をストップし，マイクロプレートリーダー (Multiscan FC, Thermo Scientific, Waltham, MA) を用いて450 nmで吸収値を決定した。Crp1とCrp4のELISAは共同研究者である北海道大学先端生命化学研究院自然免疫研究室綾部時芳教授，中村公則准教授が行った。

定量リアルタイムPCR法

組織よりRNAを抽出し，cDNAを作製した。RNAの抽出方法は下記の様に行った。まずISOGEN II (311-07361; Nippongene, Toyama, Japan) に入れて凍結保存しておいた腸管を氷冷下に解凍し, Tissue Ruptor (9001271; QIAGEN, Tokyo, Japan) を用いてホモジナイズした。ホモジナイズした溶液を新しいチューブに全量移し，RNase-free waterを200 µl加えた。Vortexで撹拌し，室温で5分間静置させた。4℃，12,000 gで15分間遠心分離を行った。分離した上清500 µlを新しいチューブに移した。2 µlのエタ沈メイト (312-01791; Nippongene) と500 µlの2-プロパノール (Wako) を添加し，vortexで良く混合させた。室温で10分間静置させた。4℃，12,000 gで15分間遠心分離を行い，上清を破棄した。1 mlの75%エタノールを添加し，撹拌せず4℃，12,000 gで15分間遠心分離をした。これを2回くり返した後，真空アスピレーターを用

いてペレットを乾燥させ，RNase-free waterを加え，60℃で15分間温めた。NanoDrop (Thermo Scientific) を用いてRNA量を測定した。RNA 1,000 ngを用いて各サンプルからcDNAを作製した。cDNA作製にはReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (FSQ-301; Toyobo, Osaka, Japan) を使用した。作製方法は，まずRNA 1,000 ngをRNase-free waterを用いて12 µlに調整し，4×DN Master Mix (Toyobo) 4 µlを加えて37℃で5分間インキュベートしゲノムDNA除去反応を行った。次に5×RT Master Mix II (Toyobo) を4 µl加え，37℃で15分間，50℃で5分間，98℃で5分間インキュベートし，逆転写反応を行った。反応終了後は-20℃で保存した。

定量リアルタイムPCRは，まず200 µl用チューブで上記方法を用いて作製し凍結保存しておいたcDNA 2 µlを滅菌水で5倍希釈する。1サンプルあたりTaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) 25 µl，20× Probe 2.5 µl，滅菌水 12.5 µlを混合し，これを5倍希釈したcDNA 10 µlに加える。これらを15 µlずつ96ウェルプレートに加え，表面をシールし，4℃，300 gで2分間遠心分離した。プローブは*Defa4* (Mm00651736_g1; Applied Biosystems)，*Mmp7* (Mm00487724_m1; Applied Biosystems) を使用し，内因性コントロールとして *18S rRNA* (forward primer; 5’-GCTCTTTCTCGATTCCGTGGG-3’ , reverse primer; 5’-ATGCCAGAGTCTCGTTCGTTATC-3’ , probe; FAM-CTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACC-TAMRA [Sigma Aldrich]) を使用した。定量リアルタイムPCRはABI StepOne System (Applied Biosystems) 上で行った。

糞便細菌量の定量

新鮮な糞便を個々のマウスから採取し，PowerFecal DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, CA) に含まれる溶液とチューブを使用して次の様に糞便中のDNAを抽出した。Solution C1を使用前に溶解されるまで60℃に温めた。糞便サンプルをDry Bead Tubeに入れ，Bead Solution 750 µlをDry Bead Tubeに加え，軽くvortexした。温めたSolution C1を60 µl加え，何回か転倒混和した後，チューブを65℃で10分間温め，bead beater-type homogenizer (TAITEC) を使用して水平にチューブを3,200 rpmで10分間クラッシュさせた。13,000 gで1分間チューブを遠心し，Collection Tubeに上清を500 µl移した。Solution C2を250 µl加え軽くvortexし，4℃で5分間インキュベートした。13,000 gで1分間チューブを遠心し，ペレットを避けてCollection Tubeに上清600 µl以下の量を移した。Solution C3を200 µl加え，しっかりvortexし，4℃

で5分間インキュベートした。13,000 gで1分間チューブを遠心し，ペレットを避けてCollection tubeに700 µl上清を移した。Solution C4を使用前によく振って混ぜ，上清に1,200 µl加え，5秒間vortexした。上清をSpin Filterの上に650 µlのせ，13,000 gで1分間チューブを遠心した。通り抜けた液体を破棄し，全ての上清がSpin Filterの上に載せられるまで繰り返した。Solution C5をSpin Filterの上に500 µl加え，13,000 gで1分間チューブを遠心し，通り抜けた液体を破棄した。13,000 gで1分間チューブを遠心し，Spin Filterを新しいCollection Tubeに移した。Solution C6をSpin Filterの中央に100 µl加え13,000 gで1分間チューブを遠心し，Spin Filter basketを破棄した。チューブ内に抽出したDNAの量をNanoDrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。DNAはPCRを施行するまで-80℃で凍結保存した。

定量リアルタイムPCRは次のように行った。まず200 µlチューブで上記方法を用いて抽出したDNA 2 µlを滅菌水で5倍希釈した。1サンプルあたりTaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) 25 µl，20× Probe 2.5 µl，滅菌水12.5 µlを混合し，これを5倍希釈したDNA 10µlに加えた。これらを15 µlずつ96ウェルプレートに加え，表面をシールし，4℃，300 gで2分間遠心分離した。プローブは*16S rRNA* (Forward primer; 5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’，Reverse primer; 5’-CTGCTGCCTYCCGTA-3’，Probe; FAM-TAA+CA+CATG+CA+AGT+CGA-BHQ1, YはC+T, 下線部はlocked nucleic acid [Sigma Aldrich]) を使用した。Naïveマウス4匹の便の*16S rRNA*発現量を1として各群の*16S rRNA*発現量を比較した。定量PCRはABI StepOne System上で行った。

糞便中の細菌DNA抽出，16S rRNAの増幅，MiSeqシーケンス

新鮮な糞便を個々のマウスから採取し，PowerFecal DNA Isolation Kitを使用して糞便中のDNAを前述のように抽出した。

16S metagenomic sequencing library protocol (Illumina, Tokyo, Japan) に従って，糞便から抽出したDNAの16S rRNA遺伝子のV3-V4可変領域をPCRで増幅した。プライマーは Forward primer; 5’-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3’ と reverse primer; 5’-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3’を用いた。PCRは2.5 µl DNA template (5 ng/µl) とforward primer (1 µM)，5 µl reverse primer (1 µM)，12.5 µlの2× Kapa HiFi HotStart ReadyMix

(KK2602; KAPA Biosystems, Wilmington, MA) を使用した。PCRサイクルは，95℃・3分のDNA鎖の熱変性後，95℃・30 秒，55℃・30秒，72℃・30秒を25サイクル，最後に72℃・5分の伸長反応とした。完成したPCR産物はAMPure XP magnetic bead based purification (A63881; Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA) を用いて純化した。純化の手順は，まずAMPure XP beadsを室温に戻し，均一になるようにAMPure XP beadsを30秒間vortexした。AMPure XP beadsを20 µlずつAmplicon PCR産物を入れた96ウェルプレートに入れた。丁寧にピペッティングを10回行い，5分間静置して室温でインキュベートした。プレートをマグネットスタンドの上に2分間置き，マグネットスタンド上にプレートをおいたままマルチチャネルピペットを使って上清を採り破棄した。マグネットスタンド上にプレートをおいたまま，80%エタノールをそれぞれのウェルに200 µlずつ入れ，30秒間マグネットスタンド上でプレートをインキュベートし，その後上清を取り除き破棄した。マグネットスタンド上にプレートをおいたまま，同様に2回目のエタノール洗浄を同様に行った。プレートはマグネットスタンドの上においたまま，beadsを10分間空気乾燥させる。マグネットスタンドからプレートをはずし，マルチチャネルピペットを使ってプレートのウェルに10 mM Tris pH 8.5を52.5 µl加えた。やさしくピペットで10回上下し，beadsが十分に撹拌されたら2分間室温でインキュベートした。上清50 µlを新しい96ウェルプレートに移し，これを二次PCR反応に用いた。二次PCR反応は個々の純化したDNA 5 µlにインデックスを付けるために行った。Nextera XT index 1とindex 2プライマー (FC-131-1002; Illumina) を使用し，個々のPCRは5 µlのindex 1プライマーと5 µlのindex 2プライマー，25 µlの2×Kapa HiFi HotStart ReadyMix，10 µlのPCR grade waterを用いて行った。PCRサイクルは，95℃・3分のDNA鎖の熱変性後，95℃・30 秒，55℃・30秒，72℃・30秒を8サイクル，最後に72℃・5分の伸長反応とした。8サイクルのPCR増幅後，PCR産物はAMPure XP magnetic bead based purificationを用いて純化した。サンプルはシーケンス前にクオリティ解析をAgilent Bioanalyserを用いて行った。Bioanalyserからサンプル濃度を算出し，10 mM Tris pH 8.5を用いて4 nMに調整した。シーケンスはゲノム支援＜MEXT KAKENHI (No.221S0002)＞のサポートの元，サンプルは九州大学大学院医学研究科細菌学分野に提出し，標準的なIlluminaシーケンスプロトコールに従ってMiSeq (Illumina) を用いてシーケンスを施行して頂いた。

バイオインフォマティクス解析

MiSeqを用いたシーケンスデータの品質改善のため，解析を行う前に曖昧塩基を含むリードまたはBowtie 2 search (version 2.2.3) によってPhiXゲノムシーケンスにマップされたリードは除いた[41]。その後，paired-endライブラリーのforwardリードとreverseリードはUSEACH (version 7.0.1090) を用いて統合した[42]。アダプタ配列除去のためTagCleanerを用いてforwardプライマーシーケンスとreverseプライマーシーケンスを除いた[43]。350塩基未満または650塩基より大きいリードとIllumina MiSeq sequencerで計算された平均Phred-like quality scoreが25未満のリードを除き，品質の高いリードを得た。シーケンスクラスタリングにはUCLUST (version 7.0.1090) を用い，97%以上の一致[42]， 80%以上のquery coverageとreference coverageであるリードを使用して行った。Chimeric operational taxonomic units (OTUs) が検出された場合は，OTUsがreference gold database (http://drive5.com/uchime/gold.fa) における (i) UCHIME (version 7.0.1090) reference mode search，(ii) UCHIME de novo mode searchの両方でキメラに当てはまった場合は除いた[44]。分類学的割り付けはブートストラップ値が0.5より大きいものをRDP MultiClassifier (version 1.1) searchを用いて行った[45]。異なる治療を受けたマウス間の属の構成の差を主成分解析によって視覚化した。Rソフトウェアのveganライブラリーにおけるの Bray-Curtis dissimilarity indexを用いてpermutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) によって統計学的に解析した。Bonferroni補正を用いて有意差を認める群の組み合わせを算出した。属レベルでSimpson indexとShannon indexを用いて細菌コミュニティの多様性を計算した[46,47]。

バイオインフォマティクス解析はゲノム支援<MEXT KAKENHI (No.221S0002) >のサポートの元, 国立遺伝学研究所生命情報研究センターの森宙史先生，黒川顕先生に施行して頂いた。

統計解析

2群間のデータ比較にはMann-Whitney U検定を使用した。3群間以上のデータ比較にはOne-way analysis of varianceと多重比較検定を行った。生存率の解析にはKaplan-Meier法を用いた。生存曲線の比較解析にはlog-rank検定を使用した。経時的変化の解析においてはTwo-way analysis of varianceと多重比較検定を行った。回帰直線ではSpearman解析を用いて相関係数を算出した。解析はJMP Pro Version 11.0.0 (SAS, Cary, NC) とPrism Version 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) を使用した。上記解析においては，$P < 0.05$を統計学的に有意と考え，*は$P < 0.05$，**は$P < 0.01$, ***は$P < 0.001$，†は$P < 0.005$として有意差を表記した。

実験結果

R-Spo1は腸幹細胞の増殖を刺激し，パネト細胞への分化を促進する

R-Spo1が*in vivo*においてLgr5陽性腸幹細胞を増殖させるかどうか検証するために，B6-*Lgr5-EGFP-creER*^{T2}マウスに経静脈的にR-Spo1 200 μgを3日間投与した。4日目に小腸全体を採取し，小腸の蛍光免疫染色にてEGFP陽性腸幹細胞数がR-Spo1投与により有意に増加している所見を確認した (**Figure 1A, B**)。

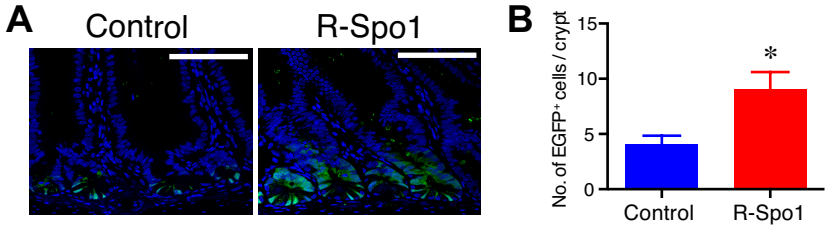


Figure 1: (**A**, **B**) B6-*Lgr5-EGFP-creER*^{T2}マウスに3日間R-Spo1 (200 μg/day) またはPBSを経静脈的に投与した。(**A**) 共焦点顕微鏡画像。EGFP（緑）はLgr5陽性細胞を示す。核の染色にはDAPI（青）を使用した。Bar, 100 μm。(**B**) 1陰窩における平均EGFP陽性細胞数（平均±標準誤差，n=4 /グループ）。データは2つの独立した実験を組み合わせて平均±標準誤差として示した。* $P < 0.05$.

さらに，R-Spo1が*in vivo*においてパネト細胞数を増殖させるか検証した。パネト細胞はH&E染色で形態学的に好酸性顆粒を有する細胞であり，免疫学的にリゾチームを発現した細胞として特定されるが，R-Spo1の6日間投与により7日目の小腸のH&E染色でパネト細胞が増加している所見を確認した (**Figure 2A**)。パネト細胞数をカウントしたところ，R-Spo1の6日間投与で十二指腸，空腸，回腸全ての小腸部位でパネト細胞の有意な増加を認めた (**Figure 2B**)。H&E染色でR-Spo1により増加したパネト細胞は，蛍光免疫染色で腸管におけるパネト細胞のマーカーであるリゾチームも陽性であることを確認した (**Figure 2C**)。

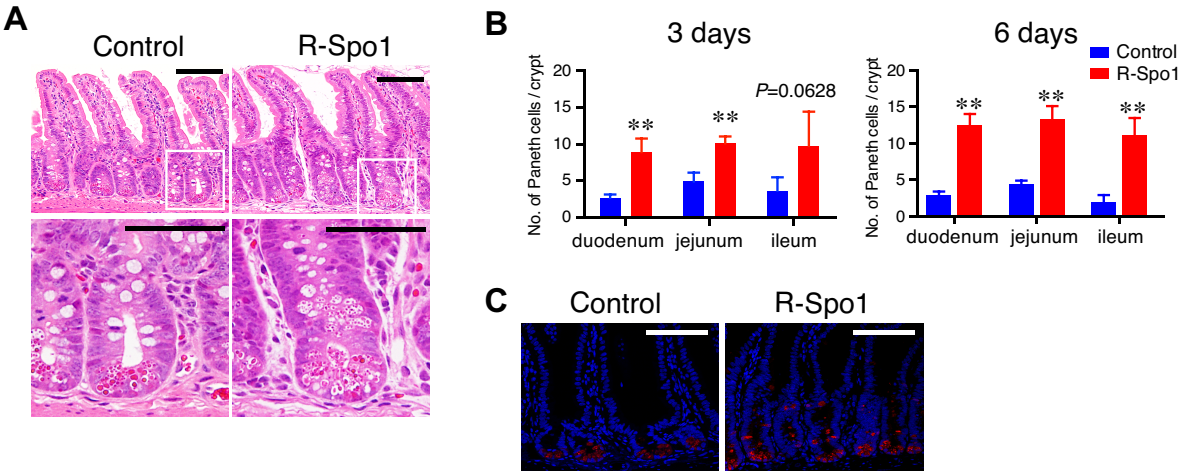


Figure 2: (**A-C**) BALB/cマウスに6日間R-Spo1 (200 µg/day) またはPBSを経静脈的に投与した。翌日に小腸を取り出し評価した。(**A**) H&E染色。白線四角内の領域を下部に示した。Bar, 100 µm（上部）; 30 µm（下部）。(**B**) 1陰窩あたりの平均パネト細胞数（平均±標準誤差, n=6 /グループ）。データは2つの独立した実験を組み合わせて平均±標準誤差として示した。$^{**}P < 0.01$. (**C**) 共焦点顕微鏡画像。リゾチーム（赤）がパネト細胞を示す。核の染色にはDAPI（青）を使用した。Bar, 100 µm。

パネト細胞を含む全ての腸管上皮細胞が腸幹細胞から分化する[35]。そのため我々はR-Spo1が腸幹細胞を刺激してパネト細胞の分化を促進するのか, R-Spo1投与前より存在するパネト細胞が増殖するのかを確かめるためにLgr5陽性腸幹細胞とそこから分化した細胞がRFP陽性細胞として視覚的に同定できるLgr5レポーターマウス (B6-*Lgr5-EGFP-creER*^{T2}×B6-*R26*^{Tomato}) を用いて検証した。B6-*Lgr5-EGFP-creER*^{T2}×B6-*R26*^{Tomato}マウスにタモキシフェン40 mg/kgを3日間腹腔内投与した後に, 経静脈的にR-Spo1 200 µgを3日間投与した。7日目に採取した小腸の蛍光免疫染色において, R-Spo1投与マウスではRFP陽性パネト細胞（*de novo*パネト細胞）がコントロールマウスと比較して有意に増加し, RFP陰性パネト細胞（Pre-existingパネト細胞）よりも増加していた (**Figure 3A, B**)。

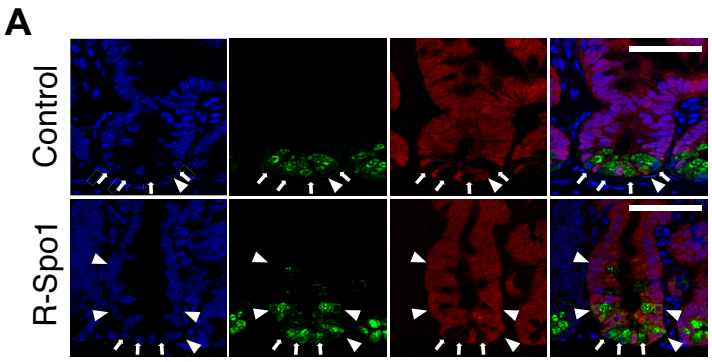


Figure 3: **(A)** 腸幹細胞をラベルするために 40 mg/kg のタモキシフェンを 3 日間投与した後に，3 日間 R-Spo1 (200 μg/day) または PBS を経静脈的に投与した。小腸の系統追跡の共焦点顕微鏡画像。RFP（赤）は Lgr5 陽性腸幹細胞と腸幹細胞から分化した細胞を示し，Crp1（緑）はパネト細胞を示す。矢印はタモキシフェン投与前より存在していたパネト細胞（Pre-existing パネト細胞）を指し，矢頭はタモキシフェン投与後に Lgr5 陽性腸幹細胞から分化したパネト細胞（*de novo* パネト細胞）を指す。核の染色には DAPI（青）を使用した。Bar, 50 μm。**(B)** 1 陰窩における Pre-existing パネト細胞と *de novo* パネト細胞の平均細胞数（平均±標準誤差, n=3 /グループ）。 $*P < 0.05$.

これらの結果はR-Spo1の腸幹細胞増殖因子としての役割[24,29]に加えて，R-Spo1が*in vivo*においてパネト細胞分化にも影響することを示している。

R-Spo1はパネト細胞のα-defensin産生を促進する

次に我々はR-Spo1投与によって増加したパネト細胞が機能的な状態，つまり抗菌ペプチドを産生しているかどうかを評価した。R-Spo1をBALB/cマウスに6日間経静脈的に投与したところ，R-Spo1によって増加したパネト細胞は抗菌ペプチドの一つであるα-defensinと，α-defensinを活性型に変換するために必要な分子であるMMP-7[48]を正常なパネト細胞と同様に発現していることを，蛍光免疫染色を用いて確認した(**Figure 4A**)。定量リアルタイムPCRにおいてもα-defensinの中で殺菌活性の高いサブタイプである*Defa4*と*Mmp7*の両方が有意に増加していることを確認した (**Figure 4B**)。

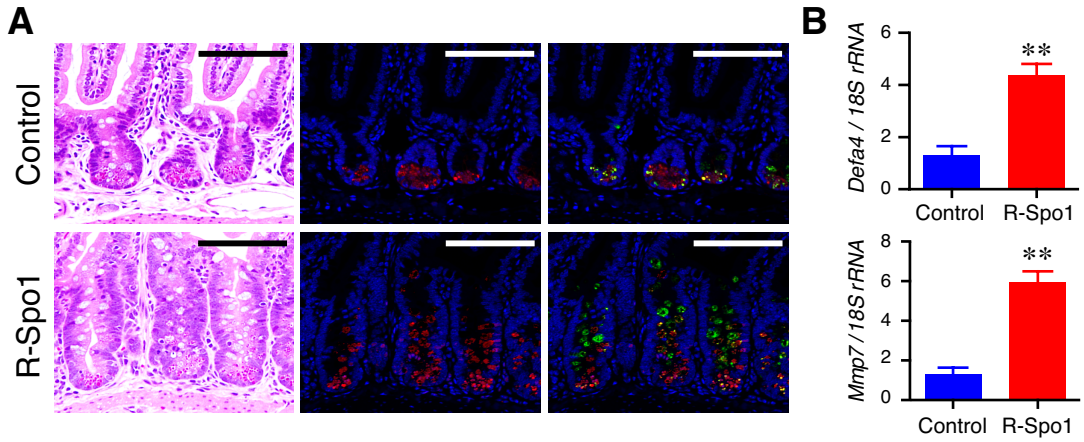


Figure 4: (**A**, **B**) BALB/cマウスに6日間R-Spo1 (200 µg/day) またはPBSを経静脈的に投与し，最終投与翌日に小腸を取り出し評価した。(**A**) 小腸の連続標本。左はH&E染色，中央はCrp1の共焦点顕微鏡画像，右はCrp1とMMP-7を重ねた共焦点顕微鏡画像（赤はCrp1，緑はMMP-7，青はDAPIを示す）。Bar, 100 µm。(**B**) *Defa4*と*Mmp7* transcriptsの定量リアルタイムPCR解析。内因性コントロールとして*18S rRNA*を使用した（n=6 /グループ）。データは2つの独立した実験を組み合わせて平均±標準誤差として示した。$^{**}P < 0.01$.

超解像度顕微鏡画像では，R-Spo1がパネト細胞の細胞質内にα-defensinの微細な顆粒を増加させることを発見し，R-Spo1はパネト細胞を増加させるのみならず，細胞当たりのα-defensin産生も促進することが示唆された (**Figure 5A**)。さらにR-Spo1により陰窩内腔にα-defensinの微細な顆粒が著明に分泌されている所見（矢頭）も確認した (**Figure 5B**)。

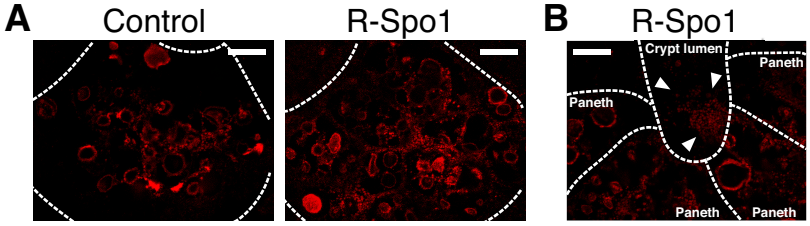


Figure 5: (**A**, **B**) BALB/cマウスに6日間R-Spo1 (200 µg/day) またはPBSを経静脈的に投与し，最終投与翌日に小腸を取り出し評価した。超解像度顕微鏡によるパネト細胞画像（赤; Crp1）。点線は単一のパネト細胞の辺縁を指す。Bar, 5 µm。(**B**) R-Spo1投与マウスの陰窩内腔にCrp1の微細な顆粒が分泌されている画像。矢頭は陰窩内腔のCrp1の顆粒分泌像を指す。Bar, 5 µm。

α-Defensinのサブタイプである Crp1と Crp4の糞便中濃度をELISA法によって測定したところ, R-Spo1は有意に糞便中のCrp1と Crp4の濃度を増加させた (**Figure 6**)。R-Spo1投与により Crp1と Crp4は投与開始72時間後より増加し始め，特にCrp4は投与開始72時間後より経時的に増加傾向を示した (**Figure 6**)。

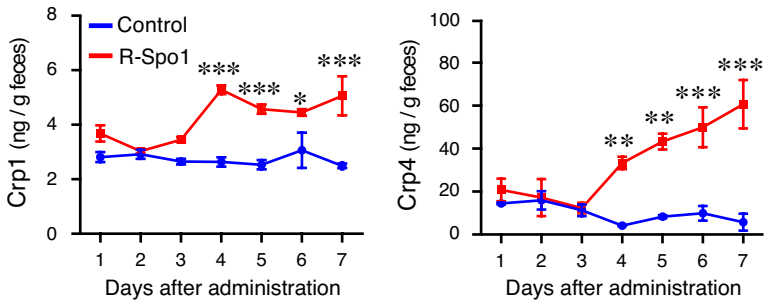


Figure 6: BALB/cマウスに6日間R-Spo1 (200 μg/day) またはPBSを経静脈的に投与した。Crp1と Crp4の糞便中濃度を平均±標準誤差で示した。データは2つの類似した結果を示した独立した2つの実験結果のうちの一つを示した。*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$.

R-Spo1により管腔内に分泌が増加したα-defensinが腸内細菌叢の構成を変化させるかどうかを検証した。糞便から抽出したDNAの16S rRNA領域のシーケンスを施行し, R-Spo1が腸内細菌叢の構成に有意な変化をもたらさないことを確認した (**Figure 7A**)。また腸内細菌叢の多様性をSimson indexと Shannon indexという2つの多様度指数を用いて属レベルで解析した。いずれの指数も種の豊富さと均等度から多様度を算出する方法であり，Simpson indexは1に近づくほど多様性が高く，Shannon indexは数値が大きいほど多様性が高いことを示す。これらの指数による解析で，R-Spo1は腸内細菌叢の多様性においても有意な変化をもたらさないことを確認した (**Figure 7B**)。

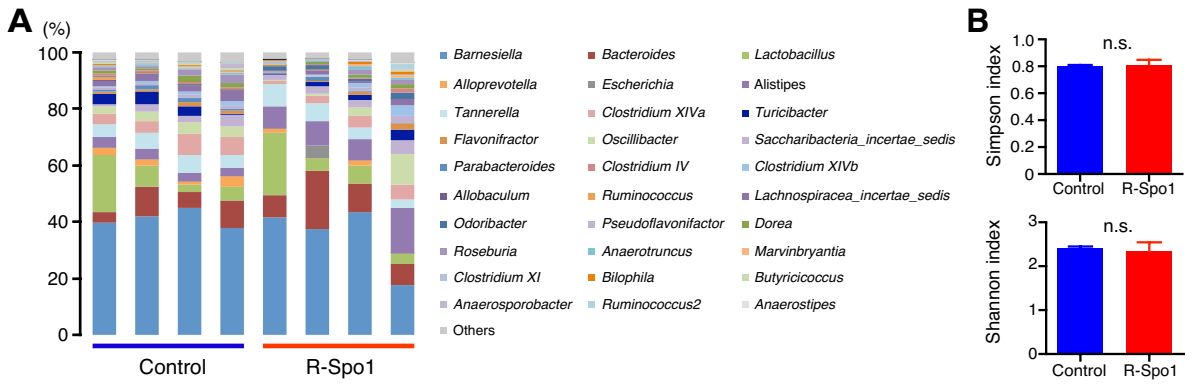


Figure 7: (**A**, **B**) B6D2F1マウスに6日間R-Spo1 (200 μg/day) またはPBSを経静脈的に投与した。(**A**) 糞便から抽出したDNAの16S rRNA領域のシーケンスによる腸内細菌叢の属レベルでの構成（n=4 /グループ）。(**B**) 腸内細菌叢の多様性はSimson indexとShannon indexを用いて属レベルで解析した。データは2つの独立した実験を組み合わせて平均±標準誤差として示した。n.s., not significant.

つまりパネト細胞由来の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を有するのみであるため，その分泌量がR-Spo1によって増加した場合も腸内細菌叢を有意に変化させることなく，宿主と共生腸内細菌の共生関係を維持できることが判明した[11,21]。

R-Spo1はGVHDからパネト細胞を保護することができる

GVHDは，その発症や重症度に腸内細菌叢が影響していることが1970年代にすでにgerm-freeマウスまたは抗菌薬投与マウスを用いて報告されている[49]。GVHDは造血幹細胞移植後に同種反応性ドナーT細胞によって起こる炎症性疾患であり，腸管，皮膚，肝臓が主に傷害される[50]。腸管では，同種反応性ドナーT細胞は小腸においてパネト細胞を傷害し，パネト細胞から分泌される抗菌ペプチドの産生を障害するため，その後腸管のdysbiosisに繋がる[14,23,51-53]。我々はR-Spo1がマウスのGVHDモデルにおいて疾患に関連する腸管dysbiosisを予防できるかどうかを検証した。B6D2F1またはB6D2F1-*Lgr5-EGFP-creER*^{T2} (H-2$^{b/d}$) のレシピエントマウスに致死量の放射線照射 (12～13 Gy) を2分割にして行い，同日主要組織適合性複合体不一致の同種 (allogeneic) ドナーであるB6 (H-2^{b}) または同系 (syngeneic) ドナーであるB6D2F1 (H-2$^{b/d}$) から5 × 10^{6}の骨髄細胞と脾細胞を採取し経静脈的に投与した。移植後5日目と7日目にレシピエントマウスから小腸を取り出し，

蛍光免疫染色を施行した。GVHDを発症したallogeneicマウス（Allo群）はGVHDを発症しないsyngeneicマウス（Syn群）と比較して，腸幹細胞とパネト細胞の両方が著明に減少していた（**Figure 8A-C**）。一方，GVHDを発症するallogeneicマウスにR-Spo1を投与したマウス（R-Spo1群）は過去の報告と同様に移植5日目の時点で腸幹細胞が保たれており，腸上皮細胞の破壊も軽度であった（**Figure 8A, B**）[24]。さらにR-Spo1はパネト細胞もGVHDから保護した（**Figure 8A-C**）。

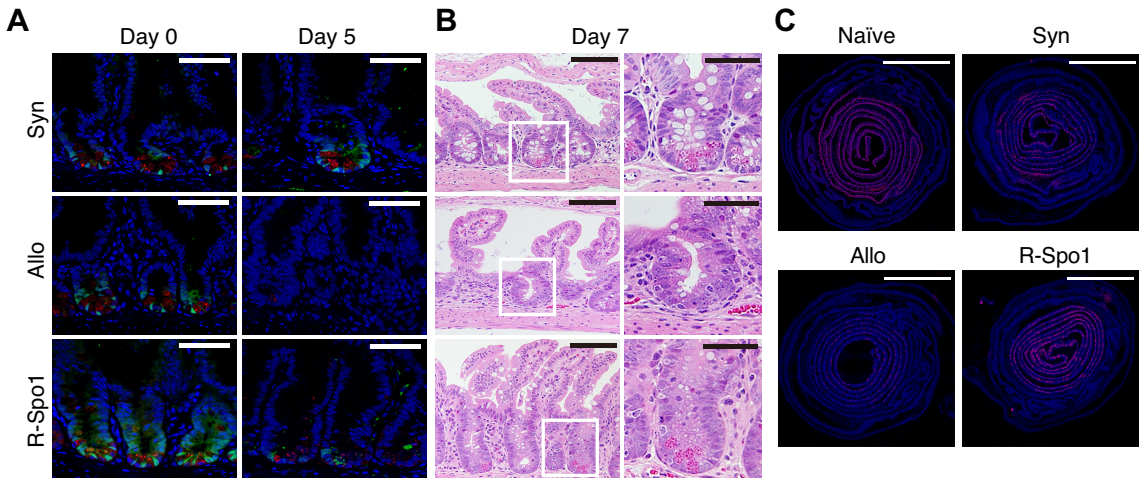


Figure 8: B6D2F1またはB6D2F1-*Lgr5-EGFP-creER*^{T2}のレシピエントマウスに致死量の放射線照射を行い，その後B6（Allo群）またはB6D2F1（Syn群）ドナーから採取した5 × 10^6骨髄細胞と5 × 10^6脾細胞を同日経静脈的に投与した。レシピエントマウスは移植同日をday 0とし，day -3〜-1とday +1〜+3にR-Spo1 (100 µg/day) またはPBSを経静脈的に投与された。**(A)** Day 0と移植後day +5の小腸の共焦点顕微鏡画像。Crp1（赤）はパネト細胞を指し，EGFP（緑）はLgr5陽性腸幹細胞を指す。核の染色にはDAPI（青）を使用した。Bar, 50 µm。 **(B)** 移植後day +7の小腸のH&E染色。Bar, 100 µm（左）; Bar, 50 µm（右）。**(C)** 移植後day +7の大腸から小腸下3分の1の蛍光顕微鏡画像。Crp1（赤）はパネト細胞を指す。核の染色にはDAPI（青）を使用した。

パネト細胞数をカウントしたところ，Allo群ではSyn群と比較して移植早期である7日目も移植後期である28日目も両方とも有意に減少していた（**Figure 9**）。この所見は過去に我々のグループから報告した結果と一致していた[23,24]。一方，R-Spo1群はパネト細胞数のカウントを行うと，移植早期で

ある7日目も移植後期である28日目もいずれも有意にAllo群よりパネト細胞数が多かった(**Figure 9**)。

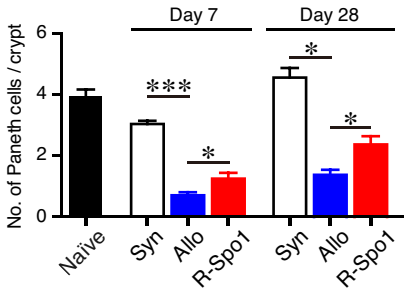


Figure 9: 移植，R-Spo1投与は前述のFigure 8と同様に施行。移植後day +7とday +28の1陰窩あたりの平均パネト細胞数（n=6 /グループ）。データは2つの独立した実験を組み合わせて平均±標準誤差として示した。*$P < 0.05$, ***$P < 0.001$.

GVHDを発症したマウスでは，パネト細胞消失と一致して，移植7日目においてα-defensinのサブタイプの一つであるCrp4の糞便中濃度が有意にSyn群と比較して低下していた（**Figure 10**)。一方，R-Spo1群ではGVHDからパネト細胞が保護されたことにより，移植7日目の糞便中のCrp4濃度がAllo群と比較して有意に保たれていた（**Figure 10**)。α-Defensinの別のサブタイプであるCrp1の糞便中濃度も確認したが，移植7日目においてSyn群と比較してAllo群では有意なCrp1濃度の低下を認めたが，Allo群とR-Spo1群との間には有意な差を認めなかった（**Figure 10**)。

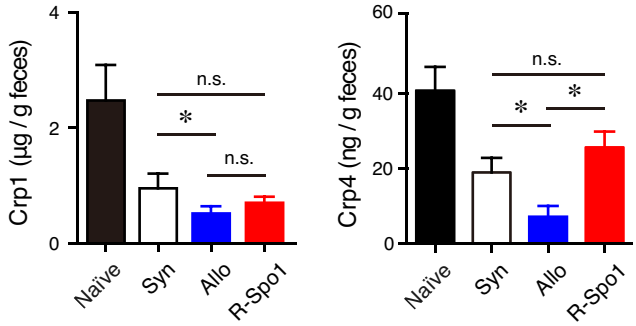


Figure 10: 移植，R-Spo1投与は前述のFigure 8と同様に施行。移植後day +7のCrp1とCrp4の糞便中濃度を平均±標準誤差で示した（n=4-8 /グループ）。データは2つの独立した実験を組み合わせて示した。*$P < 0.05$. n.s., not significant.

R-Spo1はGVHDにおける腸管dysbiosisを予防する

過去の報告と同様に，糞便中の腸内細菌量はSyn群とAllo群で有意な変化は認めなかった[14]。α-Defensinは病原性細菌に対して選択的活性を有するため，抗菌薬とは異なりR-Spo1によって増加したCrp4によってR-Spo1群の腸内細菌量がSyn群やAllo群より有意に減少することはなかった（**Figure 11**)。

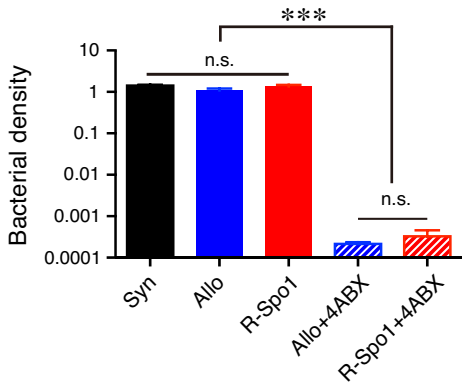


Figure 11: 移植，R-Spo1投与は前述のFigure 8と同様に施行。ストレプトマイシン，メトロニダゾール，アンピシリン，バンコマイシンを飲水ボトルに1 g/Lの濃度で加え，移植7日前より自由飲水させた。Naïveマウスと比較した16S rRNA遺伝子コピー数の定量PCRによる移植後day +7の糞便中細菌量の比較（平均±標準誤差, n=4 /グループ）。***$P < 0.001$. n.s., not significant.

次に，糞便中の細菌16S rRNAのシーケンスを行い，移植7日目の腸内細菌叢の構成を各群で比較した。Naïveマウスと比較してGVHDを発症しないSyn群では有意な腸内細菌叢の構成の変化を認めなかったが，Allo群ではNaïveマウスやSyn群と比較して著明な腸管dysbiosisを示した（**Figure 12A-D**)。この結果は過去の報告と一致していた[14,23]。一方，R-Spo1で治療されたマウスはAllo群とは有意に異なる腸内細菌叢の構成を示し，Syn群と類似した結果であった（**Figure 12A-D**)。

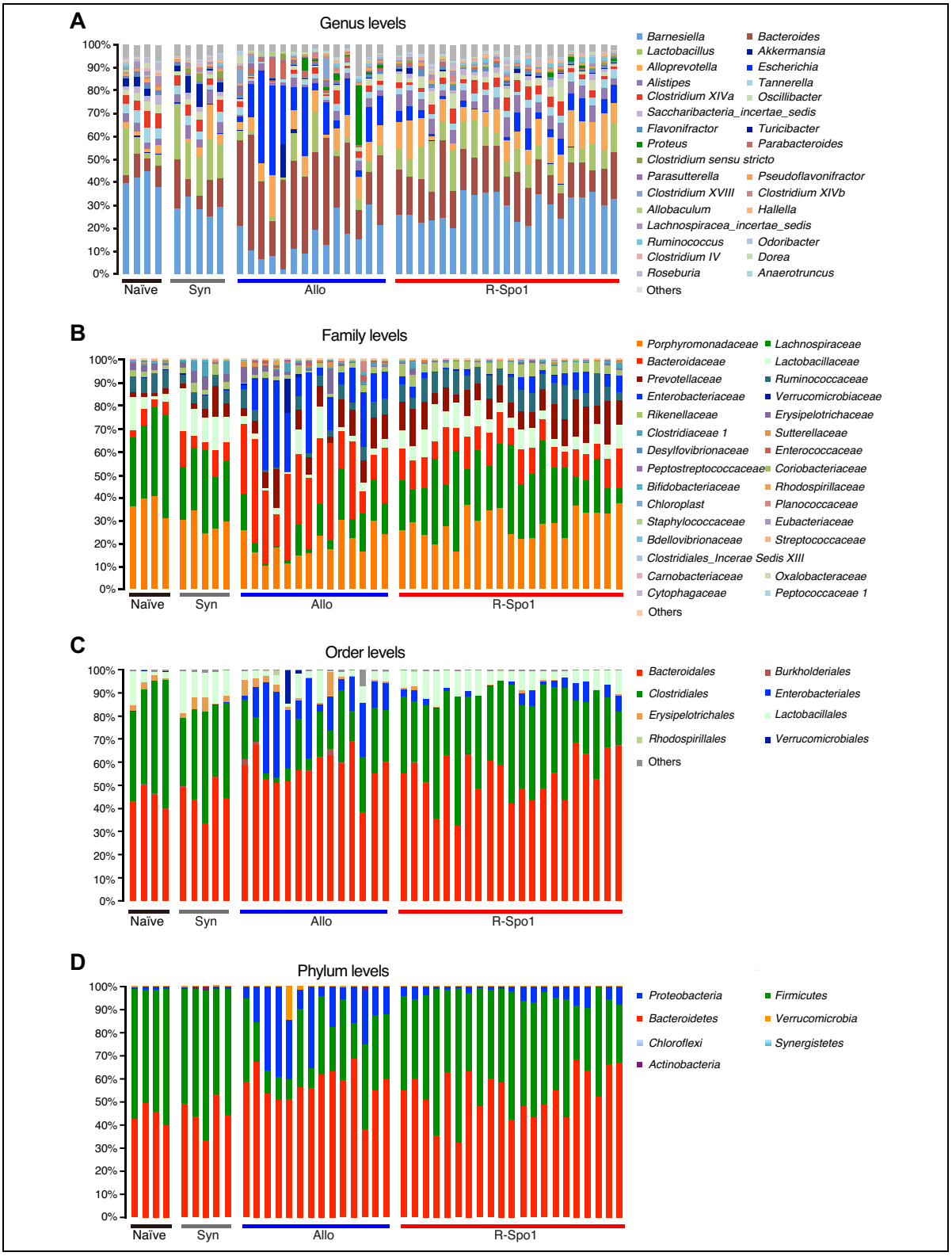
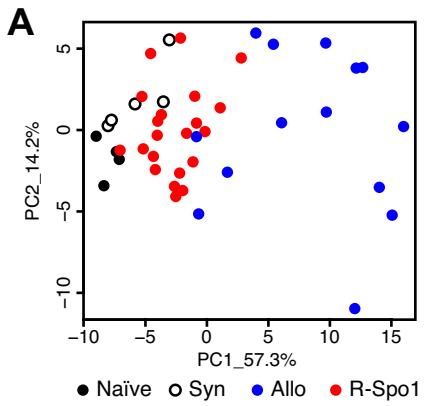

A
Genus levels
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Naïve
Syn
Allo
R-Spo1
Barnesiella
Bacteroides
Lactobacillus
Akkermansia
Alloprevotella
Escherichia
Alistipes
Tannerella
Clostridium XIVa
Oscillibacter
Saccharibacteria_incertae_sedis
Flavonifractor
Turicibacter
Proteus
Parabacteroides
Clostridium sensu stricto
Parasutterella
Pseudoflavonifractor
Clostridium XVIII
Clostridium XIVb
Allobaculum
Hallella
Lachnospiracea_incertae_sedis
Ruminococcus
Odoribacter
Clostridium IV
Dorea
Roseburia
Anaerotruncus
Others
B
Family levels
Porphyromonadaceae
Lachnospiraceae
Bacteroidaceae
Lactobacillaceae
Prevotellaceae
Ruminococcaceae
Enterobacteriaceae
Verrucomicrobiaceae
Rikenellaceae
Erysipelotrichaceae
Clostridiaceae 1
Sutterellaceae
Desylfovibrionaceae
Enterococcaceae
Peptostreptococcaceae
Coriobacteriaceae
Bifidobacteriaceae
Rhodospirillaceae
Chloroplast
Planococcaceae
Staphylococcaceae
Eubacteriaceae
Bdellovibrionaceae
Streptococcaceae
Clostridiales_Incerae Sedis XIII
Carnobacteriaceae
Oxalobacteraceae
Cytophagaceae
Peptococcaceae 1
Others
C
Order levels
Bacteroidales
Burkholderiales
Clostridiales
Enterobacteriales
Erysipelotrichales
Lactobacillales
Rhodospirillales
Verrucomicrobiales
Others
D
Phylum levels
Proteobacteria
Firmicutes
Bacteroidetes
Verrucomicrobia
Chloroflexi
Synergistetes
Actinobacteria

Figure 12: 移植，R-Spo1投与は前述のFigure 8と同様に施行。**(A-D)** 移植7日目の糞便から抽出したDNAの16S rRNA領域のシーケンスによる腸内細菌叢の属レベル **(A)**，科レベル **(B)**，目レベル **(C)**，門レベル **(D)**の構成。個々のbarが属レベルの個々のマウスの細菌構成を示している。データは6つの独立した実験を組み合わせて示した (Naïve; n=4, Syn; n=5, Allo; n=14, R-Spo1; n=21)。

主成分解析とPERMANOVAはAllo群とSyn群の間で腸内細菌構成の有意差を示した **(Figure 13A, B)**。一方，R-Spo1で治療されたマウスは腸内細菌構成がnaïveマウスやSyn群マウスの構成と有意差を認めず，腸管dysbiosisが抑制された **(Figure 13A, B)**。



B

	Naïve	Syn	Allo	R-Spo1
Naïve		0.0221	0.0009	0.0494
Syn			0.0001	0.0311
Allo				0.0008
R-Spo1				

Figure 13: 移植，R-Spo1投与は前述のFigure 8と同様に施行。**(A)** 各マウスの腸内細菌叢の属レベルの構成の主成分解析。**(B)** 各群間の属レベルの構成のPERMANOVAの*P*値。Bonferroni補正で有意な組み合わせを黄色で示した。**(A,B)** データは6つの独立した実験を組み合わせて示した (Naïve; n=4, Syn; n=5, Allo; n=14, R-Spo1; n=21)。

GVHDのマウスモデルにおいて，体重減少はGVHDの重症度を反映するが，移植7日目の体重減少の割合と特定の細菌の割合の間に有意な関連性を認めた。*Proteobacteria*門の割合，*Enterobacteriales*目の割合，*Escherichia*属と*Bacteroides*属の割合はGVHDを発症したマウスの体重減少の割合と負の相関を示した **(Figure 14)**。一方，*Firmicutes*門の割合，*Clostridiales*目の割合，*Lactobacillus*属の割合はマウスの体重減少の割合と正の相関を示した

(Figure 14)。これらの腸内細菌叢の構成の変化は他のマウスやヒトの研究結果とほぼ一致していた[14,19,52-54]。

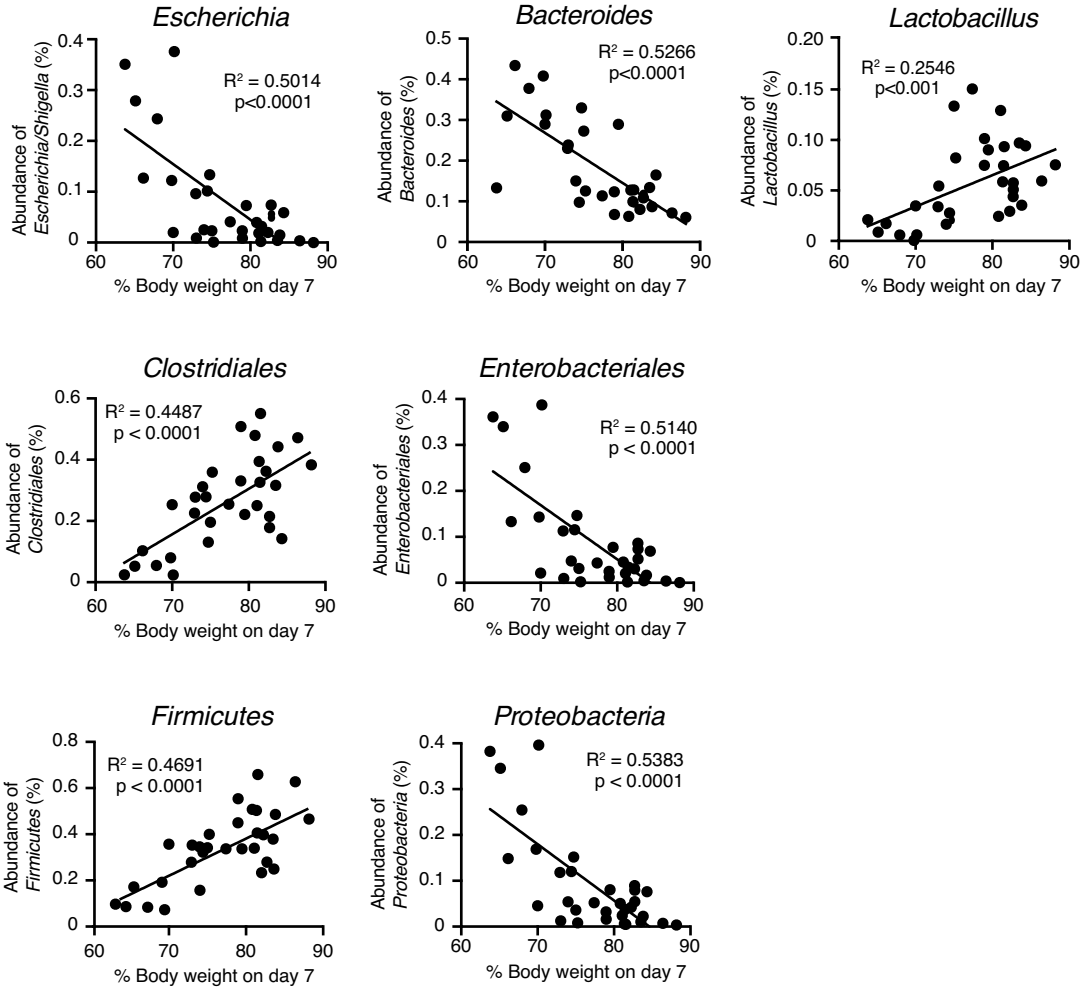


Figure 14: 移植，R-Spo1投与は前述のFigure 8と同様に施行。Allo群とR-Spo1群のSpearman解析を用いた線形回帰による移植後day +7の体重と*Escherichia*属，*Bacteroides*属，*Lactobacillus*属，*Clostridiales*目，*Enterobacteriales*目，*Firmicutes*門，*Proteobacteria*門の相関。

属レベルで腸内細菌叢の多様性をSimpson indexを用いて比較したところ，Allo群ではSyn群と比較して有意に多様性が低下していたのに対し，R-Spo1群はSyn群と同等のレベルにまで腸内細菌叢の多様性を維持していた**(Figure 15A)**。属レベルで各群において有意差が認められた菌を比較してみ

ると， R-Spo1はGVHDによる*Escherichia*と*Bacteroides*の異常増殖と，*Barnesiella*や*Lactobacillus*の減少を抑制した **(Figure 15B, Table 1)**。

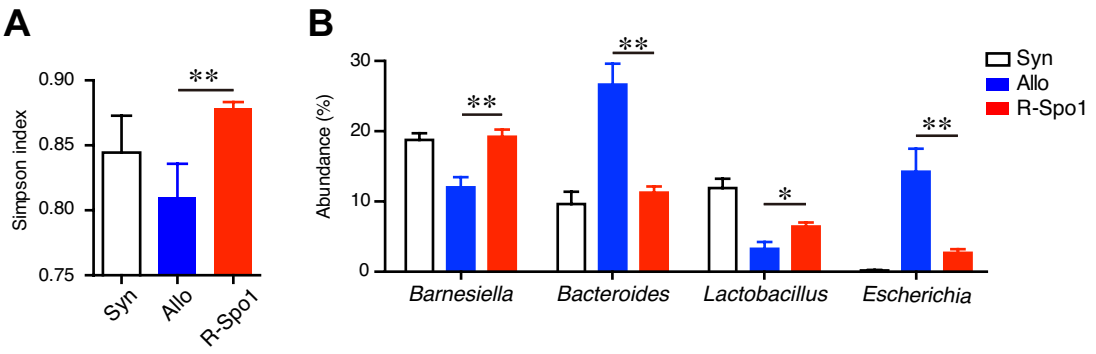


Figure 15: 移植，R-Spo1投与は前述のFigure 8と同様に施行。**(A)** 腸内細菌叢の多様性をSimson indexを用いて属レベルで解析した。**(B)** 属レベルの特定の細菌の量。**(A, B)** データは6つの独立した実験を組み合わせて平均±標準誤差として示した。$*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

Table 1

	Naïve vs Allo	Syn vs Allo	Allo vs R-Spo1
Barnesiella	0.0006536†	0.01231	1.48E-05†
Barnesiella	0.0006536†	0.004294†	0.0009352†
Lactobacillus	0.1013	0.002161†	0.000145†
Alloprevotella	0.04641	0.1483	0.1446
Escherichia	0.0006536†	0.003431†	0.0003294†
Alistipes	0.2771	0.00819	1.78E-06†
Clostridium XIVa	0.001307†	0.006634	0.0007021†
Tannerella	0.0006536†	0.00535	2.74E-05†
Oscillibacter	0.002614†	0.08408	0.0001718†
Saccharibacteria_genera_incertae_sedis	0.0006536†	0.07217	5.89E-07†
Proteus	0.03464	0.01443	0.04695
Parabacteroides	0.0006536†	0.01499	2.74E-05†

各群間の移植後の属レベルでの特定の細菌の差 (Naïve; n=4, Syn; n=5, Allo; n=14, R-Spo1; n=21)。†は群間で有意差があることをしめしている。$^{\dagger}P < 0.005$.

R-Spo1は腸管dysbiosisを予防することでGVHDの重症度を改善する

上記のようにR-Spo1はGVHDからパネト細胞を保護し，抗菌ペプチドの腸管内の濃度を維持することによって腸管dysbiosisを抑制することが示されたが，我々はR-Spo1による腸管dysbiosisの抑制がさらなるGVHDの増悪を防ぐことができるかどうかを検証した。R-Spo1を投与したマウスの小腸と大腸，脾臓をそれぞれ移植5日目，7日目に取り出し，ドナーT細胞の浸潤を評価した。Allo群と比較してR-Spo1群では小腸と大腸，脾臓へのT細胞浸潤が有意に抑制された **(Figure 16A-E)**。移植18日目に小腸と大腸の$Foxp3^{+}CD4^{+}$制御性T細胞数を評価したが，Allo群とR-Spo1群の間で有意差を認めなかった **(Figure 16F)**。

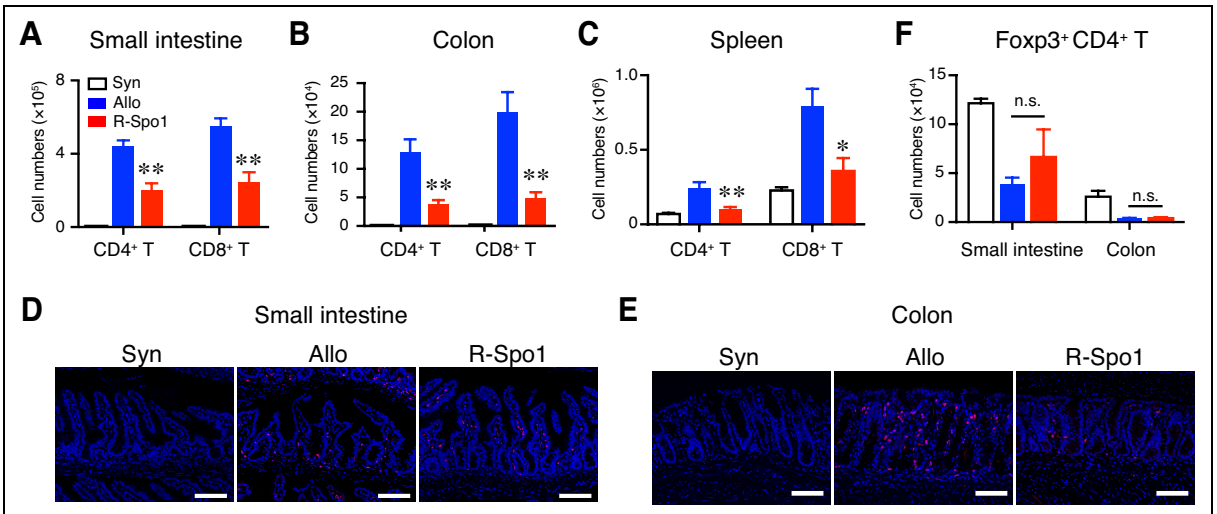


Figure 16: 移植，R-Spo1 投与は前述の Figure 8 と同様に施行。**(A, B)** 移植 day +5 の小腸 **(A)**，大腸 **(B)** のドナーT 細胞数（平均±標準誤差, Syn; n=4, Allo and R-Spo1; n=6 /グループ）。**(C)** 移植 day +7 の脾臓のドナーT 細胞数（平均±標準誤差, Syn; n=4, Allo and R-Spo1; n=8 /グループ）。**(A-C)** データは 2 つの独立した実験を組み合わせて平均±標準誤差として示した。**(D, E)** 移植 day +5 の小腸，大腸の共焦点顕微鏡画像。RFP（赤）はドナーT 細胞を指す。核の染色には DAPI（青）を使用した。Bar, 100 μm。**(F)** 移植 day +18 の小腸と大腸の $Foxp3^{+}CD4^{+}$制御性 T 細胞数（平均±標準誤差, Syn; n=2, Allo and R-Spo1; n=8 /グループ）。$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

さらにR-Spo1群で有意にGVHD死亡が減少し生存率の改善を認めた **(Figure 17)**。

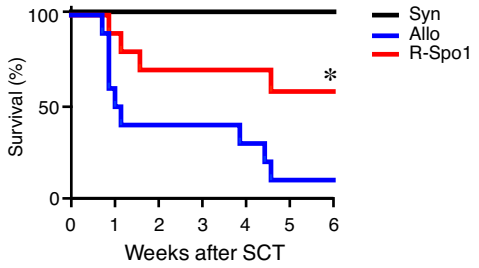


Figure 17: 移植，R-Spo1投与は前述のFigure 8と同様に施行。移植後の生存率を示す（Syn; n=4, Allo and R-Spo1; n=10 /グループ）。データは2つの独立した実験を組み合わせて平均±標準誤差として示した。*$P < 0.05$.

これらの結果はR-Spo1がGVHD関連腸管dysbiosisを予防することで同種造血幹細胞移植後の同種免疫反応を弱め，生存率を改善することを示唆している。

遺伝子組換えCrp4の経口投与もGVHD関連腸管dysbiosisを改善する

α-Defensinはパネト細胞由来の抗菌ペプチド活性の70%を占める最も殺菌活性の高い抗菌ペプチドである[11,55]。最後に我々は遺伝子組換えCrp4を直接消化管内に投与した場合も腸内細菌叢の制御が可能かどうかを検証した。

我々はCrp4の遺伝子組換え製剤を作製し[38]，遺伝子組換えCrp4 125 μgを1日2回移植後3日目から7日目まで経口投与した。糞便中Crp4濃度をELISA法にて測定したところ，Crp4投与群ではコントロールと比較して投与開始48時間後より有意に糞便中Crp4濃度が増加した。しかしα-defensinの別なサブタイプであるCrp1は2群間で有意な差を認めなかった（**Figure 18A**）。Crp4は選択活性を有し共生菌に対する殺菌活性が乏しいため，遺伝子組換えCrp4投与による腸内細菌量の有意な減少は認めなかった（**Figure 18B**）。

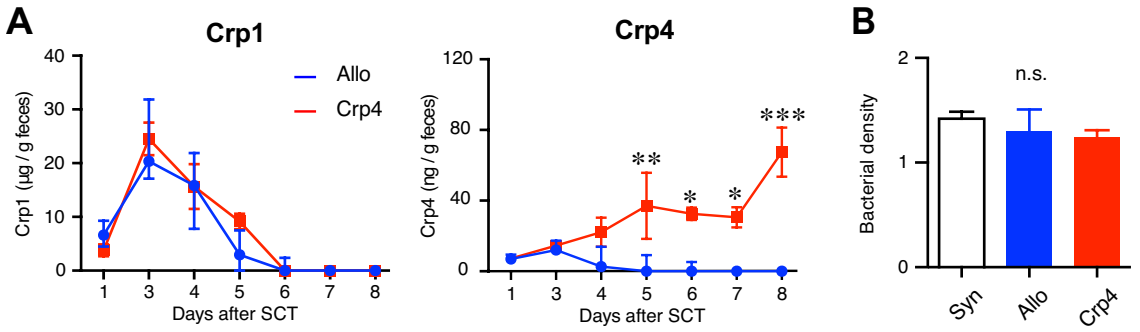


Figure 18: 移植は前述のFigure 8と同様に施行。遺伝子組換えCrp4 (250 µg / day) または滅菌水を移植day +3からday +7まで経口投与した。(**A**) 移植後のCrp1とCrp4の糞便中濃度をmeans ± SEで示した（平均±標準誤差, n=6 /グループ）。(**B**) Naïveマウスと比較した16S rRNA遺伝子コピー数の定量PCRによる移植後day +7の糞便中細菌量の比較（平均±標準誤差, n=4 /グループ）。*P < 0.05, **P < 0.01. ***P < 0.001. n.s., not significant.

移植7日目の糞便中の細菌16S rRNAのシーケンスを行い，腸内細菌叢の構成を両群で比較したところ，Crp4群でGVHD関連の腸管dysbiosisが改善している所見を認め，腸内細菌叢の多様性も改善した (**Figure 19A, B**)。しかし腸管dysbiosisの改善効果はCrp4の経口投与を中止して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 (**Figure 19A, B**)。Crp4による移植後の生存率改善も移植3週目時点までは認められたが，その後は消失した (**Figure 19C**)。

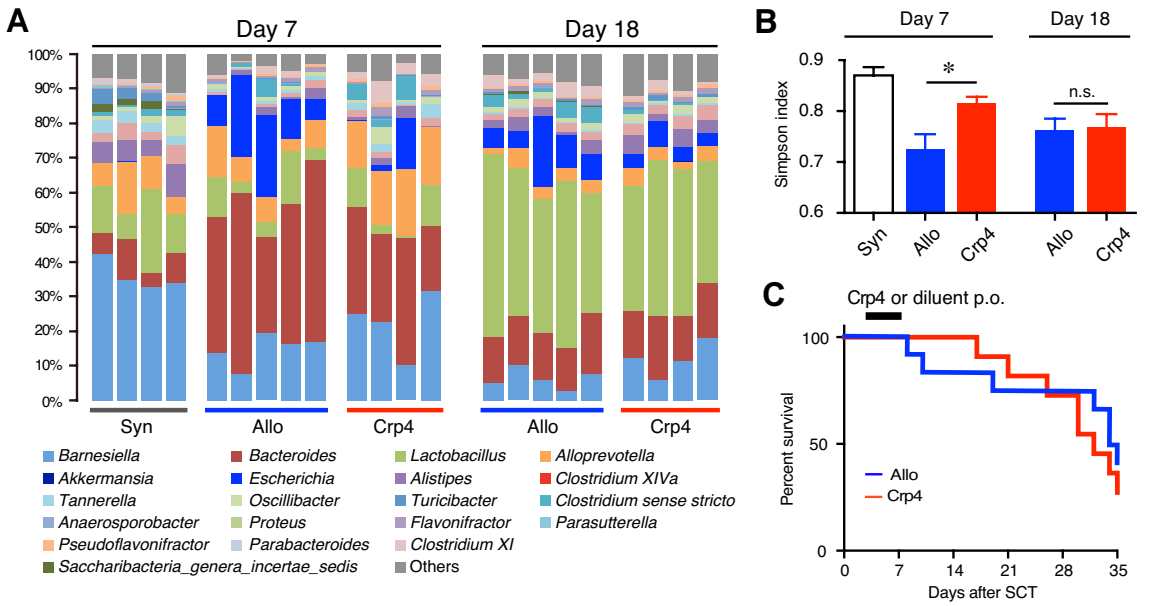
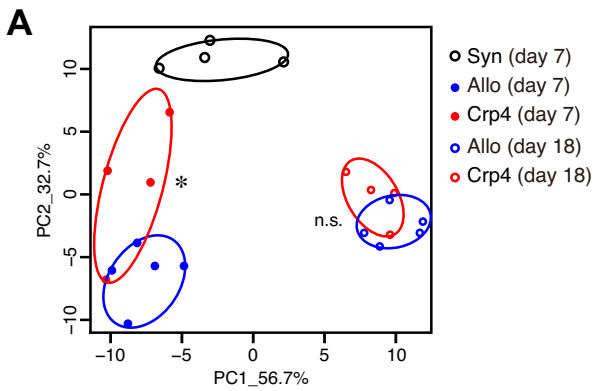


Figure 19: 移植は前述のFigure 8と同様に施行。遺伝子組換えCrp4の経口投与は前述のFigure 18と同様に施行。**(A)** 移植7日目の糞便から抽出したDNAの16S rRNA領域のシーケンスによる腸内細菌叢の属レベルの構成。個々のbarが属レベルの個々のマウスの細菌構成を示している (Syn; n=4, Allo; n=5, Crp4; n=4)。**(B)** 腸内細菌叢の多様性をSimson indexを用いて属レベルで解析した (Syn; n=4, Allo; n=5, Crp4; n=4)。**(C)** 移植後の生存率 (Allo and Crp4; n=6)。*$P < 0.05$. n.s., not significant.

主成分解析とPERMANOVAにおいても, 移植後7日目の時点ではAllo群とCrp4群の間で腸内細菌構成の有意な差を示した **(Figure 20A, B)** が, 移植後18日目の時点ではその差は消失していた **(Figure 20A, B)**。



B

	Syn (day 7)	Allo (day 7)	Crp4 (day 7)	Allo (day 18)	Crp4 (day 18)
Syn (day 7)		0.02125	0.03533	0.02125	0.03533
Allo (day 7)			0.03533	0.0214	0.02125
Crp4 (day 7)				0.02125	0.03533
Allo (day 18)					0.0741
Crp4 (day 18)					

Figure 20: 移植は前述のFigure 8と同様に施行。遺伝子組換えCrp4の経口投与は前述のFigure 18と同様に施行。**(A)** 各マウスの腸内細菌叢の属レベルの構成の主成分解析。**(B)** 各群間の属レベルの構成のPERMANOVAの*P*値。Bonferroni補正で有意な組み合わせを黄色で示した (Syn; n=4, Allo; n=5, Crp4; n=4)。$*P < 0.05$. n.s., not significant.

遺伝子組換えCrp4の経口投与は移植早期の6日目においては腸管dysbiosisの改善効果と一致してドナーT細胞の標的臓器である小腸や肝臓，二次リンパ組織である脾臓において浸潤が有意に抑制されていた（**Figure 21**）。

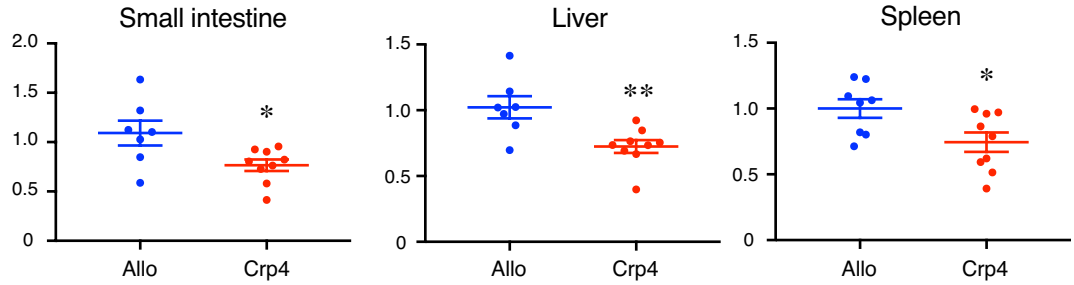


Figure 21: 移植は前述のFigure 8と同様に施行。遺伝子組換えCrp4の経口投与は前述のFigure 18と同様に施行。移植day +6の小腸（左），肝臓（中央），脾臓（右）のドナーT細胞数。データは2つの独立した実験においてAllo群の平均を1として平均±標準誤差を示した。$*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

以上よりR-Spo1とは異なり，Crp4の短期間の経口投与ではGVHDの改善効果は認められるもののR-Spo1よりその程度は弱く一時的であり，腸管

dysbiosisの長期抑制のためにはパネト細胞がGVHDによる傷害から回復してくるまでの比較的長期間の投与が必要である可能性が示唆された。

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，*in vitro*において腸オルガノイドを発生させる[56]。また，*in vivo*においてR-Spo1は腸幹細胞を刺激して陰窩細胞の過形成を誘導する[24,29]。今回我々はさらなるR-Spo1の*in vivo*における効果としてパネト細胞増殖作用を見出した。

まず我々は*in vivo*においてR-Spo1のパネト細胞に対する作用を検証し，R-Spo1の投与が有意にパネト細胞数を増加させることを発見した。腸管上皮細胞はターンオーバーが約3日と早く，一方パネト細胞の生存期間は30日から2ヶ月と他の細胞タイプとは異なり比較的長期である[57,58]。定常状態においては，R-Spo1の投与中止後は本来生存期間の長いパネト細胞も3日程度で元のレベルにまで細胞数が減少することを確認した。本来パネト細胞が小腸陰窩底部に留まるためにはエフリンB3というエフリン受容体リガンドの発現が必要であり，定常状態ではエフリンB3の発現は小腸陰窩底部にのみ強く発現していることが報告されている[59]。R-Spo1によってパネト細胞数は増加するが小腸陰窩底部以外のパネト細胞はエフリンB3の発現がないため長期に小腸陰窩や絨毛中に留まることができず，他の上皮細胞等と同様に早いターンオーバーで腸絨毛先端よりsheddingされると考えられた。R-Spo1が腸幹細胞を刺激してパネト細胞の分化を促進するのかどうかを確かめるためにLgr5陽性腸幹細胞とそこから分化した細胞がRFP陽性細胞として視覚的に同定できるLgr5レポーターマウス（B6-*Lgr5-EGFP-creER*^{T2}×B6-*R26*^{Tomato}）を用いて検証した。本研究ではタモキシフェン投与によるLgr5陽性細胞の標識から解析までの期間は7日間であるため，タモキシフェンによって標識されなかったパネト細胞の大部分は標識前に腸幹細胞から分化した細胞と考えられた。コントロール群においてもRFP陽性パネト細胞が15%程度存在したが，その理由は標識から解析までの7日間に寿命を迎えたパネト細胞が失われ新たに腸幹細胞から供給されたためと考えられた。一方，R-Spo1投与マウスではRFP陽性パネト細胞（*de novo*パネト細胞）がコントロールマウスと比較して著明に増加しており，かつRFP陰性パネト細胞（Pre-existingパネト細胞）よりも増加していたことから，R-Spo1はまずR-Spo1のリガンドであるLgr5を発現している腸幹細胞に作用し，腸幹細胞から急速にパネト細胞への分化が誘導されたと考えられた。以上の結果から，R-Spo1の腸幹細胞増殖因子としての役割[24,29]に加えて，R-Spo1には*in vivo*でパネト細胞分化を誘導しパネト細胞を増加させる効果が存在することが判明した。

次に我々はR-Spo1投与によって増加したパネト細胞が抗菌ペプチドを産生しているかどうかを評価したが, 今回の研究ではパネト細胞が分泌する抗菌ペプチドの中で殺菌活性の高いα-defensin のみを評価した。パネト細胞が有する抗菌物質はα-defensin 以外にもリゾチームやsecretory group IIA phospholipase A2，Angiogenin 4などが報告されている[10,60]。R-Spo1によって増加したパネト細胞がリゾチーム陽性であることは免疫染色にて確認したが，その他の物質に関しては検討できておらず，またこれらの腸管内への分泌量に関しても検討できなかった。パネト細胞はH&E染色で好酸性顆粒を有するのが特徴であり, その顆粒内に多くの抗菌ペプチドを有しているとされている[61]。共焦点レーザー顕微鏡を用いてR-Spo1投与マウスにおいて増加したパネト細胞で正常と同様にα-defensinが発現していることを確認したが，超解像度顕微鏡画像を用いてさらなる評価を行ったところ, R-Spo1投与マウスのパネト細胞の細胞質内には多くのCrp1陽性微細顆粒が存在することが確認された。R-Spo1の投与によって急速に分化するパネト細胞では顆粒形成よりもα-defensin産生が細胞質内で優先して行われる可能性が示唆された。また, パネト細胞からの抗菌ペプチドを含む顆粒の分泌（脱顆粒）は, 細菌，リポ多糖類，リポテイコ酸，リピドA，ムラミルジペプチド，Cholinergic stimulation，Toll様受容体リガンドによって起こることが報告されている[11,62,63]が，R-Spo1によっても脱顆粒が誘導される可能性が考えられた。上記の画像所見と一致して，ELISA法によって測定したCrp1とCrp4の糞便中濃度は，R-Spo1投与マウスにおいて投与開始72時間後より有意に増加を認めた。Crp1は小腸全体で広く分泌されており, Crp4は上部小腸ではほとんど産生されておらず回腸末端で産生されていることが報告されているが[64]，R-Spo1によって増加したα-defensinのうち，Crp4は投与開始72時間後より経時的な増加傾向を示した。

R-Spo1の短期投与は定常状態下において有意な腸内細菌叢の構成変化をもたらさなかった。腸内細菌叢の多様性もSimson indexとShannon indexを用いて評価したがR-Spo1投与では有意な変化を認めなかった。その理由としてR-Spo1の投与期間が短期間であった可能性は否定できないが, 本来パネト細胞から分泌される抗菌ペプチドは共生菌に対する殺菌活性が弱いためパネト細胞自体とパネト細胞から分泌される抗菌ペプチドの増加では腸内細菌叢の構成が乱れなかった可能性も考えられた。これに関しては，R-Spo1が抗菌薬とは対照的に腸内細菌量の減少を来さなかったこと, R-Spo1によっ

て増加したα-defensinが*in vitro*において非共生菌に対する選択的殺菌活性が示されている[21]ことから，我々は後者の理由である可能性が高いと判断した。つまりパネト細胞由来の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を有するのみであるため，その分泌量が増加した場合も腸内細菌叢を有意に変化させることなく宿主との共生関係を維持できると考えられた[11,21]。

次に，パネト細胞減少を来す疾患において，R-Spo1がパネト細胞を増殖させることが可能かどうかを検証した。我々はパネト細胞が著明に傷害されるGVHDに注目し，マウスのGVHDモデルを用いてR-Spo1のパネト細胞に対する効果を検証した。GVHDは造血幹細胞移植後に同種反応性ドナーT細胞によって起こる炎症性疾患である[50,65]。腸管では同種反応性ドナーT細胞が小腸においてパネト細胞が傷害される[14,23,51-53]。今回の検討でもGVHDを発症するallogeneicマウスは移植後5日目には著明なパネト細胞減少を認めた。しかし，R-Spo1を投与することによってパネト細胞数を有意に多く維持することが可能であった。この効果は移植後28日目の時点でも認められた。定常状態ではR-Spo1のパネト細胞増殖効果は投与中止3日後にはほぼ消失する。以上のことから，移植後28日目のパネト細胞がR-Spo1投与群において有意に維持されていた理由は，R-Spo1によってGVHDからの腸幹細胞が保護されたことによりパネト細胞への分化が長期に可能であったことと，移植早期に腸管ホメオスタシスが保たれたことにより同種免疫が寛容状態となりやすかったことが理由と考えられた。今回のR-Spo1の投与期間は移植前後3日間と短期であり，より長期の投与方法については検討しなかった。またGVHDによる腸管dysbiosis発症後のR-Spo1やCrp4の効果も今回の研究においては検討していない。R-Spo1はGVHDモデルにおいてパネト細胞数を維持したが，その結果と一致して糞便中Crp4濃度もGVHD発症マウスと比較して有意に高いレベルを維持した。定常状態ではα-defensinのサブタイプのうちCrp1とCrp4の両方でR-Spo1による糞便中濃度の有意な上昇を認めたが，GVHDモデルにおいてはAllo群とR-Spo1群の間でCrp4のみ有意差を認めた。R-Spo1群でパネト細胞が維持されているにも関わらず糞便中Crp1濃度がAllo群と比較して有意な上昇を認めなかった理由として，Crp1とCrp4の主な分泌部位の差異とGVHDによる小腸内の傷害部位の差異が関連していると考えられた。前述の通りCrp1は小腸全体で広く分泌されており，Crp4は回腸末端でより産生量が多い[64,66]。そして殺菌活性という点ではCrp1と比較してCrp4の方が強い殺菌活性を有しているのが特徴である[66]。GVHDは小腸全体を傷害しうるが，

特に回腸末端の傷害は発症時から存在し，重症化しやすい[67]。そのため回腸末端でより分泌量が多いCrp4は, R-Spo1投与によるGVHDの軽症化によって, Allo群と比較して有意な増加を示すことができたが，Crp1は小腸のより広範な部位から産生されるため，今回使用したモデルではR-Spo1投与による改善が検出しにくかった可能性が考えられる。

以上より我々はGVHDによるパネト細胞傷害が抗菌ペプチドであるα-defensinの分泌を低下させることと，R-Spo1によってそれらを回復できることを示したが，次にGVHDにおいて認められる腸内細菌叢の異常，腸管dysbiosisがR-Spo1により抑制できるかどうかを検討した。今回の我々の検討では過去の報告と同様にGVHDを発症しないSyn群のマウスではnaïveマウスと比較して腸内細菌叢の有意な腸内細菌叢の構成変化を認めなかった[14,23]。Syn群のマウスは全身放射線照射により放射線性腸炎を発症し，パネト細胞数の減少も一時的には認められたが, そのような状態では腸内細菌叢の有意な構成変化までは引き起こさないと考えられた。一方, GVHDを発症したAllo群のマウスは全身放射線照射による放射線性腸炎に加え，GVHDによるパネト細胞消失も来たし，かつパネト細胞の回復がその後も遷延するため，著明な腸管dysbiosisを呈した[14,23,27]。Allo群マウスの異常な腸内細菌叢の中で優位となる細菌は報告により様々である。Jenqらは造血幹細胞移植前にアンピシリンで治療されたマウスはGVHDを発症するとグラム陽性嫌気性球菌である*Blautia*の減少と腸球菌の増加を認めると報告した[14]。腸球菌は上皮バリアを減弱して腸炎を起こし[68]，マクロファージによるtumor necrosis factor (TNF)-αの産生を刺激する[69]。また，Heimesaatらの報告では消化管GVHDの急性期で腸内細菌科優位に細菌叢がシフトすることが示され，*Lactobacilli*, *Clostridia*，*Bifidobacteria*，*Bacillus spp.*の減少が示された[27]。本邦からの報告でも，Eriguchiらが腸内細菌科に属する大腸菌がGVHDにより優位に増加することをマウスモデルで示した[23]。R-Spo1群マウスはnaïveマウスやSyn群マウスと有意差のない腸内細菌叢の構成を呈しており, R-Spo1がパネト細胞からのα-defensin分泌を維持することにより腸管dysbiosisが抑制されたと考えられた。Allo群とR-Spo1群においてGVHDの重症度の指標として体重減少の割合と*Clostridiales*目の割合を比較したところ，両者に有意な逆相関が認められた。マウスにおいて*Clostridiales*目の中には大腸の制御性T細胞を誘導する細菌が含まれていると報告されており[70,71]，R-Spo1による腸管dysbiosisの抑制が同種免疫反応に寛容をもたらす免疫制御に関わる共生菌を誘導できたと考えられた。さらにR-Spo1によりα-defensinの分泌量を維持できたこと

でGVHDのさらなる増悪をもたらす*Escherichia*属のような病原性細菌の異常増殖も抑制できたと考えられた。また，近年同種造血幹細胞移植領域において腸内細菌叢の多様性の低下がマウスモデルにおいても実臨床においても移植後の生存率低下と関連することが報告されている[14,19,72]が，R-Spo1は腸内細菌叢の多様性も維持することが可能であった。

R-Spo1がGVHDを改善したメカニズムは，一つは腸管粘膜バリア機能の保護であり，もう一つは病原性細菌やPAMPsの抑制であると考えられる。その結果，局所の炎症性サイトカインの産生やドナーT細胞の活性化が抑制されたと考えられた。さらに共生腸内細菌は炎症制御反応と腸上皮の維持に重要であることが示されており[73,74]，R-Spo1によって腸管dysbiosisが抑制され共生腸内細菌が保たれることで宿主の栄養状態や生理的機能，代謝機能が改善したと考えられた[75-77]。

腸管dysbiosisの抑制作用はR-Spo1と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。R-Spo1は同種反応性T細胞の活性化を抑制し生存率を改善させたが，Crp4の効果は同種反応性T細胞においては中等度であった。これは恐らくR-Spo1がCrp4以外の他の抗菌ペプチドも増加している可能性と腸幹細胞や上皮細胞傷害に対する保護効果も有しているためである可能性が考えられた[24]。上皮再生は宿主防御と有益な免疫反応のためのバリア維持に重要である[24,78]。α-Defensinは上皮における保護効果を欠き，腸上皮傷害は宿主免疫系における共生菌の有益な効果を障害する[79]。Interleukin-22 (IL-22) もまた腸幹細胞に作用することで腸上皮再生を促進しGVHDの改善することが報告されているが[26,78]，腸幹細胞がパネト細胞に分化にはWnt/β-cateninシグナルが必要であり，IL-22にはパネト細胞増殖作用は認められない[32,78]。R-Spo1はパネト細胞増殖をより強く刺激し，α-defensinの分泌を促す。一方，IL-22は他の抗菌ペプチドであるregenerating islet-derived protein 3 (Reg3) の腸上皮細胞からの産生を増加させることが示されている[78]。R-Spo1とIL-22の併用療法はより魅力的なストラテジーである可能性が考えられる。

今回我々は宿主と腸内細菌叢の間のクロストークを示した。正常腸内細菌叢は宿主の健康とバランスのとれた免疫系の維持に重要である。過去の複数の報告においても，腸内細菌叢の変化が腸疾患や腸管以外の疾患における病因として重要な役割を有していることが報告されている[16,80,81]。R-Spo1ま

たはα-defensinの投与はGVHDのみならず腸管dysbiosisが関連する様々な疾患の疾患活動性を改善するために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る。本研究は造血幹細胞移植領域以外にも，糖尿病，膠原病，アレルギー，がん等幅広い医療分野への波及効果が期待できる。

総括および結論

1. 本研究全体から得られた新知見

- 腸幹細胞増殖因子であるR-Spo1がパネト細胞増殖因子としての作用を有していることを*in vivo*で証明した。

- R-Spo1の移植前後での短期投与はGVHDからパネト細胞を保護し，抗菌ペプチドの一種であるα-defensinの分泌を維持することで腸管dysbiosisを予防することが可能であった。

- Crp4の経口投与によりGVHDによる腸管dysbiosisやGVHDを抑制したが，投与を中止すると効果が消失した。

- 腸管dysbiosisの治療はこれまでプロバイオティクスやプレバイオティクス，菌叢移植が主であったが，新たに内因性抗菌ペプチドの分泌を促進するR-Spo1と遺伝子組換えCrp4という腸管dysbiosis治療法を見出した。

2. 新知見の意義

腸管エコシステムの破綻はGVHDを含む炎症性腸疾患の原因もしくは治療不応性の原因となっている可能性が示唆されているが，これまで腸管エコシステムを回復させる方法は主にプロバイオティクスやプレバイオティクス，菌叢移植であり，これらの効果は限定的であった。より生理的で強力な治療法が求められていたが，今回我々が注目したパネト細胞増殖因子R-Spo1と遺伝子組換えCrp4は，造血幹細胞移植領域における腸内細菌叢の異常dysbiosisを予防できた。R-Spo1と遺伝子組換えCrp4という腸管dysbiosis治療法は造血幹細胞移植領域以外にも，糖尿病，膠原病，アレルギー，がん等腸管dysbiosisが関連する様々疾患においても応用でき，病態の改善につながる可能性がある。

3. 今後の研究展開

現在，今回検証した腸管dysbiosisに対する新たな治療アプローチを実臨床に応用するための前段階として，造血幹細胞移植後のヒトにおけるパネト細胞傷害や抗菌ペプチド変化と腸管dysbiosisとの関連性を評価する臨床試験を進めている。

GVHDマウスモデルにおいてR-Spo1や遺伝子組換えCrp4単独療法以外にも腸上皮再生の促進効果が報告されているIL-22との併用療法によって造血幹細胞移植後の腸管dysbiosisや生存率のさらなる改善効果が認められるかどうかを検証する。

また，GVHD以外の腸管dysbiosisを来す病態や糖尿病，膠原病，アレルギー，がん等，腸管dysbiosisと疾患との関連性が示唆される領域におけるR-Spo1や遺伝子組換えCrp4の有効性の検証へ研究の領域を拡大する。

近年，腸内細菌叢によって生成される代謝産物がヒトの疾患や健康，免疫系に影響することが指摘されているため，腸管dysbiosisを生じるマウスモデルと今回開発したR-Spo1や遺伝子組換えCrp4の治療法を用いて，腸内細菌叢とそれらによって合成される腸内代謝産物との関連性をメタボローム解析によって検証し，腸内代謝産物がヒトの免疫系や病態に及ぼす影響を検討する。

謝辞

北海道大学大学院 医学研究科 内科学講座 血液内科学分野
豊嶋崇徳教授，橋本大吾講師，近藤健講師
Clara Noizat，小笠原励起，高橋秀一郎，大東寛幸，松岡里湖，荒隆英，
横畠絵美，山川知宏，江端浩

北海道大学大学院 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，中村公則准教授

北海道大学大学院 先端生命科学研究院
先端融合科学研究部門・生命分子科学分野 蛋白質科学研究室
相沢智康准教授

北海道大学 理学部
平峰里奈

九州大学大学院医学研究科細菌学分野
林哲也教授，小椋義俊准教授

国立遺伝学研究所生命情報研究センター
東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報
黒川顕教授，森宙史助教

協和発酵キリン株式会社 研究開発本部 研究機能ユニット 創薬技術研究所
冨塚一磨所長

この研究はゲノム支援<MEXT KAKENHI (No.221S0002)>によってサポートして頂いた。

引用文献

1 Grogan, D. The Microbes Within. *Sci. Am.* **312**, S2-S2 (2015).

2 Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65 (2010).

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

4 Eckburg, P. B. *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635-1638 (2005).

5 Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. & De Vos, W. M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3854-3859 (1998).

6 Salzman, N. H. *et al.* Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* **11**, 76-83 (2010).

7 Kurokawa, K. *et al.* Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* **14**, 169-181 (2007).

8 Smith, N. R., Davies, P. S., Silk, A. D. & Wong, M. H. Epithelial and mesenchymal contribution to the niche: a safeguard for intestinal stem cell homeostasis. *Gastroenterology* **143**, 1426-1430 (2012).

9 Sato, T. *et al.* Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**, 415-418 (2011).

10 Bevins, C. L. & Salzman, N. H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 356-368 (2011).

11 Ayabe, T. *et al.* Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.* **1**, 113-118 (2000).

12 Ganz, T., Selsted, M. E. & Lehrer, R. I. Defensins. *Eur. J. Haematol.* **44**, 1-8 (1990).

13 Ivanov, II *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485-498 (2009).

14 Jenq, R. R. *et al.* Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* **209**,

903-911 (2012).
15 Becattini, S., Taur, Y. & Pamer, E. G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol. Med.* **22**, 458-478 (2016).
16 Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y. & Nunez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 321-335 (2013).
17 Barnes, M. J. & Powrie, F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* **31**, 401-411 (2009).
18 Petersen, C. & Round, J. L. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell. Microbiol.* **16**, 1024-1033 (2014).
19 Taur, Y. *et al.* The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **124**, 1174-1182 (2014).
20 Ayabe, T. *et al.* Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.* **1**, 113-118 (2000).
21 Masuda, K., Sakai, N., Nakamura, K., Yoshioka, S. & Ayabe, T. Bactericidal activity of mouse alpha-defensin cryptdin-4 predominantly affects noncommensal bacteria. *J. Innate Immun.* **3**, 315-326 (2011).
22 Hill, G. R. & Ferrara, J. L. M. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **95**, 2754-2759 (2000).
23 Eriguchi, Y. *et al.* Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins. *Blood* **120**, 223-231 (2012).
24 Takashima, S. *et al.* The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J. Exp. Med.* **208**, 285-294 (2011).
25 Eriguchi, Y. *et al.* Decreased secretion of Paneth cell alpha-defensins in graft-versus-host disease. *Transpl. Infect. Dis.* **17**, 702-706 (2015).
26 Hanash, A. M. *et al.* Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* **37**, 339-350 (2012).
27 Heimesaat, M. M. *et al.* MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host

disease. *Gut* **59**, 1079-1087 (2010).

28 Clevers, H., Loh, K. M. & Nusse, R. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* **346**, 54-+ (2014).

29 Kim, K. A. *et al.* Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* **309**, 1256-1259 (2005).

30 Zhao, J. *et al.* R-spondin1, a novel intestinotrophic mitogen, ameliorates experimental colitis in mice. *Gastroenterology* **132**, 1331-1343 (2007).

31 Peng, W. C. *et al.* Structure of stem cell growth factor R-spondin 1 in complex with the ectodomain of its receptor LGR5. *Cell. Rep.* **3**, 1885-1892 (2013).

32 Yin, X. *et al.* Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. *Nat. Methods* **11**, 106-112 (2014).

33 Farin, H. F., Van Es, J. H. & Clevers, H. Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology* **143**, 1518-1529 e1517 (2012).

34 Farin, H. F. *et al.* Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature* **530**, 340-343 (2016).

35 Barker, N. *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003-1007 (2007).

36 Madisen, L. *et al.* A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* **13**, 133-140 (2010).

37 Hennet, T., Hagen, F. K., Tabak, L. A. & Marth, J. D. T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 12070-12074 (1995) .

38 Tomisawa, S. *et al.* Efficient production of a correctly folded mouse alpha-defensin, cryptdin-4, by refolding during inclusion body solubilization. *Protein. Expr. Purif.* **112**, 21-28 (2015).

39 Cooke, K. R. *et al.* An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* **88**, 3230-3239 (1996).

40 Nakamura, K., Sakuragi, N. & Ayabe, T. A monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of secreted

alpha-defensin. *Anal. Biochem.* **443**, 124-131 (2013).

41 Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357-359 (2012).

42 Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460-2461 (2010).

43 Schmieder, R., Lim, Y. W., Rohwer, F. & Edwards, R. TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets. *BMC Bioinformatics* **11**, 341 (2010).

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

45 Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5261-5267 (2007) .

46 Simpson, E. H. Measurement of diversity. *Nature* **163**, 688 (1949).

47 Shannon, C. A mathematical theory of communication. *Bell. System. Technol. J.* **27**, 379-423 (1948).

48 Wilson, C. L. *et al.* Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* **286**, 113-117 (1999).

49 Jones, J. M., Wilson, R. & Bealmear, P. M. Mortality and gross pathology of secondary disease in germfree mouse radiation chimeras. *Radiat. Res.* **45**, 577-588 (1971).

50 Teshima, T. *et al.* Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat. Med.* **8**, 575-581 (2002).

51 Levine, J. E. *et al.* Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal GVHD identify patients at high risk for non-relapse mortality. *Blood* **22**, 1505-1509 (2013).

52 Holler, E. *et al.* Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* **20**, 640-645 (2014).

53 Jenq, R. *et al.* Intestinal Blautia Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* **8,** 1373-1383

(2015).

54 Shono, Y. *et al.* Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci. Transl. Med.* **8**, 339ra371 (2016).

55 Salzman, N. H. *et al.* Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* **11**, 76-83 (2010).

56 Sato, T. *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262-265 (2009).

57 Clevers, H. C. & Bevins, C. L. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 289-311 (2013).

58 Clevers, H. The Paneth Cell, Caloric Restriction, and Intestinal Integrity. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1560-1561 (2012).

59 Batlle, E. *et al.* beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/EphrinB. *Cell* **111**, 251-263 (2002).

60 Hodin, C. M. *et al.* Starvation Compromises Paneth Cells. *Am. J. Pathol.* **179**, 2885-2893 (2011).

61 Oppenheim, J. J., Biragyn, A., Kwak, L. W. & Yang, D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann. Rheum. Dis.* **62**, 17-21 (2003).

62 Rumio, C. *et al.* Induction of Paneth cell degranulation by orally administered Toll-like receptor ligands. *J. Cell. Physiol.* **227**, 1107-1113 (2012).

63 Ayabe, T., Ashida, T., Kohgo, Y. & Kono, T. The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol.* **12**, 394-398 (2004).

64 Darmoul, D. & Ouellette, A. J. Positional specificity of defensin gene expression reveals Paneth cell heterogeneity in mouse small intestine. *Am. J. Physiol.* **271**, G68-G74 (1996).

65 Shlomchik, W. D. Graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 340-352 (2007).

66 Cunliffe, R. N. & Mahida, Y. R. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J. Leukocyte. Biol.* **75**, 49-58 (2004).

67 Schwab, L. *et al.* Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat.*

Med. **20**, 648-654 (2014).

68 Steck, N. *et al.* Enterococcus faecalis metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation. *Gastroenterology* **141**, 959-971 (2011).

69 Kim, S. O., Sheikh, H. I., Ha, S. D., Martins, A. & Reid, G. G-CSF-mediated inhibition of JNK is a key mechanism for Lactobacillus rhamnosus-induced suppression of TNF production in macrophages. *Cell. Microbiol.* **8**, 1958-1971 (2006).

70 Atarashi, K. *et al.* Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science* **331**, 337-341 (2011).

71 Atarashi, K. *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* **500**, 232-236 (2013).

72 Shono, Y., Docampo, M. D., Peled, J. U., Perobelli, S. M. & Jenq, R. R. Intestinal microbiota-related effects on graft-versus-host disease. *Int. J. Hematol.* **101**, 428-437 (2015).

73 Rosser, E. C. *et al.* Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 beta and interleukin-6 production. *Nat. Med.* **20**, 1334-1339 (2014).

74 Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**, 229-241 (2004).

75 Mastroianni, J. R. & Ouellette, A. J. Alpha-defensins in enteric innate immunity: functional Paneth cell alpha-defensins in mouse colonic lumen. *J. Biol. Chem.* **284**, 27848-27856 (2009).

76 Hooper, L. V., Midtvedt, T. & Gordon, J. I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 283-307 (2002).

77 Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. & Gordon, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**, 1915-1920 (2005).

78 Lindemans, C. A. *et al.* Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* **528**, 560-564 (2015).

79 Nakahashi-Oda, C. *et al.* Apoptotic epithelial cells control the abundance of Treg cells at barrier surfaces. *Nat. Immunol.* **17**, 441-450 (2016).

80 Teshima, T., Reddy, P. & Zeiser, R. Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* **22**, 11-16 (2016).

81 Mathewson, N. D. *et al.* Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* **17**, 505-513 (2016).