HOKKAIDO UNIVERSITY

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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	長島, 一哲
Description	配架番号：2472
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13458号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74720
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazunori_Nagashima_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　長島　一哲

学 位 論 文 題 名

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）

【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いる．腸内細菌叢では占有率や多様性が変化する dysbiosis が，腸管の粘膜免疫には腸上皮細胞の 1 系統である 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，α-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 α 多様性が有意に低下し，また β 多様性で類似度が低く 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 β 多様性で類似性が低下していた．また，Clostridiales，Lachnospiraceae，*Faecaribacterium*，*Coprococcus* が有意に低下し，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だした．また，CD 群では，Paneth 細胞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 α 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為な所見である．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 reguralatory 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．我々は 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 の関係を初めて明らかにした．Paneth 細胞は顆粒中に α -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 *XBP1* 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ている．我々は，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.
【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.