



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Dynamics and mechanisms of Paneth cell granule secretory responses in intestinal mucosal immunity [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	横井, 友樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第13948号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78111
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_YOKOI_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学) 氏 名 横井 友樹

学 位 論 文 題 名

Dynamics and mechanisms of Paneth cell granule secretory responses in
intestinal mucosal immunity

(腸管粘膜免疫における Paneth 細胞顆粒分泌応答の動態とメカニズム)

【背景】

腸管では腸上皮細胞、免疫細胞などから構成される腸管粘膜免疫が食物や腸内細菌などの外来抗原の適切な排除と共生を制御することで生体恒常性を維持している。この排除と共生の制御機構破綻は生活習慣病、がん、精神疾患をはじめ様々な疾病と関連する。小腸上皮細胞の一系統である Paneth 細胞は様々な生理活性物質を含む顆粒を分泌することで腸管自然免疫に貢献する。特に、 α -defensin は病原菌選択的な殺菌活性により腸内細菌叢を制御している。また、Paneth 細胞の分泌機能異常が炎症性腸疾患や肥満症などの疾病と関与することが知られている。以上より、Paneth 細胞顆粒分泌は排除と共生のバランス制御を介して生体恒常性維持に重要な役割を担っていると考えられる。しかし、これまで Paneth 細胞分泌応答の評価系が存在しなかったため、リガンドセンシングから顆粒分泌に至るメカニズムは全くわかっていない。そこで、本研究の目的は Paneth 細胞を含む小腸上皮細胞の 3 次元培養系である enteroid を用いた Paneth 細胞顆粒分泌評価系を確立し、外来抗原刺激および内在性刺激による Paneth 細胞顆粒分泌メカニズムを解明することによって、腸管粘膜免疫における排除と共生の制御機構を理解することである。

【方法】

Enteroid 培養のために、小腸陰窩を単離し、Matrigel で包埋後、EGF、Noggin、R-spondin-1 を含む培地にて培養した。Enteroid 中の Paneth 細胞を刺激前および刺激開始から 30 分後に共焦点レーザー顕微鏡で撮影し、刺激前後の顆粒面積および体積の減少率を顆粒分泌率として算出した。Paneth 細胞顆粒分泌評価には carbachol (CCh)、acetylcholine (ACh)、lipopolysaccharide (LPS) および *S. typhimurium* *AphoP* を用いた。LPS および *S. typhimurium* *AphoP* は microinjection によって enteroid 内腔に導入した。Paneth 細胞 ACh 受容体シグナル経路の解析にはムスカリン性 ACh 受容体 (mAChR) サブタイプ (M1-M5) 選択的アンタゴニスト、protein kinase C (PKC) 阻害剤 Go 6983 および inositol 1,4,5-trisphosphate 受容体 (IP3R) 阻害剤 2-APB を用いた。単離 Paneth 細胞から抽出した mRNA を逆転写反応後、nested PCR により mAChR の mRNA 発現を解析した。さらに、 Ca^{2+} センサー YC3.60 ノックインマウスを用いて、Förster resonance energy transfer (FRET) を利用した Paneth 細胞 Ca^{2+} イメージングを行った。マウス小腸組織における choline acetyltransferase (ChAT) の局在解析のために ChAT および PGP9.5 に対するホールマウント透明化免疫蛍光染色を行った。分泌応答後の顆粒再形成能は CCh 刺激後、培地交換をして time-lapse 解析をすることで評価した。

【結果】

1. Enteroid を用いた *ex vivo* Paneth 細胞顆粒分泌評価系の確立と外来抗原および内在性刺激に应答した顆粒分泌の解明

α -Defensin に対する蛍光免疫染色より、enteroid 中の Paneth 細胞は *in vivo* と同様に顆粒中に α -defensin を発現していた。Paneth 細胞はコリン作動薬である CCh を培地中に添加、すなわち基底膜側から刺激することで顆粒をすみやかに分泌した。CCh 刺激前後における顆粒面積と体積から算出した顆粒分泌率は強い正の相関を示したため、測定が簡便な面積顆粒分泌率によって体積を反映した正確な顆粒分泌を定量化できることを確認した。次に、腸管内腔に該当する enteroid 内腔は閉鎖されているため、microinjection による物質導入を試みた。Fluorescein を enteroid 内腔へ導入したところ、内腔でのみ顕著な蛍光強度上昇を示したことから、漏出なく物質を内腔に導入する方法を開発した。腸管内腔に存在するグラム陰性細菌成分である LPS を enteroid 内腔へ導入すると、Paneth 細胞はすみやかに顆粒を分泌した。これに対して、LPS を培地中に添加したところ、全く分泌応答を示さなかった。加えて、グラム陰性細菌である *S. typhimurium* Δ *phoP* の生菌では導入から 4-19 分後にかけて顆粒分泌応答を示した。以上より、Paneth 細胞顆粒分泌応答の *ex vivo* 評価系を確立し、Paneth 細胞が腸管内腔の外来性抗原刺激および基底膜側からの内在性刺激をそれぞれ細胞極性に依存してセンシングすることで、顆粒を分泌していることをはじめて明らかにした。

2. ACh によるムスカリン性 M3 受容体を介した Paneth 細胞顆粒分泌応答シグナル経路の解明

化学合成コリン作動薬である CCh によって Paneth 細胞は顆粒分泌することから、生体では内在性コリン作動性リガンドである ACh が分泌応答を制御していると考えられる。そこで、小腸組織で Paneth 細胞への ACh 供給細胞を探索したところ、Paneth 細胞基底膜側で ACh 合成酵素である ChAT⁺ の PGP9.5⁺ 神経終末が接合しており、コリン作動性神経由来 ACh は Paneth 細胞顆粒分泌を制御していることが示唆された。次に、enteroid を用いて ACh による分泌能を解析したところ、Paneth 細胞は ACh 濃度依存的に顆粒を分泌した。Paneth 細胞は mAChR サブタイプの M3 と M5 の mRNA を発現しており、ACh による顆粒分泌は M3R アンタゴニストでのみ有意に抑制された。M3R の下流の主要なシグナル因子である PKC と IP3R の阻害剤を用いると、顆粒分泌応答が有意に抑制された。さらに、Paneth 細胞内 Ca²⁺ 濃度は ACh 刺激後すみやかに上昇し、その後顆粒を分泌した。以上の結果より、Paneth 細胞は ACh を M3R で受容し、PKC および IP3R を介した細胞内 Ca²⁺ 上昇により顆粒分泌するメカニズムを明らかにした。

3. 分泌応答後における Paneth 細胞顆粒再形成能の解明

Paneth 細胞が分泌応答後に顆粒を再形成するかを検討したところ、CCh による顆粒分泌後、1 時間から新しく形成された顆粒の充填が開始され、21 時間後にはほぼ分泌前の状態まで再形成した。さらに、Paneth 細胞は 2 回目の CCh 刺激に対して 1 回目と同程度の顆粒分泌能を示した。このことより、Paneth 細胞は腸管内腔において顆粒の分泌と充填を繰り返しながら常に刺激到来に備えている可能性を示した。

【結論】

本研究は enteroid を用いた Paneth 細胞の顆粒分泌 *ex vivo* 評価系を確立して、Paneth 細胞顆粒分泌応答の生理的動態とその細胞内シグナル伝達メカニズムをはじめて明らかにした。本成果は Paneth 細胞を介した排除と共生による腸管粘膜免疫の恒常性維持機構に新たな知見を加えるものであり、様々な疾患の新規予防法、治療法開発に大きく貢献する。