



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Pathological mechanisms in Crohn' s disease via dysbiosis triggered by Paneth cell α -defensin misfolding [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	清水, 由宇
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14296号
Issue Date	2020-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80292
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yu_SHIMIZU_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 清水 由宇

学 位 論 文 題 名

Pathological mechanisms in Crohn's disease via dysbiosis triggered by Paneth cell α -defensin misfolding
(Paneth 細胞 α -defensin の misfolding に起因する dysbiosis を介した
クローン病の病態形成メカニズム)

【背景】

腸管には無数の常在菌からなる腸内細菌叢が存在し、様々な生理機能の調節を介して宿主の健康維持に寄与している。一方で、近年 dysbiosis と呼ばれる腸内細菌叢の破綻と様々な疾患の病態形成との関係が報告されている。小腸上皮細胞の一系統である Paneth 細胞が分泌する抗菌ペプチド α -defensin は自然免疫における主要なエフェクター因子であるとともに、常在菌は生かす病原菌は殺すという選択的な殺菌活性によって腸内細菌叢の恒常的な組成制御に関わることが知られている。 α -defensin の選択性は分子の高次構造により制御されており、*in vitro* において分子内に3本のジスルフィド結合を持つ酸化型 α -defensin は常在菌に対しほとんど殺菌活性を示さず病原菌に対し強い殺菌活性を示す一方で、ジスルフィド結合を持たない還元型 α -defensin は常在菌に対しても強い殺菌活性を示すことが報告されている。このことから、還元型 α -defensin が腸管内腔へ分泌されることで dysbiosis を介した様々な疾患の原因となることが示唆される。

クローン病 (CD)は回腸末端を中心として消化管全長に渡り慢性炎症を生じる炎症性腸疾患の一つであり、世界的な患者数の増加にも関わらず未だ原因不明で根本的な治療法が確立していない。近年、その病態形成における dysbiosis の関与が示唆されている。加えて、細胞内 misfolding タンパク質の消去系である小胞体ストレス応答に関連する CD 感受性遺伝子の変異および欠損が、Paneth 細胞の形態異常を引き起こすことが知られている。以上より、Paneth 細胞における小胞体ストレスの蓄積がジスルフィド結合の misfolding による還元型 α -defensin の産生および腸管内腔への分泌を誘導し、分泌された還元型 α -defensin が dysbiosis を引き起こすことで CD の病態形成に関与する可能性が考えられる。しかし、実際に生体内において還元型 α -defensin が腸管内腔へと分泌されるのか、腸管内腔において還元型 α -defensin が dysbiosis を引き起こすのかはこれまで全く不明である。そこで本研究は、CD 類似回腸炎を自然発症し Paneth 細胞の局在異常を生じることが知られているモデルマウス SAMP1/YitFc および健常対照の ICR マウスを用いて、Paneth 細胞における小胞体ストレスによる α -defensin の misfolding と腸内細菌を介した CD の病態形成との関係解明を目的とした。

【方法】

回腸炎の病態進行と Paneth 細胞の関係を解析するために、4, 10, 20 週齢の SAMP1/YitFc および ICR マウス回腸組織の hematoxylin-eosin 染色による組織学的解析を行った。Paneth 細胞の局在異常メカニズムを解析するために、4, 20 週齢の SAMP1/YitFc および 20 週齢の ICR マウス回腸組織切片に対し杯細胞マーカーである Muc2 および Paneth 細胞の陰窩基底部への局在に関与する EphrinB2 の免疫蛍光染色を行った。Paneth 細胞の小胞体ストレスを解析するために、4, 20 週齢の SAMP1/YitFc および 9-20 週齢の ICR マウスに対し回腸単離陰窩を用いた glycine SDS-PAGE western blot による小胞体ストレスマーカー pIRE1 α , ATF4, cleaved-ATF6, GRP78 の発現量解析、透過型電子顕微鏡による回腸 Paneth 細胞の細胞内構造観察、免疫蛍光染色による小胞体ストレスマーカー GRP78, calreticulin および小胞体ストレス抑制因子である MIST1 の局在解析を行った。マウス α -defensin である cryptdins (Crps)の小腸組織中における高次構造を解析するために、4, 20 週齢の SAMP1/YitFc および 20 週齢の ICR マウス小腸組織中 Crps に対する acid urea-PAGE western blot を行った。Paneth 細胞の分泌能を評価するために、18-20 週齢の SAMP1/YitFc および ICR マウス小腸単離陰窩よりそれぞれ作成した enteroid を用いて顆粒分泌を定量した。腸管内腔における

α -defensin の高次構造を解析するために、酸化型および還元型 Crps 間での trypsin 消化に対する安定性の違いと tricine SDS-PAGE western blot による Crps 特異的な検出を利用した新たな解析系を開発し、4, 20 週齢の SAMP1/YitFc および ICR マウス糞便中における酸化型および還元型 Crps を定量した。病態進行と dysbiosis の関係を解析するために、4, 20 週齢の SAMP1/YitFc および ICR マウス糞便の 16S rDNA メタゲノム解析によって腸内細菌叢を解析した。腸内細菌の存在が Paneth 細胞へ及ぼす影響を解析するために、4 週齢の SAMP1/YitFc に対し 6 週間の抗生剤投与を行ったのち、Paneth 細胞形態および糞便中 Crps の高次構造解析を行った。最後に、腸管内腔にて還元型 α -defensin が腸内細菌叢へ及ぼす影響を解析するために、常在菌である *Anaerotruncus coliholminis* に対する酸化型および還元型 Crps の *in vitro* における殺菌活性を評価するとともに、6 週齢の ICR マウスに対し還元型 Crps の直腸投与を行ったのち、糞便の 16S rDNA メタゲノム解析を行った。

【結果】

1. 異常 Paneth 細胞における小胞体ストレスと回腸炎進行との関係

週齢経過に伴って SAMP1/YitFc における回腸炎の進行がみられ、発症前である 4 週齢や ICR マウスには存在しない Muc2 陽性の異常な Paneth 細胞が、通常 Paneth 細胞が存在しない陰窩上部および絨毛部にまで出現し、その数は病態進行に伴い有意に増加した。20 週齢の異常 Paneth 細胞では EphrinB2 の発現が見られなかったことから、Paneth 細胞の分化局在制御の破綻が示唆された。また、異常 Paneth 細胞数と炎症スコアの間に有意な正の相関が見られたことから、異常 Paneth 細胞の増加が回腸炎の進行に関与することが示唆された。さらに、発症後の 20 週齢において、4 週齢および ICR マウスに比べ回腸単離陰窩における小胞体ストレスマーカーの発現量増加、回腸 Paneth 細胞における小胞体の膨張、GRP78, calreticulin の発現量増加および MIST1 の発現量低下が見られたことから、この異常 Paneth 細胞で小胞体ストレスが生じていることが明らかとなった。

2. 腸管内腔への還元型 α -defensin 分泌と回腸炎進行との関係

20 週齢の SAMP1/YitFc 小腸組織中より 4 週齢および ICR マウスでは見られない還元型 Crps が検出されたことから、異常 Paneth 細胞が還元型 Crps を産生することを示した。また、SAMP1/YitFc から得た enteroid の Paneth 細胞は ICR マウスと同等の顆粒分泌能を示し、20 週齢の SAMP1/YitFc 糞便中のみ還元型 Crps が存在したことから、この還元型 Crps が腸管内腔へと分泌されることを証明した。さらに、各個体の炎症スコアと糞便中の還元型 Crps 量が有意な強い正の相関を示したことから、腸管内腔へ分泌された還元型 Crps が病態進行に関与することが示唆された。

3. 回腸炎進行に伴う dysbiosis と還元型 α -defensin 分泌との関係

20 週齢の SAMP1/YitFc 腸内細菌叢において、CD 患者でも見られる α 多様性の減少、Bacteroidaceae, Rikenellaceae および *Bacteroides* の増加、Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae; Other および *Anaerotruncus* の減少からなる dysbiosis を認めた。さらに各個体の炎症スコアと dysbiosis の進行との間には有意な強い正の相関が見られたことから、病態進行に伴う dysbiosis の関与を明らかにした。さらに、各個体の糞便中における還元型 Crps 量と dysbiosis の進行との間には有意な正の相関が見られ、還元型 Crps は SAMP1/YitFc で減少した *Anaerotruncus coliholminis* に対し *in vitro* において酸化型 Crps よりも強い殺菌活性を示したことから、還元型 Crps の分泌が dysbiosis の進行に関与することを示した。還元型 Crps 分泌と dysbiosis の前後関係を明らかにするために SAMP1/YitFc へ抗生剤を投与して腸内細菌を完全に除去しても Paneth 細胞の形態異常および還元型 Crps の分泌が見られたことから、還元型 Crps の分泌が dysbiosis に先立って生じていることが示唆された。さらに、ICR マウスに対する還元型 Crps の直腸投与によって α 多様性の減少および Lachnospiraceae と Ruminococcaceae の減少が見られたことから、腸管内腔における還元型 Crps が直接的に腸内細菌叢へ作用することを明らかにした。これらの結果より、異常 Paneth 細胞内での misfolding により産生され腸管内腔へと分泌された還元型 α -defensin が、dysbiosis の誘導を介して CD の病態形成に関与するという新たな発症メカニズムを示した。

【結論】

本研究は CD モデルマウス SAMP1/YitFc を用いた解析により、Paneth 細胞 α -defensin の misfolding が dysbiosis を介して CD の発症要因となることを初めて示唆した。今後、本成果を実際の CD 患者において検証することで、Paneth 細胞および還元型 α -defensin を標的とした CD に対する新規診断、治療法開発に大きく貢献する。