



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Food factor and nutrients induce α -defensin secretion from Paneth cells and influence intestinal environment [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	高桑, 暁子
Description	担当 : 理学部図書室
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	乙第7119号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82037
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Akiko_Takakuwa_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 高桑 暁子

学 位 論 文 題 名

Food factor and nutrients induce α -defensin secretion from Paneth cells
and influence intestinal environment

(食品成分・栄養素は Paneth 細胞の α ディフェンシン分泌を誘導して腸内環境制御に関わる)

【背景】

腸管は摂取した食事の消化吸収を行う器官であると同時に、食事とともに摂取した病原菌の排除、食事由来の抗原や腸内細菌に応答する免疫器官でもある。さらに、摂取した栄養素をシグナルとして認識する情報伝達機能を有することが知られている。小腸上皮細胞の一系統である Paneth 細胞は、細菌感染刺激等に反応して自然免疫の作用因子である抗菌ペプチド α ディフェンシン(α -defensin)を分泌し、その殺菌活性によって腸管の自然免疫に貢献している。Paneth 細胞が分泌する α ディフェンシンは病原菌を強く殺菌する一方で共生菌にはほとんど殺菌活性を示さず、選択的な殺菌活性をもつことが知られており、腸内細菌叢の制御に深く関与している。さらに、Paneth 細胞の分泌機能異常が炎症性腸疾患や肥満症、糖尿病などの生活習慣病を含む多くの疾病の発症や進行に関与することが報告されている。一方、腸内細菌叢の組成や腸内細菌が産生する代謝物が宿主の腸管免疫に影響を与えることが明らかになり、正常な腸内細菌叢を維持することは腸内環境の恒常性維持につながることも報告されている。腸内細菌叢に影響を及ぼす因子として、老化、薬物、ストレスなどに加えて、食事をはじめとする生活習慣が知られている。中でも食事は腸内細菌の栄養源となり腸内細菌叢の構成に直接影響を与える重要な因子であり、さらに、腸内細菌代謝物が宿主免疫系に影響を与えることも知られている。以上のように、腸内環境は食事、腸内細菌、さらに宿主免疫系の相互作用やバランスによって恒常性が維持されると考えられている。しかし、これまで食品成分や栄養素が Paneth 細胞の自然免疫機能に与える作用については全く不明であった。本研究は、Paneth 細胞が腸内細菌だけではなく、宿主が摂取した食品成分や栄養素、特に短鎖脂肪酸とアミノ酸を認識して、 α ディフェンシン分泌に至ると仮説を立て、その応答およびメカニズムを明らかにすることによって、食品成分や栄養素による腸管の自然免疫を介した腸内環境の制御という新しい概念を示すことを目的とする。

【方法】

マウス回腸から EDTA 法により小腸陰窩を単離し、陰窩数 10,000 となるように調整した単離小腸陰窩画分に 100 μ M の短鎖脂肪酸 3 種類（酢酸、プロピオン酸、酪酸）と 1 μ M のアミノ酸 20 種類およびコントロールとして PBS をそれぞれ 37°C、30 分暴露した。上清を回収し、Sandwich ELISA による cryptdin-1 (Crp1)定量および *Salmonella typhimurium* PhoP- (*S.typhimurium*)に対する殺菌アッセイを行って α ディフェンシン分泌誘導活性とその機能を評価した。次に、Paneth 細胞の分泌機構を解析するため、単離 Paneth 細胞を用いて短鎖脂肪酸の受容体として G タンパク質共役受容体 (GPCR)およびアミノ酸トランスポーターとして Solute carrier (SLC)ファミリーについて、定量リアルタイム PCR (qPCR)による遺伝子発現解析を行った。また、qPCR で発現の確認された分子については Western blot による検出、および回腸組織を用いた免疫蛍光染色で局在解析を行った。さらに、小腸上皮細胞の 3 次元培養系である enteroid を用いて microinjection 法

で enteroid 内腔に候補刺激を導入し、Paneth 細胞の顆粒分泌応答を共焦点レーザー顕微鏡による timelapse 観察を行って、刺激導入後 30 分間の Paneth 細胞から分泌した顆粒数を計測し評価した。また、Paneth 細胞が短鎖脂肪酸の受容体およびアミノ酸トランスポーターを介して顆粒分泌誘導刺激を認識するのかを阻害実験を行って評価した。顆粒分泌誘導物質を microinjection する 30 分前に、受容体またはトランスポーターの antagonist である β -hydroxybutyrate (BHB) または 2-amino-2-norbornane-carboxylic acid (BCH) をそれぞれ enteroid の培地に加えた後、顆粒分泌誘導物質と各 antagonist を同時に enteroid 内腔へ導入し、Paneth 細胞の分泌阻害活性を評価した。

【結果】

1. 酪酸とロイシンは Paneth 細胞からの α ディフェンシン分泌を誘導する

まず、短鎖脂肪酸が Paneth 細胞からの α ディフェンシン分泌を誘導するか検討したところ、酪酸は PBS コントロールと比較して有意に Crp1 分泌を誘導した。これに対して、酢酸とプロピオン酸は Crp1 分泌を誘導しなかった。次に、20 種類のアミノ酸についてそれぞれ検討したところ、ロイシンのみが有意に Crp1 分泌を誘導した。また、酪酸とロイシンによって誘導された分泌物をそれぞれ回収し、病原菌に対する殺菌活性を検討したところ、酪酸とロイシンによって誘導された Paneth 細胞分泌物は *S. typhimurium* に対して強い殺菌活性を示した。さらに、enteroid を用いた microinjection 法で、酪酸およびロイシン刺激による Paneth 細胞の顆粒分泌応答を可視化・定量化したところ、酪酸、ロイシンともに Paneth 細胞の顆粒分泌を誘導することが確認された。以上の結果より、短鎖脂肪酸とアミノ酸のうち、酪酸とロイシンが Paneth 細胞の α ディフェンシン分泌を誘導することが明らかになった。

2. Paneth 細胞は GPCR やアミノ酸トランスポーターを介して酪酸やロイシンを認識し、 α ディフェンシンを分泌する

Paneth 細胞からの α ディフェンシン分泌は、短鎖脂肪酸とアミノ酸の中でも酪酸とロイシンという限られた成分によって誘導された。そこで次に、Paneth 細胞が酪酸やロイシンを認識する受容体およびトランスポーターを発現するかどうか、高純度 Paneth 細胞を用いた qPCR で受容体やトランスポーターの遺伝子発現を解析した。Paneth 細胞は酪酸を含む短鎖脂肪酸受容体である *Gpr41*、*Gpr43* と *Gpr109a* とロイシンを含む中性アミノ酸のトランスポーターである *Slc7a8* 遺伝子が発現していた。また、qPCR で発現が認められた *Gpr41*、*Gpr43* と *Slc7a8* について Western blot を行ったところ、これら全てのタンパク質発現を確認した。さらに、免疫蛍光染色によって、マウス回腸において *Gpr41*、*Gpr43* と *Slc7a8* が Paneth 細胞に局在することを明らかにした。最後に、enteroid と microinjection 法を用いて、酪酸とロイシンによる Paneth 細胞からの α ディフェンシン分泌が *Gpr41* および *Slc7a8* をそれぞれ介しているのかを、antagonist を用いた阻害実験を行って評価した。*Gpr41* の antagonist である BHB は酪酸による Paneth 細胞顆粒分泌を有意に抑制し、*Slc7a8* の antagonist である BCH はロイシンによる Paneth 細胞顆粒分泌を抑制したことから、酪酸とロイシンにより Paneth 細胞が分泌に至る認識メカニズムが明らかになった。

【結論】

本研究は、Paneth 細胞が *Gpr41* および *Slc7a8* を介して酪酸とロイシンをそれぞれ認識し、 α ディフェンシン分泌を誘導することを明らかにした。この結果は、Paneth 細胞が腸内細菌だけでなく食品成分や栄養素を直接認識し、 α ディフェンシンを分泌することによって腸内環境の恒常性維持に貢献している可能性を示している。本研究により、腸内環境における食品成分や栄養素の全く新しい役割が示唆された。