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)	髙桑, 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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 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

審査担当者	主査	教 授 綾 部 時 芳
	副査	教 授 出 村 誠
	副査	教 授 芳 賀 永
	副査	准教授 中 村 公 則

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）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

腸管は食べ物の消化吸収を行うとともに、病原菌の排除および食事由来の抗原や腸内細菌に応答する免疫機能を果たしている。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ことが知られている。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有し、腸内細菌叢の制御に関与する。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、食べ物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、さらに代謝物が宿主免疫系に影響を与えることが知られている。このように、腸内環境は食事すなわち食品成分や栄養素、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。

しかしながら、これまで食品成分や栄養素と腸管自然免疫の関わりについてはほとんど明らかにされていなかった。特に、食品成分や栄養素が小腸上皮細胞である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。Paneth細胞がこれまで知られていた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の刺激でαディフェンシン分泌に至るのか、また、どのような応答メカニズムなのかはわかっておらず、食品成分や栄養素の新たな機能を理解するとともに、食べ物による腸管自然免疫を介した腸内環境制御という新しい概念につながることから解明が待たれていた。

本研究で、短鎖脂肪酸である酢酸、プロピオン酸および酪酸がPaneth細胞からのαディフェンシン分泌を誘導するか単離小腸陰窩を用いて検討したところ、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。また、20種類全てのアミノ酸について同様に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。さらに、酪酸とロイシンに単離小腸陰窩を曝露した後に分泌物をそれぞれ回収し、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。加えて、小腸上皮細胞の三次元培養系である

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実際に可視化し、定量化した。以上の結果より、短鎖脂肪酸とアミノ酸のうち、それぞれ酪酸とロイシンが Paneth 細胞のαディフェンシン分泌を誘導することを明らかにした。

さらに、高純度 Paneth 細胞を用いた定量 PCR 法で受容体およびトランスポーターの遺伝子発現を解析したところ、Paneth 細胞が酪酸を含む短鎖脂肪酸受容体 *Gpr41*、*Gpr43*、*Gpr109a* 遺伝子およびロイシンを含む中性アミノ酸のトランスポーター*Slc7a8* 遺伝子を発現することを示した。また、Western blot および免疫蛍光染色により、マウス回腸において Gpr41 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 をそれぞれ介するか解析し、antagonist を用いた阻害実験で Gpr41 antagonist の BHB は酪酸による Paneth 細胞顆粒分泌を有意に抑制し、Slc7a8 antagonist の 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 細胞の分泌に至る認識メカニズムを示した。

本論文は、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初めて明らかにしたものであり、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 Paneth 細胞が腸内環境の恒常性維持に貢献している可能性を示した。この Paneth 細胞の新規機能解明から新しい機能性食品・食素材・成分の開発を促して、健康維持および様々な疾患の予防法開発に繋がることが大いに期待される。本研究は腸内環境における食品成分や栄養素の全く新しい役割を見出したものであり、自然免疫による腸管粘膜免疫の包括的理解とその応用に対し貢献するところ極めて大である。以上の理由より、著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格を有するものと認める。