



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The role of Paneth cell α -defensin as a regulator of the intestinal microbiota in nonalcoholic steatohepatitis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	中村, 駿太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	乙第7184号
Issue Date	2023-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90776
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shunta_Nakamura_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 中村 駿太

学位論文題名

The role of Paneth cell α -defensin as a regulator of the intestinal microbiota
in nonalcoholic steatohepatitis
(非アルコール性脂肪肝炎における腸内細菌叢の制御因子である
Paneth 細胞 α -defensin の役割)

【背景】

腸管には 40 兆もの腸内細菌が共生しており、栄養素の供給や免疫細胞の成熟などを介して宿主の生体恒常性維持に寄与する。一方、腸内細菌叢の破綻 (dysbiosis) は様々な疾患と関連することが示されている。小腸上皮の一系統である Paneth 細胞は抗菌ペプチド α -defensin を分泌し、自然免疫の主要な役割を担っている。さらに、 α -defensin は、病原菌は排除し共生菌は生かすという選択的殺菌活性によって腸内細菌叢を制御することが知られている。Paneth 細胞 α -defensin の分泌量の低下や構造の異常が、移植片対宿主病やクローン病と関わることが報告され、Paneth 細胞の異常が起点となって疾病が発症する可能性が示されている。

生活習慣の変化に伴って世界中で患者数が急増している非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH) は、肝硬変、肝がんへと進展する重篤な疾患である。NASH 病態の中でも肝線維化が予後に強く相関することから、肝線維化の抑制は特に大きな健康課題である。NASH 病態進行は、肥満や 2 型糖尿病と関連することから、過栄養が主要な誘因と考えられているが、詳しい病態形成メカニズムは未だ明らかになっていない。近年、NASH 患者における dysbiosis が報告され、さらに、腸内細菌由来の代謝物の変化や菌体成分の流入が NASH 病態の進展に寄与することが示されている。しかしながら、NASH における dysbiosis の原因は未だ明らかになっていない。

そこで本研究は、食餌誘導性の NASH モデルマウスを用いて、腸内細菌叢制御を担う Paneth 細胞 α -defensin と NASH 病態進行の関連性を解明することを目的とした。

【方法】

6 週齢の C57BL/6 雄マウスにコリン欠乏メチオニン減量高脂肪食 (CDAHFD) を摂取させて NASH を誘導した CDAHFD 群と標準食を摂取させた SD 群に対して、誘導 1, 3, 6, 12 週目において以下の項目を解析した。肝組織に対して、hematoxylin-eosin 染色および sirius red 染色による組織学的解析と、定量リアルタイム PCR による遺伝子発現解析を、腸内細菌叢を評価するために糞便を用いた 16S rRNA 遺伝子解析を行った。腸管透過性亢進のバイオマーカーである血清中 zonulin 量を定量して腸管透過性を評価し、さらに、脾臓の懸濁液を用いて bacterial translocation を評価した。糞便中の α -defensin を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay 法で定量して Paneth 細胞からの α -defensin 分泌量を評価し、さらに、小腸組織の免疫組織染色と電子顕微鏡観察により、Paneth 細胞の組織学的評価を行った。小腸陰窩より単離した Paneth 細胞に対する RNA-シーケンス (RNA-seq) 解析により、Paneth 細胞の機能解析を行った。Paneth 細胞の分泌能を評価するために、SD 群および CDAHFD 群の小腸単離陰窩より作製した enteroid を用いて顆粒分泌を定量した。加えて、Paneth 細胞の異常と NASH との関係性を解析するために、R-Spondin1 (R-Spo1) を 600 μ g/dose で週に 3 回、3 週間投与し、対照群の PBS 投与群との 2 群間での解析を行った。また、 α -defensin の NASH 病態への直接的影響をさらに検証するために、マウス α -defensin の cryptdin-4 (Cp4) を 110 μ g/dose で 1 日 2 回、6 週間経口投与し、対照群の生理食塩水投与群との 2 群間での解析を行った。

【結果】

1. CDAHFD 群は NASH 発症前から Paneth 細胞 α -defensin 分泌量が低下し dysbiosis が起きる

CDAHFD 群は、誘導 1 週目から脂肪肝を呈し、誘導 3 週目から肝の線維化病変の出現を認め、12 週まで継続した。また、肝臓における小胞体ストレスの亢進、酸化ストレスの亢進、およびオートファジーの抑制を認め、NASH 患者に類似した病態進行を示した。CDAHFD 群の腸内細菌叢は誘導 1 週目から SD 群と比較して有意に異なる組成と α -多様性の低下を認め、その後の経過とともに NASH 患者に一部類似する組成異常を示した。また、病態進行とともに腸管透過性の亢進、それに伴う bacterial translocation を認めた。さらに、CDAHFD 群の糞便中 α -defensin 量は、NASH 発症前の誘導 1 週から SD 群に比べて有意に低下し、その後低下し続けた。CDAHFD 群の Paneth 細胞は、Crp1 のタンパク質量の低下と顆粒形態の異常を認め、さらに、RNA-seq 解析により顆粒分泌に関連する遺伝子の発現量が有意に低下し、enteroid による顆粒分泌評価の結果、CDAHFD 群の Paneth 細胞は有意に顆粒分泌量が低下することを明らかにした。これらの結果から、CDAHFD 群は NASH 発症前から、Paneth 細胞の機能異常に伴って α -defensin 分泌量の低下と dysbiosis が起きることが示された。

2. R-Spo1 投与による α -defensin の回復は dysbiosis を抑制し NASH の病態進行を防ぐ

Paneth 細胞 α -defensin の低下が dysbiosis を介して NASH 発症に関与したかを検証するために、Paneth 細胞を増加させることで α -defensin 分泌量亢進作用を持つ Wnt 活性化剤 R-Spo1 を CDAHFD 群に投与した。その結果、CDAHFD 群で減少した腸内細菌のうち、*Muribaculum*, Muribaculaceae; Unassigned, Muribaculaceae; Uncultured bacterium, Unassigned Clostridiales; Unassigned は R-Spo1 投与によって増加し、 α -defensin 分泌量と正の相関を示した一方、CDAHFD 群で増加した *Harryflintia* は R-Spo1 投与で減少して α -defensin 分泌量と負の相関を示し、R-Spo1 投与による α -defensin 分泌量の増加によって、CDAHFD 群の dysbiosis が改善することが明らかになった。さらに R-Spo1 投与群は、PBS 投与群と比較して、肝臓における脂肪蓄積、炎症、アポトーシス、線維化病態の有意な改善を認め、*Muribaculum* は脂肪面積、線維化面積、死細胞数と負の相関を、*Harryflintia* は炎症細胞数と正の相関を示し、R-Spo1 投与による腸管内腔の α -defensin 増加は dysbiosis の抑制を介して NASH の病態進行を防ぐことが示された。

3. α -Defensin の経口投与は dysbiosis を抑制し NASH を改善する

α -Defensin と NASH 病態のより直接的な関連性をさらに検証するために、CDAHFD 群に Crp4 を投与したところ、R-Spo1 投与試験と同様に CDAHFD 群で増加した *Harryflintia* は生理食塩水投与群と比較して減少した。一方、CDAHFD 群で増加したものの R-Spo1 投与では改善を認めなかった Lachnospiraceae; Uncultured, *Ruminiclostridium 9* が Crp4 投与により減少し、R-Spo1 投与とは異なる腸内細菌に影響した。Crp4 投与により、肝臓の炎症、アポトーシス、線維化は有意に改善され、また各病態は Crp4 投与によって改善した腸内細菌との相関を示したことから、 α -defensin の直接的な投与によって dysbiosis 抑制を介して NASH の病態が改善されることが示された。一方、Crp4 投与は、肝臓における脂肪蓄積は改善せず、また、R-Spo1 投与では改善しなかった Atg12 の発現量回復を示しオートファジーの活性化が示唆された。以上より、R-Spo1 投与と Crp4 投与はともに dysbiosis の是正を介して NASH の病態を改善するが、そのメカニズムは異なることが示唆された。

【結論】

本研究により、顆粒分泌機能の低下に伴う Paneth 細胞 α -defensin の分泌低下が、dysbiosis を介して肝臓のアポトーシスや炎症を悪化させ、NASH における肝線維化の進展に寄与していることが明らかになった。本研究の成果は、NASH の病態に関わる「腸-肝軸」の新たな知見を提示するとともに、腸内細菌叢の制御を介した Paneth 細胞 α -defensin を標的とする NASH に対する新規治療および予防法の可能性を提案するものである。