



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_review.pdf, 審査の要旨



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 中村 駿 太

審査担当者	主査	教授	中村 公 則
	副査	教授	相 沢 智 康
	副査	准教授	上 原 亮 太
	副査	助教	横 井 友 樹

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)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

腸管には 40 兆もの腸内細菌が共生しており、宿主の生体恒常性維持に寄与する。一方、腸内細菌叢の組成が破綻した状態である *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。 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ということが報告され、Paneth 細胞 α -defensin 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 型糖尿病と関連し、高脂肪食に代表される不健康な食習慣が NASH の主要な誘因と考えられている。近年、NASH 患者における *dysbiosis* が報告され、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可能性が示されている。しかしながら、*dysbiosis* の原因及び NASH 病態に関与するメカニズムは未だ明らかになっておらず、NASH 病態形成メカニズムの詳細な解析が待たれていた。

本論文は、コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食 (CDAHFD) を 6 週齢の C57BL/6 マウスに摂取させて NASH を誘導し、NASH 発症及び進展において Paneth 細胞 α -defensin に異常が起きているかどうかを解析した。NASH を誘導した CDAHFD 群は、誘導 1 週目から脂肪肝と炎症を呈し、誘導 3 週目から肝臓におけるアポトーシスと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 週目以降、標準食を摂取させた SD 群と比較して有意に異なる組成を認め *dysbiosis* を生じた。CDAHFD 群の糞便中に含まれるマウスの α -defensin である cryptdin-1 (Crp1) 量は、NASH 発症前の誘導 1 週から SD 群と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 解析の結果、顆粒分泌に関連する遺伝子の発現量が有意に低下した。小腸上皮細胞の三次元培養系である enteroid を用いた顆粒分泌評価により、CDAHFD 群の Paneth 細胞は、SD 群と比較して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。

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 活性化剤の R-Spondin1 (R-Spo1) を CDAHFD 群に 3 週間尾静脈投与したところ、R-Spo1 投与群の糞便中 Crp1 量は対照群の PBS 投与群と比較して、1 週目から増加傾向を示し、2 週目以降は有意に増加した。腸内細菌叢の組成を解析したところ、CDAHFD 群で減少し、その占有率が Crp1 分泌量と正、NASH 病態と負の相関を示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て回復した。逆に、CDAHFD 群で増加し、その占有率が Crp1 分泌量と負、NASH 病態と正の相関を示した *Harryflintia* は、R-Spo1 投与で減少して正常化した。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、各病態は R-Spo1 投与によって改善した腸内細菌の占有率と相関を示した。これらのことから、R-Spo1 投与による腸管内腔の α -defensin 分泌量の増加は dysbiosis の抑制を介して NASH の病態進行を防ぐことが示された。

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 Crp アイソフォームの中で最も殺菌活性が高いことが知られている Crp4 を経口投与したところ、CDAHFD 群で増加した *Harryflintia* は、生理食塩水投与群と比較して Crp4 投与群で有意に減少した。加えて、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* は Crp4 投与により減少して正常化した。Crp4 投与によって肝臓の炎症、アポトーシス、線維化が有意に改善し、また各病態は Crp4 投与によって改善した腸内細菌と相関を示した。以上の結果から、 α -defensin の直接的な投与は dysbiosis の抑制を介して NASH 病態を改善することが示された。一方、Crp4 投与は、R-Spo1 投与によって改善した脂肪蓄積には影響せず、また、Lachnospiraceae; Uncultured, *Ruminiclostridium 9* の増加抑制という R-Spo1 投与とは異なる腸内細菌に作用した。このことから、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。

本論文は、Paneth 細胞の顆粒分泌機能の低下に伴う α -defensin の分泌量低下が、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を初めて明らかにした。NASH 病態形成メカニズムの理解、さらには NASH に対する新規治療および予防法の開発に対し貢献すること極めて大である。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あるものと認める。

(1977/2000 文字)