

パネト細胞増殖因子による消化管エコロジーの保全

北海道大学病院 血液内科

橋本 大吾

1. 背景

消化管内には数兆もの細菌からなる常在細菌叢が存在し、宿主の代謝や免疫において重要な役割を担っている(1)。定常状態では、*Firmicutes*門や*Bacteroidetes*門などの共生菌が腸内細菌叢の大部分を占め、宿主の代謝や免疫等に影響し、腸管恒常性を保ち、ヒトの健康を維持するのに重要な役割を担っている(2)。パネト細胞は小腸の陰窩基底部に腸幹細胞と隣接して存在し腸幹細胞のニッチを形成するとともに(3)、様々な抗菌ペプチドを管腔内に分泌する重要な腸内細菌叢制御因子である(4)。特にパネト細胞が分泌する α -defensinは腸管における主要な抗菌ペプチドであり、病原菌に対しては殺菌活性を有するが共生菌には活性が低いという選択的抗菌活性を有しているため(5)、腸内細菌叢構成の重要な調節因子である(6)。現在、臨床の様々な場面で用いられている抗生物質は病原性細菌と共生菌を区別できないため病原性細菌のみならず共生菌も減少させ腸内細菌叢を乱す(腸管dysbiosis)(7)。腸管dysbiosisは近年、アレルギー性疾患、多発性硬化症、自己免疫性関節炎、1型糖尿病、急性後天性免疫不全ウイルス感染症、炎症性腸疾患、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) など様々な炎症性疾患の病態生理で重要な役割を果たすのみならず、肥満などの生活習慣病においても腸管dysbiosisが関連することが報告されている(5)。

こうした様々な病態のなかでも、同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD)は、特に著明なdysbiosisを生じ、またdysbiosisがGVHDの重症化にも深く関わっていることが報告されている(8)。同種造血幹細胞移植は難治性の白血病などでは唯一の根治的治療法であるがGVHDは、患者の生活の質を低下させ、しばしば致命的となる重大な合併症である。GVHDは大きく急性と慢性に分けられ、急性GVHDはドナー由来のT細胞がレシピエント由来のアロ抗原を認識することにより活性化し組織傷害をもたらす病態であり、GVHDによるパネト細胞の消失がもたらす抗菌ペプチドの産生障害は、造血幹細胞移植後の腸管dysbiosisに繋がる(8)。腸管dysbiosisは、リポ多糖類を始めとするpathogen-associated molecular patterns (PAMPs)を産生し、腸管バリア機能の減弱によるバクテリアルトランスロケーションによって生体内へと侵入し、自然免疫系を刺激することによりさらに炎症反応を助長し消化管傷害を重症化させる(9)。そのため腸管dysbiosisを予防もしくは改善することはGVHDの治療法としても有望である。しかしながら、現在の腸管dysbiosisに対する治療戦略はプレバイオティクス/プロバイオティクスや菌叢移植を用いた“bacteriotherapy”であり、宿主側の腸管エコシステムを標的とした、より生理的なアプローチはこれまで存在しなかった。われわれは、本研究においてパネト細胞の増殖因子(増殖因子X)を発見し、これを移植後に投与することによってGVHDによるパネト細胞障害を抑制し、抗菌ペプチド産生を促進することによって、腸管dysbiosisおよびGVHDの予防を行うことを目指した。

2. 方法

マウスの骨髄移植: B6D2F1 (H-2^{b/d})レシピエントに12Gyの全身放射線照射を行なったのち、レシピエントマウス1匹あたり脾細胞 5×10^6 と骨髄細胞 5×10^6 をマウス尾静脈より輸注した。増殖因子X 100 μ gを、移植のday -3~-1とday +1~+3に尾静脈から投与した。

免疫組織学的評価: 腸管のスライス標本を作成し、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定したのちパラフィン切片を作成した。ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin; H&E) 染色もしくは蛍光免疫染色を施行した。一次抗体としてrabbit anti-lysozyme (A0099; Dako Japan, Kyoto, Japan)とrat anti-cryptdin-1 (Crp1;77-R63)を使用した。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): 移植マウスの糞便を自然乾燥させた後、bead beater-type homogenizer (Beads Crusher μ T-12, TAITEC, Koshigaya, Japan) を用いて粉碎し、PBSに懸濁し、4°Cで1時間vortexした。20,000 gで20分間遠心分離を行い、上清100 μ lをCrp1とCrp4測定に使用した(10)。

糞便中の細菌DNA抽出, 16S rRNAの増幅, シーケンス

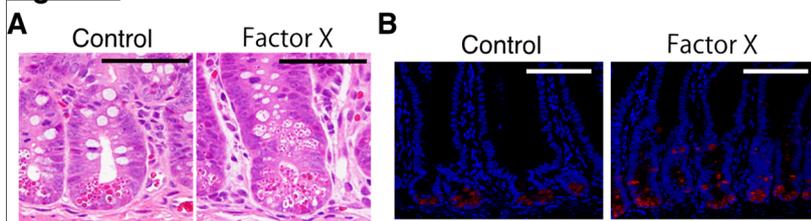
新鮮な糞便を個々のマウスから採取し、PowerFecal DNA Isolation Kitを使用して糞便中のDNAを抽出した。16S metagenomic sequencing library protocol (Illumina, Tokyo, Japan) に従って、糞便から抽出したDNAの16S rRNA

遺伝子のV3-V4可変領域をPCRで増幅したのち標準的なIlluminaシーケンスプロトコールに従ってMiSeq (Illumina) を用いてシーケンスを施行した。

3. 結果

増殖因子Xはnaïveマウスのパネト細胞を増加させる

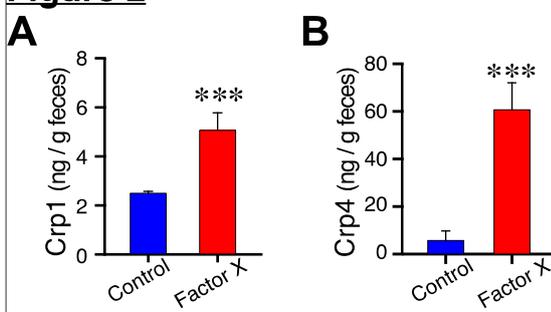
Figure 1



まず, naïveマウスに増殖因子Xを6日間投与し, パネト細胞数を増殖させるか否かを検証した。パネト細胞はH&E染色で形態学的に(Figure 1A)もしくは, リゾチームの免疫染色(Figure 1B)で定量し, いずれにおいてもパネト細胞が増加していることを確認した。

増殖因子Xはnaïveマウスのα-defensin産生を促進する

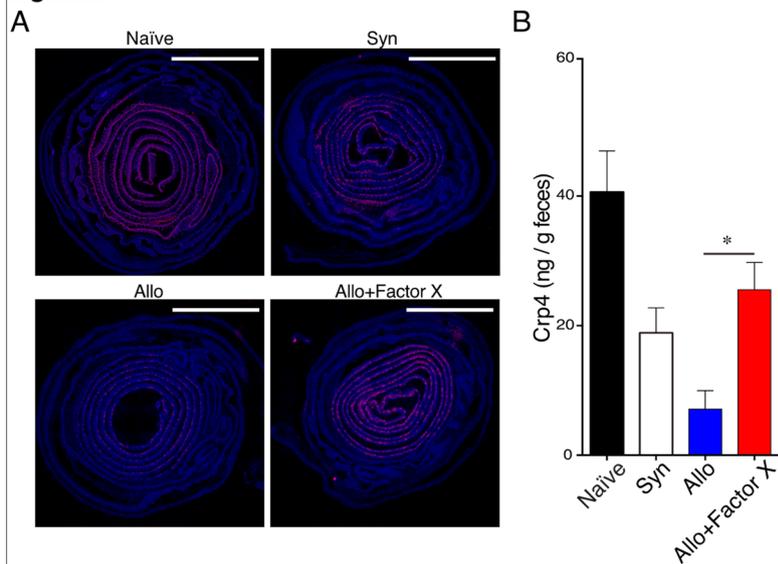
Figure 2



糞便中のα-Defensin (Crp1, Crp4)をELISA法によって測定したところ, 増殖因子Xの投与で Crp1 (Figure 2A)とCrp4 (Figure 2B)の濃度が著明に上昇しており, パネト細胞増殖因子Xの投与はα-defensin産生を促進することが示された。

増殖因子XはGVHDによるPaneth細胞とα-defensin産生を保護する

Figure 3

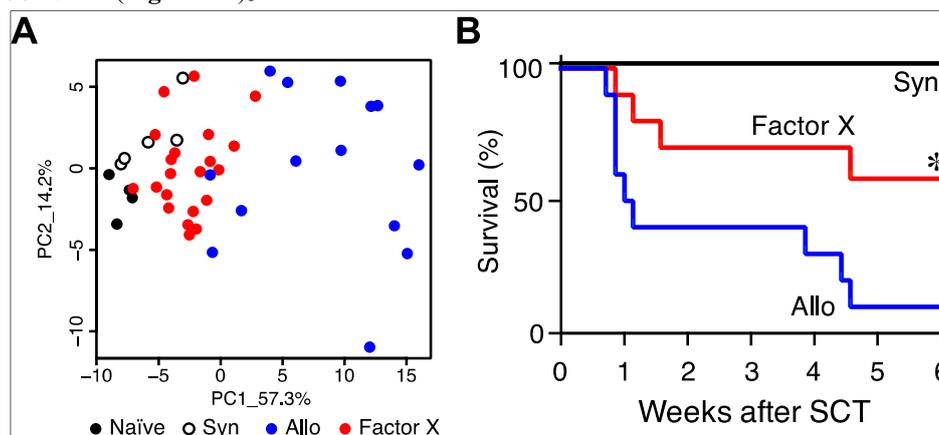


次に増殖因子Xをマウスの同種骨髄移植の前後3日間ずつ投与して, 7日目に腸管全体のスイスロール標本を作成し, パネト細胞をCrp1の蛍光免疫染色で観察したところ, GVHDの発症する同種移植後 (Allo)のマウスではGVHDによってパネト細胞が著明に減少しているにもかかわらず, 同種移植後に増殖因子Xを投与したマウスではパネト細胞が保護されていることが示された (Figure 3A)。さらに糞便中のα-defensin濃度を測定したところ, 増殖因子Xを投与することによって, α-defensinの産生低下が予防されていることが判明した (Figure 3B)。

増殖因子XはGVHDにおける腸管dysbiosisを予防し, 移植後のマウスの生存を改善する

骨髄移植後7日目の腸内細菌叢の構成を16S rRNAのシーケンスを行なって解析した。主成分解析の結果, 同種移植群(Allo)の細菌叢は, コントロールであるnaïveマウスや同系移植群 (Syn)のものと大きく異なっており, Allo群ではGVHDによる著明なdysbiosisが生じていることが判明した (Figure 4A)。一方, 増殖因子Xで治療されたマウスは腸内細菌構成がnaïveマウスやSyn群マウスの構成と有意差を認めず, 腸管dysbiosisが予防されたこと

が判明した。こうしたdysbiosisの抑制と関連して、移植後のマウスの生存は有意に改善し増殖因子XのGVHD予防効果が証明された (Figure 4B)。



4. まとめ

- ・ 増殖因子Xがパネト細胞増殖因子としての作用を有していることを*in vivo*で世界で初めて証明した。
- ・ 増殖因子Xの移植前後での短期投与はGVHDからパネト細胞を保護し、抗菌ペプチドの一種である α -defensinの分泌を維持することで腸管dysbiosisを予防することが可能であった。
- ・ 腸管dysbiosisの治療はこれまでプロバイオティクスやプレバイオティクス、菌叢移植が主であったが、内因性抗菌ペプチドの分泌を促進するパネト細胞増殖因子と遺伝子組換えCrp4を利用する、全く新しい腸管dysbiosis治療法を見出した。

5. 発表論文、参考文献

発表論文: 英文雑誌に投稿し、現在査読中である。

参考文献

1. J. Qin *et al.*, A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65 (2010).
2. P. B. Eckburg *et al.*, Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635-1638 (2005).
3. T. Sato *et al.*, Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**, 415-418 (2011).
4. C. L. Bevins, N. H. Salzman, Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* **9**, 356-368 (2011).
5. K. Masuda, N. Sakai, K. Nakamura, S. Yoshioka, T. Ayabe, Bactericidal activity of mouse alpha-defensin cryptdin-4 predominantly affects noncommensal bacteria. *Journal of innate immunity* **3**, 315-326 (2011).
6. T. Ayabe *et al.*, Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature immunology* **1**, 113-118 (2000).
7. S. Becattini, Y. Taur, E. G. Pamer, Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol Med* **22**, 458-478 (2016).
8. Y. Eriguchi *et al.*, Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins. *Blood* **120**, 223-231 (2012).
9. S. Takashima *et al.*, The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *The Journal of experimental medicine* **208**, 285-294 (2011).
10. K. Nakamura, N. Sakuragi, T. Ayabe, A monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of secreted alpha-defensin. *Anal Biochem* **443**, 124-131 (2013).