

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15463

研究課題名（和文）漢方における生薬のPaneth細胞を介した腸内環境制御メカニズム解明

研究課題名（英文）Regulation of intestinal environment via Paneth cell function in Kampo herbs

研究代表者

菊池 摩仁（Kikuchi, Mani）

北海道大学・先端生命科学研究院・博士研究員

研究者番号：30788906

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はPaneth細胞の自然免疫機能に着目し、食による健康維持や疾病予防を考える上での重要な候補でありながらこれまで不明であった漢方・生薬の効果のメカニズムを、Paneth細胞の顆粒分泌を介した腸内環境制御という視点から解析した。小腸上皮組織の3次元培養系（エンテロイド）等を用いた独自のPaneth細胞顆粒分泌評価系による評価で、漢方・生薬がディフェンシン分泌を誘導することを明らかにし、腸内環境改善効果の可能性を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漢方・生薬は様々な症状に対して伝統的に用いられているが、それらが症状を改善するメカニズムは未だ不明の点が多い。本研究によって、漢方・生薬の効果を小腸のPaneth細胞が細胞内顆粒中に豊富に存在するディフェンシンの分泌を誘導することを介する腸内環境の制御という視点からはじめて明らかにした。漢方・生薬の腸内環境に与える影響に関する全く新しいメカニズムを明らかにした本研究の学術的意義は大きく、さらに、本研究で得た腸内環境改善と健康維持に関する情報は新規食材開発に貢献する社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：By focusing on innate immune function of small intestinal Paneth cells with the viewpoint of intestinal environment regulation, this study elucidates the mechanism for efficacy of Kampo herbal medicines which remains unknown, though, are important candidate food materials for maintaining health and preventing diseases. The Kampo herbs that induce alpha-defensin secretion were identified by the evaluation system for Paneth cell granule secretions using a three-dimensional ex vivo culture system of small intestinal epithelial cells, enteroid, further suggesting effects of Kampo herbs on improving the intestinal environment.

研究分野：食品科学

キーワード：漢方 生薬 自然免疫 Paneth細胞 ディフェンシン 腸内環境 エンテロイド

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 漢方は、日本における歴史も古く独自の発達を示して現代において一般に普及している。漢方で用いられる生薬は天然に存在する植物などのうち生体に対する効果効能を持つ産物の総称であり、多くは食材として古来より体質改善を目的として用いられてきた。天然の食材の中から長い年月をかけて選び出されてきたこれらの漢方・生薬は様々な症状に対して伝統的に用いられ、比較的安全に長期的な摂取が可能であることから食による健康維持や予防治療に有用であると考えられている。漢方の中には便秘や下痢、腸炎、過敏性腸症候群などに有効とされる処方多数存在するが、漢方・生薬が腸にはたらきかけて症状を改善するメカニズムについては未だ不明である。

(2) 自然免疫の主要な作用因子である抗菌ペプチドは、生体において外界と接する部位における感染防御で重要なはたらきを担っている。莫大な数の微生物に曝されている腸管において、小腸陰窩の基底部に位置する小腸上皮細胞であるパネト細胞（Paneth 細胞）は、その細胞内顆粒中に抗菌ペプチド  $\alpha$  ディフェンシンを豊富に含んでいる。Paneth 細胞は細菌やコリン作動性刺激、さらには一部の食成分等に応答して、 $\alpha$  ディフェンシンを含む顆粒を小腸内腔に分泌し、腸内自然免疫に大きく貢献する。Paneth 細胞  $\alpha$  ディフェンシンは病原菌を強く殺菌する一方で、常在菌にはほとんど殺菌活性を示さない選択的殺菌活性を有する。さらに、 $\alpha$  ディフェンシンの量または質の異常は、腸内細菌叢の破綻を引き起こすことが知られている。しかしながら、これまで、漢方・生薬が小腸の Paneth 細胞に作用して  $\alpha$  ディフェンシン分泌量を変化させることで腸内細菌叢に影響を与えて制御し、腸内環境の恒常性維持に貢献しているのかについては全く不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまで伝統的に用いられている漢方・生薬の効能のメカニズムを、Paneth 細胞の顆粒分泌を介した  $\alpha$  ディフェンシンによる腸内環境制御という視点から明らかにすることを目的とする。具体的には、漢方・生薬を小腸上皮組織の 3 次元培養系であるエンテロイドの内腔にマイクロインジェクション法を用いて導入し、Paneth 細胞に作用して顆粒分泌を誘導するか検討し、漢方および漢方で扱われる複数の生薬の中から  $\alpha$  ディフェンシン分泌誘導能を持つ素材を見つけ出すことで、腸内環境改善と健康維持に有益な新規機能の発見から新規食材の開発までに貢献する。

## 3. 研究の方法

### (1) *Ex vivo* 評価系を用いた Paneth 細胞顆粒分泌誘導能の解析

本研究では、C57BL/6 マウスから小腸上皮組織の 3 次元 *ex vivo* 培養系であるエンテロイド (enteroid) を作製し、われわれの既報 (Yokoi Y et al., *Sci Rep* 2019) に準じてエンテロイド内腔に調製した候補漢方をマイクロインジェクション法で導入し、Paneth 細胞の顆粒分泌について共焦点レーザー顕微鏡を用いた time-lapse 観察を行うことで、ハイスループットに Paneth 細胞顆粒分泌誘導活性を解析した。この評価系を用いて顆粒分泌誘導活性を有する漢方をスクリーニングした後、次に、それらの漢方を構成するどの生薬が顆粒分泌誘導活性において中心的な役割

を担っているかについて同様の手法を用いて解析した。

Paneth 細胞顆粒分泌誘導活性を有する漢方のスクリーニングは、便秘や下痢、腸炎、過敏性腸症候群など腸症状または腸症状を伴う病態に対する有効性情報を元にして漢方を選択して行った。また、スクリーニングで抽出されてきた Paneth 細胞顆粒分泌活性を有する漢方を構成する生薬については、少なくともその中のいずれかあるいは複数が活性を有すると考えられるため、それらの生薬単体で Paneth 細胞顆粒分泌誘導活性を同様の手法で評価した。

#### (2) *In vivo* 評価による Paneth 細胞 $\alpha$ ディフェンシン分泌誘導能の解析

*Ex vivo* で顆粒分泌を誘導した漢方・生薬を投与することで、Paneth 細胞顆粒中に含まれる  $\alpha$  ディフェンシンの腸管内腔への分泌量が増加することが考えられる。さらに、Paneth 細胞からの  $\alpha$  ディフェンシン分泌が誘導されると、 $\alpha$  ディフェンシンの有する選択的な殺菌活性によって、腸内細菌叢の組成が変化することが予測される。これらの過程を検証するために、エンテロイドにおいて Paneth 細胞顆粒分泌を誘導した漢方・生薬から強度や適性等を考慮して選択した漢方・生薬についてマウスに経口投与し、糞便中の  $\alpha$  ディフェンシン量の測定、小腸の組織学的解析や腸内細菌解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) エンテロイドを用いた *ex vivo* 評価系を適用することで、漢方・生薬の Paneth 細胞顆粒分泌誘導能をハイスループットに評価可能としたことは本研究の大きな独創的成果である。便秘や下痢、腸炎、過敏性腸症候群など腸症状に対して有効とされている漢方を小腸上皮細胞の 3 次元 *ex vivo* 培養系であるエンテロイドの内腔にマイクロインジェクションし、Paneth 細胞からの顆粒分泌を共焦点レーザー顕微鏡下で 30 分間観察することで顆粒分泌誘導活性をスクリーニングしたところ、有意な顆粒分泌誘導活性を認める漢方が複数抽出された。さらに、これらの漢方を構成する生薬について同様の解析を行ったところ、少なくとも 5 種類の生薬で Paneth 細胞の顆粒分泌誘導活性を認めることが明らかになった。これら知見は国内外を問わずこれまで全く知られておらず、漢方・生薬の新たな効果発現メカニズムを明らかにしたものであると共に、広い応用展開の可能性を提示した。

(2) 上記で定量した漢方・生薬の Paneth 細胞顆粒分泌誘導活性の強さを指標にして、さらに物性や適性および、これまでに知られている効能等を総合的に考慮することで候補素材を決定して *in vivo* 試験を行った。糞便中  $\alpha$  ディフェンシン量を測定し、Paneth 細胞からの  $\alpha$  ディフェンシン分泌や腸内細菌解析を総合的に評価して腸内環境に影響する漢方・生薬を特定し、エンテロイドで Paneth 細胞からの顆粒分泌がみられた漢方・生薬の生体における  $\alpha$  ディフェンシン分泌および腸内環境への作用を検証した。Paneth 細胞  $\alpha$  ディフェンシンは選択的殺菌活性を持ち、病原菌に強い殺菌活性を示す一方で共生菌はほとんど殺菌しないことが知られており、腸管自然免疫による腸内細菌叢の制御、すなわち排除と共生の両方において重要な役割を担っている。したがって、本研究で明らかにした漢方・生薬が Paneth 細胞からの  $\alpha$  ディフェンシン分泌を誘導することは、それらが Paneth 細胞を介して腸内細菌叢にはたらきかけることで、腸内環境を適切に制御して改善する可能性を示している。以上より、これまで知られていなかった漢方・生薬の小腸上皮細胞である Paneth 細胞に及ぼす新たな機能を証明した学術的意義に加えて、漢方・生薬による腸内環境改善と健康維持作用の理解から応用への貢献という社会的インパクトを有する成果を挙げた。

(3) 結語として、本研究は、食による健康維持を考える上で重要な候補でありながら未だメカニズムが明らかになっていなかった漢方・生薬が Paneth 細胞からの  $\alpha$  ディフェンシン分泌誘導を介して腸内環境を制御するという新しい効果発現メカニズムを明らかにすることで、そのような効果を担う漢方・生薬が腸内環境改善と健康維持に有益な素材となる可能性をはじめて示した。さらに、今後の新規素材開発にも貢献する大きな成果を得た。

#### <引用文献>

- ① Sato T et al., Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009, 459: 262.
- ② Masuda K et al., *J Innate Immun* Bactericidal activity of mouse  $\alpha$ -defensin cryptdin-4 predominantly affects noncommensal bacteria. 2011, 3: 315.
- ③ Nakamura K et al., Paneth cell  $\alpha$ -defensins and enteric microbiota in health and disease. *Biosci Microbiota Food Health* 2016, 35: 57.
- ④ Takakuwa A et al., Butyric acid and leucine induce  $\alpha$ -defensin secretion from small intestinal Paneth cells. *Nutrients* 2019, 11: 2817.
- ⑤ Yokoi Y et al., Paneth cell granule dynamics on secretory responses to bacterial stimuli in enteroids. *Sci Rep* 2019, 9: 2710.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shimizu Yu, Nakamura Kiminori, Kikuchi Mani, Ukawa Shigekazu, Nakamura Koshi, Okada Emiko, Imae Akihiro, Nakagawa Takafumi, Yamamura Ryodai, Tamakoshi Akiko, Ayabe Tokiyoshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Lower human defensin 5 in elderly people compared to middle-aged is associated with differences in the intestinal microbiota composition: the DOSANCO Health Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 GeroScience	6. 最初と最後の頁 997 ~ 1009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11357-021-00398-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yokoi Yuki, Adachi Takahiro, Sugimoto Rina, Kikuchi Mani, Ayabe Tokiyoshi, Nakamura Kiminori	4. 巻 545
2. 論文標題 Simultaneous real-time analysis of Paneth cell and intestinal stem cell response to interferon- $\gamma$ by a novel stem cell niche tracking method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 14 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Kiminori, Yokoi Yuki, Fukaya Rie, Ohira Shuya, Shinozaki Ryuga, Nishida Takuto, Kikuchi Mani, Ayabe Tokiyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Expression and Localization of Paneth Cells and Their $\alpha$ -Defensins in the Small Intestine of Adult Mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 570296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.570296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Yu, Nakamura Kiminori, Yoshii Aki, Yokoi Yuki, Kikuchi Mani, Shinozaki Ryuga, Nakamura Shunta, Ohira Shuya, Sugimoto Rina, Ayabe Tokiyoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Paneth cell $\alpha$ -defensin misfolding correlates with dysbiosis and ileitis in Crohn's disease model mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900592	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Komatsu Yosuke, Shimizu Yu, Yamano Megumi, Kikuchi Mani, Nakamura Kiminori, Ayabe Tokiyoshi, Aizawa Tomoyasu	4. 巻 16
2. 論文標題 Disease progression-associated alterations in fecal metabolites in SAMP1/YitFc mice, a Crohn's disease model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metabolomics	6. 最初と最後の頁 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11306-020-01671-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yuki Yokoi, Kiminori Nakamura, Shuya Ohira, Ryuga Shinozaki, Mani Kikuchi, Tokiyoshi Ayabe
2. 発表標題 Dynamics of Paneth cell granule secretory responses to bacteria in innate enteric immunity
3. 学会等名 World Microbe Forum (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yu Shimizu, Kiminori Nakamura, Aki Yoshii, Yuki Yokoi, Mani Kikuchi, Ryuga Shinozaki, Shunta Nakamura, Shuya Ohira, Rina Sugimoto, Tokiyoshi Ayabe
2. 発表標題 ER Stress-Associated Misfolding of Paneth Cell $\alpha$ -Defensin Induces Dysbiosis and Ileitis in a Murine Model of Crohn's Disease
3. 学会等名 World Microbe Forum (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横井友樹、中村公則、高桑暁子、菊池摩仁、綾部時芳
2. 発表標題 Paneth細胞顆粒分泌応答からみた食機能評価系の確立
3. 学会等名 第17回日本食品免疫学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八塚夏美、杉本理菜、大平修也、横井友樹、菊池摩仁、綾部時芳、中村公則
2. 発表標題 母親の高脂肪食摂取が子のPaneth細胞の発達に与える作用メカニズム
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuya Ohira, Yuki Yokoi, Mani Kikuchi, Natsumi Yatsuzuka, Tokiyoshi Ayabe, Kiminori Nakamura
2. 発表標題 Simple and efficient genetic engineering of enteroids by using mouse isolated crypts
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村駿太、中村公則、菊池摩仁、横井友樹、大平修也、清水由宇、西田琢人、綾部時芳
2. 発表標題 Paneth細胞の機能異常は腸内細菌叢の破綻を介してNASH発症に関与する
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 子安惟、中岡慎、菊池摩仁、中村公則、綾部時芳
2. 発表標題 桑葉摂取による -defensinと腸内細菌叢の経時変化に対する統計解析
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村山綾菜、中村公則、菊池摩仁、横井友樹、綾部時芳
2. 発表標題 クローン病モデルマウスSAMP1/YitFcの慢性回腸炎の免疫病態
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------