

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462831

研究課題名(和文) 培養オルガノイド由来パネト細胞を用いた口腔細菌と腸管自然免疫のクロストーク解明

研究課題名(英文) Elucidation of the interplay between oral bacteria and intestinal innate immunity using Paneth cells in organoid cultures

研究代表者

中村 公則 (Nakamura, Kiminori)

北海道大学・先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：80381276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、口腔細菌の腸管への影響を自然免疫の観点から解明するために、腸管自然免疫の主要エフェクターである抗菌ペプチド・ α -defensinを分泌し自然免疫や腸内細菌叢の恒常性維持に寄与するPaneth細胞に焦点をあてた新規腸管自然免疫評価系を開発することを目的とした。本研究により、オルガノイド培養法と α -defensinを定量可能なELISAを応用することで、Paneth細胞顆粒分泌を反映した自然免疫評価系が確立できた。この評価法を応用することで、口腔細菌と腸管自然免疫の相互作用解析が可能となる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the relationship between oral bacteria and intestinal epithelia cells in terms of innate immunity, the aim of this study was to establish an evaluation system for intestinal innate immunity focused on Paneth cell α -defensin secretory functions. New analysis method for Paneth cell secretory functions using cultured organoids from mouse small intestine and newly developed sandwich ELISA for α -defensin were established. These methods will contribute to clarifying links between oral bacteria and intestinal innate immunity.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 Paneth細胞 α -defensin

1. 研究開始当初の背景

今日、口腔常在菌・病原菌は口腔内の疾患のみに関わらず生活習慣病（メタボリックシンドローム、糖尿病）などの全身疾患への関与が多く報告されてきているが、その疾患に至る機序は未だに不明である。消化管は解剖学的に口腔を起点とし、腸管に至る臓器である。腸内細菌叢を形成する微生物は、口腔から消化管を通過して多くは大腸に住み着く。口腔から大腸までの過程で、微生物は宿主の自然免疫系によって選択されて、排除・共生または感染成立に至るものと考えられる。一方、腸管細菌叢組成の変化が腸炎や生活習慣病の発症に関与しているとの報告がある。また、その腸管細菌叢の変化に小腸上皮細胞の一つパネト細胞が分泌する自然免疫のエフェクターである抗菌ペプチド・ α ディフェンシン（マウスでは Cryptdin: Crp）の関与が注目されている（Masuda K, Nakamura K *et al.*, *J Innate Immun* 2011）。したがって、口腔常在菌・病原菌がパネト細胞、さらには腸管細菌叢に影響を及ぼし、全身疾患の病因や病態に関与している可能性は大きいと考える。しかし、これまで腸管上皮細胞の生理的状態や病理を適切に反映するモデル系が確立されていないため、腸管機能に関わる分子機構の解析や自然免疫機構の評価は困難であった。その大きな理由は正常腸管上皮細胞の培養が難しいことにある。現在、腸管上皮細胞の機能解析には大腸癌由来の細胞株が用いられており、これらは正常組織由来の腸管上皮細胞を反映していない可能性が懸念される。最近、腸管上皮培養法としてオルガノイド培養法が注目されている（Sato T *et al.*, *Nature* 2011）。しかし、この培養法は基質に包埋された状態での培養であること、小腸陰窩様の組織構造体単位で増殖するため単位ごとに大きさや細胞組成が不均一であること等の理由により、*in vitro*で小腸上皮の機能解析を定量的に行うことが難しい。そこで、本申請実験では初めにオルガノイド培養法を応用・発展させ、機能解析に適した小腸上皮細胞、特に腸管自然免疫において重要な役割を担っているパネト細胞の株化を目指す。さらに、口腔常在菌・病原菌が腸管自然免疫に及ぼす影響を評価する方法として申請者が先行研究で開発した α ディフェンシンに高感度で特異性の高い sandwich ELISA を使用して、口腔内細菌が腸管上皮細胞の自然免疫機能に及ぼす影響を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、解剖学的位置は離れているが、口腔と腸管における自然免疫機構のクロストークが存在し、口腔と腸管のリンクが正常な口腔内環境および腸内環境の維持やその破綻に関与しているとの仮説を立て、口腔常在菌・病原菌のパネト細胞 α ディフェンシン分泌への影響及び、腸内細菌叢組成への関与を検討することで歯周病や肥満、糖尿病などの生活

習慣病などの全身疾患の発症や進行メカニズム解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) オルガノイド培養

CD1 マウス（10 週齢、雄）を、ジエチルエーテルで麻酔後、頸椎脱臼を行った。CD1 の腹部表面を消毒用エタノールで消毒した後、オートクレーブ滅菌済みの解剖用器具を用いて腹部を切開した。CD1 の空腸側末端から約 5 cm を切除し腸管内をゾンデと 20 cc シリンジを用いて ice cold Ca^{++} , Mg^{++} -free PBS (PBS-) で 1 回洗浄した後、EDTA 分離法に準じて小腸陰窩を単離した。すなわち、小腸組織を反転させて 30mM EDTA/ Ca^{++} , Mg^{++} -free HBSS (HBSS-) 中で振動を加え、70%以上の純度で単離陰窩を含む分画を得た。遠心分離 (4°C, 440 G, 4 min) を行い、上清を除去して 10 μM Y-27632 (Sigma) /ice cold HBSS- 500 μL で懸濁し 5 μL をスライドガラスに滴下し、顕微鏡（倒立型ルーチン顕微鏡 CKX31）下で陰窩数を算出した。さらに遠心分離を行い、上清を除去して一定数になるように単離陰窩を ice cold 培地と Matrigel (Corning) を同量で懸濁して、事前に 37°C で温めていた培養皿に播種した。このとき Matrigel が well 壁面に触れないように well の中心部を狙い、また気泡が入らないように播種した。5% CO_2 , 37°C, 20 min で重合させ、事前に 37°C で温めていた培地を加えて培養した。培養開始から 1 日置きに、事前に 37°C で温めていた新しい培地と交換した。

(2) オルガノイドを用いたホールマウント免疫染色

顕微鏡下で以下の操作を行った。培養単離小腸陰窩から成長したオルガノイドを培養皿からマイクロピペット (Eppendorf) で 1 個ずつ回収し 0.6 mL マイクロチューブ (Axygen) に入った 4%パラホルムアルデヒドに移して 25°C, 30 min 固定した。0.1%TritonX-100 (Roche) /5%ヤギ血清/PBS-で 25°C, 30 min 浸透化およびブロッキングを行った。0.1%TritonX-100/10 倍希釈ブロックエース (DS Pharma Biomedical) /PBS- (抗体希釈バッファー) で希釈したマウスモノクローナル抗 E-Cadherin 抗体 (BD Transduction Laboratories) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ウサギポリクローナル抗 Villin 2 抗体 (Cell Signaling) 200 倍希釈、ウサギモノクローナル抗 MMP7 抗体 (Cell Signaling) 100 倍希釈、ラットモノクローナル抗 Crp1 抗体 (77-R63) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 25°C, 2 hr 反応させた。抗体希釈バッファーで希釈した Alexa Fluor 594 標識抗マウス IgG 抗体 (Life Technologies) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Alexa Flour 488, 594 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Alexa Flour 488 標識抗ラット IgG 抗体 (Life Technologies) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 25°C, 1 hr 反応させた。4', 6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 25°C, 5 min 反応させた。Cell TAK (BD Transduction Laboratories) 2 $\mu\text{L}/\text{枚}$ でコー

ティングしたカバーガラスにサンプルをのせた。その後、Aqua Poly/Mount (Polysciences) でコーティングしたスライドガラス 1 穴ホール (MATSUNAMI) に包埋した。得られた標本は共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, LSM510) で観察した。固定以降、溶液を添加して反応させた後は、毎度、PBS-で洗浄し、次の反応溶液を添加した。

(3) Sandwich ELISA を用いた分泌刺激後の培養上清中 Crp1 濃度測定

① オルガノイドを用いた CCh および LPS による分泌刺激

培養開始から 7 日目に、マイクロピペットによる pipetting で物理的に Matrigel を培養皿からはがし、15 ml コニカルチューブ (Thermo) にオルガノイドを回収した。遠心分離後、上清を除去し、オルガノイドを新しい培地と Matrigel を同量で懸濁して培養皿に播種した。重合後、CCh; 10, 100, 1000 μ M (Sigma)、LPS; 1, 10, 100 μ g/mL (Sigma) を含む培地を添加し、24 時間後の培養上清を測定試料とした。培養上清回収後、新しい培地を加え顕微鏡下で各オルガノイド数を算出した。96 well 平底プレート (immunoplate maxisorp, Nunc) に、Carbonate Bicarbonate Buffer pH 9.6

(Sigma) で希釈した固相化抗体 (Crp1: 77-R5) 1 μ g/mL、100 μ L/well で 4°C、20 hr および 25°C、1 hr 固相化した。PBS-in 0.1% tween 20 (PBS-T) で 4 倍希釈した 1×ブロッケン 200 μ L/well で 25°C、1.5 hr ブロッキングした。On ice で PBS-で希釈した Crp1 また測定試料 100 μ L/well を固相化抗体と 25°C、2 hr 反応させた。PBS-で希釈したビオチン標識検出抗体 (Crp1: 77-R20) 0.5 μ g/mL、100 μ L/well を 25°C、1 hr 反応させた。その後、PBS-T で 5000 倍希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識ストレプトアビジン 100 μ L/well (GE Healthcare UK) をビオチンと 25°C、1 hr 結合反応させた。抗体固相化以降、溶液を添加して反応させた後は、毎度、PBS-T で洗浄し、次の反応溶液を添加した。3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) (SureBlue, KPL) 100 μ L/well で HRP と 25°C、30 min 酵素反応させ、青色に発色させた。反応停止液 (0.6 N 硫酸 (Nacalai)) 100 μ L/well で発色反応を止めて、OD (450/620 nm) 値を Multiscan FC (Thermo) で測定した。測定した値を各オルガノイド数で補正することでオルガノイド 1 個当たりの Crp1 濃度を算出した。

② 培養単離陰窩を用いた CCh、LPS および微生物抗原による分泌刺激

単離陰窩を最終濃度が CCh; 1, 10, 100 μ M、LPS; 1, 10, 100 μ g/mL、ムラミルジペプチド (MDP; 100 μ g/mL、Sigma)、ペプチドグリカン (PGN; 100 μ g/mL、Invivogen)、ポリリノシン・ポリシチジン酸 (P (I: C); 100 μ g/mL、Invivogen)、フラジェリン (FLA; 1mg/mL、Invivogen) になるように含む培地と Matrigel を同量で懸濁して培養皿に播種した。重合後、

上記を含む培地を添加し 1 時間および 2 時間後の培養上清を測定試料とした。培養上清回収後、新しい培地を加え顕微鏡下で各培養単離陰窩数を算出した。測定試料中の Crp1 濃度を上記と同様に sandwich ELISA で測定し、オルガノイド 1 個当たりの Crp1 濃度を算出した。

4. 研究成果

(1) オルガノイドの成長過程

オルガノイド培養法に基づいて培養した単離陰窩は、培養開始から約 30 分~70 分で内腔が閉鎖した円形の構造を形成した。さらに時間経過とともに円形構造は大きく成長していき day3 で陰窩様形態が出芽した。さらに陰窩様形態は次々に出芽していき、全体が大きくなって成長していった。Day7 までには小腸組織に類似した絨毛陰窩様構造を有するオルガノイドに成長し、細胞内顆粒を持つ細胞が陰窩様構造基底部にみられ、中央部分には内腔が存在した (図 1)。この成長過程において、上皮細胞の増殖と分化を繰り返して生じたアポトーシス細胞はオルガノイド内腔に放出されることが報告されている。さらには蓄積され、ついには上皮を突き破ってオルガノイドからあふれ出ている様子が、day3 以降観察できた (図 1)。このことより、その際に形成される穴を介して内腔と培養上清との間における物質の移動、つまり培地に添加した刺激物の内腔への移動および内腔に分泌された Crp の培養上清への移動が可能であることを示唆する。

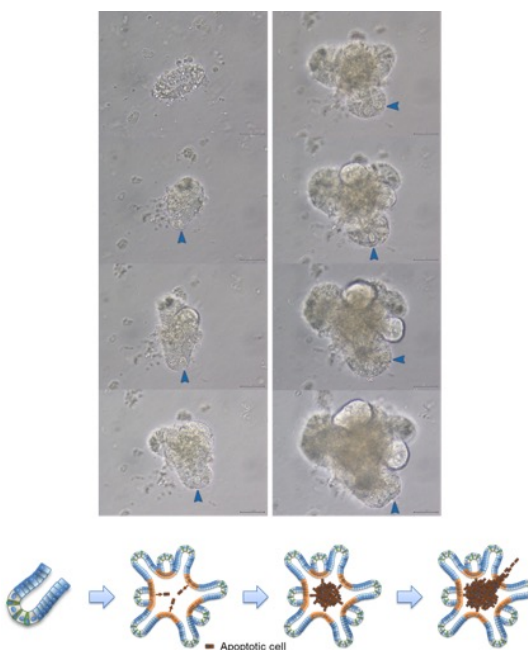


図 1 オルガノイドの成長過程

(2) オルガノイドにおける小腸上皮細胞マーカーの局在

オルガノイドが小腸上皮細胞マーカーを発現し、その局在が正常組織と同様であるかを

検討するために、培養開始から7日目のオルガノイドを用いてホルマウント免疫染色を行った。上皮細胞マーカーとして知られ、正常小腸組織では細胞膜表面に局在する E-Cadherin が、構成する全ての細胞膜表面に発現していた (図 2a)。また、Paneth 細胞や吸収上皮細胞を含む小腸上皮細胞マーカーであり、正常組織では管腔側微絨毛に局在する Villin2 が管腔側微絨毛に発現していた (図 2 b)。さらに、正常小腸組織では Paneth 細胞の管腔側にある細胞内顆粒にのみ含まれる Crp1 及び MMP7 が、微分干渉顕微鏡 (DIC) 観察で陰窩様構造基底部の管腔側にある細胞内顆粒に発現がみられ、両者は共局在していた (図 2c)。以上の結果より、得られたオルガノイドは腸上皮細胞マーカーである E-Cadherin、小腸上皮細胞マーカーである Villin2、Paneth 細胞マーカーである MMP7 および Crp1 を発現していることが確認された。

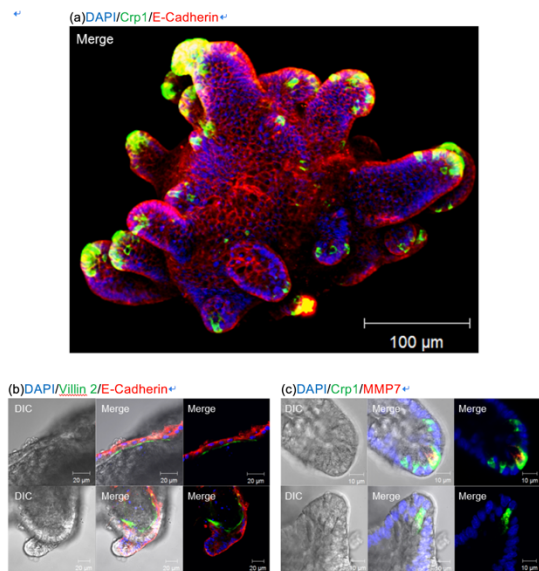


図 2 オルガノイドにおける小腸上皮細胞マーカーの局在

オルガノイドに含まれる Paneth 細胞が Crp 分泌機能を有しているのかを検討するために、sandwich ELISA を用いて分泌刺激後の培養上清中 Crp1 濃度測定を行った。培養開始から7日目の継代時に、CCh および LPS を含む培地を加えてから 24 時間後の培養上清を測定試料として sandwich ELISA で Crp1 濃度を測定した。CCh において未処理では 0.47 ± 0.05 (ng/mL)、 $10 \mu\text{M}$ では 0.92 ± 0.06 (ng/mL)、 $100 \mu\text{M}$ では 1.05 ± 0.04 (ng/mL)、 $1000 \mu\text{M}$ では 1.02 ± 0.06 (ng/mL) であり、Crp1 濃度は未処理と比べて濃度依存的に有意に高い分泌応答を示した (図 3a)。一方、LPS において未処理では 0.61 ± 0.26 (ng/mL)、 $1 \mu\text{g/ml}$ では 0.61 ± 0.29 (ng/mL)、 $10 \mu\text{g/ml}$ では 0.53 ± 0.17 (ng/mL)、 $100 \mu\text{g/ml}$ では 0.56 ± 0.22 (ng/mL) であり、Crp1 濃度は未処理と比べて上昇しなかった (図 3)。

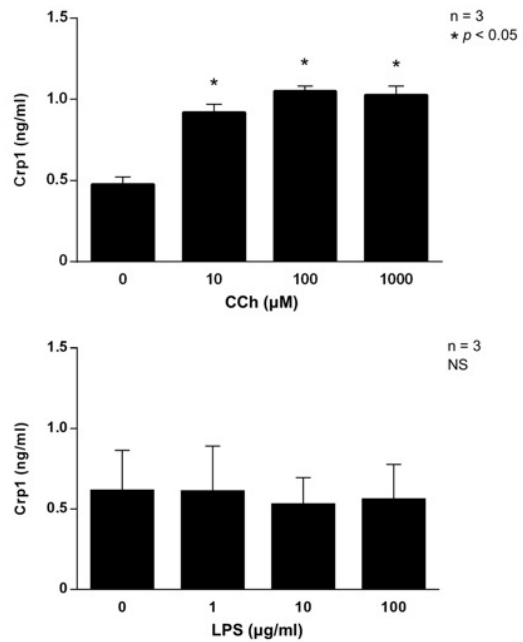


図 3 オルガノイドを用いた CCh および LPS に対する分泌応答

オルガノイドに含まれる Paneth 細胞は、コリン作動薬であるため、基底膜側からの刺激と考えられる CCh に対し分泌応答を示す一方で、細菌抗原であり内腔側からの刺激と考えられる LPS に対しては分泌応答を示さなかったこと。このことは、オルガノイドは内腔が閉鎖した構造を有することにより、内腔側からの刺激が届かないことが考えられた。そこで、内腔が開いていると考えられる単離した培養直後の陰窩である培養単離陰窩を用いることを考えた (図 4)。

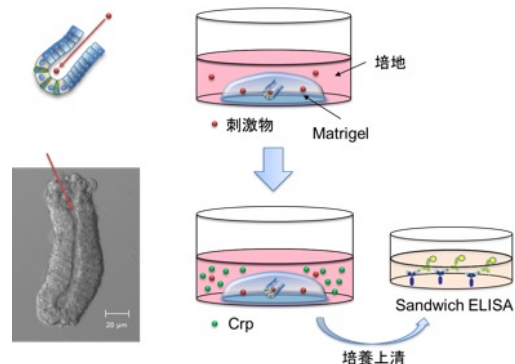


図 4 培養単離陰窩と sandwich ELISA を用いた Paneth 細胞の分泌機能解析

(3) 培養単離陰窩を用いた CCh、LPS および微生物抗原に対する分泌応答

培養単離陰窩に含まれる Paneth 細胞が Crp 分泌機能を有し、機能解析法の構築に適しているのかを検討するために、sandwich ELISA を用いて分泌刺激後の培養上清中 Crp1 濃度測定を行った。重合後に CCh、LPS、MDP、PGN、P (I: C)、FLA を含む培地を加えてから 1 時間後および 2 時間後の培養上清を測定試料として sandwich ELISA で測定した。1 時間後の

上清中では、CChにおいて未処理では 0.096 ± 0.017 (ng/mL)、 $1 \mu\text{M}$ では 0.102 ± 0.014 (ng/mL)、 $10 \mu\text{M}$ では 0.173 ± 0.018 (ng/mL)、 $100 \mu\text{M}$ では 0.274 ± 0.049 (ng/mL) であり、Crp1 濃度は未処理と比べて濃度依存的に有意に高い分泌応答を示した。また、LPS において未処理では 0.096 ± 0.017 (ng/mL)、 $1 \mu\text{g/mL}$ では 0.099 ± 0.017 (ng/mL)、 $10 \mu\text{g/mL}$ では 0.110 ± 0.020 (ng/mL)、 $100 \mu\text{g/mL}$ では 0.106 ± 0.019 (ng/mL) であり、Crp1 濃度は未処理と比べて上昇しなかった。さらに、微生物抗原を処理した場合、未処理では 0.060 ± 0.018 (ng/mL)、 $100 \mu\text{M}$ CCh では 0.189 ± 0.024 (ng/mL)、 $100 \mu\text{g/mL}$ LPS では 0.084 ± 0.013 (ng/mL)、 $100 \mu\text{g/mL}$ MDP では 0.070 ± 0.011 (ng/mL)、 $100 \mu\text{g/mL}$ PGN では 0.076 ± 0.010 (ng/mL)、 $100 \mu\text{g/mL}$ P (I: C) では 0.077 ± 0.012 (ng/mL)、 1mg/mL FLA では 0.060 ± 0.015 (ng/mL) であり、CCh において Crp1 濃度は未処理と比べて有意に高い分泌応答を示した。これに対して、LPS、MDP、PGN、P (I: C)、FLA では有意な分泌応答を検出できなかった (図 5a)。一方、2 時間後の上清中において、未処理では 0.068 ± 0.019 (ng/mL)、 $100 \mu\text{M}$ CCh では 0.215 ± 0.047 (ng/mL)、 $100 \mu\text{g/mL}$ LPS では 0.121 ± 0.033 (ng/mL)、 $100 \mu\text{g/mL}$ MDP では 0.091 ± 0.024 (ng/mL)、 $100 \mu\text{g/mL}$ PGN では 0.090 ± 0.010 (ng/mL)、 $100 \mu\text{g/mL}$ P (I: C) では 0.096 ± 0.026 (ng/mL)、 1mg/mL FLA では 0.080 ± 0.024 (ng/mL) であり、CCh および LPS において Crp1 濃度は未処理と比べて有意に高い分泌応答を示した。これに対して、MDP、PGN、P (I: C)、FLA では有意な分泌応答を検出できなかったが、1 時間後の Crp1 濃度と比べ上昇する傾向があった。以上の結果より、培養単離陰窩に含まれる Paneth 細胞は基底膜側からの刺激である CCh および内腔側からの刺激である LPS に対して分泌応答を示し、また、微生物抗原である MDP、PGN、P (I: C)、FLA に対しても分泌応答が示唆された (図 5b)。

本研究により、オルガノイドは Crp を含む小腸上皮細胞マーカーを発現し、基底膜側刺激物である CCh に対して分泌応答する一方で、内腔側刺激物である LPS には閉鎖構造を有することで応答しないことがわかった。そして、培養単離陰窩は Crp を含む小腸上皮細胞マーカーを正常組織と同様に発現し、内腔が開口して刺激物が届いていることがわかった。また、CCh および LPS に対して Paneth 細胞は分泌応答を示した。さらに、その他の検討した微生物抗原に対しても分泌応答することが示唆された。これまで、正常腸管上皮細胞が存在しないため Paneth 細胞を含む腸管上皮細胞の機能解析が進んでいなかったが、培養単離陰窩と当研究室で確立した Crp 特異的 sandwich ELISA を組み合わせることで、Paneth 細胞の分泌機能解析を行うことがはじめて可能となった。今後、この方法を用いて Paneth 細胞の分泌機能を解明し、口腔細菌と

腸管自然免疫の相互作用解析が可能となる。

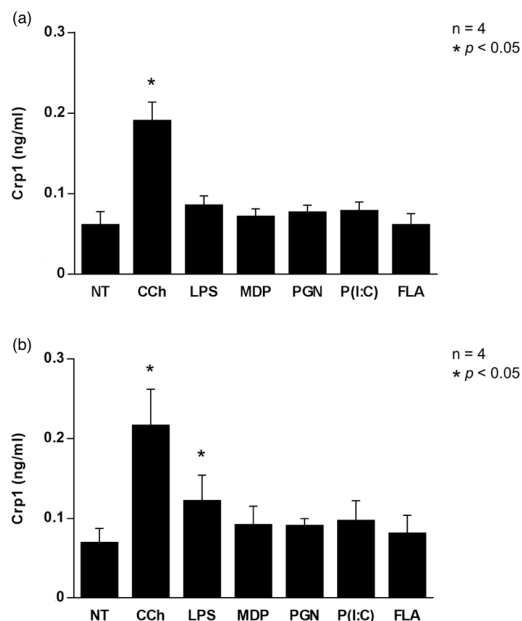


図 5 培養単離陰窩を用いた CCh、LPS および微生物抗原に対する分泌応答

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Nakamura K, Sakuragi N, TAKAKUWA A, Ayabe T. Paneth cell α -defensins and enteric microbiota in health and disease. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 2016;35 (2) :57-67. 査読 (有) .
- ② Eriguchi Y, Nakamura K, Hashimoto D, et al. (8 人中 2 番目) . Decreased secretion of Paneth cell α -defensins in graft-versus-host disease. *Transpl Infect Dis*. 2015;17 (5) :702-706. 査読 (有) .
- ③ Tomisawa S, Nakamura K, Aizawa T, et al. (10 人中 8 番目) . Efficient production of a correctly folded mouse α -defensin cryptdin-4 by refolding during inclusion body solubilization. *Protein Expr Purif*. 2015;112:21-28. 査読 (有) .
- ④ Taira R, Yamaguchi S, Shimizu K, Nakamura K, Ayabe T, Taira T. Bacterial cell wall components regulate adipokine secretion from visceral adipocytes. *J Clin Biochem Nutr*. 2015;56 (2) :149-154. 査読 (有) .
- ⑤ Ikeda M, Yamaguchi M, Kato K, Nakamura K, et al. (11 人中 4 番目) . PrIE11 a novel anti-TROP-2 antibody isolated by adenovirus-based antibody screening recognizes a unique epitope. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

- 2015;458 (4) :877-882. 査読 (有) .
- ⑥ Nukuda A, Sasaki C, Nakamura K, Haga H, *et al.* (8人中5番目) . Stiff substrates increase YAP-signaling-mediated matrix metalloproteinase-7 expression. *Oncogenesis*. 2015;4:e165. 査読 (有) .
- ⑦ 中村公則、綾部時芳. 腸上皮細胞の抗菌ペプチドによる自然免疫. 臨床免疫・アレルギー科 64 (1) : 2015; 20-25. 査読 (有) .
- ⑧ Yamaguchi M, Nishii Y, Nakamura K, *et al.* (8人中3番目) . Development of a sensitive screening method for selecting monoclonal antibodies to be internalized by cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;454(4) :600-603. 査読 (有) .

[学会発表] (計2件)

- ① 清水由宇、中村公則、吉井彩季、菊池摩仁、櫻木直也、綾部時芳「クローン病モデルマウス SAMP1/YitFc の病態形成に伴う dysbiosis と α -defensin の高次構造異常との関連」; 第39回日本分子生物学会年会、2016年12月01日~2016年12月02日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ② 横井友樹、中村公則、櫻木直也、菊池摩仁、綾部時芳; 「Enteroid を用いた Paneth 細胞顆粒分泌反応の可視化解析による機序解明」; 第12回日本食品免疫学会学術大会、2016年11月09日~2016年11月10日、伊藤謝恩ホール (東京都・文京区)

[その他]

ホームページ等

<http://www.lfsci.hokudai.ac.jp/labs/infsig/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 公則 (NAKAMURA KIMINORI)

北海道大学・先端生命科学研究院・准教授

研究者番号 : 8 0 3 8 1 2 7 6