

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660100

研究課題名(和文) 司令塔としてのパネト細胞ネットワークが解き明かす食品機能の新展開

研究課題名(英文) Paneth cells and their networks as headquarters for clarifying food function

研究代表者

櫻木 直也 (Sakuragi, Naoya)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任助教

研究者番号：80420660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はからだの司令塔としての“腸”の働きに注目し、中でも腸管上皮細胞の中核としてのパネト細胞の細胞膜および分泌タンパク質を解析することによって、パネト細胞を中心とするネットワークがいかに構築されているのかを明らかにすることであった。本研究によって、パネト細胞の高純度かつ大量取得技術を確立し、さらにパネト細胞で発現する37遺伝子をはじめて同定した。それら遺伝子を大別すると、自然免疫および再生・分化機能以外にも、栄養吸収、神経系、代謝など多様な遺伝子発現が認められた。すなわち、パネト細胞が多彩な機能を担い、パネト細胞を中心としたネットワークが食との関係において腸で働いていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was focused on "How Paneth Cell Network is organized" that may work as headquarters in the intestine. To investigate this possibility, we established high purity and large quantity Paneth cell purification method, and analyzed membrane and secretion related gene expression in Paneth cells. Total 37 genes were identified and classified into absorption of nutrition, nervous system, metabolism and so on, in addition to innate immunology, renewal and differentiation. These results suggest that Paneth cells may have many important functions and work as headquarters in the intestine.

研究分野：農芸化学

キーワード：パネト細胞 栄養吸収 神経系 代謝 再生・分化 制御

### 1. 研究開始当初の背景

腸管は体の中でありながら外界と接している器官で、内なる外とも言われている。中でも上皮細胞はその最前線に位置し、吸収上皮細胞、内分泌細胞、杯細胞、そして Paneth 細胞 (パネト細胞) からなり、幹細胞より再生・分化する。パネト細胞は陰窩基底部に存在する顆粒を持つ細胞で、自然免疫 (Ayabe T et al., Nature Immunol 2000)、および再生 (Sato T et al., Nature 2009)において重要な役割を果たしていることが知られている。パネト細胞の顆粒中には  $\alpha$ -デフィエンシンが含まれている。 $\alpha$ -デフィエンシンは強力な抗菌ペプチドであり、自然免疫に寄与している。我々はパネト細胞から小腸および大腸内腔に分泌された  $\alpha$ -デフィエンシンを初めて定量し、さまざまな疾病に關与する可能性を示した (Nakamura K, Sakuragi N, Ayabe T, Anal Biochem 2013)。さらにパネト細胞は自然免疫を担うのみならず、腸内細菌叢をコントロールすること (Masuda K, et al., J Innate Immun 2011) や、幹細胞とともに幹細胞ニッチを形成し、上皮組織の再生においても中心的な役割を果たすことが知られている。パネト細胞の顆粒中には、必須微量元素の恒常性維持に關わるメタロチオネイン、飽食シグナルであるレプチンなど食品吸収に關連する因子も存在しており、栄養の吸収においてもパネト細胞の關与が考えられる。

このように、パネト細胞は様々な面において、いわば体の“司令塔”として働いていると考えられるが、食品機能との關係については全く知られていない。パネト細胞の司令塔としての役割には、細胞膜タンパク質や分泌タンパク質が重要な役割を担うと考えられるが、これまでほとんど知見がなかったことが主たる原因と考えられる。そこで本研究では、パネト細胞の細胞膜および分泌タンパク質を網羅的に解析することにより、パネト細胞を中心としたネットワークの全貌を明らかにし、そのネットワークによる自然免疫、再生、栄養吸収の制御について明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、小腸に存在する上皮細胞であるパネト細胞が自然免疫、および再生のみならず、栄養吸収においても司令塔として働くという仮説の元、パネト細胞の細胞膜および分泌タンパク質を解析することによって、パネト細胞が他の腸上皮細胞やさまざまな臓器を制御するネットワークを構築しているメカニズムを明らかにする。また、このネットワークを利用し、食品の栄養素等の取り込みや腸内細菌叢を制御することによって、人の健康に寄与することを目的とする。これまでにない新しい視点から食品機能を論じ、広く活用する契機となる。

### 3. 研究の方法

パネト細胞の膜および分泌タンパク質の

解析を通じて、パネト細胞を中心とするネットワークと、それを介した制御系を明らかにするため、以下の研究項目を行った。

(1) 初めに、マウス小腸から小腸陰窩の分離を行った (Ayabe T et al., Nature immunol. 2000)。EDTA 含有バッファー中で摘出した小腸を一定時間振動させ、陰窩が高純度に含まれる分画を回収した。回収した陰窩はコラゲナーゼ処理により単細胞の状態にし、パネト細胞のマーカーである CD24 で標識後、セルソーター JSAN を用いてパネト細胞を分離した。

(2) セルソーターにより分離したパネト細胞からの Total RNA 抽出には Life technologies 社の PureLink™ RNA Micro Kit を使用した。抽出方法は添付のプロトコルに準じて行い、Life technologies 社の Qubit® Assays によって濃度を測定した。また得られた Total RNA は RIN 値 (分解度) 測定を行い、その品質を評価した。

(3) 細胞膜および分泌タンパク質の同定は MBL 社のシグナルシークエンストラップ (SST-REX) 法にて行った。本手法の利点は、細胞膜タンパク質と分泌タンパク質に共通するシグナル配列が存在することを利用し、そのシグナル配列を有するタンパク質のみを選択的に同定することである。

(4) 同定されたタンパク質は、遺伝子配列情報により解析、評価を行った。吸収上皮細胞や、内分泌細胞におけるパネト細胞からのシグナル受容体発現を解析するとともに、パネト細胞の細胞膜上に発現する受容体を解析しネットワークの存在に迫った。

### 4. 研究成果

(1) 本研究ではパネト細胞ネットワークを明らかにするため、まず、パネト細胞の細胞膜及び分泌タンパク質を明らかにした。そのためには、高純度かつ高品質のパネト細胞 RNA を得ることが肝要であるため、その材料となるパネト細胞を生理的な状態で高純度に取得する必要があった。本研究の最初の成果として、パネト細胞のソーティング技術を確立し、純度 90% 以上で  $10^8$  個のパネト細胞を集めることに成功した。このソーティング技術は本研究における遺伝子発現解析のみならず、パネト細胞におけるタンパク質発現解析や microRNA 解析の他に、生理的な状態での回収が可能となっていることから、幹細胞との共培養系の確立など多様な用途に用いることができると考えられる。

(2) 得られたパネト細胞から Total RNA を抽出し、その品質を RIN 値で評価したところ、高品質である事を示す RIN 値 7.8 であった。この結果は、本手法で得た Total RNA が、

SST-REX 法に供するに値するのみならず、今後、次世代シーケンサーによる全 RNA の解読など高品質な RNA を要する研究に応用可能であることを示している。

(3) パネト細胞の Total RNA より SST-REX 法にて細胞膜及び分泌タンパク質の解析を行って、37 遺伝子を同定した。これらの遺伝子について、Real-Time PCR 法にてパネト細胞における各遺伝子発現の再確認を行って、全 37 遺伝子について発現を確認した。

得られた遺伝子はその配列情報を元に機能ごとに、自然免疫、再生・分化、栄養吸収、神経系、ER ストレス、代謝などに大別できた。

自然免疫関連遺伝子としては 18 遺伝子を分類した。その中には自然免疫のエフェクター因子である ディフェンシンが含まれており、本手法の妥当性を示すと考えられる。さらに、新しい自然免疫関連因子として、ヒトを宿主とするウイルスに対するレセプターと相同性を示す遺伝子が 2 種類同定された。さらに、真菌や結核菌をリガンドとする受容体の遺伝子も同定されている。これら遺伝子は、パネト細胞の新たなパターン認識受容体候補と考えられる。これらの結果は、未だ詳細が未解明であるパネト細胞の顆粒分泌機序の解明に資する可能性がある。

栄養吸収関連遺伝子としては、ミネラルトランスポーターが 2 遺伝子と、母乳中に多く含まれる栄養素のトランスポーターも同定された。これらの結果は、パネト細胞が栄養素を直接認識し、栄養吸収に対して中心的な役割を果たす可能性を示すものと考えられる。

加えて、神経細胞に発現が認められ、疾病との因果関係が示唆される遺伝子も同定された。小腸陰窩基底部に存在するパネト細胞は組織的に腸管上皮細胞の中で最も神経系に近い位置に存在する。その細胞中で神経系に関する遺伝子発現が認められることは、脳と腸の神経接続、すなわち脳腸相関と関係する可能性を示唆していると考えられる。

ER ストレス関連遺伝子も 4 遺伝子が同定された。これまでにクローン病の感受性遺伝子として、Xbp1 や ATG16L1 など ER ストレス関連遺伝子が報告されているが、決定的な因子は未だ発見されていない。本研究で新たな ER ストレス遺伝子が同定されたことは、これら遺伝子の機能解析により、クローン病発症の機序解明に繋がる可能性がある。

そのほかにも、機能が遺伝子配列情報からは予測できない全く新しい遺伝子や、細胞間接着を担う分子で細胞間シグナル伝達に関与する遺伝子なども同定されている。

以上より、これまでパネト細胞が担うと考えられてきた自然免疫および再生・分化以外にも新たな機能を担う遺伝子がパネト細胞において発現することを明らかにした。とくにパネト細胞において、栄養吸収関連遺伝子の発現が認められたことと、神経細胞との類

似性が見いだせた意義は大きいと考える。つまり、パネト細胞は腸管内腔の栄養素を直接認識し、脳腸相関を通じた全身のコントロールを担う可能性が初めて示せたと考えられる。

さらなる研究にて、このパネト細胞が中心となるこのネットワークの全貌を明らかにできれば様々な応用が期待できる。その一例として、例えば高性能機能性食品の開発である。特定の環境下、もしくは遺伝的背景等により罹患しやすい疾病が明らかの場合、その発症を抑える事を、食によって可能とするような機能性食品の開発が可能となると考えられる。加えて、肥満や糖尿病、クローン病といった、パネト細胞との関係が示唆される疾病の、食による治療も可能となるかもしれない。

また、近年和食がユネスコ無形文化遺産に登録されたように、世界的に和食が注目も浴びている。その理由の 1 つに和食の持つ健康、特に肥満になりにくいというイメージが存在すると考えられるが、それを単に摂取カロリーからの面からだけではなく、和食の持つ機能を科学的に明らかとし、本邦の有力な資源としてさらに活用可能となると考える。

ここまで述べてきたとおり、本研究成果はパネト細胞がネットワークを構築し、全身へと影響を与えているすなわちコントロールしている可能性を初めて示し、さらには食を通じた健康維持や、機能性食品の開発、さらには食の高付加価値化などに資する結果が得られたと考えられる。

## 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 3 件)

Nakamura K, Sakuragi N, Takakuwa A, Ayabe T. Paneth cell -defensins and enteric microbiota in health and disease. Biosci Microbiota Food Health、査読有、35(2)、2016、57-67  
doi:10.12938/bmfh.2015 -019

櫻木直也、綾部時芳、自然免疫による腸内細菌叢の制御と共生 疾病との接点、診断と治療 2 月号 (特集: 腸内細菌叢からみた臨床の最前線 - ベールを脱いだ体内パートナーの機能)、査読無、Vol.104 No.2、2016、pp227-232、<http://www.shindan.co.jp/books/index.php?menu=01&cd=2160200&kbn=2#toku>

綾部時芳、櫻木直也、中村公則、腸における排除と共生 抗菌ペプチドと腸内細菌、家畜感染症学会学会誌、査読無、Vol.4 No.4、2015、133-141、<http://www.kachikukansen.org/report.html>

〔学会発表〕(計7件)

綾部時芳、横井友樹、櫻木直也、中村公則．Enteroidを用いたPaneth細胞の機能可視化～顆粒分泌・再形成および免疫系クロストーク．日本農芸化学会2016年度大会(シンポジウム テーマ：消化管研究の最前線“三次元培養法を用いた消化管の機能解析”)．2016.3.30, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

綾部時芳、櫻木直也、中村公則．腸からみれば！食品と免疫と腸内細菌がつくる“腸内環境”の解明と実用化．日本農芸化学会2016年度大会(シンポジウム テーマ：消化管研究の最前線“三次元培養法を用いた消化管の機能解析”)2016.3.29, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

菅原徹也、中村公則、櫻木直也、綾部時芳．腸管星細胞株を用いた腸管線維化機序の解析．第38回日本分子生物学会年会(第88回日本生化学会大会との合同大会, ポスター)．2015.12.1, 神戸ポートアイランド, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

吉井彩季、中村公則、櫻木直也、綾部時芳．クローン病モデルマウスSAMP1/YitFcの病態形成における-defensinの関与．第38回日本分子生物学会年会(第88回日本生化学会大会との合同大会, 口頭、ポスター)．2015.12.2, 神戸ポートアイランド, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

森川琢海、北村整一、鏑田仁人、山口和也、高橋欣也、櫻木直也、中村公則、綾部時芳．大麦若葉末がディフェンシン分泌に与える影響．日本食品化学工学会第62回大会．2015.8.28, 京都大学吉田キャンパス(京都府・京都市)

中村公則、櫻木直也、綾部時芳．クローン病モデルマウスSAMP1/YitFcの病態進行と-defensinの分泌異常．第101回日本消化器病学会総会(ワークショップ12: 消化器疾患における自然免疫と制御)．2015.4.25, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

吉井彩季、櫻木直也、中村公則、綾部時芳．クローン病モデルマウスSAMP1/YitFcの病態形成におけるPaneth細胞の関与．第19回腸内細菌学会(一般演題A-8)．2015.6.18, 北里大学コンベンションセンター(東京都・港区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

櫻木直也 (SAKURAGI, Naoya)  
北海道大学・大学院先端生命科学研究所・特任助教  
研究者番号：80420660

### (4) 研究協力者

中村 公則 (NAKAMURA, Kiminori)  
北海道大学・大学院先端生命科学研究所・准教授  
研究者番号：80381276