

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008 年度

課題番号：18390212

研究課題名（和文）

パネート細胞デフェンシンによる腸管の炎症制御メカニズムの解明と応用

研究課題名（英文）

Regulation of intestinal inflammation by Paneth cell  $\alpha$ -defensin.

研究代表者

綾部 時芳 (AYABE TOKIYOSHI)

国立大学法人 北海道大学 大学院先端生命科学研究院 教授

研究者番号：90301019

研究成果の概要：十二指腸、空腸および回腸の単離陰窩を用いて Paneth 細胞由来抗菌ペプチド cryptdin の遺伝子発現定量および免疫局在解析を行って、すべての cryptdin isoform は十二指腸、空腸に比べて回腸で発現が有意に多いことを明らかにした。回腸 Paneth 細胞分泌物の殺菌活性が最も強力であった。ヒト Paneth 細胞分泌物および  $\alpha$ -defensin が未熟樹状細胞を化学遊走させることを明らかにし、Paneth 細胞が炎症制御に関与することを示唆した。さらに、クローン病患者の  $\alpha$ -defensin 構造異常を明らかにし、抗菌ペプチドによる新規治療の可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2007 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：自然免疫、炎症、抗菌ペプチド、Paneth 細胞、炎症性腸疾患

## 1. 研究開始当初の背景

微生物に対する生体防御機構の有効性は、侵入してきた微生物を処理する免疫系のはたらきの速度と強度に依存すると考えられる。自然免疫では、宿主による微生物認識の後に急性抗微生物免疫反応が発動し、動員された炎症性白血球と局所の上皮細胞における抗菌物質の産生が生じることが知られている。宿主が産生する抗菌物質の中で、様々な病原体を直接的に死滅させるはたらきを

持つのが抗菌ペプチドである。生体において、腸管は常に莫大な数と様々な種類の微生物に曝されている。本研究代表者は、生体防御にとって最前線である腸管における内因性抗菌ペプチドのはたらきを解析し、Paneth 細胞の分泌する  $\alpha$ -defensin が腸管の感染防御に貢献していることを明らかにしてきた (Wilson C et al., *Science* 286: 113-7, 1999; Ayabe T et al., *Nature Immunol* 1: 113-8, 2000; Ayabe T et al., *Trends Microbiol* 12:

394-8, 2004 など)。生体防御機構の破綻として捉えられる壊死性腸炎や炎症性腸疾患などの難治性消化管疾患の発症や病態に、Paneth細胞 $\alpha$ -defensinが関与する可能性がある。しかし、これまでPaneth細胞の単離ができなかったことや培養細胞株が存在しないことなどの理由から、Paneth細胞及び産生・分泌する $\alpha$ -defensinについては、その発現と機能について不明の点が多かった。さらに抗菌ペプチドは自然免疫系の生体防御物質としてはたらくばかりでなく、獲得免疫系の発動にも関与する可能性が示されたが、腸管における急性炎症および慢性炎症病態とPaneth細胞 $\alpha$ -defensinの関連は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、Paneth細胞 $\alpha$ -defensinが腸管炎症を直接的、間接的に制御していることを証明することを目的とする。さらに、その炎症制御メカニズムを解明することにより、 $\alpha$ -defensinを用いた炎症に対する新しい治療法の開発に貢献することを目指す。具体的には目標を以下の三点に絞る。

(1) 研究代表者らが確立した腸上皮単離技術を応用して採取した腸上皮細胞を用いて、自然免疫と炎症、さらには獲得免疫との接点に関与する新たなPaneth細胞 $\alpha$ -defensinのはたらきを明らかにする。

(2) 腸管において、 $\alpha$ -defensinが炎症の制御に貢献していることを明らかにする。これを証明するために、 $\alpha$ -defensinを含むPaneth細胞由来物質に対する貪食細胞及び獲得免疫系に属するリンパ球の化学遊走能と炎症性サイトカイン産生能を解析して、Paneth細胞による炎症反応制御機構を解明する。

(3) 腸炎の発症、病態進展における $\alpha$ -defensinのはたらきを明らかにする。マウスモデル及びインフォームド・コンセントの下に得たクローン病患者検体を用いて腸管の炎症を制御する $\alpha$ -defensinのはたらきを検討する。 $\alpha$ -defensinを応用した腸管の難治炎症性疾患の新規治療法を提案する。本研究終了時において、粘膜免疫の分野におけるPaneth細胞 $\alpha$ -defensinによる自然免疫から獲得免疫への橋渡し及び炎症制御という新しいパラダイムを提唱したい。

## 3. 研究の方法

### (1) 小腸陰窩および小腸上皮細胞の分離

小腸粘膜材料から既報に準じて小腸陰窩、さらには小腸上皮細胞を分離した。マウス(ICR-CD1)の小腸からEDTA分離法で腸陰窩を採取した。インフォームド・コンセントの下に得たヒト小腸粘膜材料から同様に

小腸陰窩を単離した。得られたマウスおよびヒト陰窩からcollagenase分離法に準じて(Ayabe T et al., *J Biol Chem* 2002)単離小腸上皮細胞分画を得た。

(2) 十二指腸、空腸および回腸粘膜材料から分離した小腸陰窩およびPaneth細胞における $\alpha$ -defensin発現を解析した。単離陰窩からsingle crypt RNAを抽出してreal-time PCR法で単離陰窩レベルにおけるcryptdin isoform mRNA発現解析を行い、すべてのcryptdin isoform (cryptdin1~cryptdin6)についてmRNA発現を定量した。また、抗cryptdin抗体を用いた免疫蛍光染色法を施行し、共焦点レーザー顕微鏡観察下で単離小腸陰窩レベルおよび単離Paneth細胞レベルで、 $\alpha$ -defensin局在を解析した。Paneth細胞マーカーは抗cryptdin抗体(Ouellette教授より供与された抗cryptdin-1抗体、抗cryptdin-4抗体および抗cryptdin-5抗体)および本研究代表者らが作成した抗HD5抗体等を用いた。さらに、各部位から得た単離小腸陰窩を*S. typhimurium*に37°Cで30分暴露した後、回収した上清から前記の方法でPaneth細胞分泌物を採取した。*S. typhimurium*に対するこれらの各小腸部位からのPaneth細胞分泌物の殺菌活性を解析した。

### (3) Paneth細胞分泌物および $\alpha$ -defensinに対する樹状細胞等の化学遊走能解析法

Paneth細胞 $\alpha$ -defensinは、遺伝子組換え法でヒトのrHD5およびrHD6を作成した。Paneth細胞顆粒を、小腸陰窩に富む分画からNitrogen法を用いて得た後、超遠心法および膜透析法を併用して顆粒蛋白質を精製した。Paneth細胞分泌物は、小腸陰窩をカルバミルコリンまたは*S. typhimurium*に曝露し37°Cで30分反応させて上清を採取した後、30%酢酸中で蛋白質画分を抽出した。さらに、各分画から殺菌活性および電気泳動、HPLC等を用いた生化学的性状を指標として $\alpha$ -defensinをはじめとする生理活性物質を精製した。

ヒト白血球、単球および樹状細胞の分離は、インフォームド・コンセントの下に、健常ボランティアの全血から比重遠心法を用いて単核球を分離した。さらに、単核球から比重遠心法で好中球とリンパ球を、Monocyte isolation kitを用いて単球をそれぞれ得た。得られた単球にGM-CSF, IL4, TGF- $\beta$ 1を添加して7日間培養し、未熟樹状細胞を得た。さらに、TNF- $\alpha$ を添加して2日間培養し、成熟樹状細胞を回収した。各細胞群は、フローサイトメトリーで当該細胞に特異的な細胞表面抗原の発現を確認した。

遊走能試験は、96穴ケモタキスチャンバ

一を用いて、各種 Paneth 細胞由来物質をチャンバーのフィルター下層 well に、好中球、リンパ球、単球、成熟樹状細胞または未熟樹状細胞をフィルター上層の well に満たして 1.5 時間または 4 時間培養後、フィルター下層側に付着した細胞数を顕微鏡下で数えて、バッファー対照と比較検討した。測定値の検定には Mann-Whitney U test および Student t test を用いた。これらにより、Paneth 細胞  $\alpha$ -defensin および Paneth 細胞顆粒および Paneth 細胞分泌物による局所炎症への直接的関与を解析した。

#### (4) Paneth 細胞分泌物および $\alpha$ -defensin による腸上皮細胞の炎症性サイトカイン産生能解析法

炎症性サイトカイン発現について抗体アレイを用いた免疫プロット法で、IL-8 および TNF- $\alpha$  濃度を ELISA 法で解析した。さらに、培養大腸癌細胞株 T84 細胞を Paneth 細胞分泌物で刺激して上清を回収し、IL-8 および TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン分泌について ELISA 法で解析した。これにより、腸上皮細胞からの炎症性サイトカイン産生・分泌が Paneth 細胞  $\alpha$ -defensin およびその他の Paneth 細胞由来物質によって影響を受けているか否かを解析した。さらに、cryptdin-4 および HD-5 を合成・精製し、それらのグラム陽性菌及び陰性菌に対する殺菌活性を検討した。

(5) 自然発症腸炎モデルマウスである IL10 ノックアウトマウスにおける Paneth 細胞  $\alpha$ -defensin の発現について解析するとともに、腸炎モデルマウスを用いて  $\alpha$ -defensin の効果を検討した。さらに、インフォームド・コンセントの下に得たクローン病患者小腸における HD5 等の発現と殺菌活性を検討した。

## 4. 研究成果

(1) Paneth 細胞  $\alpha$ -defensin (マウスの cryptdin1~6、ヒトの HD5, HD6) を化学合成法または遺伝子組換え法で得た。Cryptdin について、十二指腸、空腸および回腸からそれぞれ得た単離陰窩を用いて、cryptdin の 6 つの isoform すべてについて小腸における空間的制御機構を詳細に解析した結果、cryptdin4 は十二指腸および空腸に比べて回腸で遺伝子発現量が数十倍多いことを明らかにした。すべての cryptdin isoform 遺伝子発現量は、十二指腸および空腸に比べて回腸で有意に多かった。また、すべての cryptdin isoform 遺伝子発現量において十二指腸と空腸では有意差を認めなかった。さらに、抗 cryptdin isoform 抗体を用いた免疫染色により、単離陰窩レベルで Paneth 細

胞顆粒を定量的に解析した結果、cryptdin isoform 発現は十二指腸および空腸に比べて回腸で有意に多いことを明らかにした。Paneth 細胞には、すべての isoform が共存する顆粒および crptdin1 のみを有する顆粒が多く、crptdin1 と cryptdin4、cryptdin1 と cryptdin5 を有する顆粒は比較的少なかった。 $\alpha$ -defensin の細胞内顆粒における三次元的免疫局在をはじめ明らかにした。さらに、回腸 Paneth 細胞分泌物の殺菌活性は他の部位に比べて有意に強いことを明らかにした。Paneth 細胞の抗菌ペプチドによる自然免疫機能は、十二指腸および空腸に比べて回腸で著しく強力であることが示唆された。小腸における自然免疫には空間的制御機構がはたしている可能性を示した。

(2) Paneth 細胞  $\alpha$ -defensin の末梢血貪食細胞およびリンパ球の化学遊走能と炎症性サイトカイン産生能を検討し、Paneth 細胞  $\alpha$ -defensin は未熟樹状細胞に対して化学遊走因子として作用することを示した。HD6 の未熟樹状細胞に対する化学遊走活性を明らかにした。また、*ex vivo* 細菌感染刺激で得た Paneth 細胞分泌物を用いて同様の化学遊走能解析を行い、未熟樹状細胞に対する化学遊走活性を明らかにした。これに対して、Paneth 細胞  $\alpha$ -defensin は成熟樹状細胞、好中球やリンパ球の遊走活性は示さなかった。Paneth 細胞分泌物および  $\alpha$ -defensin は T84 細胞からの IL-8 分泌を刺激した。また、Paneth 細胞分泌物は T84 細胞からの TNF- $\alpha$  分泌を生じさせた。以上の結果より、各種細菌感染を契機とする Paneth 細胞分泌反応が腸管の自然免疫に貢献していることが示唆された。さらに、Paneth 細胞分泌物中に含まれる抗菌ペプチドが自然免疫だけではなく、他の腸上皮細胞からの炎症性サイトカイン分泌等を通じて炎症制御に関与する可能性が示された。

(3) 腸炎モデルマウスの腸炎経過における Paneth 細胞およびそれらの cryptdin 発現を解析し、IL10 ノックアウトマウスにおける腸炎形成とともに Paneth 細胞  $\alpha$ -defensin 産生低下など自然免疫機構の異常が生じていることを明らかにした。 $\alpha$ -defensin 投与で致死腸炎マウスに対する延命効果を確認し、治療応用の可能性を示した。また、一部のクローン病患者では HD5 をはじめとする Paneth 細胞由来抗菌ペプチドの高次構造異常があり、殺菌活性の低下を生じている可能性を示した。

本研究によって、各種感染刺激に反応して  $\alpha$ -defensin を分泌する自然免疫担当である

Paneth 細胞は、未熟樹状細胞に対する誘導活性を有し、さらに IL-8 および TNF- $\alpha$  等のサイトカイン分泌を生じさせることにより、炎症制御および獲得免疫の発動に関与している可能性が示された。腸管の炎症部位では、Paneth 細胞の産生・分泌する  $\alpha$ -defensin および組織浸潤した白血球等の産生するサイトカインなどの作用が相まって、腸管粘膜組織中において Paneth 細胞由来物質の濃度勾配を形成していると考えられる。自然免疫と炎症さらには獲得免疫との接点に関与する Paneth 細胞のこれまで知られていなかった新機能を明らかにし、難治性炎症性腸疾患に対する  $\alpha$ -defensin による感染制御および炎症制御治療の可能性を示した。

#### 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 7 件)

1. Tanabe H, Sato T, Watari J, Maemoto A, Fujiya M, Kono T, Ashida T, Ayabe T, and Kohgo Y. Functional role of metaplastic Paneth cell defensins in Helicobacter pylori-infected stomach. *Helicobacter* 13: 370-379, 2008. (査読有り)
2. Sakai N and Ayabe T. Antimicrobial peptides in the gut innate immunity. *Int J Probiotics Prebiotics* 3: 123-126, 2008. (査読有り)
3. 綾部時芳. 腸管再生・分化の制御機構と再生医療細胞工学 特集: 消化管研究の最前線. *細胞工学*. 27: 796-799, 2008. (査読無し)
4. 綾部時芳. 自然免疫異常による生体防御破綻. 特集: 炎症性腸疾患の分子医学. *BIO Clinica*. 23: 1178-1182, 2008. (査読無し)
5. Tanabe H, Ayabe T, Maemoto A, Ishikawa C, Inaba Y, Sato R, Moriichi K, Okamoto K, Watari J, Kono T, Ashida T, Kohgo Y. Denatured human alpha-defensin attenuates the bactericidal activity and the stability against enzymatic digestion. *Biochim Biophys Res Commun* 358: 349-355, 2007. (査読有り)
6. 田邊裕貴、前本篤男、綾部時芳、河野 透、蘆田知史、高後 裕. クロウン病における Paneth 細胞由来抗菌ペプチドの産生異常. *分子消化器病*. 4: 110-115, 2007. (査読無し)
7. 綾部時芳. 腸上皮細胞の pattern recognition receptor とその解析法. *分子消化器病*. 4: 53-56, 2007. (査読無し)

[学会発表] (計 19 件)

国際学会:

1. Sakai N, Fukaya R, Masuda K, and Ayabe T. Regulated roles of Paneth cell  $\alpha$ -defensin in mouse small intestine and its molecular mechanism of bactericidal activity. 1<sup>st</sup> International Symposium on Regulation in Innate Immunity from Recognition molecules to Antimicrobial peptides. 2008.10.28-29, Sapporo, Japan. (シンポジウム)
2. Masuda K, Sakai N, Ayabe T. The structural property in bactericidal activities of mouse  $\alpha$ -defensin, cryptdin-4. 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2008.9.8-11, Awajishima, Japan.
3. Fukaya R, Sakai N, and Ayabe T. Regulated roles of Paneth cell  $\alpha$ -defensin in the mouse small intestine. American Gastroenterological Association, Digestive Disease Week, 2008.5.17-22 San Diego, USA.
4. Fukaya R, Sakai N, Ayabe T. Expression of Paneth cell  $\alpha$ -defensins in the mouse small intestine. 7<sup>th</sup> Awaji International Forum for infection and Immunity, 2007.9.1-5, Awajishima, Japan.
5. Fukaya R, Sakai N, and Ayabe T. Expression of Paneth cell  $\alpha$ -defensin and bactericidal reaction in mouse jejunum and ileum. 13<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology 2007.7.11 Tokyo, Japan. (ワークショップ)
6. Maemoto A, Ayabe T, tanabe H, Inaba Y, Ashida T, Fukaya R, Sakai N, Kono T, Kohgo Y. Down-regulation of Paneth cell  $\alpha$ -defensin expression and function in patients with Crohn's disease. American Gastroenterological Association, Digestive Disease Week, 2007.5.22, Washington DC, USA.
7. Fukaya R, Sakai N, Ayabe T. Paneth cell  $\alpha$ -defensin, expression and bactericidal secretion in mouse jejunum and ileum. 7<sup>th</sup> Gordon Research Conference on Antimicrobial Peptides. 2007.4.30, Barga, Italy. (ワークショップ)
8. Ayabe T, Fukaya R, Sakai N, Maemoto A, Tanabe H, Ashida T, Kohgo Y. Paneth cells and their  $\alpha$ -defensin in innate immunity and in the pathology of Crohn's disease. Basic Science; Innate and Acquired Immunity. 4<sup>th</sup> JSGE-AGA joint meeting on inflammatory bowel disease. 2007.4.19, Aomori, Japan. (招待講演)

国内学会：

9. 増田晃士、坂井直樹、綾部時芳。マウス  $\alpha$ -defensin, cryptdin-4 のジスルフィド結合が殺菌活性に及ぼす影響。第 9 回日本蛋白質科学会年会。2009.5.20, 熊本。

10. 遠藤優子、坂井直樹、綾部時芳。小腸上皮におけるセロトニン及びセロトニン受容体の発現解析。第 31 回日本分子生物学会年会。2008.12.12, 神戸。

11. 平理沙、清水恭子、平敏夫、綾部時芳。初代内蔵脂肪細胞培養系におけるマクロファージのフェノタイプとその制御。第 81 回日本生化学会大会。2008.12.10, 神戸。

12. 阿部悠子、坂井直樹、山田幸司、綾部時芳。新規創製した蛍光ソルバトクロミック色素プローブを用いた細胞膜ダイナミクス解析。第 31 回日本分子生物学会年会。2008.12.9, 神戸。

13. Fukaya R, Sakai N, Ayabe T. Paneth cell  $\alpha$ -defensin, expression and bactericidal activities in the mouse small intestine. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会。2008.12.9, 神戸。

14. 阿部悠子、坂井直樹、山田幸司、綾部時芳。生体応用を目指した蛍光ソルバトクロミック色素プローブの高性能化。日本分析化学会第 57 年会。2008.9.10, 名古屋。

15. 綾部時芳、深谷梨恵、坂井直樹、前本篤男、蘆田知史、河野 透、田邊裕貴、高後 裕。パネト細胞  $\alpha$ -defensin と腸内自然免疫：クローン病との関わりを含めて。3 学会合同大会・第 73 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会／第 19 回日本生体防御学会学術集会／第 45 回補体シンポジウム。2008.7.10-12, 札幌。

16. 阿部悠子、坂井直樹、山田幸司、綾部時芳、坂入信夫。脂溶性蛍光ソルバトクロミック色素を用いた細胞膜ダイナミクス解析の試み。第 69 回分析化学討論会。2008.5.1, 福岡。

17. 阿部悠子、福原拓馬、坂井直樹、山田幸司、綾部時芳、坂入信夫。ブルーダイオードレーザー励起が可能な蛍光ソルバトクロミック色素プローブの創製と蛍光顕微鏡による細胞膜ダイナミクス観測。化学系学協会 2008 年冬季研究発表会。2008.1.30, 札幌。

18. Fukaya R, Sakai N, Ayabe T. Topological properties of Paneth cell  $\alpha$ -defensin expression

and function in the mouse small intestine. 第 37 回日本免疫学会総会学術集会。2007.11.20, 東京。

19. 阿部悠子、福原拓馬、坂井直樹、山田幸司、綾部時芳、坂入信夫。新規蛍光ソルバトクロミック脂質分子歩ロブの創製と腸上皮細胞ダイナミクス解析の試み。日本分析化学会第 56 年会。2007.9.19, 徳島。

〔図書〕(計 2 件)

1. 綾部時芳。腸内フローラとクロストーク。学会事務センター。東京 pp99-121, 2008

2. 伊藤貴博、綾部時芳、上野伸展、金野陽高、石川千里、盛一健太郎、岡本耕太郎、田邊裕貴、前本篤男、藤谷幹浩、河野 透、蘆田知史、高後 裕。ヒト Paneth 細胞分泌物による炎症反応の制御。消化器と免疫 45。吉川敏一 監修。日本消化器免疫学会 東京 pp34-38, 2008。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綾部 時芳 (AYABE TOKIYOSHI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号：90301019

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし