

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

分子消化器病 (2007.06) 4巻2号:110~115.

【消化器病とInnate Immunity】クローン病におけるPaneth細胞由来抗菌ペプチドの産生異常

田邊裕貴, 前本篤男, 綾部時芳, 河野透, 蘆田知史, 高後裕

クローン病における Paneth 細胞由来 抗菌ペプチドの産生異常

田邊裕貴*** 前本篤男*** 綾部時芳*** 河野 透**** 蘆田知史** 高後 裕**

KEY WORDS

自然免疫, Paneth 細胞, ディフェンシン, ジスルフィド結合

SUMMARY

腸管免疫における innate immunity (自然免疫) の重要性が明らかとなるとともに炎症性腸疾患とのかかわりがクローズアップされてきた。クローン病で疾患感受性遺伝子 *NOD2* が発見され、*NOD2* 蛋白が細菌抗原を認識する細胞内レセプターで自然免疫においてきわめて重要な役割を担っていることから、クローン病と自然免疫との詳細な研究が進められた。*NOD2* 蛋白が小腸 Paneth 細胞に特異的に発現すること、*NOD2* 遺伝子改変マウスでは Paneth 細胞ディフェンシンの発現が低下するなど、腸管粘膜上皮が自然免疫に貢献することがわかりつつある。しかし、*NOD2* 遺伝子の変異は日本人ではみられず、わが国ではクローン病と Paneth 細胞、ディフェンシンとの関係は明らかではない。小腸陰窩の単離法の確立により、われわれはクローン病の Paneth 細胞の殺菌作用が低下していることを見出した。その活性低下にディフェンシンの構造異常が関与している可能性が示唆された。

はじめに～小腸 Paneth 細胞は感染防御に貢献する

消化管粘膜はひろく外界と接し、数多くの細菌に曝露されている。大腸粘膜と比較し小腸粘膜では著しく少ない細菌が腸管内に常在し、小腸粘膜上皮細胞に備わる自然免疫機構が貢献していることがしだいに明らかになってきた¹⁾。

Ayabe ら²⁾は、小腸クリプト(陰窩)の基底部に存在し、内部に多くの顆粒を有する Paneth 細胞が自然免疫担当細胞であることを明らかにしてきた。さまざまな生細菌やその細胞壁構成成分を認識し、抗菌ペプチドを含む顆粒を細胞外に分泌することで、Paneth 細胞は外界からの感染防御機構を担っている。その抗菌活性の主成分である腸管ディフェンシンは、プロペプチドとして合成され分泌顆粒内に貯蔵される。マウスを用いて腸管ディフェンシンの活性化の機序が詳細に検討された。蛋白分解酵素マトリリシンがプロ配列を切断することでディフェンシンは抗菌活性を発現する³⁾。マトリリシンのノックア

* TANABE Hiroki, MAEMOTO Atsuo/旭川医科大学医学部消化管再生修復医学講座, ** ASHIDA Toshifumi, KOHGO Yutaka/旭川医科大学医学部内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野, *** AYABE Tokiyoshi/北海道大学大学院先端生命科学研究院先端細胞機能科学分野自然免疫研究室, **** KONO Toru/旭川医科大学医学部外科学講座消化器病態外科学分野

ウトマウスでは, Paneth 細胞でディフェンシンは活性化されず抗菌作用は失われ, その結果, ノックアウトマウスでは経口投与したサルモネラ菌に感受性が高く致死率が高い⁹⁾. 逆に, ヒトディフェンシン(HD)-5 を遺伝子導入したマウスは, マウスディフェンシンだけでなく HD-5 が Paneth 細胞に特異的に発現し, 致死量のサルモネラ菌の経口投与に抵抗性となる⁹⁾. これらの検討から, Paneth 細胞はおもにディフェンシンの産生を介して腸管の感染防御に貢献していることが明らかとなった.

ディフェンシンとは?

自然免疫とは, 病原体を特異的に認識し迅速に炎症反応を引き起こす感染防御反応である. 白血球の遊走や上皮細胞からの抗菌物質の分泌により微生物の生体内への侵入が防御されている. それらの細胞では抗菌ペプチドが合成され広域の殺菌作用を有する. その主要なグループの1つがディフェンシンで, ヒトでは α -と β -ディフェンシンがある¹⁾. 塩基性アミノ酸を多く含むため陰性の電荷を有し, 3 個のジスルフィド結合により三次元構造が維持される構造的特徴をもっている. ジスルフィド結合の組み合わせにより α -と β -ディフェンシンに分けられる. α -ディフェンシンは多核白血球や小腸 Paneth 細胞に発現し, それぞれヒト好中球ペプチド(human neutrophil peptide: HNP 1-4)や HD-5, -6 とよばれる⁹⁾. HD-5 は Paneth 細胞内の顆粒にプロペプチドとして存在し, 分泌直後にトリプシンがプロ配列を切断する. 小腸クリプト内では高濃度で存在することが想定され⁹⁾, おもに細菌の細胞壁を傷害し, 殺菌効果を呈する.

自然免疫異常はクローン病の病態に関与する

炎症性腸疾患は原因不明の腸管慢性炎症をきたす疾患で, クローン病と潰瘍性大腸炎に大分される. 両疾患とも腸内細菌との関与が示唆されているが, 特定の病原細菌は同定されていない. クローン病の病態が腸管の自然免疫と獲得免疫の破綻にあることが, 臨床病理学的, または遺伝子改変動物の検討から明らかになりつつある. 欧米で, *NOD2* 遺伝子がクローン病の原因疾患感受性遺伝子の1つであることが示され⁷⁾⁸⁾, 約 1/3 のクローン病

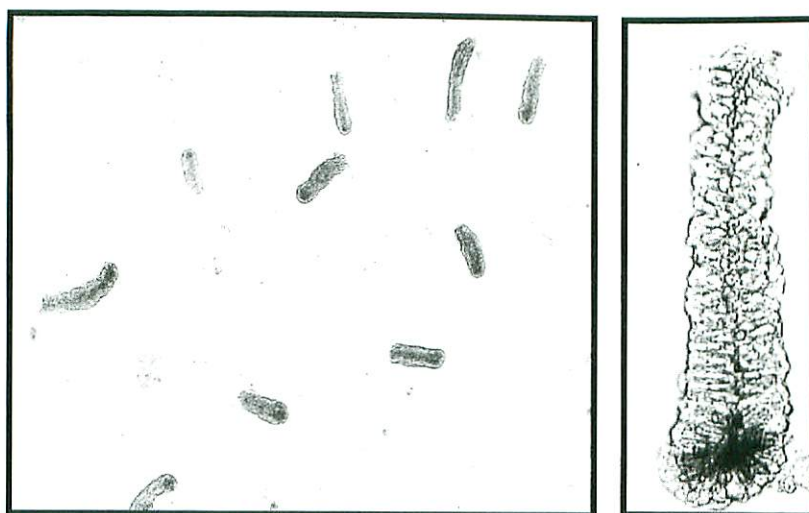
患者に遺伝子変異が認められた⁹⁾¹⁰⁾. *NOD2* 蛋白は細胞壁ペプチドグリカンの分解物である muramyl dipeptide (MDP) を認識する細胞質蛋白で, 細胞内に存在する細菌抗原に対する自然免疫担当蛋白である. 腸管上皮細胞の1つである Paneth 細胞は *NOD2* を高発現し¹¹⁾, その異常がクローン病における自然免疫の破綻として注目されている. *NOD2* ノックアウトマウスは, 胃内投与したリステリア菌に感受性で, Paneth 細胞ディフェンシンの発現が低下しているなど, 自然免疫の欠落を呈することから¹²⁾¹³⁾, *NOD2* 蛋白による細菌抗原認識機構やディフェンシンによる感染防御機構とクローン病の発症が注目されている.

Paneth 細胞の発現低下とそれに伴う腸内細菌叢の攪乱がクローン病の発症に関与しているとの仮説の下, Wehkamp ら¹⁴⁾はクローン病患者でのディフェンシンの発現を検討した. 小腸クローン病患者の回腸でディフェンシン発現が低下し, 大腸クローン病や潰瘍性大腸炎では変化は認められなかった. ディフェンシン発現低下に伴う抗菌バリアの破綻が小腸クローン病の発症に寄与していると考察している.

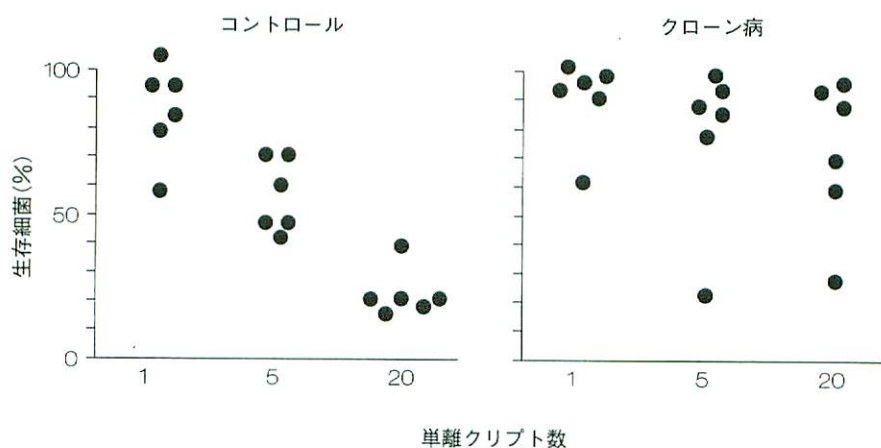
しかし, わが国のクローン病患者には *NOD2* 遺伝子変異は認められず, *NOD2* 蛋白による細菌抗原認識機構の関連は否定的である¹⁵⁾. そこで, わが国のクローン病患者を対象として Paneth 細胞の機能やディフェンシンの発現を検討する必要がある.

クローン病の単離クリプトは抗菌活性を欠損している

われわれの教室では Ayabe ら²⁾が確立したマウス小腸クリプトの分離手技を応用して, ヒト大腸癌患者およびクローン病患者から小腸クリプトを分離した(図①). 顕微鏡下に単離したクリプトとサルモネラ菌を共培養した後, その細菌数の減少を計測することで, Paneth 細胞から分泌される抗菌活性を測定することに成功した¹⁶⁾(図②). 大腸癌患者(コントロール)ではクリプトの数に依存して生存細菌は減少していくが, クローン病のクリプトからの分泌物では抗菌作用は乏しくクローン病 Paneth 細胞の抗菌活性は低下していた. *In vitro* での単離クリプトを用いた検討で殺菌効果が脱落する機序につ



図① ヒト小腸から分離したクリプト
 小腸組織を 30 mM EDTA 中で振動させ小腸陰窩（クリプト）と絨毛を分離した。顕微鏡下でクリプトを含むフラクションを確認・回収した（左図）。マイクロピペットを用いてクリプトを単離した。位相差顕微鏡にて、底部に電子密度の高い顆粒を多く含む Paneth 細胞が同定できた（右図）。

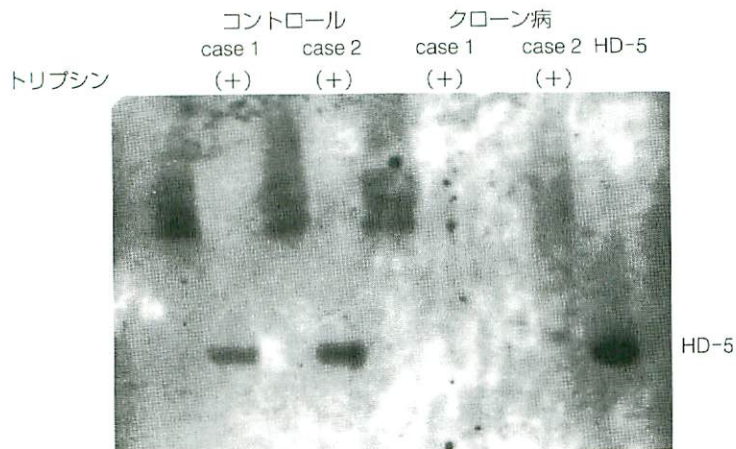


図② クローン病における抗菌活性の減弱
 単離したクリプトをサルモネラ菌に曝露した 30 分後にプレートに塗布培養し生存細菌数を計測した。コントロール（大腸癌患者）からのクリプト数が増加するにしたがい殺菌作用が強まる。一方、クローン病患者からのクリプトは抗菌活性が減弱していた。（Maemoto A, 2004¹⁶⁾より改変引用）

いては、形態異常に伴う Paneth 細胞数の減少、分泌される内因性抗菌ペプチドの異常、Paneth 細胞の顆粒分泌機能の低下などが考えられる。われわれはクローン病患者から得られた組織を用いた検討で、HD-5 の発現量に明らかな変化を認めず、HD-5 蛋白の産生異常を発見した。

クローン病の HD-5 はトリプシンにて分解される

HD-5 は小腸 Paneth 細胞に特異的に発現し、プロペプチドとして分泌顆粒に貯蔵される。前述のように、マウスではマトリリシンがプロ配列を切断するのに対して、ヒトでは Paneth 細胞にマトリリシンの発現はなく、トリプシンがプロペプチド (proHD-5) から活性型 HD-

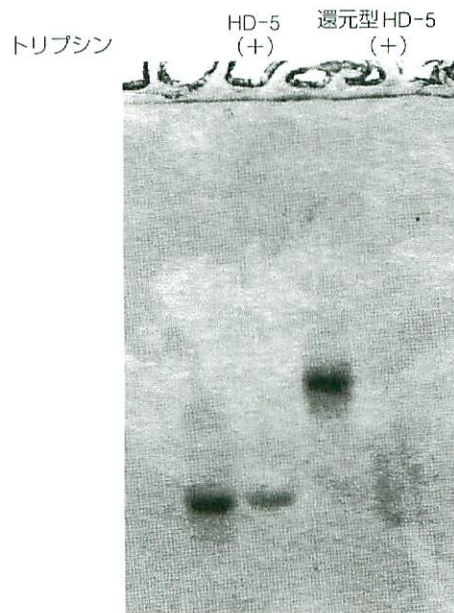


図③ クローン病小腸組織中の HD-5
 小腸組織を酢酸抽出し、Acid-urea PAGE³⁾の後にウェスタンブロットニングにて HD-5 を検出した。HD-5 の酵素抵抗性を利用して、トリプシンによる前処置（一晚、室温）を追加することで単一バンドがみられた。クローン病では HD-5 蛋白はトリプシンにより分解され、バンドは消失した。

5 への変換に役立っている¹⁷⁾。クローン病患者の小腸組織を用いて Paneth 細胞に貯留されている proHD-5 蛋白の発現量を高速液体クロマトグラフィー（high-performance liquid chromatography : HPLC）法にて測定したところ、コントロールと差はなかった。活性型 HD-5 の発現量を確認するため、トリプシン処理後にウェスタンブロットニングをおこなったところ、クローン病で HD-5 蛋白が消失していた（図③）。すなわち、HD-5 のトリプシン抵抗性がクローン病で消失していることが示唆された。

多くのディフェンシンは 30~40 個のアミノ酸からなる小型の蛋白で、複数のシステイン残基がジスルフィド結合を形成し、強固な三次元構造を形成している。そのため蛋白分解酵素に抵抗性で、腸管内で分解されずに作用を維持すると考えられている¹⁸⁾。

質量分析計を用いて、クローン病 HD-5 のジスルフィド結合が解離していることを確認したが、さらに大腸菌を用いてリコンビナントペプチドを生成し *in vitro* でのトリプシン感受性を確かめた。活性型 HD-5 とジスルフィド結合が解離した還元型 HD-5 をトリプシン処理すると、還元型 HD-5 だけが分解された（図④、⑤）。したがって、クローン病の Paneth 細胞では、分泌された proHD-5 が蛋白分解酵素で破壊され十分な機能を有し



図④ リコンビナント HD-5 のトリプシン抵抗性
 大腸菌を用いてリコンビナント HD-5 を HPLC 法にて精製した。ペプチドを 5 mM DTT にて還元し、ジスルフィド結合を切断した還元型 HD-5 も同様に精製した。それぞれのペプチドをトリプシン処理し Acid-urea PAGE 後のゲルをクマシーした。還元型 HD-5 はトリプシンにより分解され、バンドは消失した。HD-5 のジスルフィド結合は酵素分解に対して抵抗性を供与する。

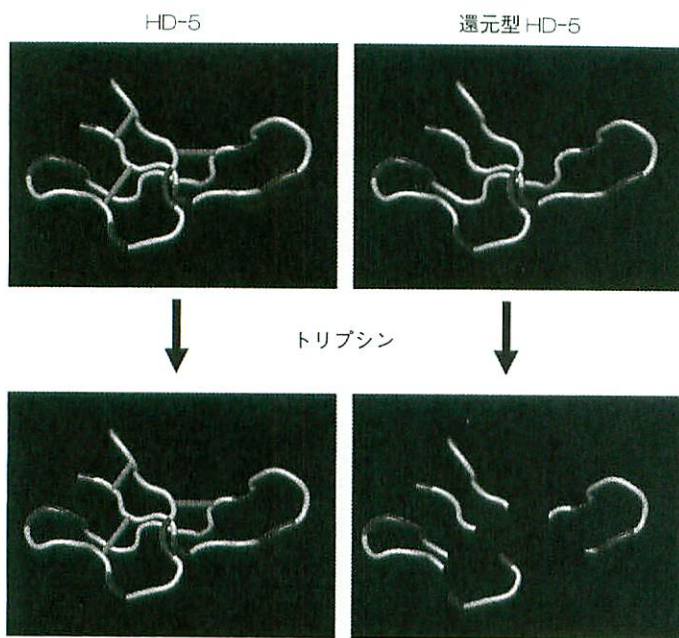


図5 HD-5のジスルフィド結合の役割

HD-5の三次元構造は3カ所のジスルフィド結合(橙色の円柱)にて保たれ、トリプシンで破壊されない。一方、還元型のHD-5はトリプシンによりアルギニン残基のN末端で切断される。塩基性アミノ酸は青、酸性アミノ酸は赤い円柱で示す。三次元構造はMolecular Modeling Data Base (mmdbId # 38964) から引用した (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/MMDB/mmdb.shtml>)。

ていないことが示唆された(図6)。HD-5の構造異常が、クローン病単離クリプトの抗菌活性低下の一因であることを示した。

おわりに

クローン病におけるPaneth細胞由来抗菌ペプチドの構造異常が、抗菌活性の低下を引き起こし、腸管の本来有する自然免疫機構の破綻をきたしている。その他の抗菌ペプチドの発現低下も報告され、抗菌ペプチドによる腸管のバリアの重要性が認識されつつある¹⁹⁾²⁰⁾。腸管内細菌を認識しその侵入から生体を防御する自然免疫の機能性分子としての抗菌ペプチドは、新たなクローン病の治療のターゲットになると考える。



文献

- 1) Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y *et al* : The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol* **12** : 394-398, 2004
- 2) Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL *et al* : Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* **1** : 113-118, 2000
- 3) Ayabe T, Satchell DP, Pesendorfer P *et al* : Activation of Paneth cell alpha-defensins in mouse small intestine. *J*

図6 HD-5の分泌と活性化のメカニズム

小腸クリプトの底部に存在するPaneth細胞は、細菌などの抗原刺激により抗菌ペプチドを含む分泌顆粒を管腔内に分泌する。Paneth細胞ディフェンシンはプロペプチド proHD-5として貯留され、分泌後にトリプシンによって活性化されHD-5としてさまざまな生理的作用を呈する。しかし、ジスルフィド結合を有していないペプチドは、トリプシンにより分解され活性を失う。

- Biol Chem* **277** : 5219-5228, 2002
- 4) Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP *et al* : Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metallo-proteinase matrilysin in innate host defense. *Science* **286** : 113-117, 1999
 - 5) Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM *et al* : Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* **422** : 522-526, 2003
 - 6) Selsted ME, Ouellette AJ : Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* **6** : 551-557, 2005
 - 7) Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H *et al* : Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411** : 599-603, 2001
 - 8) Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH *et al* : A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411** : 603-606, 2001
 - 9) Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ *et al* : Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* **357** : 1925-1928, 2001
 - 10) Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M *et al* : The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* **122** : 854-866, 2002
 - 11) Lala S, Ogura Y, Osborne C *et al* : Crohn's disease and the NOD2 gene : a role for paneth cells. *Gastroenterology* **125** : 47-57, 2003
 - 12) Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y *et al* : Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307** : 731-734, 2005
 - 13) Maeda S, Hsu LC, Liu H *et al* : Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* **307** : 734-738, 2005
 - 14) Wehkamp J, Salzman NH, Porter E *et al* : Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** : 18129-18134, 2005
 - 15) Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y *et al* : Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **123** : 86-91, 2002
 - 16) Maemoto A : Natural immunologic function of Paneth cells in small intestine of patients with Crohn's disease. *Hokkaido Igaku Zasshi* **79** : 129-136, 2004
 - 17) Ghosh D, Porter E, Shen B *et al* : Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol* **3** : 583-590, 2002
 - 18) Maemoto A, Qu X, Rosengren KJ *et al* : Functional analysis of the alpha-defensin disulfide array in mouse cryptdin-4. *J Biol Chem* **279** : 44188-44196, 2004
 - 19) Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K *et al* : Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol* **77** : 460-465, 2005
 - 20) Schaubert J, Rieger D, Weiler F *et al* : Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **18** : 615-621, 2006

 たなべ・ひろき

田邊裕貴 旭川医科大学医学部消化管再生修復医学講座

青森県生まれ。

専門は、消化器内科学。

研究テーマは、炎症から発癌へのプロセス、自然免疫と抗菌ペプチド。

趣味は、スノーボード。

 愛読書は、東野圭吾。
