

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	前 本 篤 男
学 位 論 文 題 目			
クローン病における小腸パネート細胞の自然免疫機能解析			
北海道医学雑誌第 78 巻第 6 号 平成 15 年 11 月 掲載			
研究目的			
パネート細胞は、小腸粘膜のクリプト基底部に認められ、その顆粒中に内因性抗菌ペプチドであるα-defensin を有する。最近、パネート細胞は <i>ex vivo</i> 細菌感染に反応して顆粒を分泌し、分泌された内因性抗菌ペプチドの殺菌活性によって自然免疫による強力な粘膜感染防御機構を形成していることがマウス実験で報告された。 クローン病は原因不明の難治性炎症性腸疾患であり、若年者から発症し再燃を繰り返し難治性の経過をとる。病変は全ての消化管に生じうるが、特に小腸に縦走潰瘍、敷石像などを伴う炎症を形成する。一部のクローン病患者で細菌抗原認識に関与する免疫反応異常が報告され、クローン病の病態に腸内細菌が関与する可能性が指摘されている。しかし、ヒト小腸パネート細胞顆粒に含まれる内因性抗菌ペプチドの役割や、パネート細胞の機能とクローン病との関係については不明である。 本研究は、マウスにおいて消化管の自然免疫による感染防御機構に関与していることが示されたパネート細胞のヒトにおける意義を解明し、さらに、クローン病患者におけるパネート細胞の自然免疫機能を明らかにすることを目的とする。そのために、小腸粘膜からクリプトを単離し、その形態と遺伝子発現および <i>ex vivo</i> 細菌感染に対するパネート細胞からの殺菌顆粒分泌反応を解析する。			
材料・方法			
1. ヒト小腸クリプトおよび絨毛の単離 インフォームド・コンセントの下で、大腸癌手術の切除回腸（9 例）または大腸内視鏡下生検回腸（6 例）から正常回腸粘膜を、またクローン病患者の切除回腸（10 例）または大腸内視鏡下生検材料（3 例）から回腸粘膜を得た。得られた新鮮材料を EDTA 分離法で位相差顕微鏡下に 1, 5 または 20 個のクリプトまたは絨毛を単離した。また、2000 個のクリプトは hemocytometer で計測して得た。 2. RT-PCR 1 個の単離クリプトあるいは絨毛から total RNA を抽出した。α-defensin (HD-5, HD-6), lysozyme の cDNA を検出する primer を作製し RT-PCR を行い、最終産物を 2% agar gel で電気泳動しエチジウムブロマイドで染色した。 3. <i>In situ</i> hybridisation 正常クリプトから得た HD-5 mRNA を用いて、ビオチン標識センスおよびアンチセンス RNA probe を作製した。<i>In situ</i> hybridization (ISH) は正常ヒト小腸粘膜ホルマリン固定切片で行い、RNA probe を hybridization 後、DAB で発色した。			

4. ヒト小腸パネート細胞分泌誘導と殺菌アッセイ系

単離クリプトまたは単離絨毛を *Salmonella typhimurium* *phoP*⁻ (*S. typhimurium*) に 37°C, 30 分間曝露してパネート細胞分泌を誘導した群または非曝露群を, Tryptic soy agar プレート培地で培養した. 生存 CFU を計測し, 結果を CFU 実数またはコントロール細菌群と比較した生存率で示した.

5. 免疫染色

単離クリプトにおける α -defensin の局在を, 抗 HD-5 抗体を一次抗体としたアビジン・ビオチン系の免疫染色 (Texas Red) で, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した.

6. パネート細胞顆粒蛋白の抽出法

正常単離クリプト 2000 個から Nitrogen disruption 法でパネート細胞顆粒蛋白を得た.

7. Western-blot 法

正常またはクローン病患者の単離クリプト 2,000 個を *ex vivo* 細菌曝露した上清蛋白, および方法 6 で得たパネート細胞顆粒蛋白を, 5M urea 含有 Acid-urea PAGE で分離後, nitrocellulose 膜に転写し, HD-5 の免疫反応を chemiluminescence 法で検出した.

8. 統計解析

測定値は平均±標準偏差で示し, クリプト数と生存率の相関はスピアマン順位相関係数を, 正常とクローン病患者クリプト由来殺菌活性の差異の検定は Mann-Whitney の U 検定を用いて行い, $P < 0.05$ を統計学的に有意とした.

成 績

1. 正常対照およびクローン病患者からの単離小腸クリプト

位相差顕微鏡下で観察すると, 単離クリプトは基底部のパネート細胞顆粒の存在により容易に識別し得た. クローン病患者の活動性病変近傍回腸から得た単離クリプトのほとんどは正常対照と比べてパネート細胞が減少していた. さらに, クリプトの伸長, 内腔拡大などの形態異常を認めた. これに対して, 炎症のない回腸から得た単離クリプトは, 正常対照と同様であった.

2. ヒト単離小腸クリプトにおける α -defensin の遺伝子発現および免疫局在

正常クリプトは単一クリプトレベルで, HD-5, HD-6 及び lysozyme mRNA を発現していた. ISH 法で, HD-5 mRNA の発現はクリプトの基底部に認められ, パネート細胞に一致していた. また, 抗 HD-5 抗体を用いた免疫染色では, HD-5 は小腸クリプトの最基底部のみに局在が認められ, パネート細胞における発現を確認した.

3. 細菌曝露による正常及びクローン病患者小腸クリプトからの殺菌活性放出

単離正常クリプトを *S. typhimurium* に曝露して得た分泌物の抗菌活性は, クリプトの数依存性に有意に *S. typhimurium* を殺菌した. 一方, 単離小腸絨毛を細菌曝露しても殺菌活性は検出しなかった. クローン病患者からパネート細胞を含むクリプトあるいは含まないクリプトを選択的に単離して *ex vivo* 細菌曝露すると, パネート細胞を含むクリプトから殺菌活性の放出を認めた. これに対して, パネート細胞を含まないクリプトからは抗菌活性を検出しなかった. クローン病患者のパネート細胞を含むクリプト由来の殺菌活性は, 正常クリプトと比較して有意に低かった.

4. Western blot 法によるパネート細胞からの α -defensin 分泌

Western blot 法により, パネート細胞顆粒, 正常及びクローン病患者のパネート細胞分泌物中には lysozyme 及び HD-5 蛋白が認められた. これに対して, 細菌曝露しなかった対象上清中にはいずれも認められなかった.

考 案

本研究により、正常のヒト小腸パネート細胞の腸粘膜自然免疫における機能は、マウスの場合と同様に、細菌暴露にすばやく反応して α -defensin 等の内因性抗菌ペプチドを含む顆粒を分泌し、侵入してきた病原体を殺菌することであると考えられた。

これまでクローン病について、腸管粘膜上皮の自然免疫機能の面から検討した報告はみられなかった。本研究で明らかにしたクローン病患者から得られたクリプトにみられた様々な形態異常や、パネート細胞数の減少の原因は未だ不明である。しかし、*Trichinella* 感染マウスでは小腸粘膜のパネート細胞増殖を認めることや、ある種の慢性炎症時には異所性パネート細胞が胃、大腸等に認められることなどから、炎症に伴って局所に出現する何らかの化学因子が、腸粘膜において幹細胞からのパネート細胞の分化に影響を与えている可能性が考えられた。また、正常およびクローン病患者のパネート細胞から細菌曝露 30 分後の分泌物を直接解析して殺菌活性を検出し、HD-5 を生化学的に証明したことより、パネート細胞由来の内因性抗菌ペプチドは少なくとも分泌直後に活性化されていることを明らかにした。本研究で、クローン病患者に認められた小腸粘膜におけるパネート細胞由来殺菌能の低下は、自然免疫による腸粘膜感染防御機構の破綻を意味するものと考えられた。クローン病の病態に、感染に対する自然免疫機構の異常が関与する可能性が示唆された。

結 論

ヒトの小腸パネート細胞は *ex vivo* 細菌曝露により、 α -defensin を含む顆粒を分泌し、自然免疫による小腸粘膜感染防御に貢献していることが示唆された。クローン病では、細菌感染に対するパネート細胞分泌反応の異常による自然免疫機構の破綻が、病態に関与している可能性がある。

引用文献

- 1) Selsted ME, Miller SI, Henschen AH, Ouellette AJ: Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J Cell Biol* 118: 929-936, 1992.
- 2) Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, and Ouellette AJ: Secretions of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature Immunol* 1: 113-118, 2000.
- 3) Meyers S: Clinical features and diagnosis. In: Bockus Gastroenterology 5th Edition Volume 2, ed by Haubrich WS, Schaffner F, Berk JE, WB Saunders Company, Pennsylvania, pp1410-1427, 1995.

参考文献

- 1) 前本篤男、綾部時芳、蘆田知史、藤谷佳織、佐々木有海、藤城貴教、折居史佳、藤谷幹浩、野村昌史、斉藤裕輔、高後 裕：潰瘍性大腸炎に対する遠心分離式白血球除去療法の治療効果の解析：日本アフエレーシス学会雑誌 19:4-7, 2000.
- 2) Fumika Orii, Toshifumi Ashida, Masafumi Nomura, Atsuo Maemoto, Takanori Fujiki, Tokiyoshi Ayabe, Shinjiro Imai, Yusuke Saitoh, Yutaka Kohgo: Quotitative analysis for human glucocorticoid receptor α /b mRNA in IBD: *Biochim Biophys Res Commun* 296: 1286-1294, 2002.
- 3) Mikihiro Fujiya, Yusuke Saitoh, Masafumi Nomura, Atsuo Maemoto, Kaori Fujiya, Jiro Watari, Toshifumi Ashida, Tokiyoshi Ayabe, Takeshi Obara, Yutaka Kohgo: Minute findings by magnifying colonoscopy are useful for the evaluation of ulcerative colitis: *Gastrointest Endosc* 56: 535-52, 2002.

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	前本 篤男
<u>審査委員長 高 後 裕 ㊟</u> <u>審査委員 立 野 正 敏 ㊟</u> <u>審査委員 若 宮 伸 隆 ㊟</u>			
学 位 論 文 題 目			
クローン病における小腸パネート細胞の自然免疫機能解析			
パネート細胞は、小腸粘膜のクリプト基底部に認められ、その顆粒中に内因性抗菌ペプチドである alpha-defensin を有する。最近、パネート細胞は <i>ex vivo</i> 細菌感染に反応して顆粒を分泌し、分泌された内因性抗菌ペプチドの殺菌活性によって自然免疫による強力な粘膜感染防御機構を形成していることがマウス実験で報告された。一方、クローン病は原因不明の難治性炎症性腸疾患であり、若年者から発症し再燃を繰り返し難治性の経過をとる。一部のクローン病患者で細菌抗原認識に関与する免疫反応異常が報告され、クローン病の病態に腸内細菌が関与する可能性が指摘されている。しかし、ヒト小腸パネート細胞顆粒に含まれる内因性抗菌ペプチドの役割や、パネート細胞の機能とクローン病との関連については未だに不明である。本研究は、ヒトの小腸粘膜から単離したクリプトを用いて、クローン病患者におけるパネート細胞の自然免疫機能を正常対照と比較して検討したもので、以下の結果を得た。			

① 位相差顕微鏡下観察で単離クリプトは基底部のパネート細胞顆粒の存在により容易に識別し得た。クローン病患者の活動性病変近傍回腸から得た単離クリプトのほとんどは、正常対照ではみられないクリプトの著しい伸長、分岐、内腔拡大などの形態異常を認めた。また、クローン病患者ではパネート細胞の形態異常も認めた。

② 正常クリプトは単一クリプトレベルで、alpha-defensin (HD-5, HD-6) mRNAを発現し、抗 HD-5 抗体を用いた免疫染色で、HD-5 は小腸クリプトの最基底部のみに局在が認められ、パネート細胞における発現を確認した。

③ 正常単離クリプトを *S. typhimurium* に曝露して得た分泌物の抗菌活性は、クリプトの数依存性に強力に *S. typhimurium* を殺菌した。これに対して、クローン病患者の単離クリプトを *ex vivo* 細菌曝露することにより認められた殺菌活性は、正常クリプトと比較して有意に低かった。Western blot 法により、正常及びクローン病患者のパネート細胞分泌物中には HD-5 が認められた。

本研究結果は、クローン病患者の小腸クリプトにおける様々な形態異常の存在及びクローン病患者のパネート細胞由来殺菌活性の低下を明らかにした最初の報告である。得られた成績は、クローン病における腸管局所の粘膜上皮感染防御機構の異常を示唆し、クローン病の病態において腸管感染に対する自然免疫機構の破綻が関与する可能性を示している。本研究は、未だに原因不明であるクローン病の病態解明に対して、大いに貢献するものと考えられる。また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に対する十分な知識を有していると認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。