

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	伊藤貴博
<p>学位論文題目</p> <p>ヒト Paneth 細胞分泌物による炎症反応の制御に関する解析</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>免疫系は自然免疫系と獲得免疫系に分けられる。自然免疫系では、α-defensin 等の内因性抗菌ペプチドが重要な役割を演じている。すなわち、腸上皮細胞の一つである Paneth 細胞は、細菌感染に反応して抗菌ペプチドを含む顆粒を分泌することにより自然免疫による感染防御機構を形成していると考えられている。好中球や皮膚上皮細胞由来の内因性抗菌ペプチドは、抗菌活性の他に未熟樹状細胞や T 細胞等に対して化学遊走因子として働き、自然免疫と獲得免疫のリンクに関与している可能性が報告されている。しかし、腸管粘膜上皮における自然免疫と獲得免疫の関連性については未だに明らかではない。また、マウスの Paneth 細胞 α-defensin は、ヒト大腸癌由来腸管上皮細胞株 T84 細胞を刺激して IL-8 を分泌させ、腸管粘膜の炎症に関与することが報告されているが、ヒトの Paneth 細胞分泌物や α-defensin による炎症性サイトカイン産生能については知られていない。</p> <p>本研究は、Paneth 細胞由来物質に対する樹状細胞の化学遊走能と、T84 細胞に対する炎症性サイトカイン産生能を解析することで、腸管自然免疫担当細胞である Paneth 細胞による炎症反応の制御機構を明らかにすることを目的とする。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. ヒト小腸陰窩の単離</p> <p>インフォームド・コンセントを得た大腸癌患者の手術切除回腸(6例)から正常回腸粘膜を得て EDTA 分離法で陰窩を単離した。</p> <p>2. Paneth 細胞 α-defensin 及び Paneth 細胞顆粒と分泌物の回収</p> <p>Paneth 細胞 α-defensin は、リコンビナント HD5、HD6 及び合成 HD5 を用いた。Paneth 細胞顆粒は、単離陰窩から Nitrogen disruption 法で顆粒蛋白を抽出した。Paneth 細胞分泌物は、陰窩を <i>Salmonella typhimurium phoP</i>-に曝露して 37°C で 30 分反応させ、上清を回収して得た。</p>			

3. 免疫ブロット法

Paneth 細胞分泌物及び顆粒蛋白中の HD5 及び HD6 の定量は,材料を nitrocellulose 膜に転写後,抗 HD5 抗体または抗 HD6 抗体を用いた免疫ブロット法で行った.陰窩内腔の容積から,陰窩内腔での分泌直後の HD5 及び HD6 の濃度を算出した.

4. ヒト樹状細胞の分離

インフォームド・コンセントの下に健常人から得た単球に GM-CSF, IL-4, TGF- β 1 を加えて 7 日間培養し未熟樹状細胞を得た.さらに TNF- α を添加して 2 日間培養し成熟樹状細胞を得た.得られた樹状細胞の表面抗原を,抗 Lin1 抗体,抗 HLA-DR 抗体,抗 CD83 抗体を用いてフローサイトメトリーで解析した.

5. 樹状細胞遊走性試験

96 穴ケモタキシスチャンバーを用いて各種 Paneth 細胞由来物質をフィルター下層の well に,未熟樹状細胞または成熟樹状細胞をフィルター上層の well に満たして 1.5 時間培養後,フィルターに付着した細胞数を顕微鏡下で数えて,対照と比較した.

6. T84 細胞を用いた Paneth 細胞由来物質による刺激試験

Confluent 状態の T84 細胞の apical 側から各種 Paneth 細胞由来物質を加え,5 時間培養後に basolateral 側の溶液を回収した.それらの IL-8 及び TNF- α 濃度を ELISA 法にて,炎症性サイトカイン発現を inflammation antibody array III キットを用いた免疫ブロット法で解析した.

7. 統計

測定値は平均 \pm 標準偏差で示し,検定は Mann-Whitney の U 検定及び Student の t 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. Paneth 細胞 α -defensin 分泌量

Paneth 細胞の HD5 は,小腸陰窩1個当たり Paneth 細胞顆粒内には平均 4.89ng 含まれ,*ex vivo* 細菌刺激により平均 1.25ng 分泌された.HD6 は,それぞれ 0.09ng 及び 0.06ng であった.回収した単離小腸陰窩内腔の容積(平均 17 μ l)から算出した陰窩内腔における分泌直後の HD5 及び HD6 の推定濃度はそれぞれ平均 73.5mg/ml, 3.5mg/ml であった.

2. Paneth 細胞分泌物に対する樹状細胞の遊走性

末梢血単球を7日間培養して、フローサイトメトリ解析で Lin1-, HLA-DR+, CD83-の末梢血単球由来の未熟樹状細胞に富む分画を得た。未熟樹状細胞は Paneth 細胞分泌物及び HD6 に対する化学遊走能を有していた。これに対して、HD5 に対する化学遊走能は示さなかった。また、Paneth 細胞由来物質は、末梢血単球由来の成熟樹状細胞に対して、その遊走性に影響を与えなかった。

3. Paneth 細胞分泌物による T84 細胞の活性化

Paneth 細胞分泌物、HD5 及び HD6 は、濃度依存性に T84 細胞から IL-8 を分泌させた。また、Paneth 細胞分泌物は、濃度依存性に T84 細胞から TNF- α を分泌させた。これに対して HD5 および HD6 は TNF- α を分泌させなかった。Paneth 細胞分泌物に、T84 細胞からの IL-1 β 及び RANTES の分泌誘導能を認めた。

考 案

本研究により、ヒト Paneth 細胞が *ex vivo* 細菌曝露に反応して分泌する α -defensin が十分に高濃度であり、生体内で強力な殺微生物作用を持つことが示唆された。ケモカインは、体内の炎症局面での細胞遊走や免疫応答など多くの生命現象に関与することが知られている。本研究において、ヒトの Paneth 細胞分泌物及び HD6 が、未熟樹状細胞に対する化学遊走因子としてはたらくことが示唆された。CCR6 を発現している末梢血中の未熟樹状細胞は、組織にある MIP-3 α の作用で腸管局所に遊走することが知られている。本研究により、未熟樹状細胞が Paneth 細胞由来物質によって腸管上皮付近へと動員される可能性を示した。

apical 側に分泌された Paneth 細胞由来物質が、陰窩を構成する他の上皮細胞を刺激してサイトカインを分泌させることにより獲得免疫に関与する可能性を検討した。Paneth 細胞由来物質は腸上皮細胞株である T84 細胞を刺激して、炎症性サイトカイン・ケモカインである IL-8, TNF- α , IL-1 β , RANTES を分泌させることが明らかとなった。したがって、Paneth 細胞分泌物により間接的に獲得免疫細胞が動員されることが示唆された。本研究により、ヒト Paneth 細胞とその内因性抗菌ペプチドを介した腸管における自然免疫と獲得免疫のクロストークの可能性を示した。

結 論

本研究によって、感染刺激に反応して α -defensin を分泌する Paneth 細胞が、小腸粘膜の自然免疫系だけではなく、獲得免疫系に対しても直接のおよび間接的に作用している可能性を示した。

引用文献

- 1) 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* 2000;1:113-118
- 2) Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OMZ, Oppenheim JJ. β -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999;286:525-528
- 3) Lin PW, Simon PO, Jr., Gewirtz AT, Neish AS, Ouellette AJ, Madara JL, Lencer WI. Paneth cell cryptdins act *in vitro* as apical paracrine regulators of the innate inflammatory response. *J Biol Chem* 2004;279(19):19902-19907

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	伊藤 貴博
<p>審査委員長 若 宮 伸 隆 ㊟</p> <p>審査委員 伊 藤 喜 久 ㊟</p> <p>審査委員 高 後 裕 ㊟</p> <p>審査委員 奥 村 利 勝 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>ヒト Paneth 細胞分泌物による炎症反応の制御に関する解析</p>			
<p>免疫は、抗原の特異的認識と免疫記憶を特徴とする獲得免疫とパターン認識を特徴とする自然免疫の2つに分類されている。自然免疫に関わる因子の中で抗菌ペプチドは、下等生物から保存された重要な因子で、特に腸上皮では、Paneth細胞から defensin が分泌されることが明らかにされている。さらに近年、好中球由来のα-defensin によって未熟樹状細胞と naive T 細胞において遊走能をもつこと、さらに皮膚由来のβ-defensin に対して、未熟樹状細胞と memory T 細胞が遊走能を付加されることが明らかにされ、自然免疫が獲得免疫に関与することがわかってきた。</p> <p>本学論文提出者の伊藤は、ヒト正常腸上皮から Paneth 細胞分泌物を得て、その分泌物中の defensin の定量化を行い、さらに defensin が樹状細胞に遊走能を付加する可</p>			

能性とその誘導メカニズムの検討を行った。

実験結果としては、Paneth 細胞の defensin として HD5 は、小腸陰窩 1 個あたり Paneth 細胞顆粒内には平均 4.89 ng 含まれ、ex vivo 細菌刺激により平均 1.25 ng 分泌されることを明らかにした。一方 HD6 は、小腸陰窩 1 個あたり Paneth 細胞顆粒内に平均 0.09 ng 含まれ、ex vivo 細菌刺激により平均 0.06 ng 分泌された。これらの実験結果から小腸陰窩内腔濃度は、HD5:73.5mg/ml、HD6: 3.5mg/ml であることを導き出した。さらに、Paneth 細胞分泌物の添加により、①樹状細胞における遊走能の検討で未熟樹状細胞のみに遊走能が付加されること、②Paneth 細胞近縁に存在すると考えられる腸上皮の、細胞株である T84 から炎症性サイトカインである IL-8、TNF- α 、IL-1 β 、RANTES が分泌されること、をヒトの消化管系において初めて明らかにした。これらの研究結果は、Paneth 細胞が生細菌との共存によって、内因性 defensin である HD5、HD6 の分泌することを定量的に明らかにしたばかりでなく、未熟樹状細胞に特異的に遊走能が付加されることを示したものである。このことは、腸管において自然免疫から獲得免疫の細胞が動員されること、つまり自然免疫と獲得免疫のクロストークの可能性を示したものである。

これらの研究成果は、炎症性腸疾患や感染性腸疾患において新たな知見を示すものであり、本分野の研究発展に寄与するものであると考えられる。

なお、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、関連分野に関する十分な知識を有していることを確認した。

以上の結果から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値するものと判定した。