

# 研 究 成 果 報 告 書

---

デフェンシンのヒト消化管粘膜自然免疫システムにおける機能解析

---

課題番号15590610

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金（基盤研究C）研究成果報告書

平成17年5月

研究代表者 綾部時芳

旭川医科大学医学部消化管再生修復医学講座

は し が き

古くからヒトの小腸は大腸に比べて腸内細菌数が著しく少ないことは古くから知られており、小腸には感染に対する特別な生体防御機構があるのではないかと考えられてきた。デフェンシン (defensin) は最も早くからその存在が明らかにされた内因性抗菌ペプチドの一つである。defensinはマウスおよびヒトの消化管上皮において、小腸パネート細胞に特異的に発現することが知られているが、消化管抗菌ペプチドとしてのその役割は不明であった。本研究代表者である綾部は、マウスの小腸パネート細胞の役割について検討し、実験的経口サルモネラ感染に対してPaneth細胞 $\alpha$ -defensin (cryptdin) 欠損マウスはwild-typeマウスに比べて致命率が高いことを示した (Wilson、 Ayabe et al.、 *Science* 286: 113、 1999)。さらに、マウスのcryptdinが腸管の細菌感染に対して自然免疫による強力な防御機構を形成していることを直接証明した (Ayabe et al.、 *Nature Immunol* 1: 113、 2000)。本研究は、ヒトの消化管上皮における自然免疫システムの役割を、小腸パネート細胞のdefensin分子の構造と機能、および微生物との相互作用に関わる受容体と考えられるToll-like receptor (TLR)の構造と機能の面から検討した。

研究組織

研究代表者 : 綾部 時 芳 (旭川医科大学医学部消化管再生修復医学講座)  
 研究分担者 : 高 後 裕 (旭川医科大学医学部内科学第三講座)

交付決定額 (配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15年度	2、600	0	2、600
平成 16年度	1、000	0	1、000
平成 年度			
平成 年度			
平成 年度			
総 計	3、600	0	3、600

## 研究発表

### (1) 学会誌等 (発表者名、テーマ名、学会誌名、巻号、年月日)

Tanabe et al., Mouse Paneth cell responses to cell surface glycolipids of virulent and attenuated pathogenic bacteria. *Infect Immun*, 73: 2005

Ayabe T et al., The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol*, 12: 394-398, 2004

Ebisawa Y et al., Direct evidence that induced nitric oxide in hepatocytes prevents liver damage during lipopolysaccharide tolerance in rats. *J Surg Res*, 118: 183-189, 2004

Kono T et al., Impaired nitric oxide production of the myenteric plexus in colitis detected by a new bio-imaging system. *J Surg Res*, 117: 329-338, 2004

Kohgo Y. Why is leukocytapheresis effective in inflammatory bowel diseases?  
*J Gastroenterol*, 39: 1226-1227, 2004

Watari J et al., Reduction of syndecan-1 expression in differentiated type early gastric cancer and background mucosa with gastric cellular phenotype. *J Gastroenterol*, 39: 104-112, 2004

Mirza ZK et al., Gastric intestinal metaplasia as detected by a monoclonal antibody is highly associated with gastric adenocarcinoma. *Gut*, 52: 802-807, 2003

Kohgo Y et al., Leukocytapheresis for treatment of IBD. *J Gastroenterol*, 38: 51-54, 2003

Shibata N et al., Cell kinetics and genetic instabilities in differentiated type early gastric cancers with different mucin phenotype. *Hum Pathol*, 34: 32-40, 2003

### (2) 口頭発表 (発表者名、テーマ名、学会等名、年月日)

綾部時芳、高後 裕. 炎症性腸疾患と腸内細菌—クローン病患者にみられる腸管自然免疫機能異常. (ワークショップ) 第89回日本消化器病学会総会: 2003年 4月 24-26日: 埼玉

河野 透、綾部時芳、高後 裕. 消化管疾患における再生医療の展望 — 機能マーカーによる腸粘膜幹細胞の同定・単離と分化誘導因子の解析. (シンポジウム) 第89回日本消化器病学会総会: 2003年 4月 24-26日: 埼玉

綾部時芳、蘆田知史、高後 裕. 炎症性腸疾患における小腸パネート細胞の自然免疫学的解析.  
(シンポジウム) 第40回日本消化器免疫学会総会:2003年 8月7-8日:東京

綾部時芳、高後 裕. パネート細胞による腸内細菌の認識・殺菌. (フォーラム) 2003産学官  
技術移転フォーラム:2003年 10月 8日:札幌

岡本耕太郎、綾部時芳、蘆田知史、高後 裕. サイトフェレシスによる新たな治療戦略—潰瘍性  
大腸炎に対する遠心分離式白血球除去療法の位置づけ. (ワークショップ) 第20回日本医工学  
治療学会総会学術大会:2004年 4月 23-24日:広島

綾部時芳、河野 透、高後 裕. 機能マーカーを用いたヒト腸上皮幹細胞の同定. 第2回幹細胞  
シンポジウム:2004年 4月 26-27日:東京

綾部時芳、高後 裕. 感染症:パネート細胞による腸内細菌の認識および殺菌機構の解析.  
(ワークショップ招待講演) 第93回日本病理学会総会:2004年 6月 9-11日:札幌

綾部時芳、河野 透、高後 裕. 再生医工学的アプローチによるヒト腸上皮幹細胞の分離・培養の  
可能性. (シンポジウム) 第46回日本消化器病学会大会:2004年 10月 21-24日:福岡

伊藤貴博、綾部時芳、高後 裕. 単離小腸陰窩を用いたパネート細胞の自然免疫機能診断.  
(ワークショップ) 第46回日本消化器病学会大会:2004年 10月 21-24日:福岡

綾部時芳、岡本耕太郎、蘆田知史、高後 裕. 遠心分離式白血球除去療法の治療効果と適応. (ラ  
ンチョンセミナー) 第24回日本アフエレシス学会:2004年 11月 19-20日:舞浜

綾部時芳、高後 裕. 腸上皮の自然免疫機構—感染刺激の受容と殺菌—. (シンポジウム)  
第34回細胞情報伝達系北海道研究会:2004年 11月27日:札幌

田邊裕貴、綾部時芳、前本篤男、蘆田知史、高後 裕. クロウン病におけるPaneth細胞の自然免  
疫機構. (シンポジウム) 国際科学振興財団第12回浜名湖シンポジウム:2004年 12月 23-24  
日:浜松

### (3) 出版物 (著者名、書名、出版者名、年月日)

蘆田知史、綾部時芳、高後 裕. 消化管と免疫. 戸田剛太郎、税所宏光、寺野 彰、幕内雅敏編 Annual  
Review消化器 2004. 東京:中外医学社;2004. pp67-69.

綾部時芳. 内因性抗菌ペプチドと消化管の自然免疫. マイケル・ザスロフ監修. 自然免疫 vol.1. 東京:  
Innate Immunity研究会出版;2004. pp133-164.

綾部時芳、蘆田知史、河野 透、高後 裕. 腸上皮細胞におけるPaneth細胞の自然免疫機能と病原体認識  
機構. 奥村 康、平野俊夫、佐藤昇志編 Annual Review免疫 2005. 東京:中外医学社;2005. pp81-87.

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当なし

## 研 究 の 目 的

本研究は、ヒトの消化管における自然免疫システムの役割を、小腸パネート細胞のdefensin分子の構造と機能、および微生物との相互作用に関わる受容体と考えられるToll-like receptor (TLR)の構造と機能の面から検討することによって解明することを目的とする。第一に、ヒトのパネート細胞が細菌および細菌抗原に対して、マウスと場合と同じように抗菌ペプチドを分泌することにより腸管感染防御に貢献していることを証明する。パネート細胞 $\alpha$ -defensinに対する特異抗体を作製し、defensin (HD-5、HD-6)発現を解析する。また、ヒトの小腸 $\alpha$ -defensin (HD-5、HD-6)の電荷と抗菌活性との間接を検討する。さらに、単離陰窩または単離したパネート細胞を直接いろいろな細菌に曝露することによって自然免疫機構の分子認識メカニズムを検討し、自然免疫病原体認識機構から消化管自然免疫の分子基盤と機能を検討する。

## 方 法

### 1. 抗 $\alpha$ -defensin抗体の作製

ヒト小腸パネート細胞 $\alpha$ -defensinに対する特異抗体を作製するために、HD-5 peptideおよびHD-6 peptideをOuelletteらの方法にしたがって作製した。われわれの既報 (*Nature Immunol* 2000)に準じて、インフォームド・コンセントを得た健常小腸を有するボランティアの内視鏡的小腸生検材料または大腸疾患患者の手術切除小腸材料から小腸陰窩を単離した。次に小腸陰窩から $\alpha$ -defensinを含むパネート細胞顆粒をNitrogen法で精製した後、活性化分画を回収した。蛋白分離用電気泳動法により抗菌分画の分離した。免疫源は、sequenceを解析し活性化HD-5または活性化HD-6であることを確認した。得られた免疫源ペプチドはアジュバンドとともに兎への免疫法により、それぞれ抗HD-5 peptide抗体、抗HD-6 peptide抗体を得た。

## 2. パネート細胞分泌機能および分泌物の解析

単離小腸陰窩を次に示すような様々な細菌および細菌抗原に曝露して、各々の分泌物を回収し解析する。正常腸内細菌 (*Lactobacillus*)、グラム陰性菌 (*S. typhimurium*, *E. coli*)、グラム陽性菌 (*S. aureus*) (以上、いずれも1000 CFU/陰窩)、細菌抗原 (Lipopolysaccharide 100ng/ml)を単離小腸陰窩と培養後、単離陰窩のパネート細胞から放出される抗菌活性を指標として、*ex vivo*でヒト小腸パネート細胞分泌アッセイを行って上清中の抗菌活性を測定した (Ayabe T et al., *Nature Immunol*: 113-116, 2000)。単離小腸陰窩からパネート細胞分泌物を回収し、高速逆相液体クロマトグラフィーおよびacid-urea PAGEで検出される分画について、本研究上記1. で作製した抗 $\alpha$ -defensin抗体を用いてWestern blot法を併用して解析した。

## 3. ヒトパネート細胞 $\alpha$ -defensinの構造と機能の解析

小腸パネート細胞顆粒中及びその分泌物中から、上記2. で得られる蛋白の生化学的特徴を指標として、ヒト $\alpha$ -defensinの電荷および抗菌活性との関係を解析した。HD-5 peptideとHD-6 peptideを用いて、パネート細胞から分泌された抗菌活性のうち $\alpha$ -defensin (HD-5またはHD-6)が占める貢献を、1. で作製した抗体を用いた阻害実験を行った。さらに、これらの抗体を用いて免疫組織化学的解析により単離小腸陰窩における $\alpha$ -defensinの局在を検討した。

## 4. パネート細胞分泌に関わる受容体候補Toll-like receptor (TLR)の解析

ヒトパネート細胞におけるTLRの発現を、単離陰窩及び単離細胞のレベルで、RT-PCR法および免疫組織化学的方法で検討した。これまでに報告されている10種類のTLRおよびTLR関連分子であるCD14, MD2についてそれぞれoligoprimerを作成し、単離陰窩および単離細胞から得たtotal RNAを材料としてRT-PCRを施行して、TLR mRNA発現を検討した。また、TLR-2, TLR-4については、抗体を用いて免疫組織科学的に単離小腸陰窩におけるそれぞれの発現を検討した。

なお、本研究ではヒトの消化管を主に解析研究するため、試料等の提供者、その家族・血縁者その他

の関係者の人権及び利益の保護には格段の配慮を行った。具体的には、本研究で試料を得る場合には文書による十分なインフォームド・コンセントを提供者、提供者が未成年の場合には保護者から得た。また、本研究で得られた結果の公表の際には、提供者、その家族・血縁者その他の関係者の人権及び利益の保護を十分に配慮して行うものとしている。

## 結 果

1. ヒト小腸パネート細胞  $\alpha$ -defensin に対する特異抗体を得るため、HHD-5 peptide および HD-6 を作製した。免疫原をアジュバンドとともに兎への免疫して得た抗 HD-5 抗体および抗 HD-6 抗体の特異性について検証した。これらの抗体の免疫反応性を、作製した  $\alpha$ -defensin 標品およびヒト小腸粘膜組織材料を用いて検討したところ、パネート細胞顆粒における特異的反応性が確認された。
2. ヒト単離小腸陰窩を正常腸内細菌、グラム陰性菌 (*S. typhimurium*, *E. coli*)、グラム陽性菌 (*S. aureus*) または細菌抗原である Lipopolysaccharide に曝露して、各々の分泌物を回収し、殺菌活性を検討したところ、単離陰窩のパネート細胞から放出される抗菌活性を指標とすると、検討した各種細菌および細菌抗原はすべてパネート細胞分泌を誘導することが確認された。
3. ヒト単離小腸陰窩から分泌物を回収、分離した。これら材料における  $\alpha$ -defensin を、本研究で作製した 2 種類の抗  $\alpha$ -defensin 抗体を用いた Western blot 法で検出した。その結果、分泌物中には HD5 および HD6 が存在していた。したがって、分泌物はパネート細胞由来であることが証明された。
4. ヒト小腸パネート細胞分泌物の分画から免疫学的、生化学的性状を指標として  $\alpha$ -defensin を検出、同定した。さらに、それらの陽性電荷および抗菌活性を確認した。これにより、ヒトのパネ

ート細胞がマウスの場合と同じように抗菌ペプチドを分泌することにより腸管感染防御に貢献していることを明らかにした。パネート細胞から分泌される $\alpha$ -defensinの役割を示唆した。

5. ヒトのToll様受容体の発現を、単離陰窩レベルでRT-PCR法および免疫組織化学的方法で検討した結果、パネート細胞におけるTLR-1~TLR-8, TLR-10の選択的発現を検出した。また、関連分子であるCD14は発現を認めたが、MD2の発現は認められなかった。

## 考 案

内因性抗菌ペプチドは、感染に対する生体防御機構の第一線である自然免疫機構の主要な因子の一つである。哺乳類では、好中球、マクロファージなどの貪食細胞や、皮膚上皮および歯肉粘膜、消化管粘膜、呼吸器粘膜、泌尿器、生殖器粘膜などの上皮細胞に内因性抗菌ペプチドが発現していることが知られている。内因性抗菌ペプチドは、細菌、真菌、原虫及びウイルスに対してまでの極めて広い抗微生物スペクトラムを有し、その作用は殺微生物作用である。

生体において、消化管粘膜上皮は常にさまざまな病原体に曝されている。一層の細胞層からなる消化管上皮は、生存に必要な栄養素や水などの吸収機能を有すると同時に、飲食と共に摂取される微生物や毒素に対するバリアである(表1)。哺乳類の大腸内腔には大量かつ極めて多種類の微生物が定住しており、そのほとんどは細菌であるために、一般に腸内細菌叢と呼ばれる。正常な腸内細菌叢は通常、病原菌の感染を妨げるとともに、消化吸收機能を助けていると考えられている。腸管粘膜免疫については、獲得免疫の面からは比較的よく理解されて重要性が認識されているが、自然免疫の分子基盤や役割はこれまであまり顧みられず、未だに十分に理解されていない。特に、腸管上皮細胞は生体防御という視点からは単なるバリアとして捉えられていた。腸管上皮細胞は、宿主の体内にありながら腸管内腔の微生物などの外来性物質と最前線で接している。パネート細胞は、19世紀に小腸の陰窩基底部に発見されたが、その機能が長年不明であった。われわれは、パネート細胞のはたらきに注目し、腸管粘膜免疫における意義を検討してきた。すなわち、マウスのパネート細胞 $\alpha$ -defensin (cryptdin)の活性化酵素がマトリライシン



(MMP-7)であることをマトリライシン遺伝子欠損マウスの検討により明らかにし、活性化 cryptdin を完全に欠損するこのマウスでは、*in vivo*経口サルモネラ感染による致死率が野生型マウスに比べて有意に高いことを示してきた。さらに、*ex vivo*細菌感染によるマウスのパネート細胞からの分泌物アッセイ系を確立し、分泌物中に存在する  $\alpha$ -defensin の殺菌活性を直接的方法により証明した。本研究でわれわれは、ヒトにおける消化管自然免疫機構の貢献とメカニズムを、単離小腸陰窩を用いた *ex vivo*系を構築することによって直接明らかにした。

自然免疫系では、外敵の侵入を微生物認識受容体で検出し、内因性抗菌ペプチドをはじめとするエフェクターのはたらきで微生物を撃退すると考えられる。微生物の認識に関わる分子に Toll-like receptor)がある。これまでに10個のヒトTLRが解析され、それぞれ特異的な微生物由来物質を認識することが知られている。しかし、上皮細胞のTLRについては未だにほとんど不明であった。消化管上皮細胞については、ヒトの大腸癌細胞株でTLRの発現が報告されている。本研究で、ヒトの小腸陰窩のパネート細胞におけるTLRの選択的発現が示されたことから、それらの機能についての解明が急務である。ヒトの消化管における自然免疫の分子が、微生物と消化管粘膜上皮細胞の直接的相互作用から解明されることの意義は大きい。水際で微生物の侵入を防いでいる消化管自然免疫に特異的な分子機構と機能が明らかになれば、これらをターゲットとする新しい自然免疫治療にも結びつくことが予想されることから、今後の研究進展が望まれる。

## 結 語

消化管粘膜上皮の自然免疫機構は従来考えられていたような受動的で非特異的なばかりのシステムではなく、制御されたシステムである。パネート細胞に存在する内因性抗菌ペプチドは、小腸陰窩微小環境において上皮幹細胞やその他の消化管上皮細胞群を感染から防ぎ、自然免疫に貢献していると考えられる。