

総説

腸における排除と共生 —抗菌ペプチドと腸内細菌—

綾部時芳、櫻木直也、中村公則

北海道大学大学院先端生命科学研究院 細胞生物科学分野

〒001-0021 札幌市北区北21条西11丁目

Tel: 011-706-9049, Fax: 011-706-9053

E-mail: ayabe@sci.hokudai.ac.jp

【要約】

消化管は、成長と生存に必要な栄養を消化と吸収によって取り入れる場であると同時に、経口的に侵入する様々な病原体を排除する場である。腸管自然免疫は病原体に対してすばやく強力に応答して感染防御に貢献している。一方で腸は、腸内細菌叢を構成する莫大な数の常在菌と共生する場でもある。この、腸における排除と共生が腸内環境の恒常性を維持し、延いては疾病の発症や進展に関与することがわかってきた。腸内細菌叢の構成異常“dysbiosis”と、感染症はもちろん、炎症性腸疾患、生活習慣病や癌など様々な疾病との関係が報告されており、機序の解明が待たれている。粘膜免疫と共生の両方において、腸上皮細胞の1系統であるPaneth細胞が関与している。Paneth細胞は小腸陰窩の最基底部に位置し、細胞内顆粒の抗菌ペプチド α ディフェンシン(α -defensin)を感染刺激にすばやく反応し分泌する。Paneth細胞 α -defensinは病原菌を強く殺菌する一方、常在菌にはほとんど殺菌活性を示さず、腸における排除と共生に直接関与し、腸内細菌叢を制御している。腸炎モデルIL10欠損マウスは糞便中 α -defensinが有意に低下し、移植片対宿主病モデルマウスでは、Paneth細胞が傷害されて α -defensinが消失し、著しいdysbiosisを生じて感染死に至る。寄生体である腸内細菌叢と宿主のPaneth細胞が担う自然免疫が形成する“腸内環境”から疾病を論じる。

キーワード: 自然免疫、抗菌ペプチド、Paneth細胞、 α -defensin、腸内細菌

【はじめに】

腸管粘膜を覆っている一層の上皮細胞は、宿主と外界を隔てる物理的バリアであると同時に、経口的に侵入しようとする様々な病原体に対して最初に免疫系が作用する場である。すなわち、腸の上皮細胞は、微生物の侵入を認識し、それにすばやく応答する強力な自然免疫を有している。同時に、腸は生きるために必要な栄養を食事から消化、吸収するという重要な機能を果たしている。さらに、腸は生体において最大

の免疫臓器であるとともに、神経細胞が豊富で密な脳腸相関があることなど、多くの種類の細胞群が多彩かつ重要な機能を果たしている場であることが知られている。

ヒトをはじめ脊椎動物の免疫系は自然免疫と獲得免疫の2つから成っている。自然免疫の重要性は腸管についても例外ではなく、自然免疫ではたらくToll様受容体やNod様受容体などの微生物認識分子と、自然免疫の作用因子である抗菌ペプチド(antimicrobial peptide)や活性酸素などについての最新知見が明らかになるに従って、腸管感染防御における自然免疫の貢献がますます注目されている[2, 6]。腸

受理: 2015年11月16日

上皮細胞が自然免疫機能を果たしていることが明らかとなった。すなわち、小腸上皮を構成する上皮細胞の一系統である Paneth 細胞は、 α -defensin という抗菌ペプチドを産生・分泌する [4, 34]。一方、腸には莫大な数の腸内細菌が常在しており、正常腸内細菌叢を形成して、宿主と共生していることがわかっている [12, 28, 42]。本稿では主に、Paneth 細胞 α -defensin と腸内細菌が関与する“腸における排除と共生”を理解し、腸管感染症、クローン病をはじめとする炎症性腸疾患、生活習慣病などの疾病との関わりについて現状をまとめる。特に、腸上皮細胞である Paneth 細胞が産生・分泌する α ディフェンシンという抗菌ペプチドの機能と、その異常と疾病の関係について概説する。

【哺乳類の自然免疫ではたらく抗菌ペプチド】

多細胞性生物は微生物の感染から身を守るために防御機構を持っている。粘膜上皮細胞は粘液によって覆われており、細胞同士は強固な細胞間結合によって微生物の侵入を防ぐ物理的バリアとなっている。このようなバリアに加えて、宿主は免疫系を駆使して生体防御を行っている。微生物がバリアを突破して体内に侵入しようとした場合には、自然免疫が最前線ですばやく応答する。自然免疫を担当する細胞は、貪食細胞、NK 細胞および気道や消化管など外界に接する部位の様々な上皮細胞である。からだにおける微生物と抗菌ペプチドの分布を図 1 に示した。外界と接する部分には正常細菌（微生物）叢が存在しており、その同じ部位にはほぼ必ず抗菌ペプチドが発現していることがわかっている。そしてまた、様々な病原菌はこれらの部位から侵入して感染症を起こすのである。

抗菌ペプチドは、感染防御の最前線に位置する自然免疫の主要な作用因子である [46, 54]。30 個ほど（15～45 個）のアミノ酸からなる殺微生物作用を持つペプチドで、植物、昆虫から哺乳類まで広く存在しており、全生物界で 1,000 種類以上がこれまでに報告されている。全ての抗菌ペプチドに共通の特徴として、塩基性アミノ酸を豊富に含んでいるために陽性電荷を有すること、疎水性部分を持つ両親媒性を呈することが挙げられる。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、泌尿器粘膜、生殖器粘膜などの上皮細胞に抗菌ペプチドが発現している [54]。また、抗菌ペプチドは、細菌、真菌、原虫、ウイルスなどに対して殺微生物作用を示し、臨床的には耐性菌を生じにくいことが知られている。抗菌ペプチドの殺微生物作用機序はまだ十分に解明されていないが、微生物の細胞膜を構成する脂質そのものや細胞膜の電荷などをターゲットにしていることが分かっている。哺乳類の抗菌ペプチドは、ディフェンシン (defensin)・ファミリーとカセリシジン (cathelicidin)・ファミリーに分けられる。哺乳類の defensin は 3 つのサブファミリー (α -defensin, β -defensin, θ -defensin) からなる。 α -defensin は貪食細胞の他に、腸上皮細胞である Paneth 細胞に発現が認められており、6 個のシステイン残基が 3 つのジスルフィド結合を形成する複雑な高次構造を持つ。ヒト、サル、ウマ、ウサギ、マウス、ラットをはじめとする哺乳類の消化管粘膜上皮において α -defensin は Paneth 細胞の顆粒のみに発現し、マウスでは 6 個以上の isoform (cryptdin-1 ~ cryptdin-6) が、ヒトでは HD5 と HD6 の 2 つがある [13, 19, 33, 44]。 β -defensin はヒト、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、マウス、ラットなど多くの哺乳類やニワトリなどの貪食細胞や呼吸器、消化管、腎臓、眼、生殖器、歯肉、皮膚などの上皮細胞に広く存在しており、感染刺激によって産生が誘導されることが知られている [10]。 β -defensin は自然免疫以外の機能も広く知られており、例えば、CDB103 という β -defensin はイヌの毛の色を決定していることが報告された [9]。 θ -defensin はサル (old-world monkey) の単球だけに発現する動物界で唯一の環状ペプチドであり、ヒトには存在しない。カセリシジン・ファミリーはプロドメインがカセリン様ドメインとして哺乳類の種を越えてよく保存されている [48, 52]。cathelicidin の活性基は defensin と異なりシステインを欠き、 α ヘリックス構造をとる。ヒトとマウスにはそれぞれ一種類ずつカセリシジンがあり、LL37 はヒトの好中球、皮膚上皮細胞および大腸上皮細胞に発現し、マウスには CRAMP が発現している。ウシは indolicidin、ブタは protegrin を

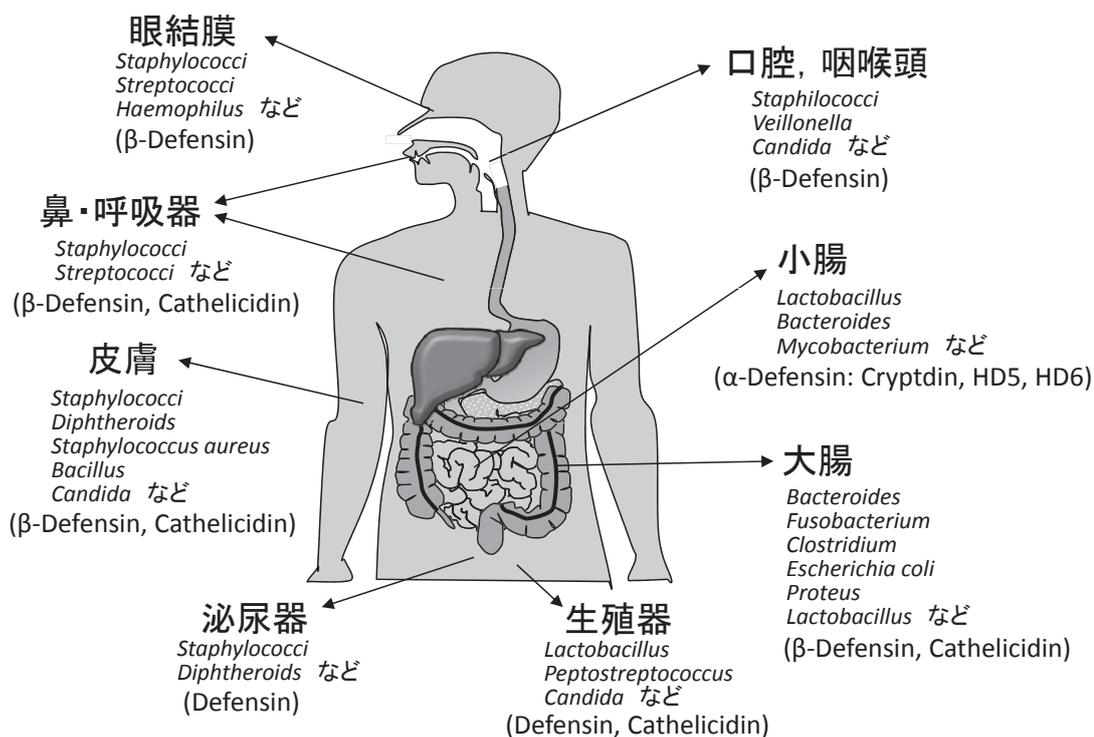


図1. からだの微生物叢の分布と抗菌ペプチドが発現する部位は一致している
ヒトのからだで外界と接する部位には微生物が住み着いており、微生物叢を形成している。その部位は抗菌ペプチドが存在する部位と一致している。

好中球に発現している。近年、抗菌ペプチドが感染防御に極めて重要な役割を果たしていることがわかってきた。

[Paneth細胞が産生・分泌するαディフェンシン]

小腸粘膜の陰窩と絨毛を構成する上皮細胞は、円柱細胞 (Columnar cell)、腸管内分泌細胞 (Enteroendocrine cell)、杯細胞 (Goblet cell) と Paneth 細胞 (Paneth cell) の4系統がある。これらは全て、陰窩の基底近傍にある腸管上皮幹細胞から分化して、Paneth細胞を除く3系統の細胞群は内腔側に移動しながら3~4日で再生と脱落を繰り返している。これに対して、Paneth細胞は小腸陰窩の最基底で幹細胞と隣り合わせに位置し、そこで25日ほど生存することが知られている [35]。Paneth細胞α-defensinは腸管における感染防御を担っていることが明らかになった [54]。すなわち、cryptdinを活性化する酵素である Matrilysin (Matrix Metalloproteinase-7) 遺伝子のノックアウトマウスは、活性型 cryptdin を完全に欠如し、*in vivo* サルモネラ経口感染の致死率が

野生型マウスに比べて有意に高いことが示された [51]。さらに、Paneth細胞が *ex vivo* 細菌刺激やコリン作働性刺激等にすばやく反応してα-defensinを腸内腔に分泌して病原体を排除していることが示され、腸管自然免疫への貢献が明らかになった [4, 5, 34, 39]。

最近になって、α-defensinは腸内細菌との共生にも重要な役割を果たしていることがわかった。ヒトのPaneth細胞α-defensinであるHD5遺伝子をマウスのPaneth細胞に導入すると、小腸の腸内細菌叢の構成が大きく変化することが報告された [41]。すなわち、α-defensinのみの違いが腸内細菌叢に影響することが示された。また、小腸にあるPaneth細胞から分泌されたα-defensinが、盲腸から直腸までの大腸内腔に殺菌活性を保ったまま存在することがわかり、α-defensinが大腸の細菌叢にも影響することが明らかとなった [26]。われわれは、cryptdinの病原菌と常在菌に対する殺菌活性を比較解析した。正常な高次構造を持つ酸化型 cryptdin は、*Salmonella Typhimurium*、*Escherichia coli*、*Yersinia enterocolitica* や

Listeria monocytogenes など検討した 11 菌種の病原菌全てに対して強い殺菌活性を示した [27]。これに対して、*Bifidobacterium bifidum*、*Bacteroides thetaiotaomicron* や *Lactobacillus casei* など検討した常在菌 12 菌種のうち 8 菌種に対しては殺菌活性をほとんど示さなかった。Cryptdin が殺菌活性を示した常在菌は日和見感染を起こすことが知られている菌であった。また、高次構造が異常な還元型 cryptdin は検討した菌全てに殺菌活性を示したことから、cryptdin の殺菌活性に高次構造が関与することがわかった [27]。すなわち、 α -defensin は腸内細菌に対して選択的な殺菌活性を持つことがはじめて明らかとなり、 α -defensin が病原体排除と常在菌との共生の両方に寄与していることがわかった (図 2)。小腸陰窩には Paneth 細胞に隣接して幹細胞が存在し、幹細胞ニッチ (stem cell niche) を形成して腸上皮細胞の再生と分化を支配することも示されている [29, 43]。

【 α ディフェンシンと腸内細菌と疾病の関係】

疾病と Paneth 細胞および α -defensin の関係が目ざされている。壊死性腸炎は、新生児の終末回腸に出血、浮腫を伴う壊死などが起こる重篤な疾病である。低出生体重児に好発することから腸管における未発達な自然免疫が原因の一つとして考えられている。壊死性腸炎では小腸組織中の HD5 発現量の低下が報告されたことから、腸管自然免疫の破綻が発症に関与する可

能性が示されていた [40]。また、炎症性腸疾患の一つであるクローン病の患者では、病変部小腸組織の HD5 発現が健常対照者に比べて低下していることが示されたが、これらの報告では炎症による二次的な現象を捉えている可能性も否定できず、さらなる検討が待たれていた [45]。Maemoto は cryptdin の構造と殺菌活性相関を解析し、SS 結合を形成する 6 個のシステインは殺菌活性そのものではなく、分解酵素によるペプチド高次構造の破壊を防ぐ作用に関与していることを示した [24]。また、還元型の HD5 は酵素による分解を受けやすいことが示され、実際のクローン病患者において高次構造異常のために HD5 が活性化酵素である trypsin の作用によって分解を受けたと考えられる症例が報告された [47]。すなわち、Paneth 細胞における HD5 高次構造の異常がクローン病の病態に関与する可能性が示された。さらに、小胞体ストレス応答の転写因子 *XBPI* がクローン病に関与することが、Paneth 細胞との関係で明らかになった。腸上皮細胞で *XBPI* を欠損するマウスでは、Paneth 細胞の形態異常を伴う腸炎が高率に生じること、また、クローン病患者の *XBPI* 遺伝子に SNPs が存在することが報告された [20]。さらに、オートファジー関連遺伝子である *Atg16L1* はクローン病感受性に関与し、*Atg16L1* を欠損するマウスでは Paneth 細胞の顆粒形成や分泌に異常が生じることが示された [7, 8]。欧米のクローン病患者においてグラム陽性細菌抗原の認

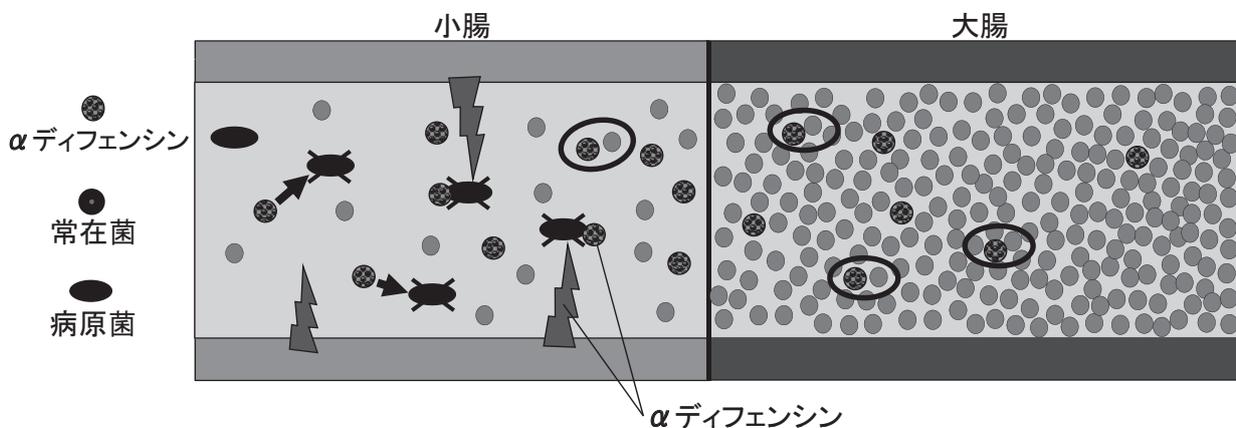


図 2. Paneth 細胞 α ディフェンシンは腸内細菌叢を制御している
 α ディフェンシンは病原菌を強く殺菌する一方、常在菌はほとんど殺菌しないことで、腸内細菌を制御して腸内環境の恒常性維持に貢献している。

識に関わる *NOD2* 遺伝子変異が疾患感受性に関わることが報告され、クローン病の病態に腸内細菌の認識および自然免疫応答が関与する可能性が示されている [32]。また、cryptdin は segmented filamentous bacteria という腸内細菌に作用し、小腸粘膜固有層の Th17 細胞数を変化させて、自然免疫から獲得免疫にまで影響が及ぶ可能性が示された [3, 14, 16]。このように、炎症性腸疾患において Paneth 細胞および α -defensin が重要な役割を果たしていることが示唆されている。

一方、腸内細菌と疾病の関係が近年大きなトピックスとなっている。2006年に、肥満者の腸内細菌叢は非肥満者に比べて *Firmicutes* が多く *Bacteroidetes* が少ないことが、細菌の 16S rRNA メタゲノム解析を行って報告された [49]。現在までに、腸内細菌叢の構成が異常であること (dysbiosis) と、肥満症、炎症性腸疾患、II 型糖尿病、非アルコール性脂肪肝炎、自閉症、肝硬変症、肝癌、大腸癌など多くの疾病の関係が報告されている [1, 17, 18, 22, 23, 25, 36, 37, 50, 53]。潰瘍性大腸炎では大腸の細菌感染や炎症が進んでしまうと、治療に抵抗する感染がしばしば臨床的に大きな問題となる。大腸炎モデルである IL2 欠損マウスや IL10 欠損マウスは大腸炎を自然発症するが、無菌環境で

飼育すると腸炎が発生しない。また、無菌環境で飼育されたこれらのマウスを通常の飼育環境に置くと腸炎を発症することから、腸内細菌が腸炎発症のトリガーとなっていることがわかっている [21, 38]。Dysbiosis は腸内環境の恒常性を破綻することが知られている。腸内細菌が変化して多様性が消失することや病原菌が増えることは、多くの疾病のトリガーとなり、病態の増悪因子となる。一方、前述したように、dysbiosis が炎症性腸疾患、生活習慣病、癌など様々な疾病に関与することが急速に知られてきたが、未だその詳細な機序はほとんど不明である。

Nakamura は、 α -defensin と dysbiosis さらには疾病との関係を解明するために、sandwich ELISA を樹立して、分泌された cryptdin をはじめて定量した [30]。そして、マウス消化管内腔および糞便中の cryptdin 濃度を測定して、十二指腸、空腸から回腸末端に向かって cryptdin 分泌量が著しく増加することを明らかにした。また、大腸内腔にも酸化型 cryptdin が存在することを示した。また、腸炎を発症した IL10 欠損マウスでは糞便中の cryptdin 量が有意に低下していることを示した。Eriguchi は、移植片対宿主病 (GVHD) モデルマウスを用いて、GVHD では Paneth 細胞

腸内環境

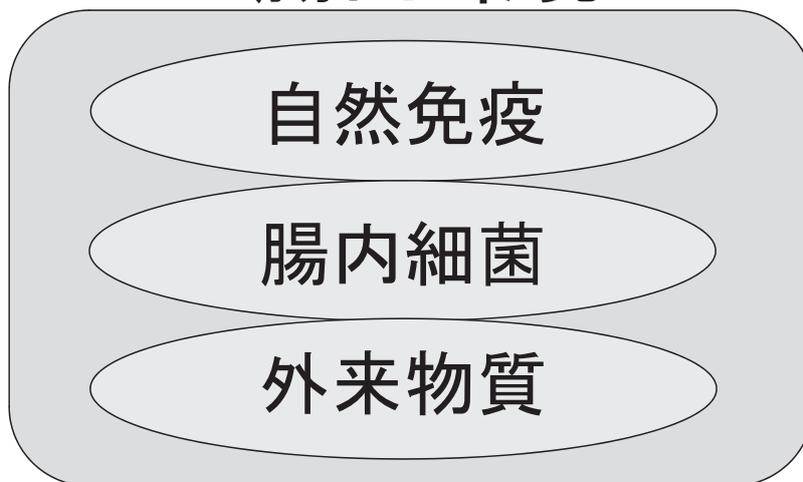


図 3. 腸内環境を構築する 3 つの因子 (仮説)

抗菌ペプチド α ディフェンシンをはじめとする自然免疫の作用分子、正常腸内細菌叢を形成する常在菌 (共生菌)、および食品など経口摂取される外来物質の 3 つの因子は、影響を受け合いながら腸内環境を規定している。

が傷害されて cryptdin が欠如することによって、dysbiosis が生じて感染死に至ることを明らかにした [11, 12]。この他にも、腸管の虚血再灌流障害や Toxoplasma 原虫感染症においても Paneth 細胞の障害が dysbiosis に繋がることがわかっている [15]。すなわち、 α -defensin の異常が dysbiosis を引き起こすことで、様々な疾病の発症や病態に直接関与することが明らかになった。以上のことから、図 3 に示したように、Paneth 細胞とその α -defensin による腸内細菌の制御という視点から腸内環境と疾病の関係を理解することによって、疾病の予防、治療に貢献することが期待される [31]。

【おわりに】

Paneth 細胞と α -defensin がどのように健康維持と疾病に関わっているのかについてはまだ解析が始まったばかりであり、その解明は今後の課題である。また、疾病と腸内細菌が関与する詳細な機序の解明もこれからである。それらの機序の一つとして、寄生体である腸内細菌叢、経口摂取する食品、宿主の Paneth 細胞が担う自然免疫によって形成される“腸内環境”という視点から、 α -defensin と消化管疾患をはじめとする様々な疾病との関係を検討することには大きな意義があると考えられる。

【引用文献】

- [1] Abu-Shanab, A. and Quigley, E. M. 2010. The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7: 691-701.
- [2] Akira, S. and Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511.
- [3] Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K. 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 331: 337-341.
- [4] Ayabe, T., Satchell, D. P., Wilson, C. L., Parks, W. C. and Selsted, M. E. Ouellette AJ. 2000. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 1: 113-118.
- [5] Ayabe, T., Satchell, D. P., Pesendorfer, P., Tanabe, H., Wilson, C. L., Hagen, S. J. and Ouellette, A. J. 2002. Activation of Paneth cell J-defensins in mouse small intestine. *J Biol Chem* 277: 5219-5228.
- [6] Ayabe, T., Ashida, T., Kohgo, Y. and Kono, T. 2004. The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol* 12: 394-398.
- [7] Cadwell, K., Liu, J. Y., Brown, S. L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J. K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J. A., Hunt, S., Stone, C. D., Brunt, E. M., Xavier, R. J., Sleckman, B. P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T. S. and Virgin, H. W. 4th. 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456: 259-263.
- [8] Cadwell, K., Patel, K. K., Maloney, N. S., Liu, T. C., Ng, A. C., Storer, C. E., Head, R. D., Xavier, R., Stappenbeck, T. S. and Virgin, H. W. 4th. 2010. Virus plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell* 141: 1135-1145.
- [9] Candille, S. I., Kaelin, C. B., Cattanach, B. M., Yu, B., Thompson, D. A., Nix, M. A., Kerns, J. A., Schmutz, S. M., Millhauser, G. L. and Barsh, G. S. 2007. α -defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. *Science* 318:1418-1423.
- [10] Diamond, G. and Bevins, C. L. 1998. I-Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin Immunol Immunopathol* 88: 221-225.
- [11] Eriguchi, Y., Takashima, S., Oka, H., Shimoji, S., Nakamura, K., Uryu, H., Shimoda, S., Iwasaki, H., Shimono, N., Ayabe, T., Akashi, K. and Teshima, T. 2012. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α -defensins. *Blood* 120: 223-231.
- [12] Eriguchi, Y., Nakamura, K., Hashimoto, D., Shimoda, S., Shimono, N., Akashi, K., Ayabe, T. and Teshima, T. 2015. Decreased Secretion of Paneth cell I-defensin in Graft-versus-host disease. *Transplant Infect Dis* doi: 10.1111/tid.12423.
- [13] Ghosh, D., Porter, E., Shen, B., Lee, S. K., Wilk, D., Drazba, J., Yadav, S. P., Crabb, J. W., Ganz, T. and Bevins, C. L. 2002. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol* 3: 583-590.
- [14] Goto, Y., Panea, C., Nakato, G., Cebula, A., Lee, C., Diez, M. G., Laufer, T. M., Ignatowicz, L.

- and Ivanov, II. 2014. Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation. *Immunity* 40: 594-607.
- [15] Grootjans, J., Hodin, C. M., de Haan, J. J., Derikx, J. P., Rouschop, K. M., Verheyen, F. K., van Dam, R. M., Dejong, C. H., Buurman, W. A. and Lenaerts, K. 2011. Level of activation of the unfolded protein response correlates with Paneth cell apoptosis in human small intestine exposed to ischemia/reperfusion. *Gastroenterology* 140: 529-539.
- [16] Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S., Lowe, A. W., Itoh, K., Kiyono, H. and Ohno, H. 2009. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462: 226-230.
- [17] Henaoui-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W. Z., Strowig, T., Thaïss, C. A., Kau, A. L., Eisenbarth, S. C., Jurczak, M. J., Camporez, J. P., Shulman, G. I., Gordon, J. I., Hoffman, H. M. and Flavell, R. A. 2012. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 482: 179-185.
- [18] Hodin, C. M., Verdham, F. J., Grootjans, J., Rensen, S. S., Verheyen, F. K., Dejong, C. H., Buurman, W. A., Greve, J. W. and Lenaerts, K. 2011. Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals. *J Pathol* 225: 276-284.
- [19] Jones, D. E. and Bevins, C. L. 1992. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 267: 23216-23225.
- [20] Kaser, A., Lee, A. H., Franke, A., Glickman, J. N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E. E., Higgins, D. E., Schreiber, S., Glimcher, L. H. and Blumberg, R. S. 2008. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134: 743-756.
- [21] Kfihh, R. J., LoNer, D., Rennick, K., Rajewsky, K. and Müller, W. 1993. Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-274.
- [22] Kostic, A. D., Xavier, R. J. and Gevers, D. 2014. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 146: 1489-1499.
- [23] Ley, R. E. 2010. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* 26: 5-11.
- [24] Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. and Knight, R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489: 220-230.
- [25] Maemoto, A., Qu, X., Rosengren, K. J., Tanabe, H., Henschen-Edman, A., Craik, D. J. and Ouellette, A. J. 2004. Functional analysis of the alpha-defensin disulfide array in mouse cryptdin-4. *J Biol Chem* 279: 44188-44196.
- [26] Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J. and Dore, J. 2006. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55: 205-211.
- [27] Mastroianni, J. R. and Ouellette, A. J. 2009. J-defensins in enteric innate immunity: functional Paneth cell α -defensins in mouse colonic lumen. *J Biol Chem* 284: 27848-27856.
- [28] Masuda, K., Sakai, N., Nakamura, K., Yoshioka, S. and Ayabe, T. 2011. Bactericidal activity of mouse m-defensin, cryptdin-4 predominantly affects non-commensal bacteria. *J Innate Immun* 3: 315-326.
- [29] Mitsuoka, T. 2014. Establishment of intestinal bacteriology. *Biosci Microbiota Food Health* 33: 99-116.
- [30] Nakamura, K. and Ayabe, T. 2012. Paneth cells and stem cells in the intestinal stem cell niche and their association with inflammatory bowel disease. *Inflammation Regeneration* 32: 53-60.
- [31] Nakamura, K., Sakuragi, N. and Ayabe, T. 2013. A monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of secreted i-defensin. *Anal Biochem* 443: 124-131.
- [32] Nakamura, K., Sakuragi, N., Takakuwa, A. and Ayabe, T. 2015. Paneth cell P-defensins and enteric microbiota in health and disease. *Biosci Microbiota Food Health* in press.
- [33] Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nuñez, G. and Cho, J. H. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 603-606.

- [34] Ouellette, A. J., Miller, S. I., Henschen, A. H. and Selsted, M. E. 1992. Purification and primary structure of murine cryptdin-1, a Paneth cell defensin. *FEBS Lett* 304: 146-148.
- [35] Ouellette, A. J. 2011. Paneth cell J-defensins in enteric innate immunity. *Cell Mol Life Sci* 68: 2215-2229.
- [36] Potten, C. S. 1975. Kinetics and possible regulation of crypt cell populations under normal and stress conditions. *Bull Cancer* 62: 419-430.
- [37] Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., Dai, Y., Sun, X., Li, Z., Tang, A., Zhong, S., Li, X., Chen, W., Xu, R., Wang, M., Feng, Q., Gong, M., Yu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Hansen, T., Sanchez, G., Raes, J., Falony, G., Okuda, S., Almeida, M., LeChatelier, E., Renault, P., Pons, N., Batto, J. M., Zhang, Z., Chen, H., Yang, R., Zheng, W., Li, S., Yang, H., Wang, J., Ehrlich, S. D., Nielsen, R., Pedersen, O., Kristiansen, K. and Wang, J. 2010. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 469: 55-60.
- [38] Qin, N., Yang, F., Li, A., Prifti, E., Chen, Y., Shao, L., Guo, J., Le Chatelier, E., Yao, J., Wu, L., Zhou, J., Ni, S., Liu, L., Pons, N., Batto, J. M., Kennedy, S. P., Leonard, P., Yuan, C., Ding, W., Chen, Y., Hu, X., Zheng, B., Qian, G., Xu, W., Ehrlich, S. D., Zheng, S. and Li, L. 2014. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 513: 59-64.
- [39] Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A. C. and Horak, I. 1993. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75: 253-261.
- [40] Salzman, N. H., Ghosh, D., Huttner, K. M., Paterson, Y. and Bevins, C. L. 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 422: 522-526.
- [41] Salzman, N. H., Underwood, M. A. and Bevins, C. L. 2007. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 19: 70-83.
- [42] Salzman, N. H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjoberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., Stoel, M., Zhou, Y., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Bevins, C. L., Williams, C. B. and Bos, N. A. 2010. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol* 11: 76-83.
- [43] Sartor, R. B. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134: 577-594.
- [44] Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M. and Clevers, H. 2010. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469: 415-418.
- [45] Selsted, M. E. and Ouellette, A. J. 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 6: 551-557.
- [46] Simms, L. A., Doecke, J. D., Walsh, M. D., Huang, N., Fowler, E. V. and Radford-Smith, G. L. 2008. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 57: 903-910.
- [47] Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H. and Boman, H. G. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-248.
- [48] Tanabe, H., Ayabe, T., Maemoto, A., Ishikawa, C., Inaba, Y., Sato, R., Moriichi, K., Okamoto, K., Watari, J., Kono, T., Ashida, T. and Kohgo, Y. 2007. Denatured human α -defensin attenuates the bactericidal activity and the stability against enzymatic digestion. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 349-355.
- [49] Tomasinsig, L. and Zanetti, M. 2005. The cathelicidins-structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci* 6: 23-34.
- [50] Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. and Gordon, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031.
- [51] Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V., Knight, R., Ley, R. E., Gewirtz, A. T. 2010. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 328: 228-231.
- [52] Wilson, C. L., Ouellette, A. J., Satchell, D. P., Ayabe, T., Lopez-Boado, Y. S., Stratman, J. L., Hultgren, S. J., Matrisian, L. M. and Parks, W. C. 1999. Regulation of intestinal alpha-defensin

- activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286: 113-117.
- [53] Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D. M., Lubkowski, J. and Oppenheim, J. J. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* 22: 181-215.
- [54] Yoshimoto, S., Loo, T. M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., Iwakura, Y., Oshima, K., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Ishikawa, Y., Hara, E. and Ohtani, N. 2013. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 499: 97-101.
- [55] Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.

Host defense and symbiosis with the intestinal microbiota –Antimicrobial peptides in enteric innate immunity

Tokiyoshi Ayabe M.D., Ph.D.

Naoya Sakuragi Ph.D., Kiminori Nakamura D.D.S., Ph.D.

Department of Cell Biological Science, Graduate School of Life Science, Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University

[Abstract]

The intestine absorbs nutrients necessary for life, and it also prevents invasion of pathogens, thus contributing to mucosal immunity. The intestinal microbiota comprised of a huge number of symbiotic microorganisms lives in the intestinal lumen. Recently, relationships between intestinal microbiota and various diseases such as infectious diseases, inflammatory bowel disease (IBD) , obesity, lifestyle disease and certain cancers have become evident. Paneth cells at the base of small intestinal crypts contribute to enteric innate immunity by secreting microbicidal α -defensins in response to bacteria and colinergic stimuli. The α -defensins have selective activities against bacteria, eliciting potent microbicidal activities against pathogenic bacteria, but minimal or no bactericidal activity against commensal bacteria. Therefore, α -defensins regulate the composition of the intestinal microbiota in vivo and play a critical role in homeostasis of the entire intestine. Decreased cryptdin secretions of IL10-null, IBD-model, mice and lethal dysbiosis due to Paneth cell α -defensin deficiency in acute graft-versus-host-disease (GVHD) model mice have been reported. Because Paneth cells contribute to enteric innate immunity, symbiosis with the intestinal microbiota, and epithelial regeneration in the small intestine, roles of α -defensin in the “intestinal environment” may be extremely important for health and related with various diseases including infectious diseases and lifestyle disease.

Key words: α -defensin, antimicrobial peptide, innate immunity, Paneth cell, intestinal microbiota