



ラットパイエル板におけるM細胞の分化を誘導する因子に関する研究

湯浅, 秀人

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2018-03-25

(Date of Publication)

2019-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7208号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007208>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

ラットパイエル板における M 細胞の分化を誘導する
因子に関する研究

平成 30 年 1 月

神戸大学大学院農学研究科

湯浅 秀人

本論文の第 I 章及び第 II 章の付図等は
「社団法人日本獣医学会」に帰属する。

目次

総緒	1
第I章 ラットパイエル板濾胞被蓋上皮および濾胞付属腸絨毛の上皮における Toll-like receptor-2, -4 および-9 の発現の差異についての免疫組織化学的研究	9
I-1. 小緒	10
I-2. 材料および方法	12
1) 供試動物および飼育法	12
2) 材料採取および組織学的処理	12
3) 免疫組織化学的染色	13
4) 組織学的区分法	14
5) 定量組織学的観察法	14
6) 統計解析	15
I-3. 結果	16
1) 上皮の細胞構成	16
2) パイエル板のリンパ小節および腸絨毛における各種 TLR の発現	17
3) 一般の腸陰窩および濾胞付属腸陰窩における各種 TLR の分布	19
I-4. 考察	21
1) 濾胞付属腸絨毛および濾胞被蓋上皮の微絨毛円柱上皮細胞における TLR の発現について	21
2) 濾胞被蓋上皮の M 細胞における TLR の発現について	22
3) 濾胞付属腸陰窩からの分泌型 TLR について	23
4) M 細胞の分化と TLR との関連について	23
I-5. 小括	25
第II章 M 細胞の分化に関わる因子についての免疫組織化学的研究	27
II-1. 小緒	28
II-2. 材料および方法	30

1) 供試動物および飼育法	30
2) 材料採取および組織学的処理	30
3) 免疫組織化学的染色	30
4) グラム染色法	31
5) 組織構成要素および細菌の増殖程度の定義	32
6) 定量組織学的観察法	32
7) 統計解析	32
II-3. 結果	33
1) 濾胞被蓋上皮における M 細胞の分布	33
2) 濾胞被蓋上皮上に存在する細菌の性質	33
3) リンパ小節における TLR-2, -4 および-9 の局在	33
4) 腸絨毛およびリンパ小節における RANK の局在	36
5) 腸絨毛およびリンパ小節における RANKL の局在	36
6) 腸絨毛およびリンパ小節の上皮における 活性型 caspase 3 の局在	37
II-4. 考察	38
1) 常在細菌により誘導される M 細胞の分化と TLR との関係について	38
2) リンパ小節における RANK および RANKL の局在と M 細胞の分布との比較について	38
3) リンパ小節における RANK および RANKL の局在と 上皮におけるアポトーシスとの関係について	39
II-5. 小括	41
総括	43
Abstract	48
謝辞	52
引用文献	53
付図および付図説明	63

総 緒

ヒトの消化管内には莫大な数の常在細菌が存在している。一般的に健康なヒトの常在細菌の数は 100 兆個以上であり，その多様性は 400 種類以上にもものぼるとされている [Bourlioux *et al.*, 2003]。これらの細菌は胎児の段階では存在せず，出生を経て細菌の消化管内への定着が始まる。その後成体に至ってからは生理的条件下における細菌の数および構成は一定に保たれている [Cresci and Bawden, 2015; Zoetendal *et al.*, 1998]。常在細菌は病原性を有する細菌の消化管上皮への接着および侵入の抑制 [Canny and McCormick, 2008] や短鎖脂肪酸やビタミン等の栄養素の合成などの有益な作用を与えるとされており [Batt *et al.*, 1996]，さらに正常な免疫応答や経口免疫寛容の誘導にも不可欠であるとされている [Moreau and Corthier, 1988; Sudo *et al.*, 1997]。一方，近年では腸内細菌叢の構成の変化と高血圧 [Yang *et al.*, 2015]，肥満 [Turnbaugh *et al.*, 2006]，自己免疫疾患 [Yadav *et al.*, 2017]，糖尿病 [Alkanani *et al.*, 2015] および乳癌 [Xuan *et al.*, 2014] などの種々の疾患との間に深いつながりがあるとされている。これらのことから動物の健康を維持し，増進するためには消化管内腔における常在細菌の定着を制御し，そのバランスを維持することが不可欠である。

動物の粘膜上皮上への常在細菌の定着は非特異的生体防御によって制御されている。すなわち哺乳動物の後位消化管では粘膜が杯細胞から分泌される 2 層の厚い粘液層に覆われており [Atuma *et al.*, 2001]，小腸および結腸において粘液層が細菌の上皮への接着を妨げる物理的バリアーを形成するとされている [Johansson *et al.*, 2008; Rozee *et al.*, 1982]。加えて消化管粘膜を覆う粘液層には種々の抗菌物質が含まれることにより，化

学的バリアーをも形成するとされている [Dupont *et al.*, 2014]。またラット消化管全長では細菌の粘膜上皮への優先的な接着部位が粘膜の最内腔側に位置するアポトーシス後期の上皮細胞であるとされており [Chin *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2009]、小腸の上皮細胞に細菌が接着した場合には、上皮細胞が接着した細菌を物理的に排除する可能性が示唆されている [Inamoto *et al.*, 2008a, b]。さらに小腸腸絨毛間隙深部に向かって細菌が増殖した場合には、腸絨毛の丈の縮小および上皮細胞の交代促進が起こり [Qi *et al.*, 2009]、加えて腸陰窩に存在するパネート細胞からリゾチームや sPLA2 などの抗菌物質の一過性の分泌が起こるとされている [Yokoo *et al.*, 2011a, b]。このように粘膜上の常在細菌の増殖に呼応して様々な生体防御応答が起こることから、粘膜の上皮には細菌の構成成分を認識する受容体の存在が想定されている [Inamoto *et al.*, 2008a, b; Qi *et al.*, 2009]。

Toll-like receptor (TLR) は、細菌やウイルス由来の構成成分である病原体関連分子パターンを認識する受容体ファミリーとして近年注目されており、哺乳綱ではこれまでに 13 種類の TLR が同定されている。TLR ファミリーの中で細菌の構成成分を認識する TLR として、TLR-2 と二量体を形成し、トリアシルリポペプチドを認識する TLR-1、ペプチドグリカン、リポ蛋白質およびリポタイコ酸等を認識する TLR-2、リポポリサッカライドを認識する TLR-4、細菌の鞭毛に含まれるフラジェリンを認識する TLR-5、さらに細菌の DNA に含まれる非メチル化 CpG 配列を認識する TLR-9 があげられる。生体内で TLR を発現する主要な細胞である免疫担当細胞では、TLR を介して前記のリガンドを認識することによって NF- κ B などの転写因子が活性化され、炎症性サイトカインの分泌が誘導される [Akira *et al.*, 2006; Gleeson *et al.*, 2006; Kawai and Akira, 2007; Netea *et al.*, 2006]。一方、近年では免疫担当細胞以外の細胞種として、消化管

の上皮細胞に TLR の発現が報告されている。すなわちヒト結腸上皮の初代培養細胞では TLR-1 から-9 が発現するとともに [Otte *et al.*, 2004], ヒトの小腸末端および結腸の上皮細胞は TLR-2 から-5 を発現することが明らかにされており [Cario and Podolsky, 2000], さらにラットの十二指腸, 空腸および回腸の絨毛円柱上皮細胞の線条縁に TLR-2 が発現することが免疫組織化学的に示唆されていることから, 小腸全長にわたって腸絨毛上皮に発現する TLR-2 が常在細菌の増殖等を監視している可能性が推察されている [Mantani *et al.*, 2011]。

常在細菌の定着制御に関わるもう一つの因子として, 消化管における主要な特異的生体防御因子の一つである IgA の存在が挙げられる。哺乳類の免疫グロブリンクラスは IgM, IgG, IgD, IgE および IgA から構成されており, IgM が B 細胞の成熟段階のもっとも初期に発現され, その後クラススイッチを経て, 各免疫グロブリンを発現する B 細胞および形質細胞に成熟するとされている [Schroeder Jr and Cavacini, 2010]。ヒトでは全形質細胞の 80% が消化管の粘膜固有層に存在しており, これらの形質細胞のほとんどが IgA を産生していることから [van der Heijden *et al.*, 1987], 消化管の内腔には多数の IgA が存在しており, 種々の病原菌などに対する生体防御としての機能を果たしている [Apter *et al.*, 1993; Forbes *et al.*, 2008]。一方, 消化管内に存在する常在細菌にも IgA が付着しており [Brandtzaeg *et al.*, 1968; van der Waaij *et al.*, 1996], IgA の細菌表面への付着が細菌の粘膜上皮への接着を妨げるとされている [Williams and Gibbons, 1972]。さらに IgA のクラススイッチにおいて重要な働きする活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) を欠損させたマウスでは小腸内腔における細菌の構成が大きく変化するが, AID 欠損マウスの粘膜固有層における IgA を再構築することにより, 細菌の構成が野生型マウスと同

様に回復することから、IgA が消化管内腔の常在細菌叢の制御における重要な因子であるとされている [Fagarasan *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2004]。

IgA 産生の主要な誘導部位とされているのが、消化管粘膜に存在する粘膜付属リンパ組織（GALT）の中でも代表的な組織であるパイエル板である [Suzuki *et al.*, 2007]。パイエル板は小腸粘膜に存在する集合リンパ小節であり [Heel *et al.*, 1997]、ヒトではパイエル板は胎児期から小腸に散在しており、その数は出生を経て成体に至るまで増加するとされている [Cornes, 1965]。このパイエル板に多数存在するリンパ小節は濾胞被蓋上皮（FAE）に覆われて、その直下の粘膜固有層は構成される細胞の違いにより円蓋域、濾胞域および傍濾胞域に区分されており [Chin *et al.*, 2006; Junt *et al.*, 2008]、各領域に存在する免疫担当細胞の相互作用によって食餌性抗原や病原菌に対する免疫応答および経口免疫寛容が誘導される [Heel *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2010]。一方、生理学的条件下の粘膜上に形成された細菌コロニー下の粘膜には必ずリンパ小節が存在することから、リンパ小節が常在細菌のコロニー単位での定着制御に貢献する可能性が考えられている [Yamamoto *et al.*, 2009]。

Owen と Jones は 1974 年にヒトのパイエル板の FAE に、一般的な微絨毛円柱上皮細胞とは異なる形態を示す上皮細胞を見出しており、この細胞を microfold cell すなわち M 細胞と呼称している [Owen *et al.*, 1974]。その後の報告では M 細胞は遊離縁側に薄い膜状の細胞質を有する形態学的特徴から membrane cell [von Rosen *et al.*, 1981] または membranous epithelial cell [Kato, 1990; Owen, 1977] とも呼称されており、現在ではこれら両方の頭文字をとって M 細胞と呼ばれている。この M 細胞の形態については超微形態学的観点を中心に、ヒト [Kanou, 1984; Owen and Jones, 1974]、マウス [Owen, 1977]、ラット [Kanou, 1984; Onishi *et al.*, 2007b] にお

いて研究されてきた。M 細胞の超微形態学的特徴は小腸の上皮の大部分を占める微絨毛円柱上皮細胞とは形態的に大きく異なる。すなわち、遊離縁側には微絨毛の代わりに微ヒダまたは太く短い微絨毛を不規則に有し、遊離縁側の薄い膜状の細胞質の基底側に多数の遊走細胞を容れるポケットを形成する。さらに M 細胞の細胞質内には多数の小胞が見出されており [Owen, 1977], 腸管内腔にラテックス粒子ないし西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) を投与した場合には, M 細胞の細胞質に存在する小胞内および直下の免疫担当細胞に投与物がみとめられることから, M 細胞は腸管内腔の食餌性抗原や病原菌を未消化のまま取り込み, 直下の免疫担当細胞に受け渡すことにより, 免疫応答の入り口を担うとされている [Owen, 1977; Pappo and Ermak, 1989; von Rosen *et al.*, 1981]。一方, M 細胞は消化管内腔の抗原を取り込むには適さないリンパ小節の側面に主に出現することが明らかにされている [Chin *et al.*, 2006; Gebert *et al.*, 1999]。加えて M 細胞が腸管内腔の常在細菌をも取り込むことから, この取り込みを介してリンパ小節による常在細菌の定着制御にも貢献している可能性が想定されている [Chin *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2009]。

これまで M 細胞による細菌の取り込みに関わる受容体について多くの研究がなされている。すなわち, M 細胞が GPI アンカー型タンパク質である glycoprotein 2 (GP2) を介して細菌の線毛を構成する FimH を認識し, 細菌を取り込むとされており [Hase *et al.*, 2009], 他にも M 細胞による $\beta 1$ -integrin を介した *Yersinia pseudotuberculosis* の取り込み [Clark *et al.*, 1998] および Cellular prion protein を介した *Brucella abortus* の取り込み [Nakato *et al.*, 2009; Nakato *et al.*, 2012] が明らかにされている。またマウスパイエル板の M 細胞では IgA の選択的な接着が起こることから, M 細胞には IgA に対する受容体が発現しており, この受容体を介して常在細菌

菌がリンパ小節内に取り込まれる可能性が示唆されている [Mantis *et al.*, 2002; Rol *et al.*, 2012]。さらにマウス M 細胞で TLR-2, -4 および-9 の発現 [Chabot *et al.*, 2006; Tyrer *et al.*, 2006] およびブタ M 細胞で TLR-2 および-9 の発現が報告されていることから [Shimosato *et al.*, 2005; Tohno *et al.*, 2005], マウスおよびブタでは TLR-2 が M 細胞における取り込み受容体として働くことが示唆されている [Chabot *et al.*, 2006; Tohno *et al.*, 2005]。

M 細胞の研究の中で多くの注目を集めてきた研究の一つが分化に関する研究である。これまで M 細胞がどの細胞から分化するかについては、ヒト [Kernéis *et al.*, 1997], マウス [Bye *et al.*, 1984; Gebert *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1992], ラット [Onishi *et al.*, 2007b], トリ [Kitagawa *et al.*, 2003] およびブタ [Miyazawa *et al.*, 2006] などの多くの動物で研究されている。すなわち、M 細胞の起源はリンパ小節に隣接する腸陰窩 (FAIC) に位置する幹細胞由来の微絨毛円柱上皮細胞であり [Bye *et al.*, 1984; Gebert *et al.*, 1999; Kitagawa *et al.*, 2003], この微絨毛円柱上皮細胞が FAE において盛んな取り込みをすることによって遊離縁側の細胞膜を消費し、結果的に微絨毛が欠損することによって M 細胞の形態へと分化することが明らかにされている [Onishi *et al.*, 2007b]。さらに M 細胞の分化に深く関わりとされているのが細菌の存在である。これまで SPF マウスをコンベンショナルな飼育環境下に移すと、M 細胞の増加が起こることから、M 細胞の分化への細菌の関与が示唆されており [Smith *et al.*, 1987], その後無菌マウスへの *Salmonella typhimurium* の経口投与 [Savidge *et al.*, 1991] またはウサギ小腸の腸管ループ内への *Streptococcus pneumoniae* の投与 [Borghesi *et al.*, 1996] により、M 細胞の増加が誘導されることが明らかにされている。加えて、ラットパイエル板のリンパ小節では FAE 上の常在細菌に呼応して M 細胞の分化が誘導される可能性が示唆されている [Chin *et al.*, 2006]。こ

のように、粘膜表面における常在細菌の存在に呼応して M 細胞の分化が誘導されることから、リンパ小節の FAE には常在細菌を認識し、M 細胞の分化に繋がる受容体の発現が想定される。しかし前記のように M 細胞における細菌認識に関わる受容体については、その重要性から多く研究されているものの、M 細胞の前駆細胞である微絨毛円柱上皮細胞におけるこのような受容体の発現の有無についての研究は未だおこなわれていない。また近年では M 細胞の分化に関わる因子として receptor-activator of Nf- κ B (RANK) およびそのリガンドである RANKL が注目されている。RANKL および RANK はそれぞれ TNF スーパーファミリーに属するサイトカインおよびその受容体として 1997 年に骨髄由来の樹状細胞と T 細胞との間の相互作用を高める調整因子として報告された [Anderson *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997b]。その後、これらの因子が骨形成への関与 [Yasuda *et al.*, 1998]、樹状細胞、血管内皮細胞ないし上皮細胞におけるアポトーシスの抑制 [Fata *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 1997a]、胸腺やリンパ節、さらには粘膜リンパ小節であるパイエル板および孤立リンパ小節、クリプトパッチなどのリンパ組織の形成および維持にも関与することが報告されている [Kim *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2007]。近年では RANK および RANKL ノックアウトマウスで M 細胞が著しく減少するとされている [Knoop *et al.*, 2009; Rios *et al.*, 2016]。加えて、マウス [de Lau *et al.*, 2012; Knoop *et al.*, 2009; Rios *et al.*, 2016; Wood *et al.*, 2016]、ウシ [Tahoun *et al.*, 2012] およびヒト [Rouch *et al.*, 2016] の腸管上皮細胞由来の培養細胞が RANKL の刺激により M 細胞マーカーである glycoprotein 2 を発現することから、RANK および RANKL が M 細胞の分化に深く関わる因子として注目されている。しかし RANK/RANKL シグナリングが M 細胞の分化にどのように関与するのかについては未だ明らか

にされておらず、RANK/RANKL と M 細胞の分化との関係についての組織学的観点からの詳細な研究も未だおこなわれていない。

そこで本研究では、まず常在細菌により誘導される M 細胞の分化に関わる受容体の候補として哺乳綱の TLR の中でも常在細菌の構成成分を認識する TLR-2, -4 および-9 に着目し、第 I 章では粘膜上皮上に常在細菌が定着していないパイエル板のリンパ小節およびそれに付属する腸絨毛の上皮における TLR の発現を免疫組織化学的に精査することにより、パイエル板上皮における TLR 発現の基本的な局在を明らかにするとともに、M 細胞の分化と TLR との関係について予備的検討をおこなうことを目的とした。次いで第 II 章では粘膜上皮上に常在細菌が定着したパイエル板に着目し、常在細菌により誘導される M 細胞の分化と TLR との関係についてさらなる解析をおこなうことを目的とした。また第 II 章ではリンパ小節およびそれに付属する腸絨毛における RANK および RANKL の発現およびその局在についても免疫組織化学的に精査することにより、RANK/RANKL シグナリングの M 細胞分化への関与について組織学的に検討し、M 細胞の分化メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

第 I 章

ラットパイエル板濾胞被蓋上皮および濾胞付属腸絨毛の上皮に
おける **Toll-like receptor-2, -4** および **-9** の発現の差異についての
免疫組織化学的研究

I-1. 小 緒

ラット小腸の腸絨毛では、上皮細胞へ常在細菌が接着すると、上皮細胞が β アクチンやミオシン細糸などからなる物理的防御層を接着部位の細胞質内に形成し、接着した細菌を物理的に排除することが明らかにされている [Inamoto *et al.*, 2008a, b]。また、腸絨毛先端の接着部位から腸絨毛間隙の深部にまで細菌が増殖すると、腸絨毛の丈の縮小および上皮細胞の移動速度の促進が起こり [Qi *et al.*, 2009]、さらに腸陰窩底部に存在するパネート細胞から lysozyme や sPLA2 などの抗菌物質が一過性に分泌されることが明らかにされている [Qi *et al.*, 2009; Yokoo *et al.*, 2011a]。このように、腸絨毛では上皮細胞に近接する常在細菌に対して局所的な生体防御応答を惹起することから、腸絨毛の表面には細菌を認識する何らかの受容体が存在する可能性が想定されている [Inamoto *et al.*, 2008a, b; Qi *et al.*, 2009]。これに関して、ラット十二指腸、空腸および回腸の絨毛円柱上皮細胞の線条縁に TLR-2 の発現が免疫組織化学的に検出されていることから、小腸全長にわたって TLR-2 が腸絨毛に定着した常在細菌をモニタリングしている可能性が推察されている [Mantani *et al.*, 2011]。

ラットのパイエル板では、FAE 上に存在する常在細菌に呼応して M 細胞の分化が促進され、M 細胞によって常在細菌が取り込まれるとされている [Chin *et al.*, 2006]。したがって FAE にも腸絨毛上皮と同様に常在細菌の認識に関与する TLR のような受容体が発現している可能性が想定される。さらにラットパイエル板の FAE における常在細菌の接着が腸絨毛の上皮よりも高頻度であることが明らかにされており [Mantani *et al.*, 2014]、加えて腸絨毛では常在細菌の接着頻度と上皮における TLR の発現との間には関連があることが示唆されていることから [Mantani *et al.*,

2011], FAE では腸絨毛とは異なる常在細菌に対する特殊な認識機構が備わっている可能性が想定される。

M細胞はリンパ小節に隣接する FAIC 由来の上皮細胞のみから分化するとされており [Gebert *et al.*, 1999], FAIC にはこの M 細胞の分化以外にも杯細胞やパネート細胞が少ないといった一般の腸陰窩とは異なる特徴が報告されている [Mantani *et al.*, 2014]。これらのことから, FAIC は一般腸陰窩とは異なる性質をもった腸陰窩であると考えられる。この FAIC からは FAE だけでなくリンパ小節に隣接する濾胞付属腸絨毛 (FAIV) を構成する上皮細胞も産生されるが, FAIV と一般の腸絨毛との性質の差異については未だ調べられていない。そこで, 細菌の構成成分を認識する受容体である TLR-2, -4 および-9 に着目し, 第 I 章ではリンパ小節およびそれに付属する腸絨毛の上皮細胞におけ TLR-2, -4 および-9 の発現状況を免疫組織化学的に精査し, 各上皮における TLR の発現の差異について明らかにすることによって, FAE および FAIV における常在細菌の定着制御機構の特殊性を探るとともに, M 細胞の分化と TLR-2, -4 および-9 との関係についても検討した。

I-2. 材料および方法

1) 供試動物および飼育法

同腹ではない 7 週齢の SPF Wistar 系ラット（日本 SLC，浜松，日本）の雄 5 匹を用いた。供試動物の飼育および実験については「神戸大学動物実験実施規則」に基づいておこなった（許可番号：25-06-01）。実験動物の飼育を神戸大学ライフサイエンスラボラトリーの個別換気ケージシステム (TECNIPLAST S.p.A., Buguggiate, イタリア) を用いておこなった。飼育条件については室温を $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ，湿度を 50% に保ち，配合飼料（「ラボ R-A2」高圧滅菌済；日本農産工業，横浜，日本）の自由摂食および自由飲水さらに午前 7 時から午後 7 時までの 12 時間照明とした。

実験期間中，ラットには外見上の異常はみとめられず，健全であり，材料採取時における肉眼解剖的所見および主要臓器の組織学的所見においても異常はみとめられなかった。

2) 材料採取および組織学的処理

ラットをソムノペンチル（共立製薬，東京，日本）の腹腔投与による深麻酔下で安楽死させた後，胸郭の腹側を正中切開し，右心壁を切開して放血死させた。ただちにパイエル板を含む回腸を摘出し，4% paraformaldehyde リン酸緩衝固定液に 24 時間浸漬した。

凍結切片の作製については Barthel と Raymond (1990) の方法に準拠した。その方法を要約して以下に記載する。

固定後，組織片の 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4; 以下 PB) による洗浄を 30 分間ずつ 3 回おこなった。次いで，5% スクロース加 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4; 以下スクロース加 PB) に 20 分間ずつ 3 回，10%，12.5%，

15%スクロース加 PB にそれぞれ 30 分, 20%スクロース加 PB に 1 時間浸漬し, 最後に 4°Cの 20%スクロース加 PB と OCT コンパウンド (Sakura Finetek, Torrance, CA, 米国) を 2 : 1 の割合で混合した混合液に一晩浸漬した。浸漬後, 溶液とともにアルミ箔製の容器中に移し, その容器を液体窒素中の銅塊に押し付けて急速凍結した。作製した凍結ブロックについては薄切時まで-30°Cで保存した。次いで, クリオスタット (HM505E 型, CarlZeiss, Jena, 独国) を用いて 4 μ m 厚の凍結切片を作製し, 3'-aminopropyltriethoxysilane (信越化学工業, 東京, 日本) をコーティングしたスライドガラスに貼付して, 使用時まで-30°Cで冷凍保存した。

3) 免疫組織化学的染色

前記の凍結切片を蒸留水に浸漬し, アスピレーターによる陰圧条件下で切片に含まれる気泡を除去して, 0.05%の Tween20 (和光純薬工業, 大阪, 日本) を加えた 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.4, 以下 0.05% T-PBS) で 3 回洗浄した。続いて 100%メタノールと 0.5%過酸化水素水に室温でそれぞれ 30 分間浸漬した後, 0.05% T-PBS で 3 回洗浄し, ブロッキングワゴン Histo (ナカライテスク, 京都, 日本) と室温で 1 時間反応させた。その後, 100 倍希釈の抗 TLR-2 (D-17), TLR-4 (M-16) および TLR-9 (N-15) ヤギ IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 米国) と室温で攪拌しながら 30 分間反応させた後, 4°Cで 18 時間反応させた。反応後, 0.05% T-PBS で 3 回洗浄し, 200 倍希釈の抗ヤギ IgG マウス IgG (Chemicon International Inc., Billerica, MA, 米国) と室温で 1 時間反応させた。最後にトリス緩衝液 (pH7.6) で切片を 3 回洗浄し, 0.17 μ l/ml の過酸化水素を加えた 0.02% 3,3'-diaminobenzidine (同仁化学研究所, 益城, 日本) トリス緩衝液で発色させた後, ヘマトキシリン染色液で対比染色した。実

験対照切片には一次抗体の代わりに非免疫ヤギ IgG (Peprotech, Rocky Hill, NJ, 米国) および PBS を反応させた。

4) 組織学的区分法

組織の一般形態を観察するために、凍結切片をヘマトキシリン・エオシン染色した。腸絨毛のうちリンパ小節に隣接する腸絨毛を濾胞付属腸絨毛 (FAIV), これ以外の腸絨毛を一般腸絨毛 (IV) と仮称し, さらに FAIV の長軸よりリンパ小節側を f-FAIV およびリンパ小節に対置する側を af-FAIV と仮称した。またリンパ小節に隣接する腸陰窩を FAIC, これ以外の腸陰窩を一般腸陰窩 (IC) と仮称した (図 1)。

IV, FAIV およびリンパ小節については, 腸陰窩開口部から最内腔側の上皮細胞までを 3 等分し, 腸陰窩側から順に基部, 中部および頂部と呼称した。

5) 定量組織学的観察法

それぞれの個体から, 常在細菌が上皮上に存在せず, 腸絨毛の長軸に沿って縦断された IV および FAIV を無作為に 5 本ずつ, さらにリンパ小節の最内腔側の頂点を通して縦断されたリンパ小節を無作為に 5 つずつ選び出し, 100 倍の対物レンズを装着した光学顕微鏡下で, IV, af-FAIV および f-FAIV の片側の上皮ならびに片側の FAE に存在する総上皮細胞に対する微絨毛円柱上皮細胞, 杯細胞および M 細胞ならびに TLR-2, -4 および-9 陽性の微絨毛円柱上皮細胞および M 細胞の割合を算出し, 百分率で表した。次いで, 個体毎の平均値を算出し, さらに 5 個体における平均値を求めてその値を平均値±標準偏差として表示した。上皮細胞種の判定基準については, 微絨毛円柱上皮細胞の場合, 上皮細胞の遊離縁側の

線条縁と細胞核が確認できるもの，M 細胞の場合，線条縁が欠如しており，遊走細胞を包むポケットを有すもの，および杯細胞の場合，杯細胞特有の杯状の形状，分泌顆粒および基底側の細胞核を有するものを対象として計測した。

6) 統計解析

すべての平均値の正規性を Kolmogorov-Smirnov 検定により検定し，分散の検定を Bartlett 検定によりおこなった。パラメトリックの検定の場合には one way ANOVA をおこなった後，Tukey-Kramer 検定をおこない，ノンパラメトリックな検定の場合には Kruskal-Wallis 検定をおこなった後，Steel-Dwass 検定をおこなった。 $P < 0.05$ 未満を有意とした。

I-3. 結 果

1) 上皮の細胞構成

IV, af-FAIV および f-FAIV の上皮は, 微絨毛円柱上皮細胞および杯細胞で構成されており, その分布には部位的差異がなかった。一方, FAE は微絨毛円柱上皮細胞および杯細胞に加えて M 細胞によって構成されており, M 細胞はリンパ小節の頂部よりも基部から中部を覆う FAE 中に多く存在した。さらに腸絨毛の上皮と比べて FAE では杯細胞の出現が極めて少なく, FAE 中に散在していた。

以上の所見を定量組織学的に観察した結果, IV, af-FAIV および f-FAIV の上皮間には各上皮細胞の割合に差異はなかったが, FAE では, この上皮にのみ M 細胞が存在すること, ならびに微絨毛円柱上皮細胞および杯細胞の出現頻度が有意に低いことが確認された (表 1)。

表 1 ラットパイエル板や腸絨毛の上皮を構成する上皮細胞の割合

	IV	af-FAIV	f-FAIV	FAE
微絨毛円柱上皮細胞 (%) ¹⁾	84.4 ± 4.4 ^{a)}	78.3 ± 3.0 ^{b)}	73.0 ± 5.7 ^{c)}	66.9 ± 2.8 ^{a), b), c)}
杯細胞 (%) ¹⁾	15.6 ± 4.4 ^{d)}	21.7 ± 3.0 ^{e)}	27.0 ± 5.7 ^{f)}	3.9 ± 1.6 ^{d), e), f)}
M 細胞 (%) ¹⁾	0 ^{g)}	0 ^{h)}	0 ⁱ⁾	29.2 ± 2.1 ^{g), h), i)}

1) 上皮細胞総数に対する各種上皮細胞数の割合。値は平均値 ± 標準偏差。

a) - f): $p < 0.05$, g) - i): $p < 0.01$.

IC および FAIC は主に微絨毛円柱上皮細胞, 杯細胞およびパネート細胞で構成されていた。IC および FAIC のリンパ小節に対置する側の上皮

では杯細胞およびパネート細胞が多数存在したが、リンパ小節側の上皮ではほとんどみとめられなかった。

2) パイエル板のリンパ小節および腸絨毛における各種 TLR の発現

腸絨毛における TLR の局在については、TLR ごとに分けて以下に記載し、リンパ小節における TLR の局在については TLR-2, -4 および-9 で類似したため、一括して以下に記載する。

a) 腸絨毛における TLR-2 の発現

IV, af-FAIV および f-FAIV の基部から頂部にかけて、多くの微絨毛円柱上皮細胞の線条縁が TLR-2 陽性を示し、その陽性強度は基部では弱く、中部から頂部にかけては強かった (図 2)。IV, af-FAIV および f-FAIV の頂部では陰性の微絨毛円柱上皮細胞がまれにみとめられたのに対して、f-FAIV の基部では陰性の微絨毛円柱上皮細胞が多くみとめられた (図 2)。定量組織学的には、f-FAIV の上皮では IV および af-FAIV の上皮に比べて陽性の線条縁を有する微絨毛円柱上皮細胞の出現頻度が有意に低く (図 3)、その陽性強度も弱かった (図 2b)。IV, af-FAIV および f-FAIV の頂部の微絨毛円柱上皮細胞の細胞質内にはまれに TLR-2 膜陽性の小胞がみとめられた。IV, af-FAIV および f-FAIV の杯細胞では微絨毛が TLR-2 陰性であったが、分泌顆粒がまれに陽性を示した。また IV, af-FAIV および f-FAIV の上皮内リンパ球は陰性であった。IV および FAIV の粘膜固有層には遊走細胞の細胞膜および細胞質に TLR-2 陽性がまれにみとめられ、微細な顆粒状の陽性が粘膜固有層内の細胞間隙や毛細血管内腔にもまれにみとめられた。その他の組織構成要素は陰性であった。

b) 腸絨毛における TLR-4 の発現

IV, af-FAIV および f-FAIV の頂部では, TLR-4 陽性の線条縁を有する微絨毛円柱上皮細胞がまれにみとめられたが, ほとんどの微絨毛円柱上皮細胞の線条縁は陰性であった (図 4)。また定量組織学的には, IV, af-FAIV および f-FAIV 間における TLR-4 陽性微絨毛円柱上皮細胞の出現頻度に有意な差はみとめられなかった (図 5)。一方, IV, af-FAIV および f-FAIV の頂部の微絨毛円柱上皮細胞の細胞質内および細胞間隙にまれに顆粒状の TLR-4 陽性がみとめられた。IV, af-FAIV および f-FAIV の上皮における杯細胞および上皮内リンパ球に陽性はみられなかった。IV および FAIV の粘膜固有層には, 遊走細胞の細胞膜および細胞質に TLR-4 陽性がまれにみとめられるとともに, 微細な顆粒状の陽性が粘膜固有層内の細胞間隙や毛細血管内腔にもまれにみとめられた。その他の組織構成要素は陰性であった。

c) 腸絨毛における TLR-9 の発現

IV, af-FAIV および f-FAIV の上皮における微絨毛円柱上皮細胞, 杯細胞および上皮内リンパ球は TLR-9 陰性であった (図 6)。また定量組織学的には, IV, af-FAIV および f-FAIV 間における TLR-9 陽性微絨毛円柱上皮細胞の出現頻度に有意な差はみられなかった (図 7)。IV および FAIV の粘膜固有層では, 遊走細胞の細胞膜および細胞質に TLR-9 陽性がまれにみとめられた。その他の組織構成要素は陰性であった。

d) リンパ小節における各種 TLR の発現

リンパ小節を覆う FAE の全長で, まれに TLR-2, -4 ないし-9 陽性の線条縁を有する微絨毛円柱上皮細胞がみとめられたが, ほとんどの微絨毛

円柱上皮細胞の線条縁は TLR-2, -4 および -9 陰性であった (図 8a, 9a, 10a)。一方, リンパ小節の基部から中部に散在する M 細胞の遊離縁側の細胞膜には TLR-2, -4 ないし -9 陽性が多数みとめられ (図 8b, 9b, 10b), 頂部の FAE では基部および中部に比べて TLR-2, -4 ないし -9 陽性を呈する M 細胞が少なかった。またリンパ小節基部から中部における TLR-2, -4 ないし -9 陽性 M 細胞よりも FAE の上流である腸陰窩側に位置する微絨毛円柱上皮細胞は TLR-2, -4 および -9 陰性であった (図 8c, 9c, 10c)。またリンパ小節全長において TLR-2 および -9 陽性 M 細胞と比べて TLR-4 陽性 M 細胞が多数存在した。稀に出現する杯細胞は TLR-2, -4 および -9 陰性であった。加えて, TLR-2, -4 および -9 の微細な顆粒状の陽性が微絨毛円柱上皮細胞の細胞質, M 細胞のポケット内の遊走細胞の細胞質内および上皮毛細血管の内腔にまれにみとめられた。その他の組織構成要素は陰性であった。

IV, af-FAIV, f-FAIV および FAE 間における各種 TLR の発現の差異を定量組織学的に検討した結果, IV, af-FAIV および f-FAIV と比べて FAE における TLR-2 陽性上皮細胞 (含微絨毛円柱上皮細胞および M 細胞) は有意に少なかった (図 3)。一方, IV, af-FAIV および f-FAIV の TLR-4 および -9 の陽性微絨毛円柱上皮細胞に比べて, FAE における TLR-4 および -9 の陽性 M 細胞の出現頻度は有意に高かった (図 5, 7)。

3) 一般の腸陰窩および濾胞付属腸陰窩における各種 TLR の分布

IC および FAIC の内容物, 微絨毛円柱上皮細胞の線条縁および杯細胞とパネート細胞の微絨毛が TLR-2, -4 および -9 陽性を示した (図 11, 12, 13)。また IC および FAIC においてパネート細胞の細胞質の分泌顆粒に TLR-4 陽性がみとめられたが, TLR-2 および -9 は陰性であった (図 12b, d)。

IC および FAIC の微絨毛円柱上皮細胞および杯細胞の細胞質は TLR-2, -4 および-9 陰性であった。腸陰窩の内容物における TLR-2 の陽性は IC および FAIC の両方で頻繁にみとめられたのに対し, TLR-9 の陽性は両方でまれであった。一方, FAIC の内容物における TLR-4 の陽性は IC と比べて頻繁にみとめられた。

本章におけるすべての陰性対照切片で陽性反応はみとめられなかった。

I-4. 考 察

1) 濾胞付属腸絨毛および濾胞被蓋上皮の微絨毛円柱上皮細胞における TLR の発現について

小腸粘膜ではこれまで segmented filamentous bacteria や *Lactobacillus fermentum* がマウスパイエル板の FAE に優先的に接着することが報告されており [Klaasen *et al.*, 1992; Plant and Conway, 2001], さらにラットパイエル板の FAE において常在細菌の接着が周囲の腸絨毛の上皮よりも高頻度であることが明らかにされている [Mantani *et al.*, 2014]。ラット小腸の粘膜表面に定着するこれらの常在細菌の検知は, 絨毛円柱上皮細胞に発現した TLR-2 を介する可能性が推察されているとともに, 頂部に TLR-2 陰性の領域を有する腸絨毛の上皮には頻繁に常在細菌が接着することから, 上皮における TLR-2 の発現の低下が常在細菌の接着に貢献すると考えられている [Mantani *et al.*, 2011]。本章における観察結果では, IV, af-FAIV および f-FAIV の多くの微絨毛円柱上皮細胞が TLR-2 陽性を示したが, FAE のほとんどの微絨毛円柱上皮細胞は TLR-2, -4 および-9 陰性であったことから, FAE の微絨毛円柱上皮細胞では腸絨毛の上皮と比べて TLR の発現が弱いことが示唆された。さらにリンパ小節における常在細菌の優先的な接着部位とされているリンパ小節の先端部の FAE では M 細胞の出現が稀であり, 微絨毛円柱上皮細胞によって構成されていること [Chin *et al.*, 2006] を併せ考えると, 常在細菌の優先的な接着部位であるリンパ小節頂部の上皮を主に構成する微絨毛円柱上皮細胞における TLR-2 の低発現が FAE への高頻度な細菌接着に貢献している可能性が考えられた。加えて今回の観察結果では, IV および af-FAIV の上皮に比べて f-FAIV における TLR-2 陽性微絨毛円柱上皮細胞の出現頻度が低く, その陽性強度も弱かったことから, FAE だけでなく f-FAIV の上皮もまた一

一般腸絨毛の上皮と比べて TLR の発現が弱いことが示唆された。したがって FAE と f-FAIV の上皮によって構成される間隙では一般の腸絨毛間隙に比べて細菌の構成成分が上皮によって認識されづらく，腸絨毛間隙よりも常在細菌の定着を許容する環境を形成していると考えられた。

2) 濾胞被蓋上皮の M 細胞における TLR の発現について

RT-PCR を用いた研究から，マウスのパイエル板 FAE の微絨毛円柱上皮細胞および M 細胞で TLR-2, -4 および-9 の mRNA が発現しており，その発現量は微絨毛円柱上皮細胞に比べて M 細胞で高いとされている [Cashman and Morgan, 2009]。また免疫組織化学的研究から，マウスのパイエル板 FAE の微絨毛円柱上皮細胞および M 細胞において TLR-2, -4 および-9 が発現するとされており [Chabot *et al.*, 2006; Tyrer *et al.*, 2006]，同様にブタのパイエル板 FAE では微絨毛円柱上皮細胞で TLR-9 が発現するとともに [Shimosato *et al.*, 2005]，M 細胞で TLR-2 および-9 が発現するとされている [Shimosato *et al.*, 2005; Tohno *et al.*, 2005]。さらにマウスおよびブタで TLR-2 が M 細胞における取り込み受容体であることが示唆されている [Chabot *et al.*, 2006; Tohno *et al.*, 2005]。本章の観察結果では，ラットパイエル板の FAE 中の多くの M 細胞に TLR-2, -4 および-9 陽性がみとめられたが，微絨毛円柱上皮細胞はほとんど陰性であった。一方，これまでラット小腸の腸絨毛の上皮では TLR-2 は発現するが，TLR-4 および-9 は発現しないとされており [Mantani *et al.*, 2011]，今回の観察結果においても IV および FAIV の上皮では TLR-2 のみが検出された。以上のことから，ラットのパイエル板においても FAE の M 細胞が TLR-2, -4 および-9 を発現することが示唆されるとともに，FAE は主に M 細胞の TLR を介して腸絨毛よりも多種の細菌由来の物質の認識あるいは取り込みをおこ

なっている可能性が考えられた。

3) 濾胞付属腸陰窩からの分泌型 TLR について

従来、ヒトの唾液や血液などの様々な分泌液中に分泌型 TLR の存在が明らかにされており、この分泌型 TLR がリガンドを中和することによって膜型 TLR によるリガンド認識を緩和するとされている [Chockalingam *et al.*, 2011; Iwami *et al.*, 2000; LeBouder *et al.*, 2003]。さらにラットの小腸の腸陰窩を含む外分泌腺から腸管内腔に分泌型 TLR-2, -4 および-9 が分泌されることが報告されており、これによって腸管内腔の常在細菌由来の TLR リガンドが中和され、膜型 TLR を介した常在細菌に対する過剰な生体防御応答を抑制すると考えられている [Mantani *et al.*, 2012]。本章における観察結果では、IC と同様に FAIC でも内容物中に TLR-2, -4 および-9 の陽性がみとめられた。このことから FAIC でも IC と同様に分泌型 TLR-2, -4 および-9 が分泌されることが示唆され、f-FAIV と FAE との間隙においても膜型 TLR のリガンドに対する認識が FAIC 由来の分泌型 TLR によって緩和されることにより、常在細菌由来のリガンドの過剰な認識が抑制される可能性が考えられた。本章の考察 1) で論じた、FAE と f-FAIV の上皮における TLR の低発現が常在細菌の定着を許容している可能性に加えて、FAE に付属する FAIC から分泌される分泌型 TLR-2, -4 および-9 もまたこの常在細菌の定着の許容に貢献している可能性が考えられた。

4) M 細胞の分化と TLR との関連について

ラットパイエル板では M 細胞の分化は、超微形態学的観察から FAE の未熟な微絨毛円柱上皮細胞が内腔物質の盛んな取り込みをおこなうことによって起こること [Onishi *et al.*, 2007b]、さらに FAE 上に存在する常在

細菌に呼応して促進されることが明らかにされている [Chin *et al.*, 2006]。また M 細胞の分化を促進する細菌由来の因子については特定されていないが, TLR-2 ないし-4 のリガンドであるペプチドグリカンおよびリポポリサッカライドを微粒子と同時にマウス回腸のパイエル板を含む部位に作製したループ内に投与すると, M 細胞を介した微粒子の取り込みが増加することが報告されていることから [Chabot *et al.*, 2006], 常在細菌由来の TLR のリガンドが FAE 上に発現する TLR によって認識され, M 細胞の分化促進に関与している可能性が考えられる。しかし本章での観察では, 常在細菌の定着していないパイエル板でも正常な M 細胞の出現はみとめられ, これらの M 細胞には TLR-2, -4 ないし-9 の発現がみとめられたものの FAE の M 細胞よりも上流側に位置し, M 細胞の前駆細胞であると考えられる微絨毛円柱上皮細胞の線条縁には TLR-2, -4 および-9 の陽性はみとめられなかった。これらのことから少なくとも常在細菌が存在していない時に起こる M 細胞の分化には TLR-2, -4 および-9 は関与しておらず, これらの TLR は M 細胞へと分化した後に発現されることが示唆された。

I-5. 小 括

ラット小腸の粘膜上に細菌が定着していないパイエル板のリンパ小節およびそれに付属する腸絨毛における TLR 発現の差異について免疫組織化学的に精査した。

その結果、TLR-2 は一般腸絨毛および FAIV の先端部を除く全長の微絨毛円柱上皮細胞において陽性を示したが、FAIV のリンパ小節側の上皮では一般腸絨毛および FAIV の対リンパ小節側に比べてその陽性強度は弱く、陽性細胞の出現頻度も有意に低かった。さらにリンパ小節の FAE では TLR-2, -4 および-9 の発現は M 細胞の遊離縁側にみとめられたが、M 細胞の前駆細胞を含む FAE 全長のほぼすべての微絨毛円柱上皮細胞ではみとめられなかった。また FAIC では一般腸陰窩と同様、上皮細胞の線条縁および内腔に TLR-2, -4 および-9 の陽性がみとめられ、パネート細胞の分泌顆粒にも TLR-4 の陽性がみとめられた。これらの所見から、FAIV のリンパ小節側上皮および FAE では一般腸絨毛の上皮と比べて TLR の発現が弱いことが示唆され、これらの結果から FAIV のリンパ小節側上皮および FAE では、一般腸絨毛上皮と比べて細菌に対する認識能が弱くなっている可能性が考えられた。加えて、一般の腸陰窩では分泌型 TLR が分泌され、リガンドに結合することにより腸絨毛上皮における膜型 TLR を介したリガンドの認識を抑制する可能性が想定されているが、この分泌型 TLR の分泌が FAIC でも一般腸陰窩と同様に分泌されていることが示唆された。したがって、FAIV のリンパ小節側上皮と FAE との間隙では腸絨毛間隙よりも常在細菌の定着を許容する環境が形成されていると考えられた。一方、粘膜上に細菌が定着していないパイエル板のリンパ小節では TLR-2, -4 および-9 は M 細胞の分化に直接的には関与しないことが

示唆されるとともに、微絨毛円柱上皮細胞が M 細胞に分化した後に TLR が発現されることが示唆された。

第 II 章

M 細胞の分化に関わる因子についての免疫組織化学的研究

II-1. 小 緒

小腸の集合リンパ小節であるパイエル板は消化管における免疫応答や経口免疫寛容の誘導に深く関わりとされている [Heel *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2010]。このリンパ小節を覆う FAE 内には特殊な上皮細胞である M 細胞が存在しており, M 細胞は腸管内腔の物質を取り込み, 直下の免疫担当細胞に未消化のまま受け渡すことにより免疫応答の入り口を担うとされる [Owen, 1977; Pappo and Ermak, 1989]。

M 細胞は FAE の微絨毛円柱上皮細胞が盛んな取り込みをおこなうことによって遊離縁側の細胞膜を消費することにより, 微絨毛が消失し, M 細胞の形態へと分化することが明らかにされており [Onishi *et al.*, 2007b], さらに M 細胞の分化は FAE 上に存在する常在細菌に呼応して促進されるとされている [Chin *et al.*, 2006]。したがって, FAE の微絨毛円柱上皮細胞が何らかの受容体を介して細菌を認識し, 盛んな取り込みをおこなうことにより, M 細胞へと分化していく可能性が想定されるが, この受容体については未だ明らかにされていない。

これまで TLR-2 ないし-4 のリガンドであるペプチドグリカンおよびリポポリサッカライドを微粒子と同時にマウス回腸のパイエル板を含む部位に作製したループ内に投与すると, M 細胞を介した微粒子の取り込みが増加することが報告されている [Chabot *et al.*, 2006]。このことから第 I 章では, TLR を M 細胞の分化を誘導する受容体の候補としたが, 少なくとも粘膜上皮上に常在細菌が定着していないリンパ小節においては TLR-2, -4 および-9 が M 細胞の前駆細胞である微絨毛円柱上皮細胞に発現しないことから, M 細胞の分化に直接的には関与していないことが示唆された。一方, マウスの結腸上皮 [Lundin *et al.*, 2008], ウシの乳腺上皮

[Ibeagha-Awemu *et al.*, 2008]およびヒトの結腸上皮由来の培養細胞 [Ewaschuk *et al.*, 2007]において TLR の発現がリガンドの刺激によって変化するとされている。しかし粘膜上皮上に常在細菌が定着したパイエル板リンパ小節の FAE における TLR の発現については未だ明らかにされていない。そこで第 II 章では第一の目的として FAE 上に常在細菌が存在するリンパ小節において TLR-2, -4 および-9 を免疫組織化学的に検出し, M 細胞の分化と TLR との関係について更なる解析をおこなった。

近年, RANK および RANKL をノックアウトしたマウスでは M 細胞の減少が起こることが明らかにされ [Knoop *et al.*, 2009; Rios *et al.*, 2016], このことから M 細胞の分化に深く関わる因子として RANK および RANKL の存在が注目されている。さらに *in vitro* の研究においてもマウス [de Lau *et al.*, 2012; Wood *et al.*, 2016], ウシ [Tahoun *et al.*, 2012] およびヒト [Rouch *et al.*, 2016] 腸管上皮細胞由来の培養細胞を RANKL で刺激すると M 細胞の分化が誘導されることから, RANK/RANKL シグナリングが M 細胞の分化において重要な因子であるとされている。しかし RANK/RANKL シグナリングが実際にどのようにして M 細胞の分化に貢献しているのかについては明らかにされていない。一方, M 細胞の分化は上皮細胞におけるアポトーシスの抑制とも関連がある可能性が想定されており [Onishi *et al.*, 2007a], RANK/RANKL シグナリングもまたマウスの乳腺上皮ではアポトーシスの抑制に関わる報告がなされている [Fata *et al.*, 2000]。そこで第 II 章では第二の目的としてリンパ小節における RANK, RANKL および活性型 caspase 3 の発現を免疫組織化学的に検討し, RANK/RANKL シグナリングと M 細胞の分化および上皮におけるアポトーシスとの関係について考察した。

II-2. 材料および方法

1) 供試動物および飼育法

同腹ではない 7 週齢の SPF Wistar 系ラット（日本 SLC）の雄 20 匹を用いた。供試動物の飼育等に関しては第 I 章と同様であるため省略する。

2) 材料採取および組織学的処理

ラットをソムノペンチル(共立製薬)の腹腔投与による深麻酔下で安楽死させた後、胸郭の腹側を正中切開し、右心壁を切開して放血死させた。ただちにパイエル板を含む回腸を摘出し、10 匹のラットから採取した TLR-2, -4 および-9 を検出するための組織を 4%paraformaldehyde リン酸緩衝固定液に 24 時間浸漬し、別のラット 10 匹から採取した RANK, RANKL および活性型 caspase 3 を検出するための組織を 4%paraformaldehyde リン酸緩衝固定液に 1 時間浸漬した。

凍結切片の作製については第 I 章と同様に Barthel と Raymond (1990)の方法に準じて凍結ブロックを作製し、次いで、クリオスタット(CM1950 型, Leica Biosystems, Nussloch, 独国)を用いて 4 μ m 厚の凍結切片を作製し、3'-aminopropyltriethoxysilane（信越化学工業）をコーティングしたスライドガラスに貼付して、使用時まで -30°C で冷凍保存した。

3) 免疫組織化学的染色

前記の凍結切片を蒸留水に浸漬し、アスピレーターを用いて陰圧条件下で切片に含まれる気泡を除去した後、0.05% T-PBS で 3 回洗浄し、RANK および RANKL 検出用の切片については 80°C で 10 分間加熱処理した。続いて 100%メタノールと 0.5%過酸化水素水に室温でそれぞれ 30 分浸漬した後、0.05% T-PBS で 3 回洗浄し、ブロッキングワン Histo（ナカライテ

スク) と室温で 1 時間反応させた。その後, 100 倍希釈の抗 TLR-2, -4 および-9 ヤギ IgG (Santa Cruz Biotechnol.), 100 倍希釈の抗 RANK マウス IgG (Santa Cruz Biotechnol.), 400 倍希釈の抗 RANKL ヤギ IgG (Santa Cruz Biotechnol.) ないし 400 倍希釈の抗活性型 caspase 3 ウサギ IgG (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, 米国) と室温で攪拌しながら 30 分間反応させた後, 6°C で 18 時間反応させた。反応後, 0.05% T-PBS で 3 回洗浄し, 100 倍希釈の抗マウス IgG ラット IgG (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, 米国), 400 倍希釈の抗ヤギ IgG ロバ IgG (Jackson Laboratory) ないし 200 倍希釈の抗ウサギ IgG ヤギ F(ab')₂ (Millipore, Billerica, MA, 米国) と室温で 1 時間反応させた。最後にトリス緩衝液 (pH7.6) で切片を 3 回洗浄して DAB 発色液 (同仁化学研究所) と反応させ, ヘマトキシリン染色液で対比染色した。

実験対照切片には一次抗体の代わりに非免疫ヤギ (Peprotech), マウス (Santa Cruz Biotechnol.) ないしウサギ IgG (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, 米国) および PBS を反応させた。

4) グラム染色法

前記の凍結切片をグラム氏染色第 1 液 (石炭酸ゲンチアナ紫液; 武藤化学, 東京, 日本) と室温で 1 分間反応させた。その後, 蒸留水で洗浄した後, グラム氏染色第 2 液 (ルゴール液; 武藤化学) と室温で 1 分間反応させ, 蒸留水で洗浄した。次にアセトンに切片を 1 分間浸漬して脱色した後に蒸留水で洗浄し, グラム氏染色第 3 液 (10 倍希釈チール液; 武藤化学) と室温で 1 分間反応させた。その後, 蒸留水で洗浄してアセトンで脱水し, 封入した。

5) 組織構成要素および細菌の増殖程度の定義

常在細菌の定着ないし増殖状況を確認するために、凍結切片をヘマトキシリン・エオシン染色し、組織の一般形態を観察した。一般形態の観察に際して、リンパ小節の腸陰窩開口部から最内腔側に位置する上皮細胞までを3等分し、腸陰窩側から基部、中部および頂部と区分した。その後リンパ小節をFAE上に存在する常在細菌の位置に応じて2つに分類した。すなわち、FAE上に細菌が存在しないリンパ小節またはリンパ小節の頂部のFAE上にのみ細菌が存在するリンパ小節をnb-LF、リンパ小節頂部から中部または基部のFAE上にまで細菌が存在するリンパ小節をb-LFと分類した（図14）。

6) 定量組織学的観察法

TLR検出に用いた10個体から最内腔側の頂点を通して縦断されたnb-LFおよびb-LFを無作為に計20個ずつ選び出し、100倍の対物レンズを装着した光学顕微鏡下で、片側のリンパ小節の頂部、中部および基部のFAEに存在するM細胞数ならびにTLR-2, -4および-9陽性の微絨毛円柱上皮細胞数およびM細胞数を計測した。計測値は箱ひげ図を用いて最小値、第1四分位、中央値、第3四分位、最大値を示した。第I章と同じ基準で各種上皮細胞種を判定して計測した。

7) 統計解析

すべての平均値の正規性をKolmogorov-Smirnov検定によりおこなった。パラメトリックの検定の場合にはWelchの*t*検定をおこない、ノンパラメトリックな検定の場合にはMann-Whitneyの*U*検定をおこなった。 $P < 0.05$ 未満を有意とした。

II-3. 結 果

1) 濾胞被蓋上皮における M 細胞の分布

M 細胞はリンパ小節周囲の腸絨毛の上皮および腸陰窩の上皮ではみとめられず，リンパ小節の FAE 内にのみみとめられた。nb-LF では基部から中部の FAE 内に少数の M 細胞が散在しており，頂部に向かうにつれて少なくなっていた（図 15a, b）。一方，b-LF では nb-LF と比べて FAE 内に M 細胞が多数みとめられた（図 15c, d）。また定量組織学的にも b-LF では全長の FAE で nb-LF の FAE より M 細胞数が有意に増加しており，その中でも頂部において特に顕著に増加していた（図 16）。

2) 濾胞被蓋上皮上に存在する細菌の性質

リンパ小節の FAE 上には細菌コロニーがしばしばみとめられ，この細菌コロニーを形成する細菌のほとんどがグラム陰性桿菌であった（図 17a）。これらの細菌はリンパ小節頂部の微絨毛円柱上皮細胞に優先的に接着しており（図 17b），まれに中部から基部にかけての FAE 上にまで存在していた（図 17a）。

3) リンパ小節における TLR-2, -4 および-9 の局在

nb-LF における TLR の局在については，TLR-2, -4 および-9 すべてで同様の局在を示したため，一括して以下に記載し，b-LF における TLR の局在については TLR ごとに分けて以下に記載する。

a) nb-LF における TLR-2, -4 および-9 の局在

nb-LF の FAE では，M 細胞は遊離縁側に TLR-2, -4 および-9 陽性を示

し、M細胞の腸陰窩側を含むFAE全長のほぼすべての微絨毛円柱上皮細胞が陰性であった（図18-1a, 1b, 20-1a, 1b, 22-1a, 1b）。また杯細胞および上皮内リンパ球はTLR-2, -4および-9陰性であった。nb-LFではTLR-2, -4および-9の微細な顆粒状の陽性が微絨毛円柱上皮細胞の細胞質, M細胞のポケット内の遊走細胞の細胞質内および上皮下毛細血管の内腔にまれにみとめられた。その他の組織構成要素は陰性であった。

b) b-LFにおけるTLR-2の局在

b-LFのFAEではM細胞の遊離縁側の細胞膜がTLR-2陽性を示したが、M細胞よりも腸陰窩側に位置する微絨毛円柱上皮細胞を含むリンパ小節基部から中部にかけての微絨毛円柱上皮細胞は陰性であった（図18-2a, 2b）。一方、b-LF頂部では少数の微絨毛円柱上皮細胞がTLR-2陽性の線条縁を示しており、TLR-2陽性の微絨毛円柱上皮細胞の大部分は細菌の接着を伴っていた（図18-2c）。また杯細胞はTLR-2陰性であった。定量組織学的にもTLR-2陽性微絨毛円柱上皮細胞の数はnb-LF頂部のFAEよりもb-LF頂部のFAEで有意に増加していたが、b-LF基部および中部のFAEとnb-LF基部および中部のFAEとの間には有意な差はみられなかった（図19）。またTLR-2陽性M細胞数にはFAE全長でb-LFとnb-LFとの間に有意な差はみられなかった（図19）。b-LFではTLR-2の微細な顆粒状の陽性がM細胞のポケット内および上皮直下の遊走細胞の細胞質内に中程度みとめられた。その他の組織構成要素は陰性であった。

c) b-LFにおけるTLR-4の局在

b-LFのFAEではM細胞の遊離縁側の細胞膜がTLR-4陽性を示しており、このTLR-4陽性M細胞の腸陰窩側近傍に位置する多くの微絨毛円柱

上皮細胞の線条縁が TLR-4 陽性を示した(図 20-2a, 2b)。さらにこの TLR-4 陽性微絨毛円柱上皮細胞の少数が細胞質内に大小様々な小胞状の陽性を有していた(図 20-2b)。またリンパ小節頂部では細菌の接着を伴う微絨毛円柱上皮細胞を含む多くの微絨毛円柱上皮細胞の線条縁で TLR-4 陽性がみとめられ(図 20-2c)、さらに細胞質内にも顆粒状の TLR-4 陽性が多数みとめられた。また杯細胞は TLR-4 陰性であった。定量組織学的にも nb-LF の FAE よりも b-LF 全長の FAE で TLR-4 陽性微絨毛円柱上皮細胞および TLR-4 陽性 M 細胞が有意に増加していた(図 21)。b-LF では TLR-4 の微細な顆粒状の陽性が M 細胞のポケット内および上皮直下の遊走細胞の細胞質内および上皮下毛細血管の内腔に中程度みとめられた。その他の組織構成要素は陰性であった。

d) b-LF における TLR-9 の局在

b-LF の FAE では M 細胞の遊離縁側の細胞膜が TLR-9 陽性を示したが、M 細胞よりも腸陰窩側に位置する微絨毛円柱上皮細胞は陰性であった(図 22-2a, 2b)。一方、b-LF 頂部では少数の微絨毛円柱上皮細胞の線条縁が TLR-9 陽性であり、TLR-9 陽性の微絨毛円柱上皮細胞には頻繁に細菌が接着していた(図 22-2c)。また杯細胞は TLR-9 陰性であった。定量組織学的にも TLR-9 陽性微絨毛円柱上皮細胞の数は nb-LF 頂部の FAE よりも b-LF 頂部の FAE で有意に増加していたが、b-LF 基部および中部の FAE と nb-LF 基部および中部の FAE との間には有意な差はみられなかった(図 23)。また b-LF 全長の FAE と nb-LF 全長の FAE における TLR-9 陽性 M 細胞数には有意な差はみられなかった(図 23)。b-LF では TLR-9 の微細な顆粒状の陽性が M 細胞のポケット内および上皮直下の遊走細胞の細胞質内および上皮下毛細血管の内腔に中程度みとめられた。その他の組織

構成要素は陰性であった。

4) 腸絨毛およびリンパ小節における RANK の局在

腸絨毛全長で微絨毛円柱上皮細胞の細胞質が RANK 陽性を示し、陽性強度は腸絨毛基部の上皮で中程度で頂部に向かうにつれて弱くなった (図 24-1a)。杯細胞は陰性であった。腸絨毛の粘膜固有層には細胞質内に陽性を有する遊走細胞が多数みとめられた (図 24-1b)。その他の組織構成要素は陰性であった。

nb-LF および b-LF では FAE 全長の微絨毛円柱上皮細胞および M 細胞の細胞質が RANK 陽性を示し、その陽性強度は FAE 全長で中程度であった (図 24-2a, 24-2b, 24-3a, 24-3b)。また M 細胞のポケット内および粘膜固有層の遊走細胞の大部分が細胞質で陽性を示した (図 24-2b, 3b)。その他の組織構成要素は陰性であった。

5) 腸絨毛およびリンパ小節における RANKL の局在

RANKL は腸絨毛を構成するすべての細胞で陰性であった (図 25a)。

nb-LF および b-LF の FAE 全長の上皮で RANKL は陰性であった (図 25b, 25c)。一方、円蓋域に存在する間質細胞が RANKL 陽性を示し、その陽性強度は FAE 直下で最も強く、濾胞域に向かうにつれて弱くなった (図 25b, 25c)。さらに強い陽性を示す細胞が占める範囲は nb-LF では頂部で最も広く、基部に向かうにつれて弱くなっており、陽性間質細胞の密度も nb-LF 頂部でもっとも高く、基部に向かうにつれて低くなった (図 25b)。一方、b-LF では nb-LF と比べて特にリンパ小節基部から中部で強い陽性を示す細胞が占める範囲が広くなり、陽性間質細胞の密度も高くなった (図 25c)。また nb-LF では M 細胞のポケット内および粘膜固有層に位置

する遊走細胞の細胞質内にまれに RANKL 陽性がみとめられ、b-LF では nb-LF に比べて M 細胞のポケットないし粘膜固有層に位置する RANKL 陽性の遊走細胞が多くみとめられた。

6) 腸絨毛およびリンパ小節の上皮における活性型 caspase 3 の局在

腸絨毛では全長の上皮細胞が細胞質内で活性型 caspase 3 陽性を示し、腸絨毛の先端部に特に強い陽性がみとめられた (図 26-1)。

nb-LF および b-LF ではリンパ小節の頂部の一部の上皮細胞を除く FAE 全長の微絨毛円柱上皮細胞および M 細胞が活性型 caspase 3 陰性であり (図 26-2a, 3a), 先端部に存在する微絨毛円柱上皮細胞がまれに細胞質で強い活性型 caspase 3 の陽性を示した (図 26-2b, 3b)。

本章におけるすべての陰性対照切片で陽性反応はみとめられなかった。

II-4. 考 察

1) 常在細菌により誘導される M 細胞の分化と TLR との関係について

ラットパイエル板では M 細胞の分化は、FAE の未熟な微絨毛円柱上皮細胞が内腔物質の盛んな取り込みをおこなうことによって起こること [Onishi *et al.*, 2007b], さらに FAE 上に存在する常在細菌に呼応して促進されることが明らかにされている [Chin *et al.*, 2006]。本章では、リンパ小節深部の FAE 上にまでグラム陰性菌が増殖した場合には、FAE の M 細胞よりも上流側に隣接し、M 細胞の前駆細胞であると考えられる微絨毛円柱上皮細胞に TLR-2 および TLR-9 の発現は起こらないが、TLR-4 の発現がみとめられたことから、M 細胞は TLR-4 陽性微絨毛円柱上皮細胞から分化することが示唆された。さらにこの TLR-4 陽性微絨毛円柱上皮細胞が細胞質内に小胞状の TLR-4 陽性を有していること、加えて nb-LF と比べて b-LF において TLR-2 および TLR-9 陽性 M 細胞の数は変化せず、TLR-4 陽性 M 細胞のみが増加することから、微絨毛円柱上皮細胞に発現する TLR-4 を介した TLR-4 リガンドの盛んな取り込みが生じることにより、微絨毛円柱上皮細胞から M 細胞への分化が誘導され、TLR-4 陽性 M 細胞の増加につながることが考えられた。

2) リンパ小節における RANK および RANKL の局在と M 細胞の分布との比較について

RANK および RANKL をノックアウトしたマウスでは M 細胞の減少が起こるとともに [Knoop *et al.*, 2009; Rios *et al.*, 2016], RANKL ノックアウトマウスでは RANKL の腹腔ないし皮下投与により M 細胞の回復が起こ

ることが明らかにされている[Knoop *et al.*, 2009]。さらに *in vitro* の研究でもマウス[de Lau *et al.*, 2012; Wood *et al.*, 2016], ウシ[Tahoun *et al.*, 2012] およびヒト[Rouch *et al.*, 2016]の腸管上皮細胞由来の培養細胞に RANKL の刺激を与えると M 細胞マーカーである GP2 を発現することから, RANK/RANKL シグナリングが M 細胞の分化における重要な因子であるとされている。さらにマウスパイエル板リンパ小節における免疫組織化学的検出により FAE における RANK の発現および FAE 直下の間質細胞における RANKL の発現が報告されている[Knoop *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2007]。本章における観察においても, リンパ小節では RANK が FAE に発現しており, また RANKL が FAE 直下の間質細胞に発現することが確認された。nb-LF における RANK の発現は FAE 全長で中程度であり, RANKL の発現はリンパ小節頂部で最も強く基部に向かうにつれて弱くなったが, M 細胞の分布は主にリンパ小節の基部から中部の FAE に集中しており, 頂部の FAE では少なかった。一方, b-LF では nb-LF と比べて FAE における RANK の発現に変化はみとめられず, RANKL の発現はリンパ小節基部から中部で増強したが, M 細胞は特に頂部で顕著な増加を示した。このように RANKL の局在と M 細胞の出現部位および増加部位が一部対応していないことが示唆されたことから, RANK および RANKL は M 細胞の分化に直接的には関与していない可能性が考えられた。

3) リンパ小節における RANK および RANKL の局在と上皮におけるアポトーシスとの関係について

活性型 caspase 3 は一般的にアポトーシスの進行に深く関わる因子とされている[Porter and Jänicke, 1999]。一方, caspase3 はヒト赤芽球の成熟[Carlile *et al.*, 2004; Zermati *et al.*, 2001]およびマウスの筋芽細胞の分化

[Fernando *et al.*, 2002]において重要な働きを有しており, これらのことから caspase 3 を始めとするアポトーシス関連タンパク質は細胞のアポトーシスだけではなく, 成熟や分化にも関与するとされている [Wang and Lenardo, 2000]。さらにラット小腸の腸絨毛では全長の上皮細胞で活性型 caspase 3 が発現することから, 腸絨毛の上皮細胞は腸陰窩を出た後, 頂部に向かって移動するその過程でアポトーシスの進行とともに細胞の成熟をおこなうとされている [Onishi *et al.*, 2007a]。一方, ラットパイエル板の FAE では活性型 caspase 3 の発現する上皮細胞がリンパ小節の頂部に局限することから FAE の上皮細胞は腸絨毛の上皮細胞よりも未成熟な状態であることが示唆されており, この上皮細胞の未成熟な状態が M 細胞の分化に必要であることが考えられている [Onishi *et al.*, 2007a]。またマウスの乳腺上皮では RANK/RANKL シグナリングが上皮細胞のアポトーシス抑制に関与することが報告されている [Fata *et al.*, 2000]。本章における観察では, RANK の発現は腸絨毛およびリンパ小節, 双方の上皮でみとめられたのに対し, RANKL の発現はリンパ小節では FAE 全長の上皮直下の間質細胞でみとめられたものの腸絨毛ではみとめられず, 逆に活性型 caspase 3 の発現は腸絨毛では全長の上皮細胞で発現しており, リンパ小節では頂部の少数の微絨毛円柱上皮細胞に局限することが示唆された。したがって, このリンパ小節に特異的な RANKL の刺激が FAE におけるアポトーシスの進行を抑制し, M 細胞の分化に必要な上皮細胞の未成熟な状態の維持に貢献している可能性が考えられた。

II-5. 小 括

M 細胞の分化を誘導する因子について明らかにすること目的とし、第一にラット小腸の粘膜上に細菌が定着しているパイエル板の FAE における TLR の発現と常在細菌により誘導される M 細胞の分化との関係について組織学的に精査し、次いでリンパ小節における RANK/RANKL と M 細胞の分化および上皮のアポトーシスとの関係について組織学的観点から精査した。

その結果、リンパ小節深部の FAE 上にまでグラム陰性菌が増殖した場合には、FAE の微絨毛円柱上皮細胞による TLR-2 および-9 の発現は起こらないが、TLR-4 の発現がみとめられた。また M 細胞の上流に隣接する M 細胞前駆細胞の微絨毛円柱上皮細胞に TLR-4 の発現がみとめられたことから、FAE 上におけるグラム陰性菌の増殖に呼応して M 細胞は TLR-4 陽性微絨毛円柱上皮細胞から分化することが示唆された。加えて、TLR-4 陽性微絨毛円柱上皮細胞の細胞質内に小胞状の陽性がみとめられたことを併せ考えると、TLR-4 陽性微絨毛円柱上皮細胞にリガンドの盛んな取り込みが誘導されることによって M 細胞の分化が誘導され、TLR-4 陽性 M 細胞の増加につながることが考えられた。また FAE 上への常在細菌が存在しないリンパ小節 (nb-LF) では RANK 発現は FAE 全長でみとめられるとともに、RANKL の発現はリンパ小節頂部でもっとも強く基部に向かうにつれて弱くなるのに対し、M 細胞は主にリンパ小節基部から中部に集中して散在した。一方深部の FAE 上にまで常在細菌が存在するリンパ小節 (b-LF) では、nb-LF と同様に RANK の発現は FAE 全長でみとめられたものの、RANKL の発現はリンパ小節の基部から中部で強くなっていたのに対し、M 細胞は特にリンパ小節の頂部で増加していた。これら

の結果から、リンパ小節における RANKL の局在と M 細胞の出現部位および増加部位が一部対応しないことが示唆されたことから、RANK/RANKL は M 細胞の分化に直接的には関与していない可能性が考えられた。また、RANK の発現は腸絨毛およびリンパ小節、双方の上皮でみとめられたのに対し、RANKL の発現はリンパ小節では FAE 全長の上皮直下の間質細胞でみとめられたものの腸絨毛ではみとめられなかった。対照的に活性型 caspase 3 の発現は腸絨毛では全長の上皮細胞で発現しており、リンパ小節では頂部の少数の微絨毛円柱上皮細胞に限局することが示唆された。これらのことから、このリンパ小節特異的な RANKL の刺激が M 細胞の分化に必要な FAE の上皮細胞の未成熟な状態の維持に貢献している可能性が考えられた。

総 括

M 細胞の分化は濾胞被蓋上皮 (FAE) の微絨毛円柱上皮細胞が盛んな取り込みをおこなうことによって遊離縁側の細胞膜を消費することにより、誘導されることが明らかにされており、さらに FAE 上に存在する常在細菌に呼応して促進されることが示唆されている。したがって、FAE の微絨毛円柱上皮細胞が細菌の認識をおこなう何らかの受容体を介して盛んな取り込みをおこない、M 細胞へと分化していく可能性が想定されるが、このような受容体については未だ明らかにされていない。近年、細菌やウイルス由来の構成成分である病原体関連分子パターンを認識する受容体として Toll-like receptor (TLR) が注目されており、微粒子と一緒に TLR リガンドを腸管内に投与することにより、リンパ小節内への M 細胞を介した微粒子の取り込みが増加することが明らかにされている。しかしパイエル板における TLR の発現に関する研究は M 細胞に集中しており、M 細胞の前駆細胞を含むリンパ小節全長の M 細胞以外の上皮細胞における TLR の発現については未だ明らかにされていない。そこで本論文の第 I 章では、常在細菌により誘導される M 細胞の分化を誘導する受容体の候補として、TLR の中でも細菌の構成成分を認識する TLR-2, -4 および-9 に着目し、まず粘膜上に常在細菌が存在しないパイエル板リンパ小節の FAE 等の上皮における TLR 発現の詳細について明らかにするとともに、常在細菌が存在しない FAE における M 細胞の分化への TLR の関与について明らかにすることを目的とした。次いで第 II 章では、FAE 上に常在細菌が存在するリンパ小節の FAE における TLR-2, -4 および-9 の発現の詳細について明らかにし、常在細菌により誘導される M 細胞の分化への TLR の関与について明らかにすることを第一の目的とした。また近年、M 細胞の分化に大きく関与する因子として RANK および RANKL の存在

が注目されている。しかし RANK/RANKL シグナリングと M 細胞への分化との関係について組織学的観点からは明らかにされておらず、さらに RANK/RANKL シグナリングがどのように M 細胞の分化に関わるのかについても明らかにされていない。一方、FAE ではアポトーシスの進行が腸絨毛の上皮よりも遅れていることが示唆されており、このアポトーシスの遅延が FAE 特異的な M 細胞の分化に貢献している可能性が想定されている。加えて RANK/RANKL シグナリングもまた上皮におけるアポトーシスの抑制への関与が明らかにされている。そこでラットパイエル板における RANK, RANKL および活性型 caspase 3 の詳細な局在を精査し、RANK/RANKL シグナリングと M 細胞の分化および FAE におけるアポトーシスとの関係について明らかにすることを第二の目的とした。

第 I 章ではラット小腸の粘膜上に常在細菌が定着していないパイエル板におけるリンパ小節およびそれに付随する腸絨毛の上皮における TLR-2, -4 および-9 の局在を免疫組織化学的に精査した。その結果、TLR-2 は一般腸絨毛および FAIV の先端部を除く全長の微絨毛円柱上皮細胞において陽性を示したが、FAIV のリンパ小節側の上皮では一般腸絨毛および FAIV の対リンパ小節側に比べてその陽性強度は弱く、陽性細胞の出現頻度も有意に低かった。さらにリンパ小節の FAE では TLR-2, -4 および-9 の発現が M 細胞の遊離縁側にみとめられたが、M 細胞の前駆細胞を含む FAE 全長のほぼすべての微絨毛円柱上皮細胞ではみとめられなかった。また FAIC では一般腸陰窩と同様、上皮細胞の線条縁および内腔に TLR-2, -4 および-9 の陽性がみとめられ、パネート細胞の分泌顆粒にも TLR-4 の陽性がみとめられた。したがって、FAIV のリンパ小節側上皮および FAE では一般腸絨毛の上皮と比べて TLR の発現が弱いことが示唆され、これらの結果から FAIV のリンパ小節側上皮および FAE では、一般腸絨毛上

皮と比べて細菌に対する認識能が弱くなっている可能性が考えられた。加えて、一般の腸陰窩では分泌型 TLR が分泌され、リガンドに結合することにより腸絨毛上皮における膜型 TLR を介したリガンドの認識を抑制する可能性が想定されているが、この分泌型 TLR の分泌が FAIC でも一般腸陰窩と同様に分泌されていることが示唆された。したがって、FAIV のリンパ小節側上皮と FAE との間隙では腸絨毛間隙よりも常在細菌の定着を許容する環境が形成されていると考えられた。一方、粘膜上に細菌が定着していないパイエル板のリンパ小節では TLR-2, -4 および-9 は M 細胞の分化に直接的には関与しないことが示唆されるとともに、微絨毛円柱上皮細胞が M 細胞に分化した後に TLR が発現されることが示唆された。

第 II 章では第 I 章に次いで常在細菌により誘導される M 細胞の分化への TLR の関与についての更なる解析をおこなうとともに、RANK/RANKL シグナリングの M 細胞の分化および上皮のアポトーシスへの関与を組織学的観点から検討することを目的に、ラット小腸パイエル板の FAE 上に常在細菌が定着していないリンパ小節 (nb-LF) および定着しているリンパ小節 (b-LF) において TLR-2, -4, -9, RANK, RANKL および活性型 caspase 3 の局在を免疫組織化学的に精査し、加えて RANK, RANKL および活性型 caspase 3 の局在については付属する腸絨毛においても精査した。その結果、リンパ小節深部の FAE 上にまでグラム陰性菌が増殖した場合には、FAE の微絨毛円柱上皮細胞による TLR-2 および-9 の発現は起こらないが、TLR-4 の発現がみとめられた。また M 細胞の上流に隣接する M 細胞前駆細胞の微絨毛円柱上皮細胞に TLR-4 の発現がみとめられたことから、M 細胞は TLR-4 陽性微絨毛円柱上皮細胞から分化することが示唆された。加えて、TLR-4 陽性微絨毛円柱上皮細胞の細胞質内に小胞状の

陽性がみとめられたことを併せ考えると、TLR-4 陽性微絨毛円柱上皮細胞にリガンドの盛んな取り込みが誘導されることによって M 細胞の分化が誘導され、TLR-4 陽性 M 細胞の増加につながるものが考えられた。また nb-LF では RANK の発現は FAE 全長でみとめられるとともに、RANKL の発現はリンパ小節頂部でもっとも強く、基部に向かうにつれて弱くなるのに対し、M 細胞は主にリンパ小節基部から中部に集中して散在した。一方 b-LF では、nb-LF と同様に RANK の発現は FAE 全長でみとめられたものの、RANKL の発現はリンパ小節の基部から中部で強くなっていたのに対し、M 細胞は特にリンパ小節の頂部で増加していた。これらの結果から、リンパ小節における RANKL の局在と M 細胞の出現部位および増加部位が一部対応していないことが示唆されたことから、RANK/RANKL は M 細胞の分化に直接的には関与していないことが考えられた。一方、RANK の発現は腸絨毛およびリンパ小節、双方の上皮でみとめられたのに対し、RANKL の発現はリンパ小節では FAE 全長の上皮直下の間質細胞でみとめられたものの腸絨毛ではみとめられなかった。対照的に、活性型 caspase 3 の発現は腸絨毛では全長の上皮細胞で発現しており、リンパ小節では頂部の少数の微絨毛円柱上皮細胞に限局することが示唆された。これらのことから、このリンパ小節特異的な RANKL の刺激が M 細胞の分化に必要な FAE の上皮細胞の未成熟な状態の維持に貢献している可能性が考えられた。

以上の結果を統合すると、本学位論文ではパイエル板リンパ小節および付属する腸絨毛の上皮における TLR 発現の特異性および M 細胞の分化メカニズムの一端を明らかにすることが出来た。またラットパイエル板では、リンパ小節と腸絨毛の間隙では一般腸絨毛間隙よりも上皮による細菌に対する認識能が低く、細菌が認識されづらい環境が形成されてお

り、リンパ小節深部の FAE 上まで常在細菌が増殖した場合には FAE の微絨毛円柱上皮細胞が TLR-4 を発現し、この TLR-4 を介して M 細胞の分化が誘導される可能性が考えられた。一方、リンパ小節における RANK/RANKL シグナリングは M 細胞の分化には直接関与しておらず、むしろ M 細胞の分化に必要な FAE の上皮細胞の未成熟な状態の維持に貢献している可能性が考えられた。

Abstract

Study on the Factor Inducing Differentiation into M-cells in Rat Peyer's Patches

Hideto Yuasa

The differentiation into M-cells is performed by the active pinocytosis of immature microvillous epithelial cell (MV) and is accelerated by the increase of indigenous bacteria on the follicle-associated epithelium (FAE) of Peyer's patch. Therefore, it is speculated that differentiation into M-cells is induced by some receptors recognizing bacterial substances in MV of FAE. The uptake of latex microspheres, probably mediated by M-cells, into lymphatic follicles (LFs) of mouse Peyer's patches is increased by co-administration of latex microspheres with several Toll-like receptor (TLR)-ligands, such as peptidoglycan and lipopolysaccharide. However, the expression of TLRs in MV of FAE has not been clarified in Peyer's patch. Therefore, the study of chapter I in this thesis aims to clarify the expression of TLR-2, -4 and -9 which recognize the ligands from bacterial constituents and the participation of TLRs in the differentiation from MV into M-cells in the FAE of rat Peyer's patch without indigenous bacterial colonies on the FAE. The study of chapter II in this thesis first aims to clarify the expression of TLR-2, -4 and -9 in the epithelial cells of the FAE and the participation of TLRs in the differentiation from MV into M-cells in the FAE of rat Peyer's patch with indigenous bacterial colonies. Recently, RANK and RANKL have been introduced as the factors inducing the differentiation into M-cells. However, the mechanism of the differentiation into M-cells induced by RANK/RANKL signaling has not

been clarified *in vivo*. On the other hand, the down-regulation of epithelial apoptosis in the FAE is probably involved in the differentiation into M-cells. Moreover, RANK/RANKL signaling is involved in the inhibition of epithelial apoptosis in the murine mammary gland. Therefore, the study of chapter II in this thesis secondly aims to clarify the relationship among RANK/RANKL signaling, the down-regulation of epithelial apoptosis and the differentiation from MVs into M-cells in FAE of rat Peyer's patches.

In chapter I, the expressions of TLR -2, -4 and -9 were immunohistochemically investigated in the FAE, and epithelia of the follicle-associated intestinal villus (FAIV) and ordinary intestinal villus (IV) in rat Peyer's patch without indigenous bacterial colonies on the mucosae. As a result, TLR-2 was expressed in the striated borders of MVs in both IV and FAIV except in their apices. However, TLR-2 expression in the striated borders was weaker in the epithelium of the follicular side of FAIV (f-FAIV) than in epithelia of IV and the anti-follicular side of FAIV. TLR-4 and -9 were not expressed in the epithelia of FAIV and IV. In the FAE, TLR-2, -4 and -9 were not expressed in the striated borders of MVs, whereas the roofs of some typical M-cells were immunopositive for all TLRs. In the follicle-associated intestinal crypt (FAIC), immunopositivities for all TLRs were observed in the striated borders of MVs and the luminal substances. From these findings, TLR-2, -4 and -9 are suggested not to participate directly in differentiation from MVs into M-cells but to be expressed in M-cell after the differentiation from MV into M-cell in the FAE of rat Peyer's patches without indigenous bacterial colonies. Furthermore, these findings also suggest that the recognition for indigenous bacteria by TLR expressed in the epithelia is probably more difficult in the space between FAE and the epithelium of FAIV than in the intervillous spaces.

In chapter II, the expressions of TLR-2, -4, -9, RANK, RANKL and cleaved caspase-3 were immunohistochemically investigated in the rat Peyer's patches with and without indigenous bacterial colonies on the mucosae. As a result, TLR-2 and -9 were not expressed

in the MVs, whereas TLR-4 was expressed in the striated borders of MVs upstream next to M-cells in the FAE of lymphatic follicles with Gram-negative bacterial colonies (b-LF). These results suggested that TLR-4⁺ MVs differentiate into M-cells in the FAE of b-LF. In addition, TLR-4⁺ vesicles were frequently detected in the cytoplasm of the MV with TLR-4⁺ striated borders in the FAE of b-LF. Considering that the number of TLR-4⁺ M-cells was greater in the FAE of b-LF than the FAE of lymphatic follicle without bacterial colonies (nb-LF), TLR-4⁺ MVs probably take up TLR-4 ligands and differentiate into TLR-4⁺ M-cells in the b-LF. On the other hand, the intensity of immunopositivity for RANK was moderate throughout the FAE with or without bacterial colonies on the FAE. In addition, the area of accumulated RANKL-immunopositive stromal cells was thicker in the dome area of the apical portion than in that of the basal portion in the nb-LF, whereas M-cells frequently appeared in the FAE of the basal and middle portions in the nb-LF. Moreover, the area with accumulated RANKL-immunopositive stromal cells was thicker in the basal and middle portions of the dome area in the b-LF than those in the nb-LF, whereas M-cells were markedly increased in the FAE of the apical portion in the b-LF compared to that in the nb-LF. These findings suggest that the distributions of RANK and RANKL do not correspond to the distribution of M-cells in the nb-LF, and that neither distribution was correlated with the change in the distribution of M-cells in the b-LF. Therefore, RANK and RANKL do not probably participate directly in the differentiation into M-cells. In addition, it is suggested that RANKL is expressed in the stromal cells of the LF, but not in the intestinal villus, and that cleaved caspase 3 is expressed in almost all epithelial cells throughout the IV, but not in the epithelial cells throughout the FAE except for apex of LF. Therefore, RANK/RANKL signaling in the LF probably contribute to the down-regulation of epithelial apoptosis to form a milieu suitable for M-cell differentiation.

In conclusion, the special expression of TLRs in the FAE of LF and the epithelia of FAIV

and IV in rat Peyer's patch and some of mechanisms of differentiation into M-cell are clarified in this doctoral thesis. Furthermore, this doctoral thesis also suggests that the recognition for indigenous bacteria by TLR expressed in the epithelia is probably more difficult in the space between FAE and the epithelium of FAIV than in the intervillous spaces and that TLR-4 is expressed in the MV of FAE and probably induce the differentiation into TLR-4⁺ M-cell in the case that Gram-negative bacterial colonies expand on the FAE from apical portion to middle and basal portion of LF. On the other hand, RANK/RANKL signaling in the LF probably do not participate directly in the differentiation into M-cells and probably contribute to the down-regulation of epithelial apoptosis to form a milieu suitable for M-cell differentiation.

謝 辞

本稿を終えるにあたり，本研究に終始御懇篤なる御指導および御助言賜りました，本学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座北川 浩 教授に深謝致します。

また本論文を御校閲下さいました本学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座 星 信彦 教授ならびに河野 潤一 教授に深謝致します。

さらに，本研究に御懇篤なる御助言を賜りました本学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座 万谷 洋平 特命助教ならびに横山 俊史 助教に深謝致します。

最後になりましたが，本研究の遂行にあたり終始御協力くださいました組織生理学教育研究分野および動物分子形態学教育研究分野の教室員各位に心より御礼申し上げます。

引用文献

- Akira S., Uematsu S. and Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783–801.
- Alkanani A. K., Hara N., Gottlieb P. A., Ir D., Robertson C. E., Wagner B. D., Frank D. N. and Zipris D. 2015. Alterations in intestinal microbiota correlate with susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes* **64**: 3510–3520.
- Anderson D. M., Maraskovsky E., Billingsley W. L., Dougall W. C., Tometsko M. E., Roux E. R., Teepe M. C., DuBose R. F., Cosman D. and Galibert L. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390**:175–179.
- Apter F. M., Michetti P., Winner 3rd L. S., Mack J. A., Mekalanos J. J. and Neutra M. R. 1993. Analysis of the roles of antilipopolysaccharide and anti-cholera toxin immunoglobulin A (IgA) antibodies in protection against *Vibrio cholerae* and cholera toxin by use of monoclonal IgA antibodies *in vivo*. *Infect. Immun.* **61**:5279–5285.
- Atuma C., Strugala V., Allen A. and Holm L. 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**: G922–G929.
- Barthel L. K. and Raymond P. A. 1990. Improved method for obtaining 3-microns cryosections for immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **38**: 1383–1388.
- Batt R. M., Rutgers H. C. and Sancak A. A. 1996. Enteric bacteria: friend or foe? *J. Small Anim. Pract.* **37**: 261–267.
- Borghesi C., Regoli M., Bertelli E. and Nicoletti C. 1996. Modifications of the follicle-associated epithelium by short-term exposure to a non-intestinal bacterium. *J. Pathol.* **180**: 326–332.
- Bourlioux P., Koletzko B., Guarner F. and Braesco V. 2003. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The Intelligent Intestine,” held in Paris, June 14, 2002. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**: 675–683.
- Brandtzaeg P., Fjellanger I. and Gjeruldsen S. T. 1968. Adsorption of immunoglobulin A onto oral bacteria *in vivo*. *J. Bacteriol.* **96**: 242–249.
- Bye W. A., Allan C. H. and Trier J. S. 1984. Structure, distribution, and origin of M cells in

- Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology* **86**: 789–801.
- Canny G. O. and McCormick B. A. 2008. Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within? *Infect. Immun.* **76**: 3360–3373.
- Cario E. and Podolsky D. K. 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* **68**: 7010–7017.
- Carlisle G. W., Smith D. H. and Wiedmann M. 2004. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* **103**: 4310–4316.
- Cashman S. B. and Morgan J. G. 2009. Transcriptional analysis of Toll-like receptors expression in M cells. *Mol. Immunol.* **47**: 365–372.
- Chabot S., Wagner J. S., Farrant S. and Neutra M. R. 2006. TLRs regulate the gatekeeping functions of the intestinal follicle-associated epithelium. *J. Immunol.* **176**: 4275–4283.
- Chin K., Onishi S., Yuji M., Inamoto T., Qi W. M., Warita K., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2006. Differentiation of epithelial cells to M cells in response to bacterial colonization on the follicle-associated epithelium of Peyer's patch in rat small intestine. *J. Vet. Med. Sci.* **68**: 1023–1028.
- Chockalingam A., Cameron J. L., Brooks J. C. and Leifer C. A. 2011. Negative regulation of signaling by a soluble form of Toll-like receptor 9. *Eur. J. Immunol.* **41**: 2176–2184.
- Clark M. A., Hirst B. H. and Jepson M. A. 1998. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect. Immun.* **66**: 1237–1243.
- Cornes J. S. 1965. Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: part I the development of Peyer's patches. *Gut* **6**: 225–229.
- Cresci G. A. and Bawden E. 2015. Gut microbiome: what we do and don't know. *Nutr. Clin. Pract.* **30**: 734–746.
- de Lau W., Kujala P., Schneeberger K., Middendorp S., Li V. S. W., Barker N., Martens A., Hofhuis F., DeKoter R. P., Peters P. J., Nieuwenhuis E. and Clevers H. 2012. Peyer's patch M cells derived from Lgr5⁺ stem cells require SpiB and are induced by RankL in cultured "miniguts". *Mol. Cell. Biol.* **32**: 3639–3647.
- Dupont A., Heinbockel L., Brandenburg K. and Hornef M. W. 2014. Antimicrobial peptides and the enteric mucus layer act in concert to protect the intestinal mucosa. *Gut Microbes* **5**: 761–765.

- Ewaschuk J. B., Backer J. L., Churchill T. A., Obermeier F., Krause D. O. and Madsen K. L. 2007. Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infect. Immun.* **75**: 2572–2579.
- Fagarasan S., Muramatsu M., Suzuki K., Nagaoka H., Hiai H. and Honjo T. 2002. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* **298**: 1424–1427.
- Fata J. E., Kong Y. Y., Li J., Sasaki T., Irie-Sasaki J., Moorehead R. A., Elliott R., Scully S., Voura E. B., Lacey D. L., Boyle W. J., Khokha R. and Penninger J. M. 2000. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* **103**: 41–50.
- Fernando P., Kelly J. F., Balazsi K., Slack R. S. and Megeney L. A. 2002. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 11025–11030.
- Forbes S. J., Eschmann M. and Mantis N. J. 2008. Inhibition of *Salmonella enterica* serovar typhimurium motility and entry into epithelial cells by a protective antilipopolysaccharide monoclonal immunoglobulin A antibody. *Infect. Immun.* **76**: 4137–4144.
- Gebert A., Fassbender S., Werner K. and Weissferdt A. 1999. The development of M cells in Peyer's patches is restricted to specialized dome-associated crypts. *Am. J. Pathol.* **154**: 1573–1582.
- Gleeson M., McFarlin B. and Flynn M. 2006. Exercise and Toll-like receptors. *Exerc. Immunol. Rev.* **12**: 34–53.
- 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.
- Heel K. A., McCauley R. D., Papadimitriou J. M. and Hall J. C. 1997. Review: Peyer's patches. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **12**: 122–136.
- Ibeagha-Awemu E. M., Lee J. W., Ibeagha A. E., Bannerman D. D., Paape M. J. and Zhao X. 2008. Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of Toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Res.* **39**: 11. doi: 10.1051/vetres:2007047.
- Inamoto T., Kawata Y., Qi W. M., Yamamoto K., Warita K., Kawano J., Yokoyama T., Hoshi

- N. and Kitagawa H. 2008a. Ultrastructural study on the epithelial responses against attachment of indigenous bacteria to epithelial membranes in Peyer's patches of rat small intestine. *J. Vet. Med. Sci.* **70**: 235–241.
- Inamoto T., Namba M., Qi W. M., Yamamoto K., Yokoo Y., Miyata H., Kawano J., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2008b. An immunohistochemical detection of actin and myosin in the indigenous bacteria-adhering sites of microvillous columnar epithelial cells in Peyer's patches and intestinal villi in the rat jejunoleum. *J. Vet. Med. Sci.* **70**: 1153–1158.
- Iwami K. I., Matsuguchi T., Masuda A., Kikuchi T., Musikachoen T. and Yoshikai Y. 2000. Cutting edge: Naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J. Immunol.* **165**: 6682–6686.
- Johansson M. E., Phillipson M., Petersson J., Velcich A., Holm L. and Hansson G. C. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**: 15064–15069.
- Jung C., Hugot J. P. and Barreau F. 2010. Peyer's patches: The immune sensors of the intestine. *Int. J. Inflamm.* **2010**: 823710. doi:10.4061/2010/823710.
- Junt T., Scandella E. and Ludewig B. 2008. Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 764–775.
- Kanou T. 1984. Morphological study of microfold cells of intestinal lymphoid follicles in Peyer's patches. *Kawasaki Med. J.* **10**: 181–189.
- Kato T. 1990. A study of secretory immunoglobulin A on membranous epithelial cells (M cells) and adjacent absorptive cells of rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol. Jpn.* **25**: 15–23.
- Kawai T. and Akira S. 2007. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* **13**: 460–469.
- Kernéis S., Bogdanova A., Kraehenbuhl J. P. and Pringault E. 1997. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* **277**: 949–952.
- Kim D., Mebius R. E., MacMicking J. D., Jung S., Cupedo T., Castellanos Y., Rho J., Wong B. R., Josien R., Kim N., Rennert P. D. and Choi Y. 2000. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J. Exp. Med.* **192**: 1467–1478.

- Kim H. H., Shin H. S., Kwak H. J., Ahn K. Y., Kim J. H., Lee H. J., Lee M. S., Lee Z. H. and Koh G. Y. 2003. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *FASEB J.* **17**: 2163–2165.
- Kitagawa H., Hosokawa M., Takeuchi T., Yokoyama T., Imagawa T. and Uehara M. 2003. The cellular differentiation of M cells from crypt undifferentiated epithelial cells into microvillous epithelial cells in follicle-associated epithelia of chicken cecal tonsils. *J. Vet. Med. Sci.* **65**: 171–178.
- Klaasen H. L., Koopman J. P., Poelma F. G. and Beynen A. C. 1992. Intestinal, segmented, filamentous bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **8**: 165–180.
- Knoop K. A., Kumar N., Butler B. R., Sakthivel S. K., Taylor R. T., Nochi T., Akiba H., Yagita H., Kiyono H. and Williams I. R. 2009. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J. Immunol.* **183**: 5738–5747.
- LeBouder E., Rey-Nores J. E., Rushmere N. K., Grigorov M., Lawn S. D., Affolter M., Griffin G. E., Ferrara P., Schiffrin E. J., Morgan B. P. and Labéta M. O. 2003. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR) 2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J. Immunol.* **171**: 6680–6689.
- Lee H. W., Park H. K., Na Y. J., Kim C. D., Lee J. H., Kim B. S., Kim J. B., Lee C. W., Moon J. O. and Yoon S. 2008. RANKL stimulates proliferation, adhesion and IL-7 expression of thymic epithelial cells. *Exp. Mol. Med.* **40**: 59–70.
- Lundin A., Bok C. M., Aronsson L., Björkholm B., Gustafsson J. A., Pott S., Arulampalam V., Hibberd M., Rafter J. and Pettersson S. 2008. Gut flora, Toll-like receptors and nuclear receptors: a tripartite communication that tunes innate immunity in large intestine. *Cell. Microbiol.* **10**: 1093–1103.
- Mantani Y., Kamezaki A., Udayanga K. G. S., Takahara E., Qi W. M., Kawano J., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2011. Site differences of Toll-like receptor expression in the mucous epithelium of rat small intestine. *Histol. Histopathol.* **26**: 1295–1303.
- Mantani Y., Yokoo Y., Kamezaki A., Udayanga K. G. S., Takahara E., Takeuchi T., Kawano J., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2012. Immunohistochemical detection of Toll-like receptor-2, -4 and -9 in exocrine glands associated with rat alimentary tract. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 1429–1438.
- Mantani Y., Yuasa H., Nishida M., Takahara E., Omotehara T., Udayanga K. G. S., Kawano J., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2014. Peculiar composition of epithelial cells in

- follicle-associated intestinal crypts of Peyer's patches in the rat small intestine. *J. Vet. Med. Sci.* **76**: 833–838.
- Mantis N. J., Cheung M. C., Chintalacharuvu K. R., Rey J., Corthésy B. and Neutra M. R. 2002. Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J. Immunol.* **169**: 1844–1851.
- Miyazawa K., Aso H., Kanaya T., Kido T., Minashima T., Watanabe K., Ohwada S., Kitazawa H., Rose M. T., Tahara K., Yamasaki T. and Yamaguchi T. 2006. Apoptotic process of porcine intestinal M cells. *Cell Tissue Res.* **323**: 425–432.
- Moreau M. C. and Corthier G. 1988. Effect of the gastrointestinal microflora on induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in C3H/HeJ mice. *Infect. Immun.* **56**: 2766–2768.
- Nakato G., Fukuda S., Hase K., Goitsuka R., Cooper M. D. and Ohno H. 2009. New approach for m-cell-specific molecules screening by comprehensive transcriptome analysis. *DNA Res.* **16**: 227–235.
- Nakato G., Hase K., Suzuki M., Kimura M., Ato M., Hanazato M., Tobiume M., Horiuchi M., Atarashi R., Nishida N., Watarai M., Imaoka K. and Ohno H. 2012. Cutting Edge: *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J. Immunol.* **189**: 1540–1544.
- Netea M. G., Van der Meer J. W. M. and Kullberg B. J. 2006. Recognition of pathogenic microorganisms by Toll-like receptors. *Drugs Today* **42**: 99–105.
- Onishi S., Miyata H., Inamoto T., Qi W. M., Yamamoto K., Yokoyama T., Warita K., Hoshi N. and Kitagawa H. 2007a. Immunohistochemical study on the delayed progression of epithelial apoptosis in follicle-associated epithelium of rat Peyer's patch. *J. Vet. Med. Sci.* **69**: 1123–1129.
- Onishi S., Yokoyama T., Chin K., Yuji M., Inamoto T., Qi W. M., Warita K., Hoshi N. and Kitagawa H. 2007b. Ultrastructural study on the differentiation and the fate of M cells in follicle-associated epithelium of rat Peyer's patch. *J. Vet. Med. Sci.* **69**: 501–508.
- Otte J. M., Cario E. and Podolsky D. K. 2004. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **126**: 1054–1070.
- Owen R. L. 1977. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. *Gastroenterology* **72**: 440–451.

- Owen R. L. and Jones A. L. 1974. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* **66**: 189–203.
- Pappo J. and Ermak T. H. 1989. Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake. *Clin. Exp. Immunol.* **76**:144–148.
- Plant L. and Conway P. 2001. Association of *Lactobacillus* spp. with Peyer's patches in mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**: 320–324.
- Porter A. G. and Jänicke R. U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**: 99–104.
- Qi W. M., Yamamoto K., Yokoo Y., Miyata H., Inamoto T., Udayanga K. G. S., Kawano J., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2009. Histoplanimetric study on the relationship between the cell kinetics of villous columnar epithelial cells and the proliferation of indigenous bacteria in rat small intestine. *J. Vet. Med. Sci.* **71**: 463–470.
- Rios D., Wood M. B., Li J., Chassaing B., Gewirtz A. T. and Williams I. R. 2016. Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria. *Mucosal Immunol.* **9**: 907–916.
- Rol N., Favre L., Benyacoub J. and Corthésy B. 2012. The role of secretory immunoglobulin A in the natural sensing of commensal bacteria by mouse Peyer's patch dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **287**: 40074–40082.
- Rouch J. D., Scott A., Lei N. Y., Solorzano-Vargas R. S., Wang J., Hanson E. M., Kobayashi M., Lewis M., Stelzner M. G., Dunn J. C. Y., Eckmann L. and Martín M. G. 2016. Development of functional microfold (M) cells from intestinal stem cells in primary human enteroids. *PLoS One* **11**: e0148216. doi: 10.1371/journal.pone.0148216.
- Rozee K. R., Cooper D., Lam K. and Costerton J. W. 1982. Microbial flora of the mouse ileum mucous layer and epithelial surface. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1451–1463.
- Savidge T. C., Smith M. W., James P. S. and Aldred P. 1991. Salmonella-induced M-cell formation in germ-free mouse Peyer's patch tissue. *Am. J. Pathol.* **139**: 177–184.
- Schroeder Jr H. W. and Cavacini L. 2010. Structure and Function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**: S41–S52.
- Shimosato T., Tohno M., Kitazawa H., Katoh S., Watanabe K., Kawai Y., Aso H., Yamaguchi T. and Saito T. 2005. Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches. *Immunol. Lett.* **98**: 83-89.

- Smith M. W., James P. S. and Tivey D. R. 1987. M cell numbers increase after transfer of SPF mice to a normal animal house environment. *Am. J. Pathol.* **128**: 385–389.
- Smith M. W. and Peacock M. A. 1992. Microvillus growth and M-cell formation in mouse Peyer's patch follicle-associated epithelial tissue. *Exp. Physiol.* **77**: 389–392.
- Sudo N., Sawamura S., Tanaka K., Aiba Y., Kubo C. and Koga Y. 1997. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J. Immunol.* **159**: 1739–1745.
- Suzuki K., Ha S. A., Tsuji M. and Fagarasan S. 2007. Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Semin. Immunol.* **19**: 127–135.
- Suzuki K., Meek B., Doi Y., Muramatsu M., Chiba T., Honjo T. and Fagarasan S. 2004. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 1981–1986.
- Tahoun A., Mahajan S., Paxton E., Malterer G., Donaldson D. S., Wang D., Tan A., Gillespie T. L., O'Shea M., Roe A. J., Shaw D. J., Gally D. L., Lengeling A., Mabbott N. A., Haas J. and Mahajan A. 2012. Salmonella transforms follicle-associated epithelial cells into M cells to promote intestinal invasion. *Cell Host Microbe* **12**: 645–656.
- Taylor R. T., Patel S. R., Lin E., Butler B. R., Lake J. G., Newberry R. D. and Williams I. R. 2007. Lymphotoxin-independent expression of TNF-related activation-induced cytokine by stromal cells in cryptopatches, isolated lymphoid follicles, and Peyer's patches. *J. Immunol.* **178**: 5659–5667.
- Tohno M., Shimosato T., Kitazawa H., Katoh S., Iliev I. D., Kimura T., Kawai Y., Watanabe K., Aso H., Yamaguchi T. and Saito T., 2005. Toll-like receptor 2 is expressed on the intestinal M cells in swine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**: 547–554.
- 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.
- Tyrer P., Foxwell A. R., Cripps A. W., Apicella M. A. and Kyd J. M. 2006. Microbial pattern recognition receptors mediate M-cell uptake of a gram-negative bacterium. *Infect. Immun.* **74**: 625–631.
- van der Heijden P. J., Stok W. and Bianchi A. T. J. 1987. Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total 'background' immunoglobulin production. *Immunology* **62**: 551–555.

- van der Waaij L. A., Limburg P. C., Mesander G. and van der Waaij D. 1996. *In vivo* IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut* **38**: 348–354.
- von Rosen L., Podjaski B., Bettmann I. and Otto H. F. 1981. Observations on the ultrastructure and function of the so-called “microfold” or “membraneous” cells (M cells) by means of peroxidase as a tracer. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.* **390**: 289–312.
- Wang J. and Lenardo M. J. 2000. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J. Cell. Sci.* **113**: 753–757.
- Williams R. C. and Gibbons R. J. 1972. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science* **177**: 697–699.
- Wong B. R., Josien R., Lee S. Y., Sauter B., Li H. L., Steinman R. M. and Choi Y. 1997a. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J. Exp. Med.* **186**: 2075–2080.
- Wong B. R., Rho J., Arron J., Robinson E., Orlinick J., Chao M., Kalachikov S., Cayani E., Bartlett 3rd F. S., Frankel W. N., Lee S. Y. and Choi Y. 1997b. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 25190–25194.
- Wood M. B., Rios D. and Williams I. R. 2016. TNF- α augments RANKL-dependent intestinal M cell differentiation in enteroid cultures. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **311**: C498–C507.
- Xuan C., Shamonki J. M., Chung A., Dinome M. L., Chung M., Sieling P. A. and Lee D. J. 2014. Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS One* **9**: e83744. doi: 10.1371/journal.pone.0083744.
- Yadav S. K., Boppana S., Ito N., Mindur J. E., Mathay M. T., Patel A., Dhib-Jalbut S. and Ito K. 2017. Gut dysbiosis breaks immunological tolerance toward the central nervous system during young adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**: E9318–E9327.
- Yamamoto K., Qi W. M., Yokoo Y., Miyata H., Udayanga K. G. S., Kawano J., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2009. Histoplanimetric study on the spatial relationship of distribution of indigenous bacteria with mucosal lymphatic follicles in alimentary tract of rat. *J. Vet. Med. Sci.* **71**: 621–630.
- Yang T., Santisteban M. M., Rodriguez V., Li E., Ahmari N., Carvajal J. M., Zadeh M., Gong M., Qi Y., Zubcevic J., Sahay B., Pepine C. J., Raizada M. K. and Mohamadzadeh M. 2015. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension* **65**: 1331–1340.

- Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinoshita M., Mochizuki S., Tomoyasu A., Yano K., Coto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N. and Suda T. 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 3597–3602.
- Yokoo Y., Miyata H., Udayanga K. G. S., Qi W. M., Takahara E., Mantani Y., Yokoyama T., Kawano J., Hoshi N. and Kitagawa H. 2011a. Immunohistochemical and histoplanimetric study on the spatial relationship between the settlement of indigenous bacteria and the secretion of bactericidal peptides in rat alimentary tract. *J. Vet. Med. Sci.* **73**: 1043–1050.
- Yokoo Y., Miyata H., Udayanga K. G. S., Qi W. M., Takahara E., Yokoyama T., Kawano J., Hoshi N. and Kitagawa H. 2011b. Immunohistochemical study on the secretory host defense system of bactericidal peptides in rat digestive organs. *J. Vet. Med. Sci.* **73**: 217–225.
- Zermati Y., Garrido C., Amsellem S., Fishelson S., Bouscary D., Valensi F., Varet B., Solary E. and Hermine O. 2001. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* **193**: 247–254.
- Zoetendal E. G., Akkermans A. D. and de Vos W. M. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3854–3859.

付図および付図説明

略号

af-FAIV:	濾胞付属腸絨毛の対リンパ小節側
b-LF	FAE 上に細菌の存在するリンパ小節
DA:	円蓋域
FA:	濾胞域
FAE:	濾胞被蓋上皮
FAIC:	濾胞付属腸陰窩
FAIV:	濾胞付属腸絨毛
f-FAIV:	濾胞付属腸絨毛の対リンパ小節側
IC:	一般腸陰窩
IV:	一般腸絨毛
LF:	リンパ小節
M:	M 細胞
MV:	微絨毛円柱上皮細胞
nb-LF	FAE 上に細菌の存在しないリンパ小節
RANK:	Receptor-activator of Nf- κ B
RANKL:	Ligand of receptor-activator of Nf- κ B
TLR:	Toll-like receptor

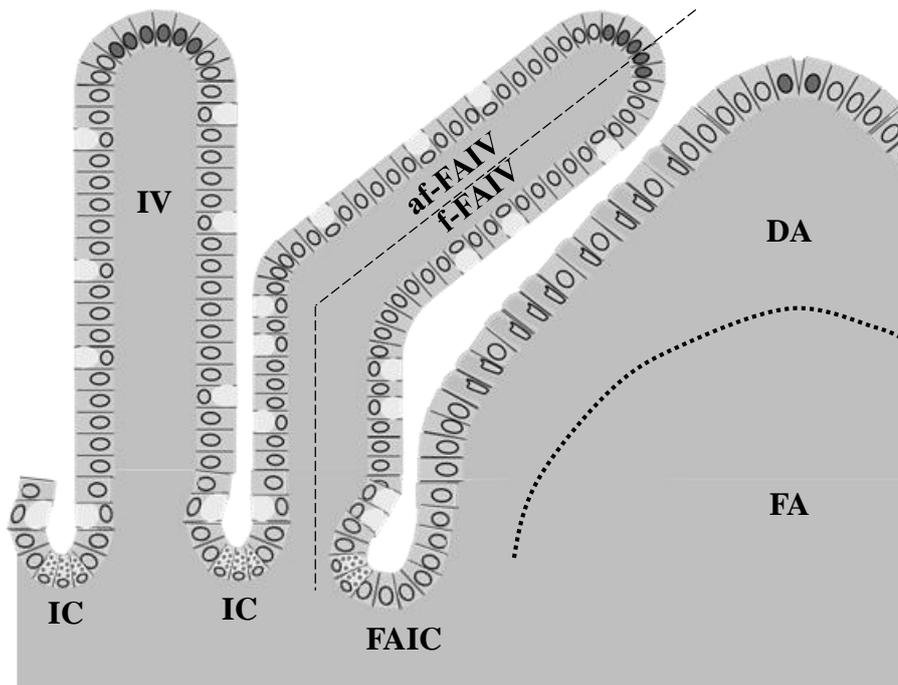


図1 ラットパイエル板の模式図

破線：af-FAIVとf-FAIVの境界線

点線：DAとFAの境界線

図 2 腸絨毛における TLR-2 の免疫組織化学的検出結果

a) IV における TLR-2 の局在

IV の基部から頂部の MV の線条縁が TLR-2 陽性を示し、その陽性強度は IV の基部では弱く、頂部に向かうにつれて強くなっている。

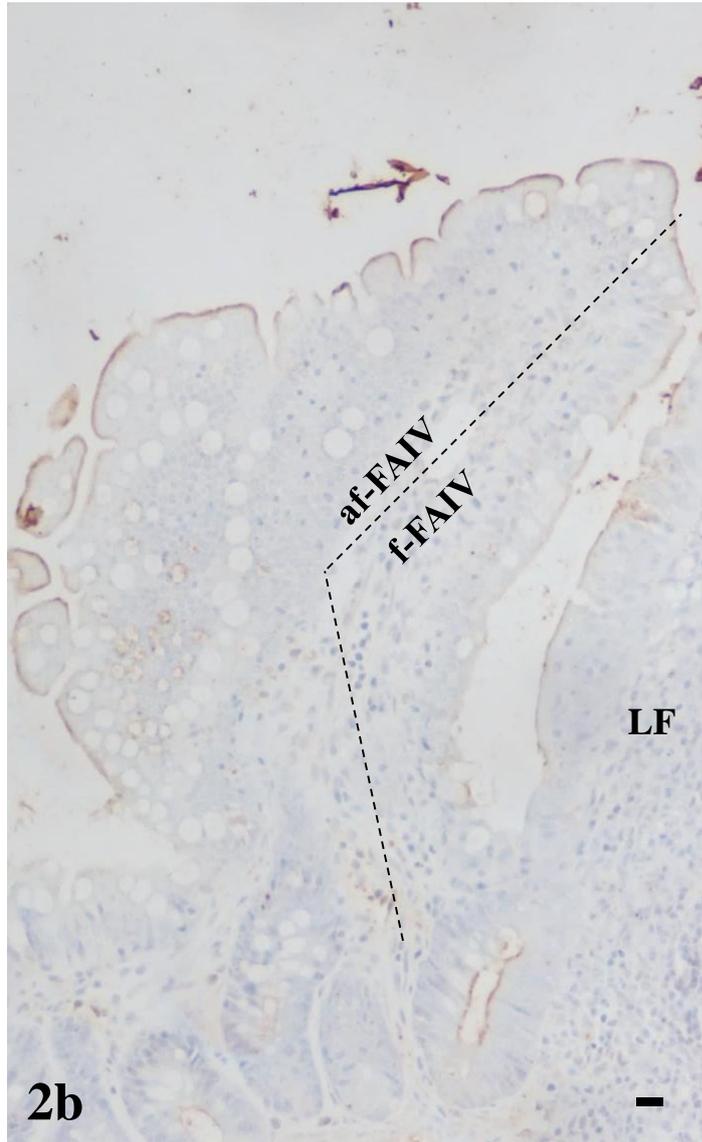
b) FAIV における TLR-2 の局在

af-FAIV および f-FAIV の MV の線条縁が TLR-2 陽性を示し、af-FAIV の線条縁の陽性強度は強く、f-FAIV の線条縁の陽性強度は弱くなっている。

破線：af-FAIV と f-FAIV との間の境界線

Bar=10 μ m

対比染色：ヘマトキシリン染色



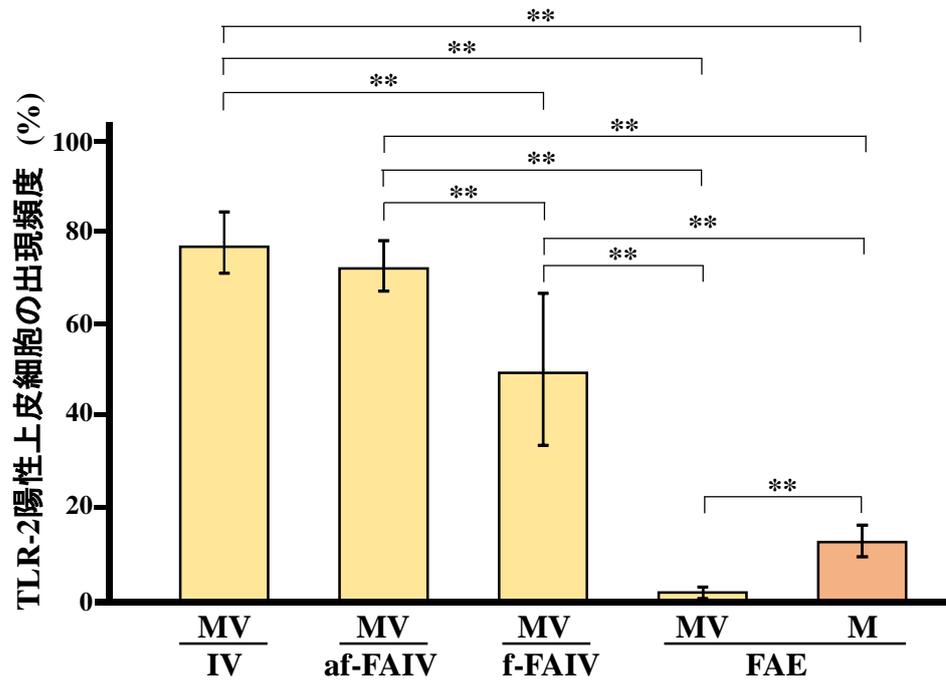


図3 腸絨毛およびリンパ小節におけるTLR-2陽性上皮細胞の出現頻度

値は平均値±標準偏差を示す。

** : $P < 0.01$

図 4 腸絨毛における TLR-4 の免疫組織化学的検出結果

a) IV における TLR-4 の局在

IV のすべての MV の線条縁が TLR-4 陰性である。

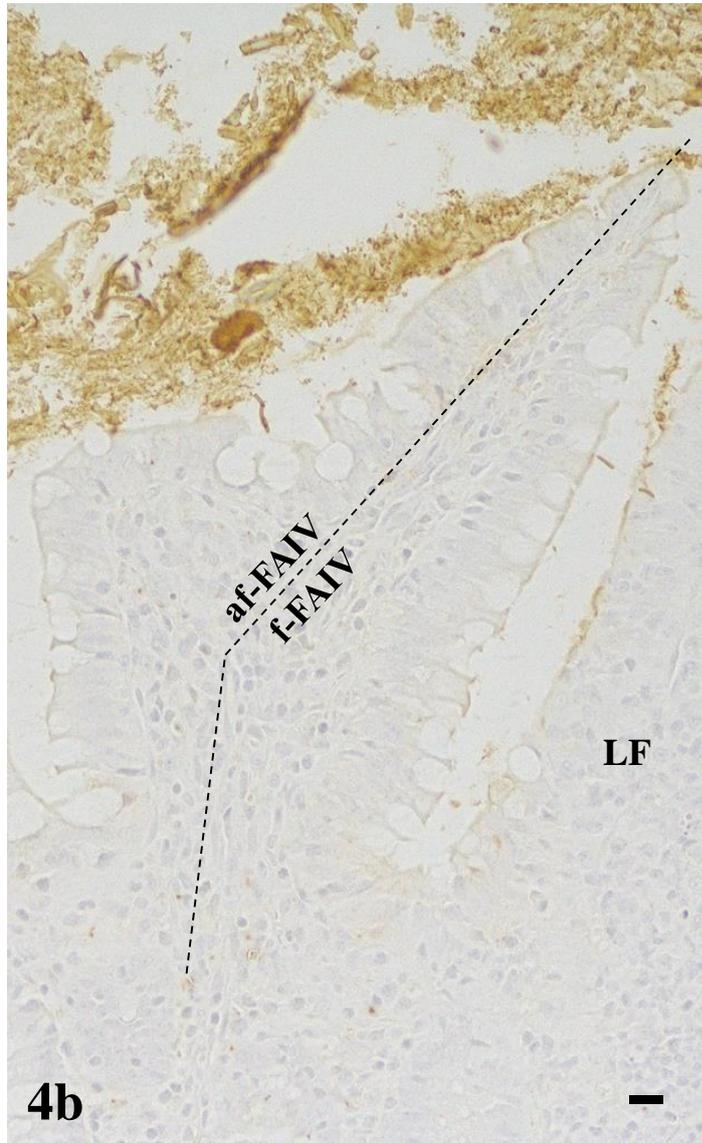
b) FAIV における TLR-4 の局在

af-FAIV および f-FAIV のすべての MV の線条縁が TLR-4 陰性である。

破線：af-FAIV と f-FAIV との間の境界線

Bar=10 μ m

対比染色：ヘマトキシリン染色



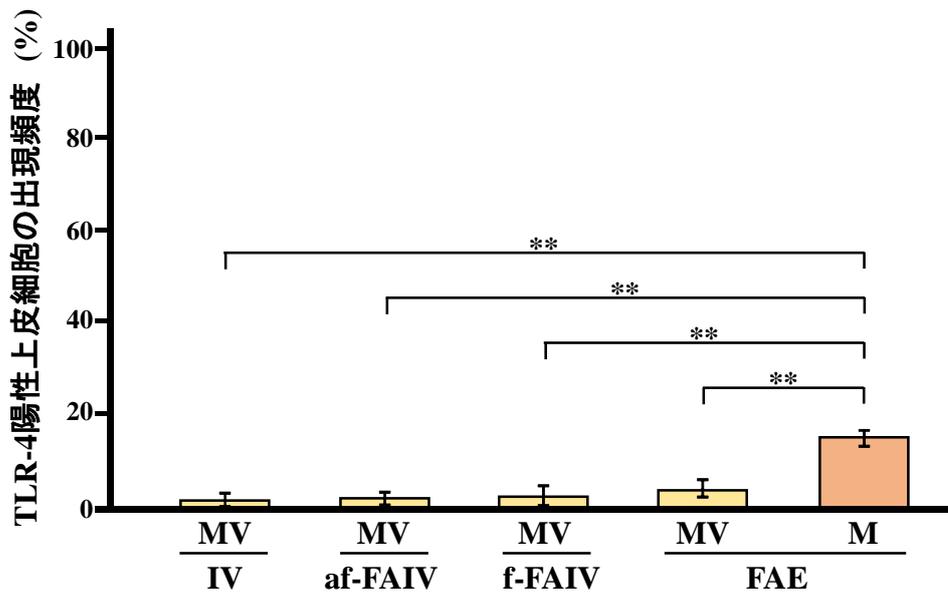


図5 腸絨毛およびリンパ小節におけるTLR-4陽性上皮細胞の出現頻度

値は平均値±標準偏差を示す。

** : $P < 0.01$

図 6 腸絨毛における TLR-9 の免疫組織化学的検出結果

a) IV における TLR-9 の局在

IV のすべての MV の線条縁が TLR-9 陰性である。

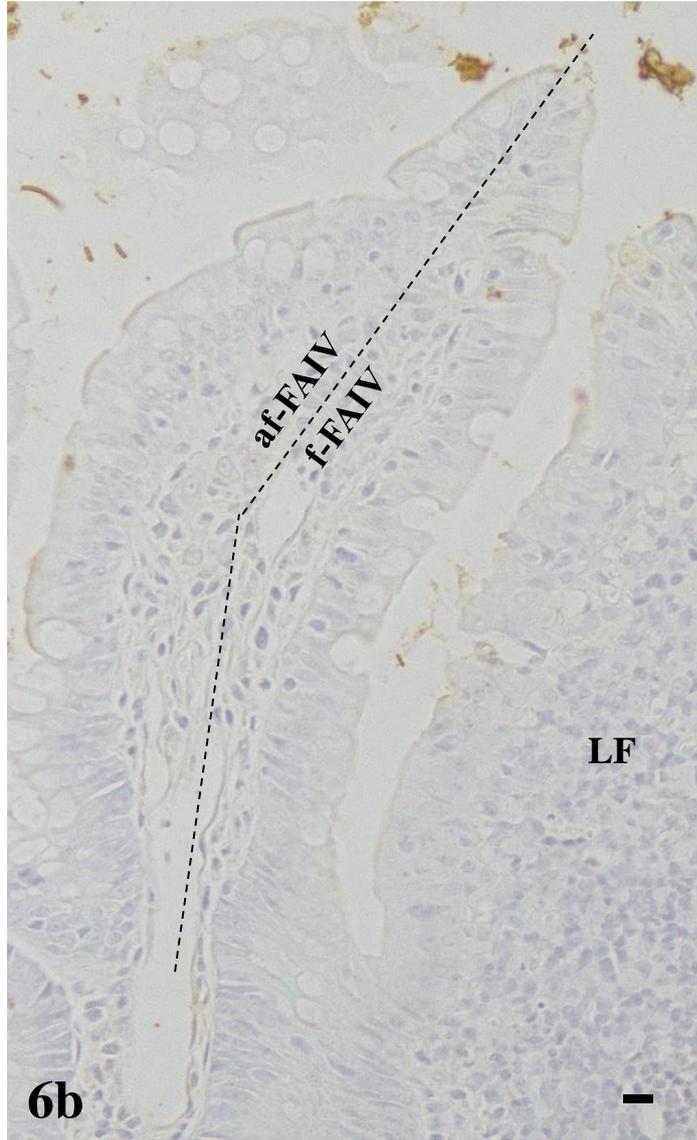
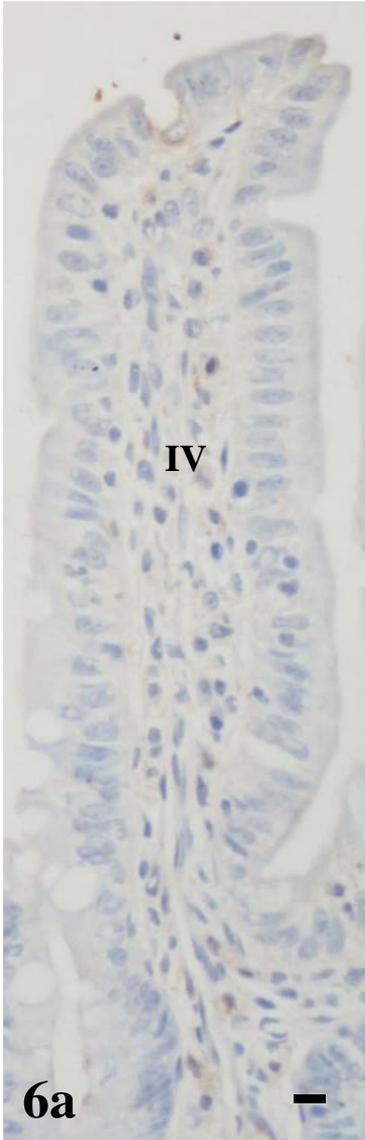
b) FAIV における TLR-9 の局在

af-FAIV および f-FAIV のすべての MV の線条縁が TLR-9 陰性である。

破線：af-FAIV と f-FAIV との間の境界線

Bar=10 μ m

対比染色：ヘマトキシリン染色



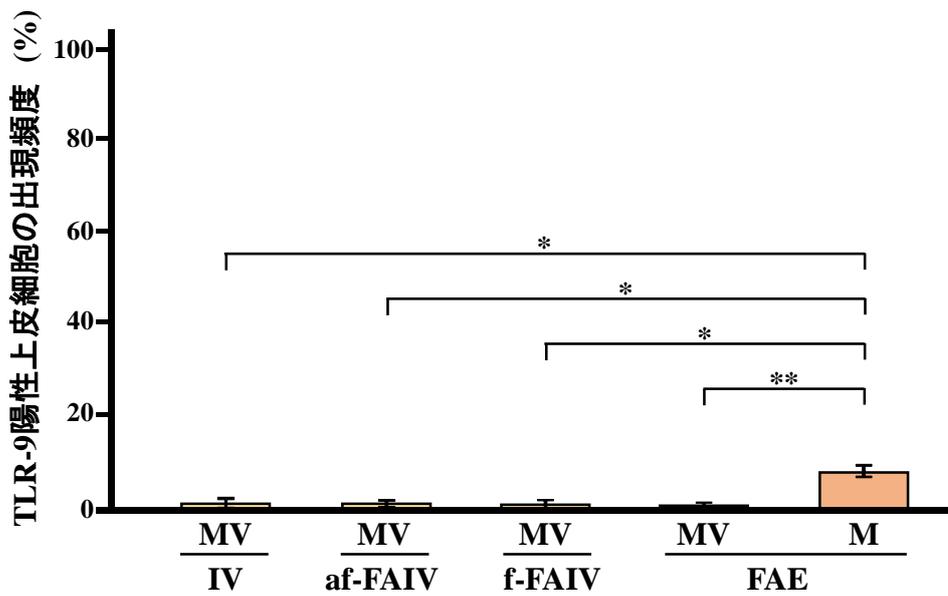


図7 腸絨毛およびリンパ小節におけるTLR-9陽性上皮細胞の出現頻度

値は平均値±標準偏差を示す。

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$

図 8 リンパ小節における TLR-2 の免疫組織化学的検出結果

a) FAE の低倍像

FAE 中のほぼすべての MV の線条縁が TLR-2 陰性である。リンパ小節の FAE 中に TLR-2 陽性を呈する M 細胞（矢印）が散在する。

b) 図 a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

M 細胞の基底側にはポケット（破線）が形成されており、その中には遊走細胞が存在している。M 細胞の遊離縁側の細胞膜が TLR-2 陽性を示している（矢印）。近傍の MV の線条縁は TLR-2 陰性である（矢頭）。

* :M 細胞のポケット内の遊走細胞の核

c) リンパ小節基部から中部における TLR-2 の分布

TLR-2 陽性 M 細胞（矢印）の腸陰窩側に位置する MV の線条縁は TLR-2 陰性である。

Bar=10 μm

対比染色：ヘマトキシリン染色

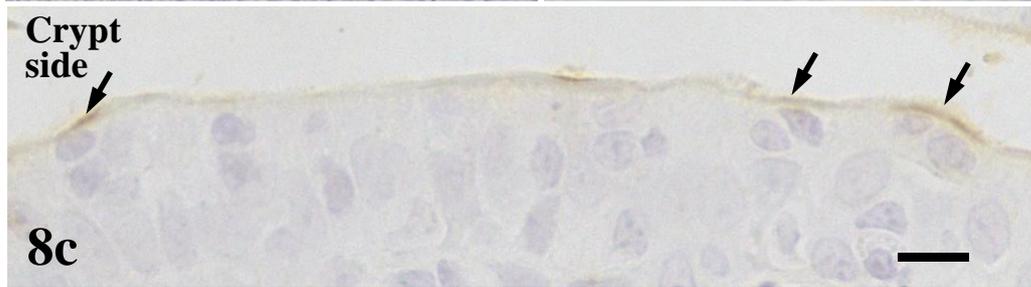
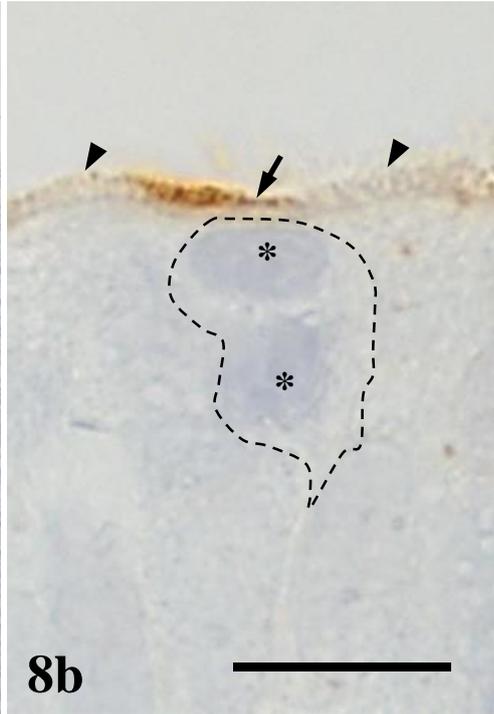
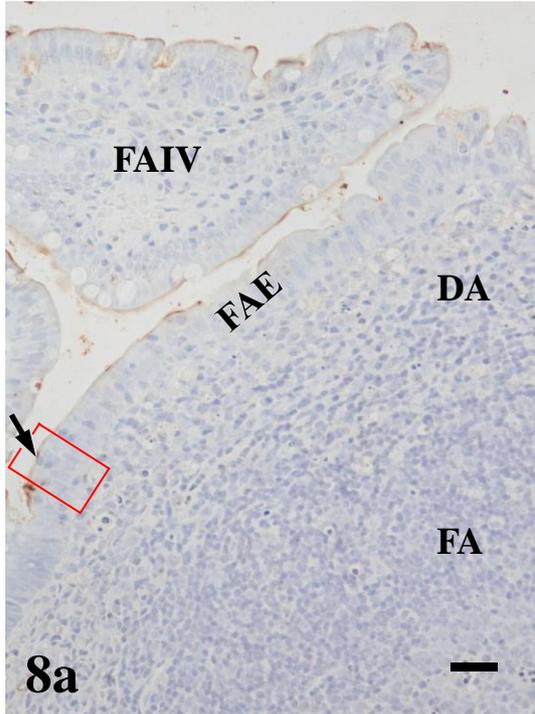


図 9 リンパ小節における TLR-4 の免疫組織化学的検出結果

a) FAE の低倍像

FAE 中のほぼすべての MV の線条縁が TLR-4 陰性である。リンパ小節の FAE 中に TLR-4 陽性を呈する M 細胞（矢印）が散在する。

b) 図 a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

M 細胞の基底側にはポケット（破線）が形成されており、その中には遊走細胞が存在している。M 細胞の遊離縁側の細胞膜が TLR-4 陽性を示している（矢印）。近傍の MV の線条縁は TLR-4 陰性である（矢頭）。

* :M 細胞のポケット内の遊走細胞の核

c) リンパ小節基部から中部における TLR-4 の分布

TLR-4 陽性 M 細胞（矢印）の腸陰窩側に位置する MV の線条縁は TLR-4 陰性である。

Bar=10 μ m

対比染色：ヘマトキシリン染色

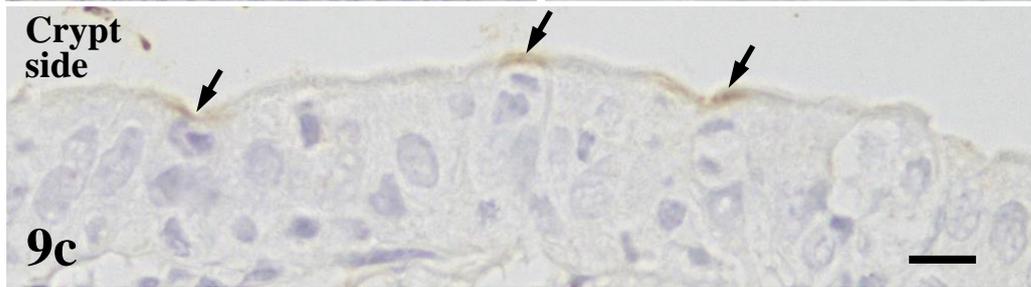
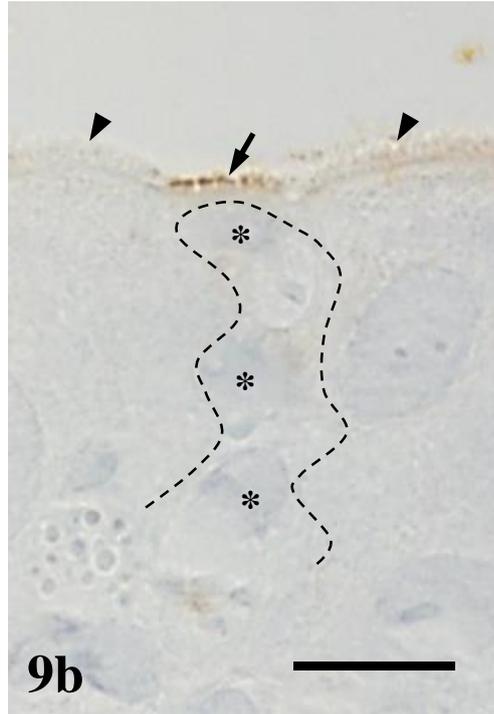
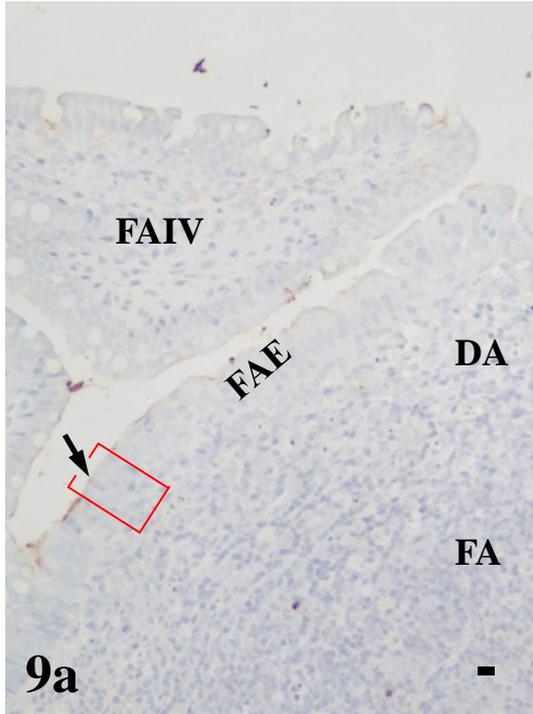


図 10 リンパ小節における TLR-9 の免疫組織化学的検出結果

a) FAE の低倍像

FAE 中のほぼすべての MV の線条縁が TLR-9 陰性である。リンパ小節の FAE 中に TLR-9 陽性を呈する M 細胞（矢印）が散在する。

b) 図 a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

M 細胞の基底側にはポケット（破線）が形成されており、その中には遊走細胞が存在している。M 細胞の遊離縁側の細胞膜が TLR-9 陽性を示している（矢印）。近傍の MV の線条縁は TLR-9 陰性である（矢頭）。

* :M 細胞のポケット内の遊走細胞の核

c) リンパ小節基部から中部における TLR-9 の分布

TLR-9 陽性 M 細胞（矢印）の腸陰窩側に位置する MV の線条縁は TLR-9 陰性である。

Bar=10 μ m

対比染色：ヘマトキシリン染色

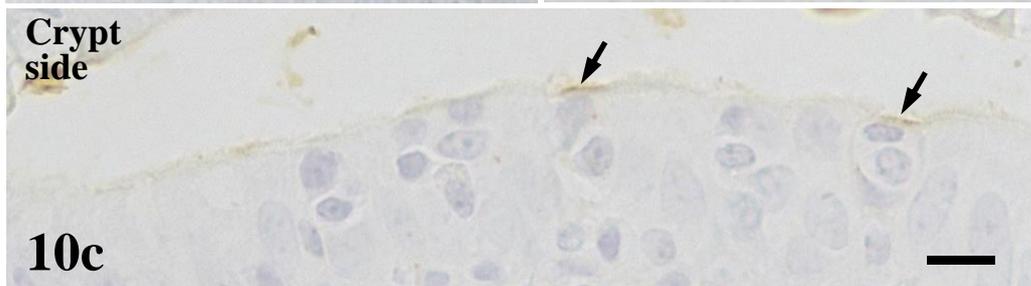
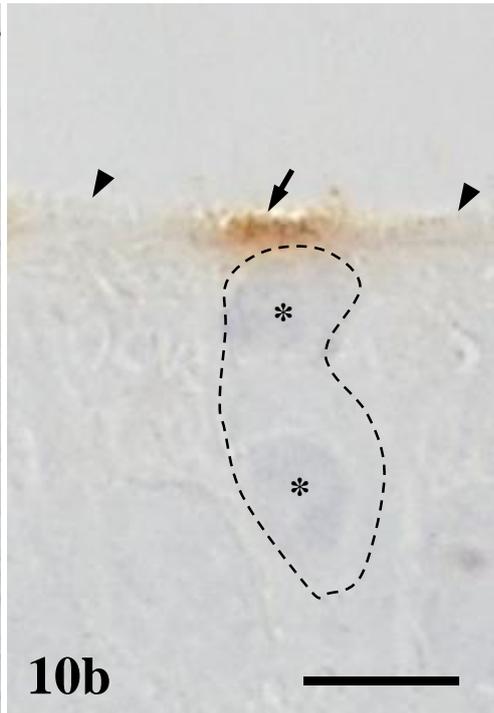
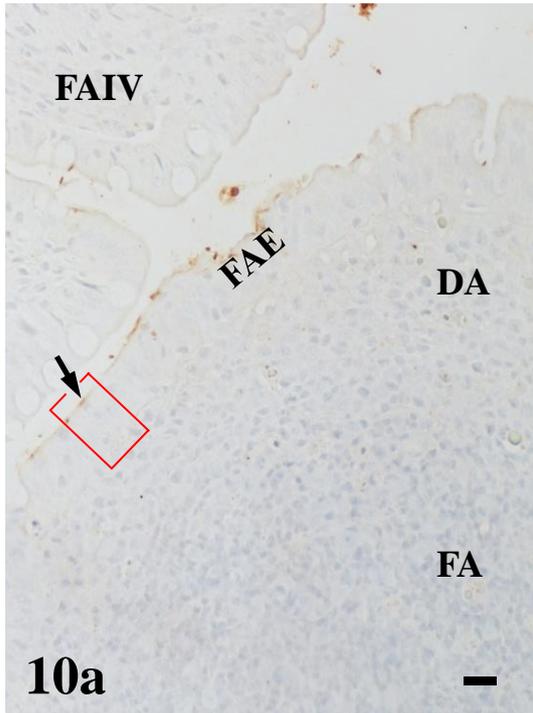


図 11 腸陰窩における TLR-2 の免疫組織化学的検出結果

a) IC における TLR-2 の局在

IC の MV の線条縁が TLR-2 陽性を示すとともに (矢印), 腸陰窩の内容物も顆粒状ないし雲状の強陽性を示している (矢頭)。

b) FAIC における TLR-2 の局在

FAIC の MV の線条縁が TLR-2 陽性を示すとともに (矢印), 腸陰窩の内容物も顆粒状ないし雲状の陽性を示している (矢頭)。

Bar=10 μ m

対比染色 : ヘマトキシリン染色

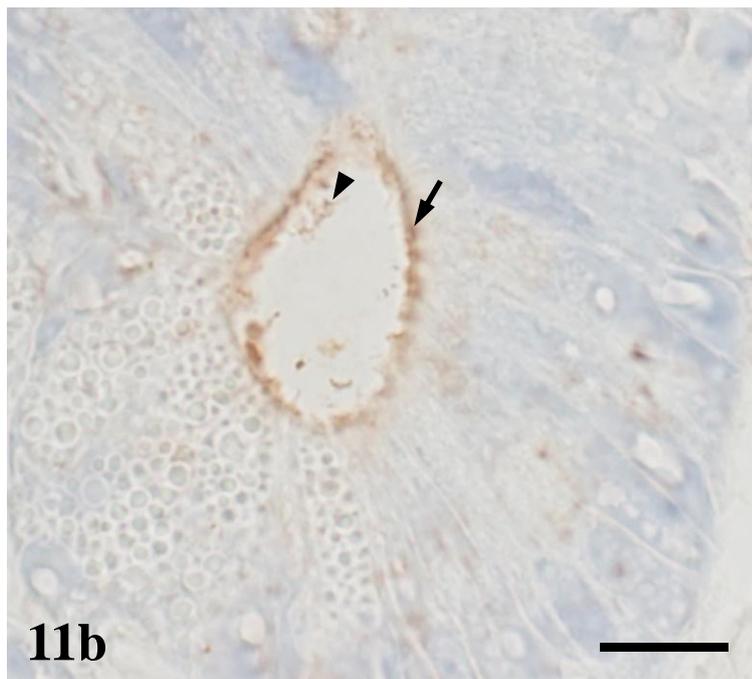


図 12 腸陰窩における TLR-4 の免疫組織化学的検出結果

a) IC における TLR-4 の局在

IC の MV の線条縁 (矢印) およびパネート細胞の分泌顆粒が TLR-4 陽性を示すとともに, 腸陰窩の内容物も顆粒状の陽性を示している (矢頭)。

b) 図 a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

パネート細胞の一部の分泌顆粒 (矢頭) が TLR-4 陽性を示している。

c) FAIC における TLR-4 の局在

FAIC の MV の線条縁 (矢印) およびパネート細胞の分泌顆粒が TLR-4 陽性を示すとともに, 腸陰窩の内容物も顆粒状ないし雲状の陽性を示している (矢頭)。

d) 図 c の赤枠で囲まれた部位の高倍像

パネート細胞の一部の分泌顆粒 (矢頭) が TLR-4 陽性を示している。

Bar=10 μ m

対比染色 : ヘマトキシリン染色

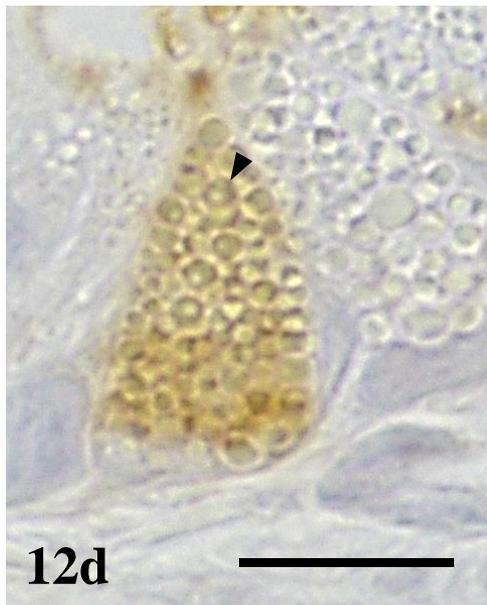
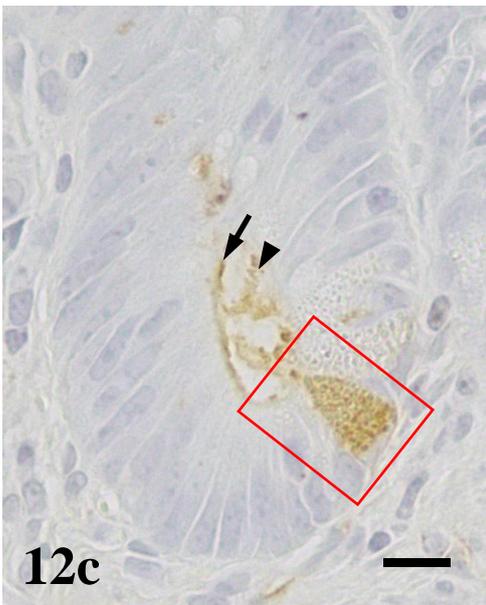
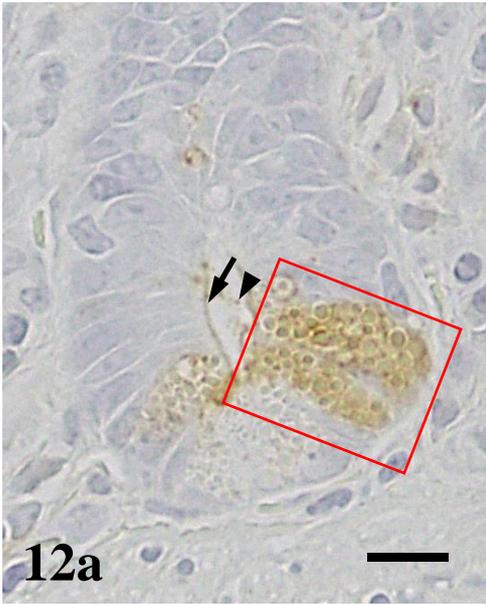


図 13 腸陰窩における TLR-9 の免疫組織化学的検出結果

a) IC における TLR-9 の局在

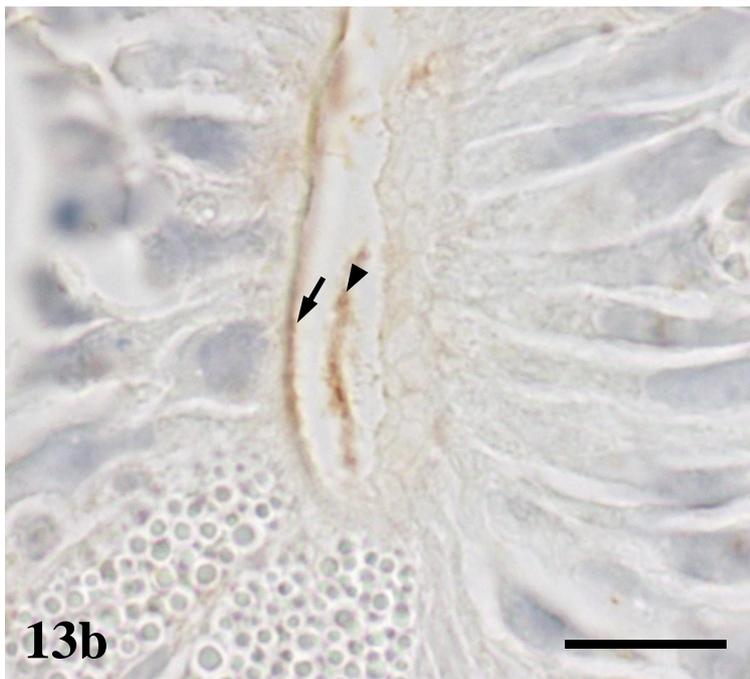
IC の MV の線条縁が TLR-9 陽性を示すとともに (矢印), 腸陰窩の内容物も顆粒状ないし雲状の陽性を示している (矢頭)。

b) FAIC における TLR-9 の局在

FAIC の MV の線条縁が TLR-9 陽性を示すとともに (矢印), 腸陰窩の内容物も顆粒状ないし雲状の陽性を示している (矢頭)。

Bar=10 μ m

対比染色 : ヘマトキシリン染色



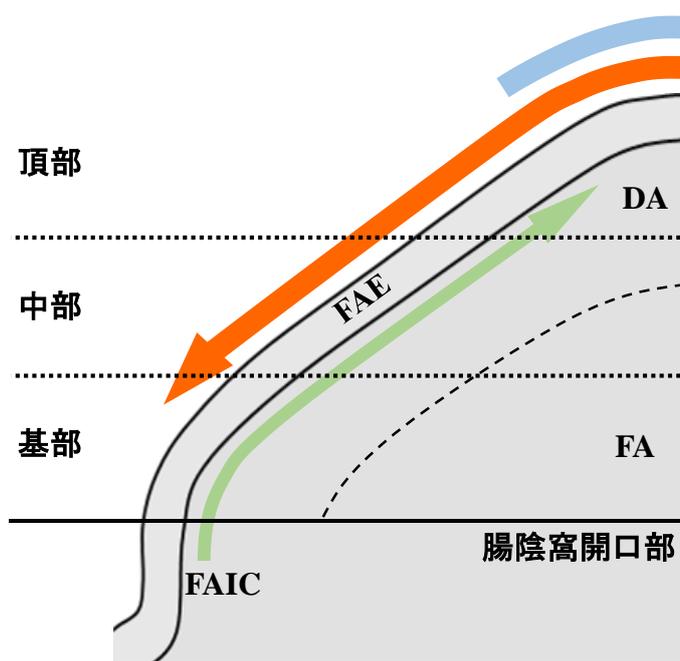


図14 リンパ小節上の細菌の増殖程度

青 棒：細菌が定着していないリンパ小節 (nb-LF)

赤矢印：細菌が定着したリンパ小節 (b-LF)

緑矢印：上皮の移動方向

破線：DAとFAの境界線

点線：LFの基部，中部および頂部の境界線

図 15 リンパ小節の一般組織像

a) nb-LF の FAE における M 細胞の分布

nb-LF の FAE 内には M 細胞（矢印）が散在しており，リンパ小節基部から中部の FAE では中程度みとめられ，頂部では少数である。

b) nb-LF の M 細胞の高倍像

FAE の MV 間に線条縁を有さず，基底側にポケットを有する M 細胞（矢印）が存在しており，そのポケット内に遊走細胞（*）が多数存在している。

c) b-LF の FAE における M 細胞の分布

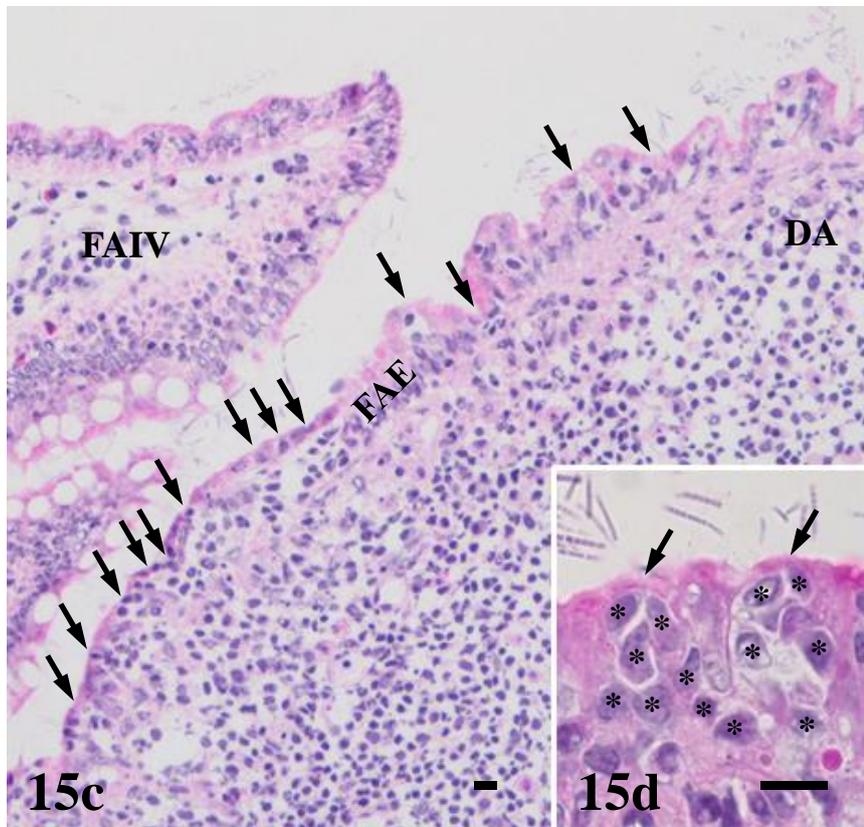
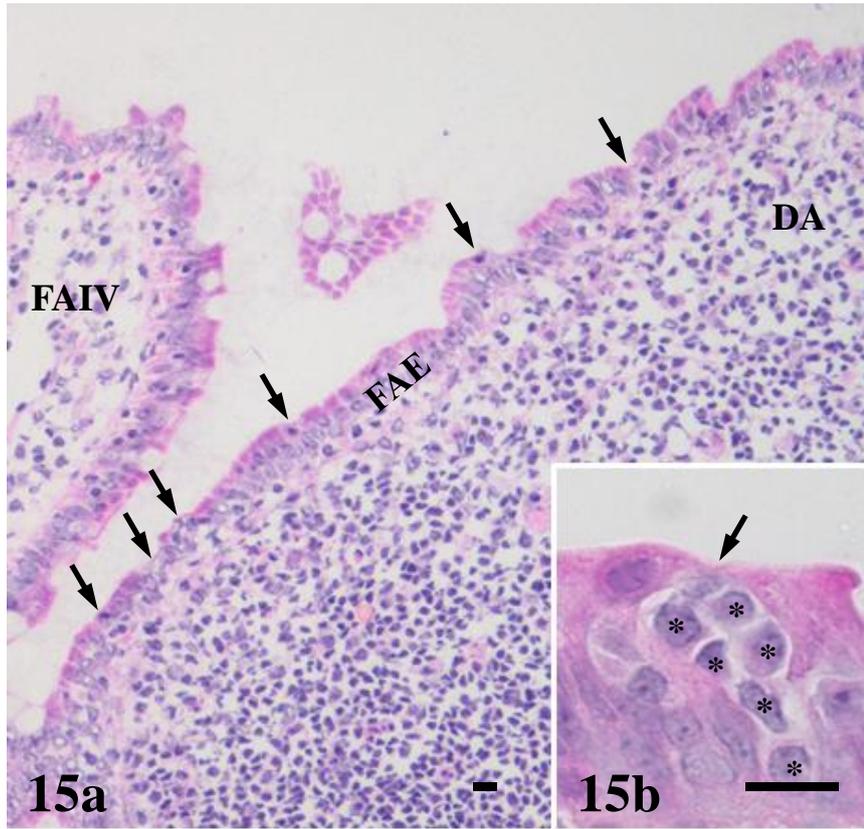
b-LF の FAE 全長で M 細胞（矢印）が多くみとめられる。

d) b-LF の M 細胞の高倍像

FAE 内において M 細胞（矢印）が隣接する M 細胞と繋がったポケットを有している。

Bar=10 μ m

染色：ヘマトキシリン・エオシン染色



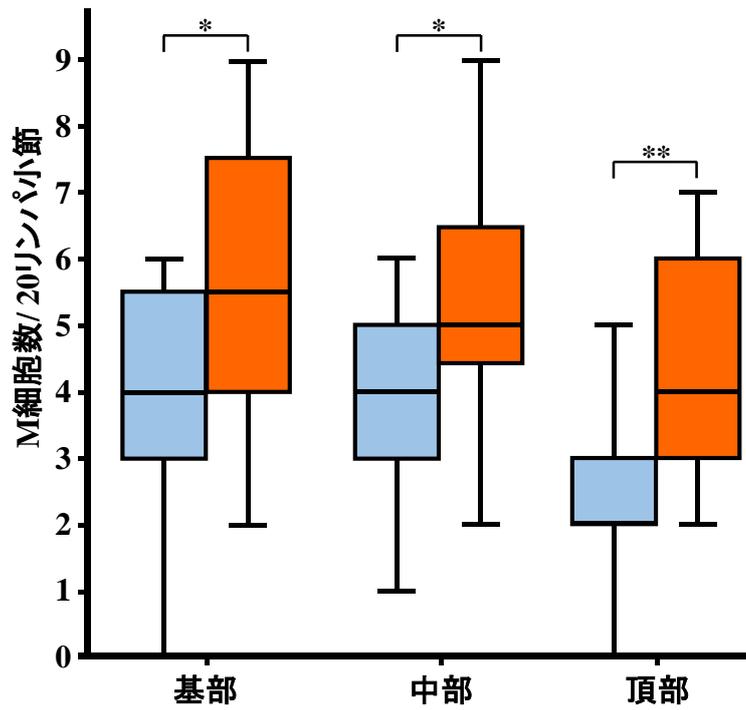


図16 nb-LF (■) およびb-LF (■) のFAE
におけるM細胞数

値は箱ひげ図を用いて最小値, 第1四分位,
中央値, 第3四分位および最大値を示す。

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$

図 17 リンパ小節の FAE 上に存在する細菌に対するグラム染色

a) LF の FAE 上に存在する細菌の性状

細菌は LF 全長の FAE 上に存在しており，これらの細菌はすべてグラム陰性桿菌である（矢頭）。

b) 図 a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

LF 頂部の FAE 上に存在する細菌の多くは頂部の MV に接着している（矢印）。

Bar=10 μ m

染色：グラム染色

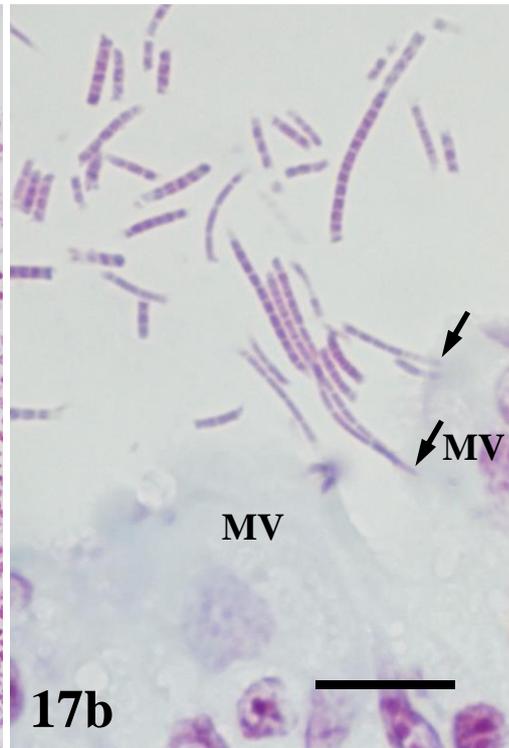
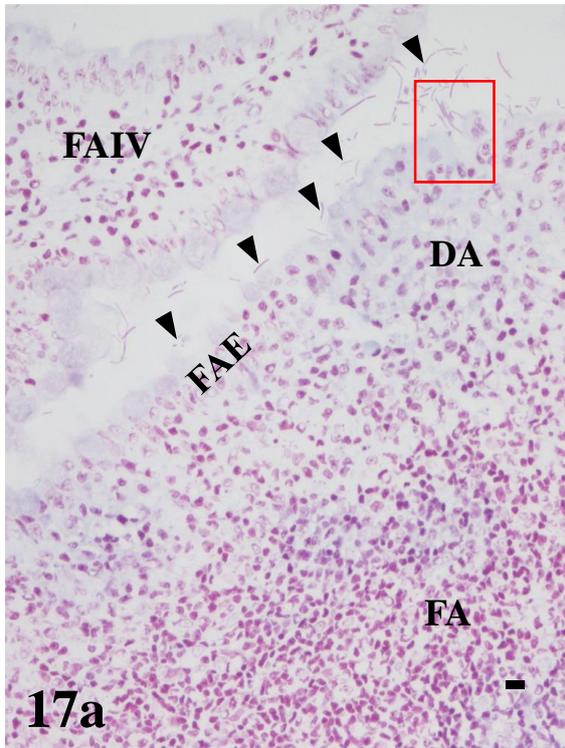


図 18 nb-LF および b-LF における TLR-2 の免疫組織化学的検出結果

1a) nb-LF の FAE における TLR-2 の局在

FAE 全長の MV の線条縁が TLR-2 陰性である。遊離縁側に TLR-2 陽性を呈する M 細胞 (矢印) が FAE 中に散在している。

1b) 1a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

M 細胞の遊離縁側が TLR-2 陽性を示しており (矢印), TLR-2 陽性 M 細胞の近傍に位置する MV の線条縁は TLR-2 陰性である (矢頭)。

* :M 細胞のポケット内の遊走細胞の核

2a) b-LF の FAE における TLR-2 の局在

LF 頂部の FAE では少数の MV の線条縁に TLR-2 陽性がみとめられるが, LF 基部から中部の FAE では MV は TLR-2 陰性である。遊離縁側に TLR-2 陽性を呈する M 細胞 (矢印) が FAE 中に散在している。

2b) 2a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

M 細胞の遊離縁側が TLR-2 陽性を示しており (矢印), TLR-2 陽性 M 細胞の近傍に位置する MV の線条縁は TLR-2 陰性である (矢頭)。

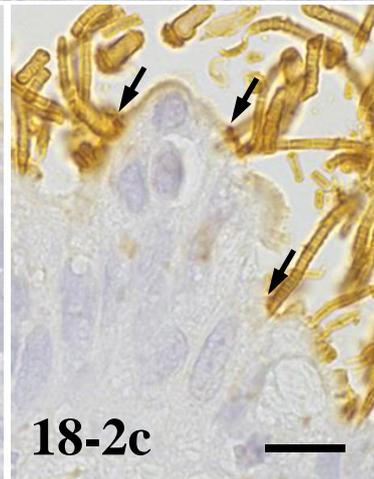
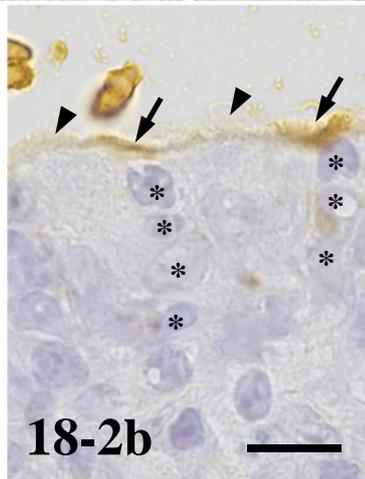
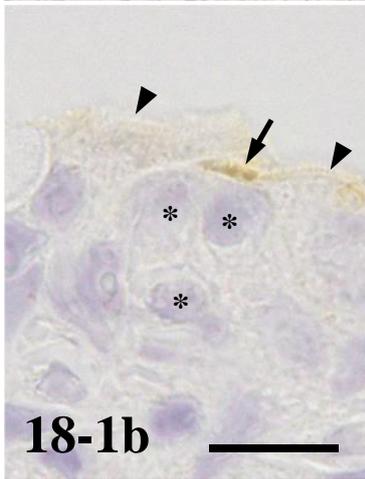
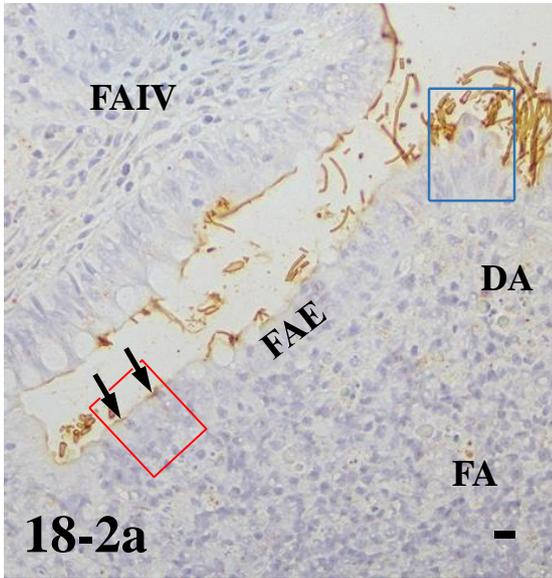
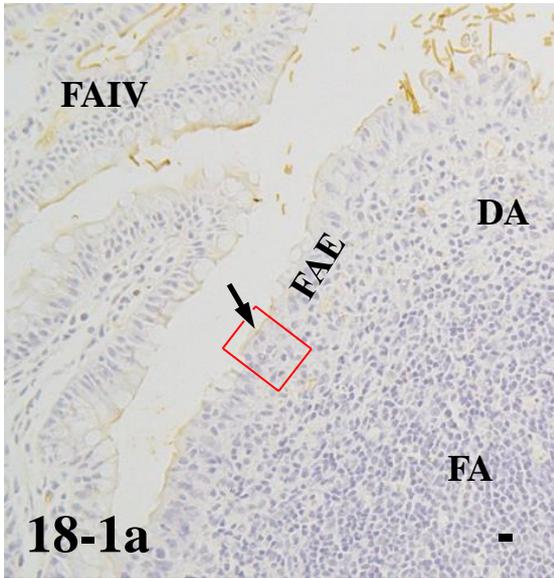
* :M 細胞のポケット内の遊走細胞の核

2c) 2a の青枠で囲まれた部位の高倍像

リンパ小節頂部の細菌が接着した MV の線条縁には TLR-2 陽性がみとめられる (矢印)。

Bar=10 μ m

対比染色 : ヘマトキシリン染色



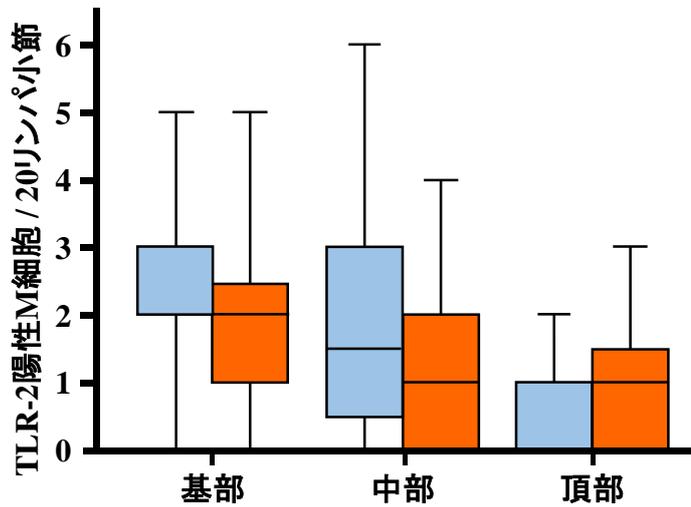
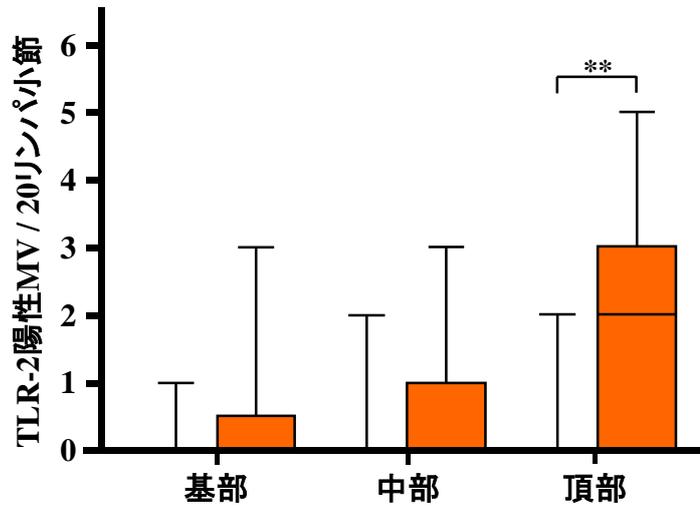


図19 nb-LF (■) およびb-LF (■) のFAEにおける
TLR-2陽性M細胞数およびTLR-2陽性MV数

値は箱ひげ図を用いて最小値, 第1四分位, 中央値, 第3四分位および最大値を示す。

** : $P < 0.01$

図 20 nb-LF および b-LF における TLR-4 の免疫組織化学的検出結果

1a) nb-LF の FAE における TLR-4 の局在

FAE 全長の MV の線条縁が TLR-4 陰性である。遊離縁側に TLR-4 陽性を呈する M 細胞 (矢印) が FAE 中に散在している。

1b) 1a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

M 細胞の遊離縁側が TLR-4 陽性を示しており (矢印), TLR-4 陽性 M 細胞の近傍に位置する MV の線条縁は TLR-4 陰性である (矢頭)。

* :M 細胞のポケット内の遊走細胞の核

2a) b-LF の FAE における TLR-4 の局在

FAE の多くの MV の線条縁および M 細胞 (矢印) の遊離縁側が TLR-4 陽性を示す。

2b) 2a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

M 細胞の遊離縁側が TLR-4 陽性を示しており (矢印), TLR-4 陽性 M 細胞の近傍に位置する MV の線条縁も TLR-4 陽性を示している (矢頭)。TLR-4 陽性微絨毛円柱上皮細胞の細胞質内には大小様々な小胞状の TLR-4 陽性がみとめられる (破線)。

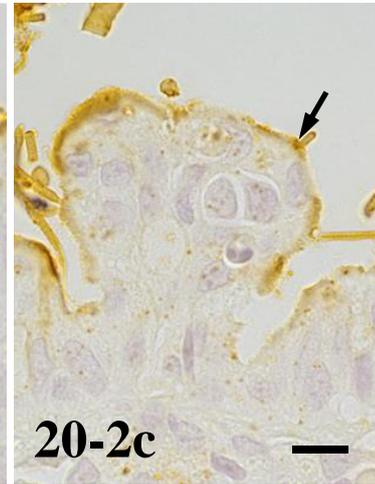
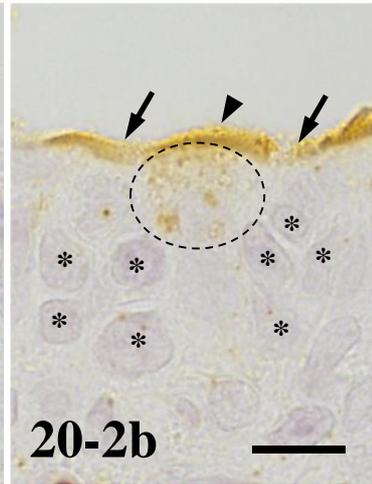
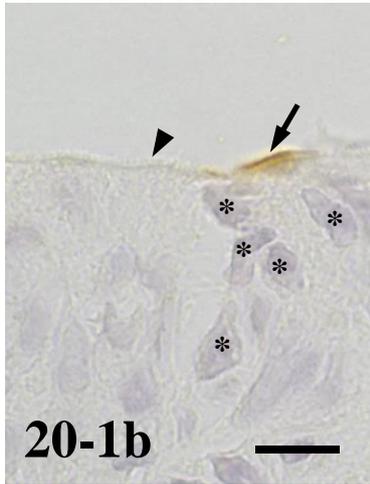
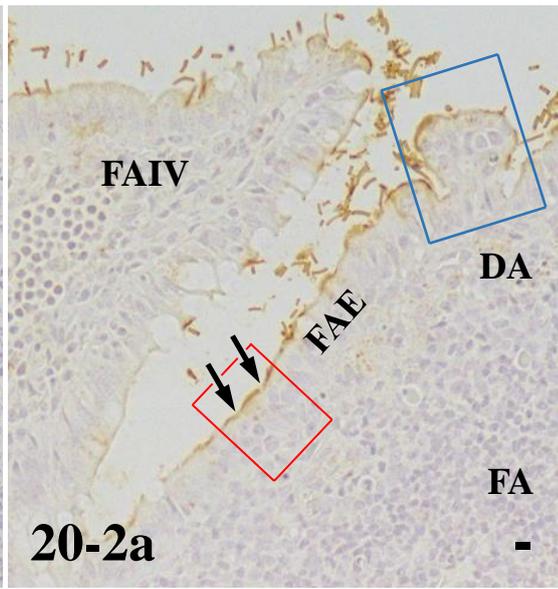
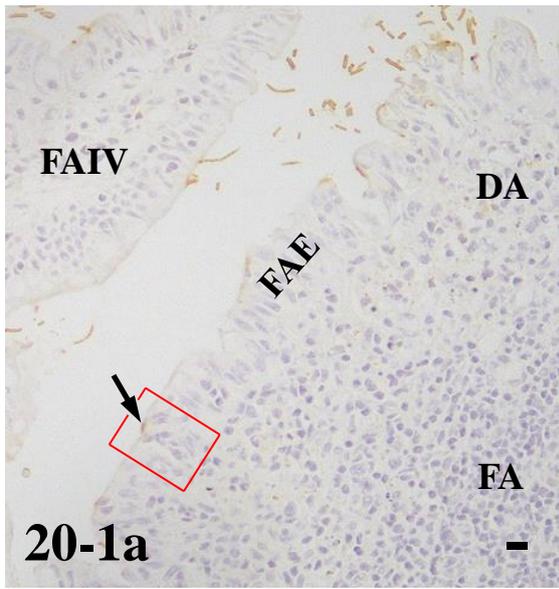
* :M 細胞のポケット内の遊走細胞の核

2c) 2a の青枠で囲まれた部位の高倍像

リンパ小節頂部の細菌が接着した MV (矢印) を含む多くの MV の線条縁において TLR-4 陽性がみとめられる。

Bar=10 μ m

対比染色 : ヘマトキシリン染色



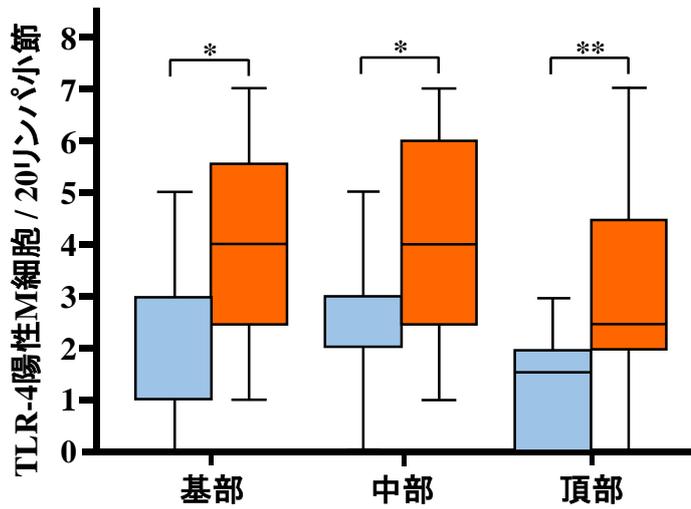
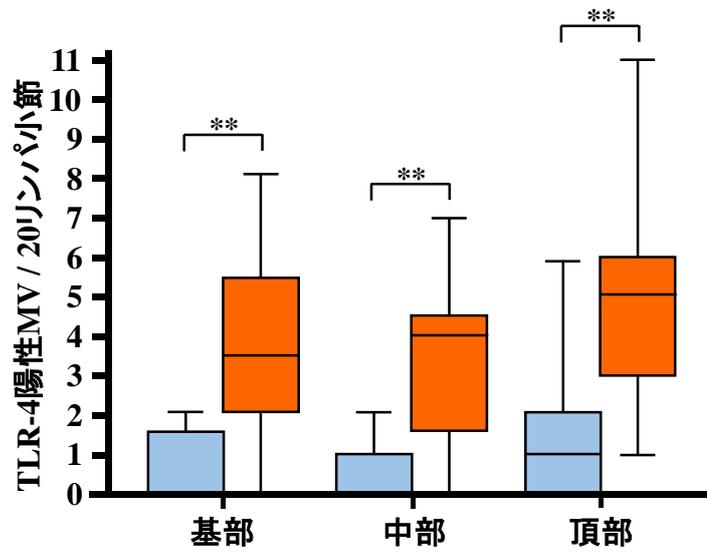


図21 nb-LF (■) およびb-LF (■) のFAEにおける TLR-4陽性M細胞数およびTLR-4陽性MV数

値は箱ひげ図を用いて最小値, 第1四分位, 中央値, 第3四分位および最大値を示す。

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$

図 22 nb-LF および b-LF における TLR-9 の免疫組織化学的検出結果

1a) nb-LF の FAE における TLR-9 の局在

FAE 全長の MV の線条縁が TLR-9 陰性である。遊離縁側に TLR-9 陽性を呈する M 細胞 (矢印) が FAE 中に散在している。

1b) 1a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

M 細胞の遊離縁側が TLR-9 陽性を示しており (矢印), TLR-9 陽性 M 細胞の近傍に位置する MV の線条縁は TLR-9 陰性である (矢頭)。

* :M 細胞のポケット内の遊走細胞の核

2a) b-LF の FAE における TLR-9 の局在

LF 頂部の FAE では少数の MV の線条縁に TLR-9 陽性がみとめられるが, LF 基部から中部の FAE の MV は TLR-9 陰性である。遊離縁側に TLR-9 陽性を呈する M 細胞 (矢印) が FAE 中に散在している。

2b) 2a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

M 細胞の遊離縁側が TLR-9 陽性を示しており (矢印), TLR-9 陽性 M 細胞の近傍に位置する MV の線条縁は TLR-9 陰性である (矢頭)。

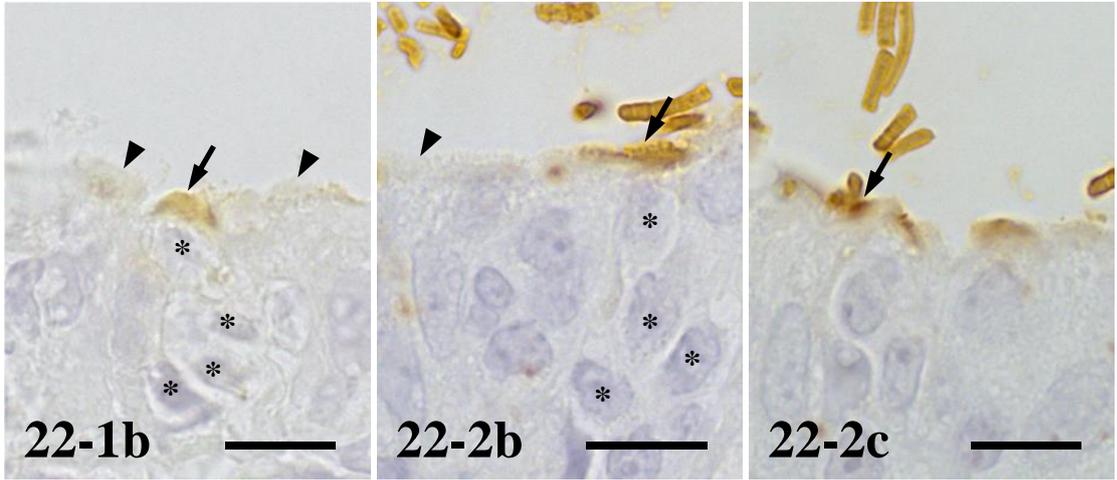
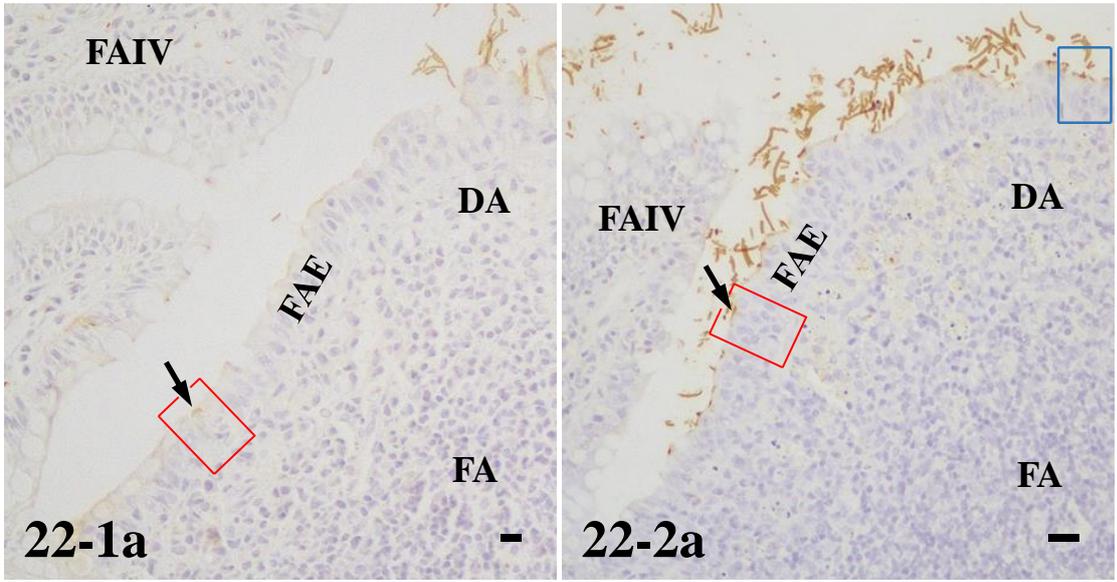
* :M 細胞のポケット内の遊走細胞の核

2c) 2a の青枠で囲まれた部位の高倍像

リンパ小節頂部の細菌が接着した MV の線条縁には TLR-9 陽性がみとめられる (矢印)。

Bar=10 μ m

対比染色 : ヘマトキシリン染色



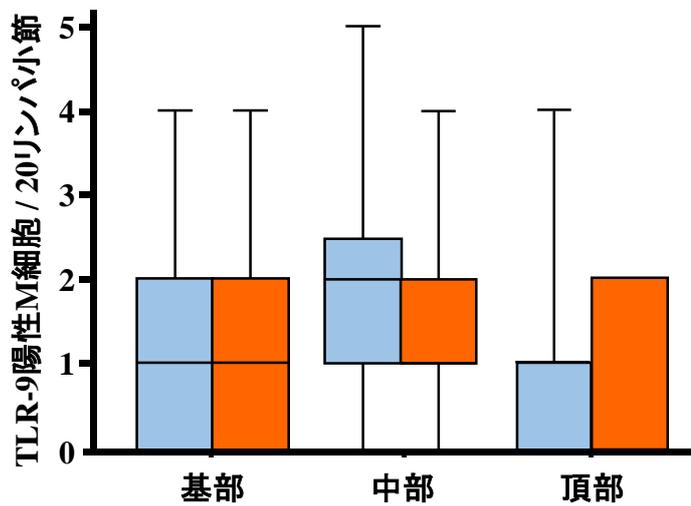
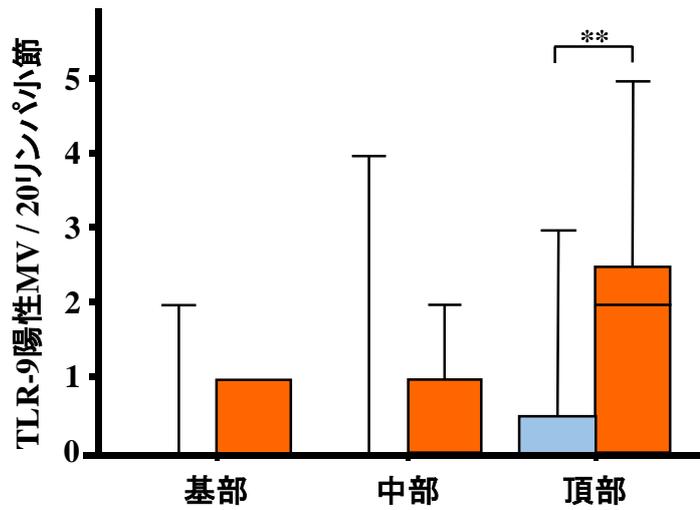


図23 nb-LF (■) およびb-LF (■) のFAEにおける
TLR-9陽性M細胞数およびTLR-9陽性MV数

値は箱ひげ図を用いて最小値, 第1四分位, 中央値, 第3四分位および最大値を示す。

** : $P < 0.01$

図 24 腸絨毛およびリンパ小節における RANK の免疫組織化学的検出結果

1a) 腸絨毛における RANK の局在

腸絨毛全長の上皮細胞が RANK 陽性を示しており, その陽性強度は基部で中程度であり, 頂部に向かうにつれて弱くなっている。

1b) 腸絨毛の粘膜固有層における RANK の局在

腸絨毛の粘膜固有層に RANK 陽性の遊走細胞 (*) が多数みとめられる。

2a) nb-LF における RANK の局在

FAE の M 細胞 (矢印) および微絨毛円柱上皮細胞の細胞質が中程度の陽性を示している。DA および FA に存在する多数の遊走細胞が RANK 陽性を示している。

2b) 2a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

FAE の MV (矢頭) の細胞質および M 細胞 (矢印) の細胞質 (破線) が RANK 陽性を示しており, M 細胞のポケット内に存在する遊走細胞 (*) にも RANK の陽性がみとめられる。

3a) b-LF における RANK の局在

FAE の M 細胞 (矢印) および微絨毛円柱上皮細胞の細胞質が中程度の陽性を示している。DA および FA に存在する多数の遊走細胞が RANK 陽性を示している。

3b) 3a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

FAE の MV (矢頭) の細胞質および M 細胞 (矢印) の細胞質 (破線) が RANK 陽性を示しており, M 細胞のポケット内に存在する遊走細胞 (*) にも RANK の陽性がみとめられる。

Bar=10 μ m

対比染色 : ヘマトキシリン染色

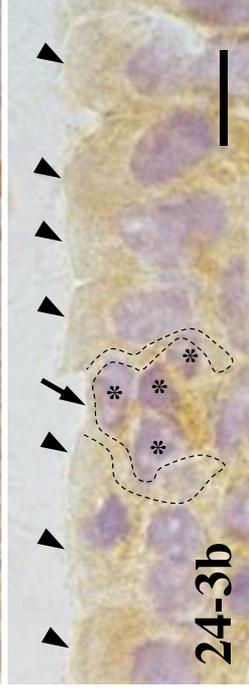
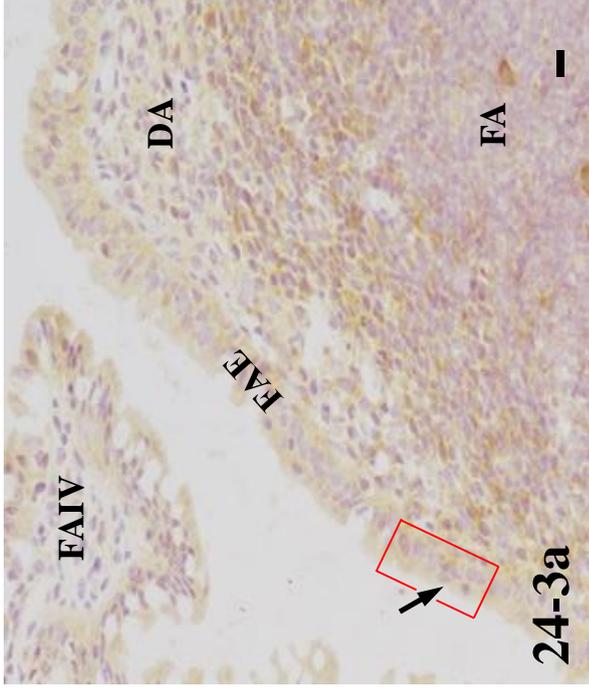
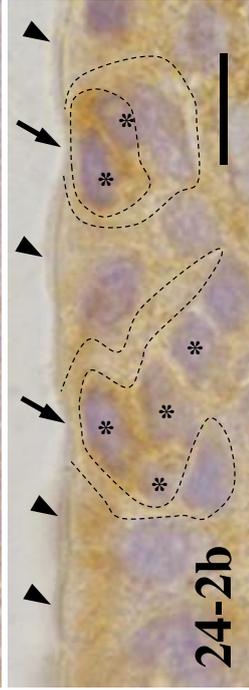
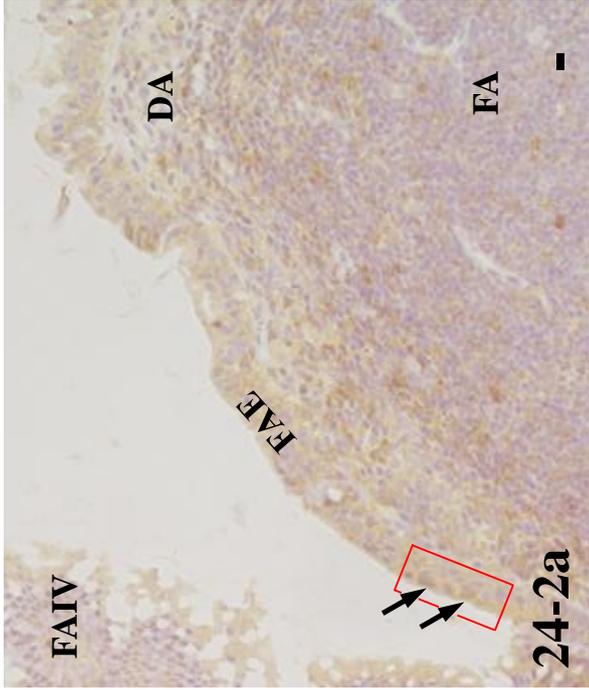
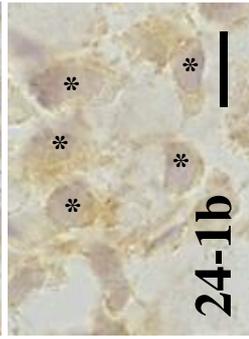
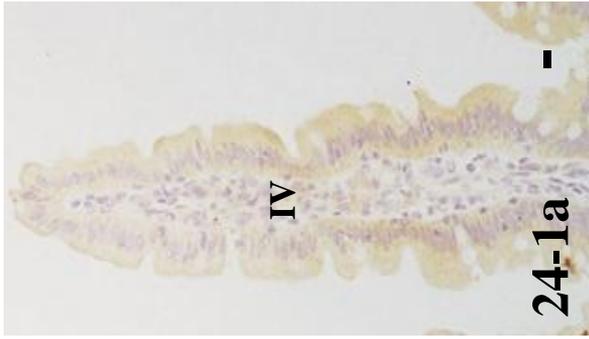


図 25 腸絨毛およびリンパ小節における RANKL の免疫組織化学的
検出結果

a) 腸絨毛における RANKL の局在

腸絨毛の構成組織は RANKL 陰性である。

b) nb-LF における RANKL の局在

LF の FAE は RANKL 陰性であり， DA および FA の間質細胞が RANKL 陽性を示している。陽性強度は FAE 直下の間質細胞で最も強く， FA に向かうにつれて弱くなっている。

破線： RANKL 陽性の間質細胞が密集した領域

c) b-LF における RANKL の局在

LF の FAE は RANKL 陰性であり， 上皮直下の間質細胞が RANKL 陽性を示している。陽性強度は FAE 直下の間質細胞で最も強く， FA に向かうにつれて弱くなっている。nb-LF と比べてリンパ小節の基部から中部で RANKL 陽性の間質細胞が密集した領域が広がっている。

破線： RANKL 陽性の間質細胞が密集した領域

Bar=10 μ m

対比染色：ヘマトキシリン染色

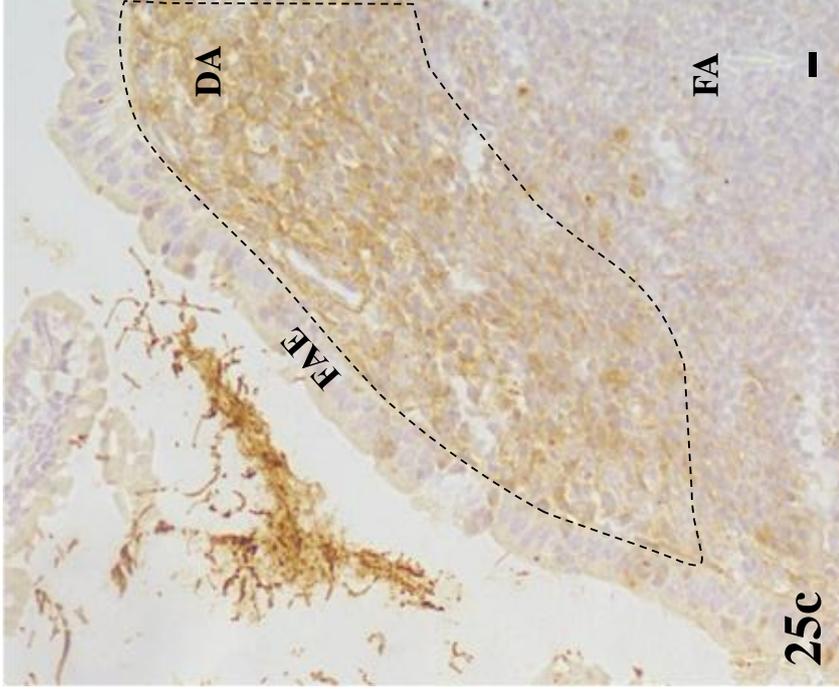
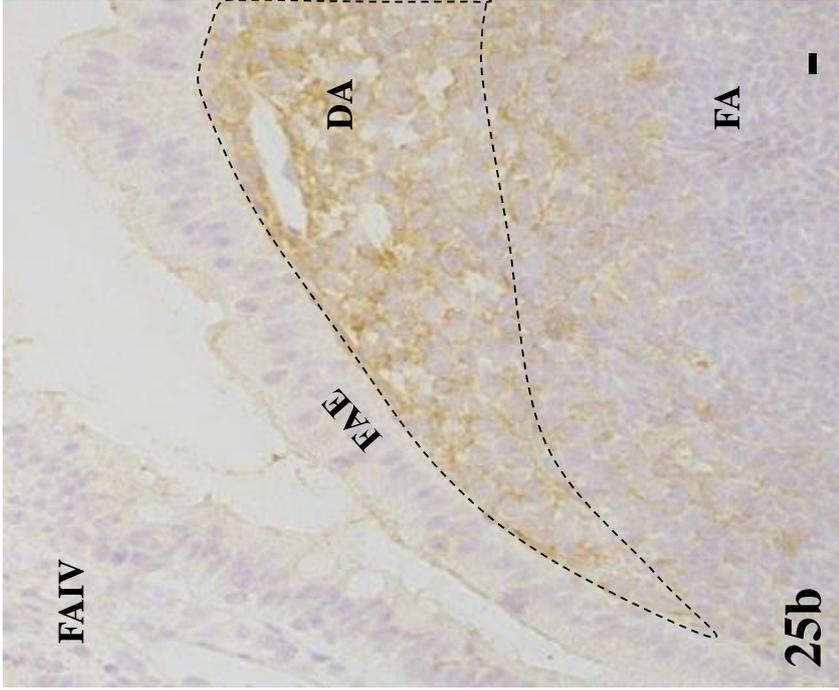
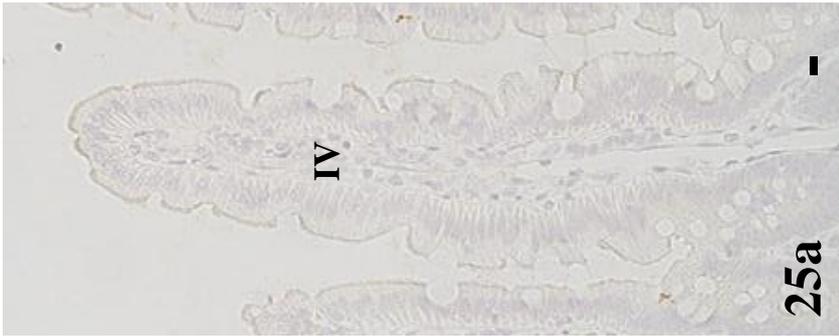


図 26 腸絨毛およびリンパ小節における活性型 caspase 3 の免疫組織化学的検出結果

1) 腸絨毛上皮における活性型 caspase 3 の局在

腸絨毛全長の上皮細胞が細胞質内に陽性を示しており，特に腸絨毛の先端部において強い陽性を示している。

2a) nb-LF の FAE における活性型 caspase 3 の局在

LF 頂部に活性型 caspase 3 陽性の MV が少数出現するが，FAE 全長の多くの MV および M 細胞は活性型 caspase 3 陰性である。

2b) 図 2a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

LF 頂部の少数の MV が細胞質内に活性型 caspase 3 強陽性を示している。

3a) b-LF の FAE における活性型 caspase 3 の局在

LF 頂部に活性型 caspase 3 陽性の MV が少数出現するが，FAE 全長の多くの MV および M 細胞は活性型 caspase 3 陰性である。

3b) 図 3a の赤枠で囲まれた部位の高倍像

LF 頂部において少数の MV が細胞質内に活性型 caspase 3 強陽性を示している。

Bar=10 μ m

対比染色：ヘマトキシリン染色

