Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-11

# 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。

別紙様式３（博士論文審査等内規第２条関係）

# 博士論文内容の要旨

氏　　名　湯浅　秀人

専攻・講座　資源生命科学専攻・応用動物学講座

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）

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

指導教員　北川　浩



動物の粘膜リンパ小節を被う濾胞被蓋上皮（FAE）には特殊な上皮細胞である“M 細胞”が存在する。この M 細胞の分化に関してラットのパイエル板を実験モデルとして M 細胞への形態学的な変化や M 細胞の分化誘導に関わる因子の一端が明らかにされてきており，現在まで FAE の微絨毛円柱上皮細胞の盛んな取り込みによる遊離縁側の細胞膜の消費が M 細胞への形態学的変化を招来することが明らかにされるとともに，FAE 上に存在する常在細菌に呼応して M 細胞への分化が促進されるとされている。この盛んな取り込みを誘導する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，微粒子とともに TLR のリガンドを腸管内腔に投与すると，M 細胞を介する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 FAE の上皮における TLR の発現と M 細胞への分化との関連については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るとされており，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属する腸絨毛（FAIV）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 は一般の腸絨毛および FAIV の先端部を除く全長の微絨毛円柱上皮細胞で陽性を示したが，FAIV のリンパ小節側の上皮の陽性強度は一般の腸絨毛および FAIV の対リンパ小節側の上皮に比べて弱く，陽性上皮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発現がみられなかった。また FAIC では一般の腸陰窩と同様，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 では一般の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。以上の所見から，粘膜上に細菌が存在し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。また FAIV のリンパ小節側上皮および FAE は，一般の腸絨毛の上皮と比べて細菌に対する認識能が弱いことに加えて，分泌型 TLR の分泌が FAIC でもおこなわれていることから，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。

第Ⅱ章では，ラット小腸パイエル板の FAE 上に常在細菌が存在しないリンパ小節（nb-LF）および存在するリンパ小節（b-LF）等における 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た。その結果，リンパ小節の FAE 上を深部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 TLR-4 が発現したが，TLR-2 および-9 は発現しなかった。また M 細胞の上流に隣接する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 TLR-4 陽性小胞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での TLR-4 リガンドの盛んな取り込みが M 細胞への分化を誘導し，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 nb-LF の FAE 全長で RANK の発現が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減弱したのに対し，M 細胞は主にリンパ小節基部から中部に集中して存在した。一方，b-LF では，nb-LF と同様に RANK の発現が FAE 全長でみとめられ，RANKL の発現が nb-LF と比べて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顕著に増加した。これらの所見から，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とが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ことが考えられた。一方，RANK は FAE および腸絨毛の上皮で発現したのに対し，RANKL 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られなかった。対照的に，活性型 caspase 3 の発現は腸絨毛全長の上皮細胞で発現しており，FAE ではリンパ小節頂部の少数の微絨毛円柱上皮細胞に限局して発現したことから，このリンパ小節での RANKL は M 細胞の分化に必要な FAE でのアポトーシスの抑制に貢献している可能性が考えられた。

以上，本博士論文では，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できた。すなわち，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の腸絨毛間隙よりも上皮による細菌に対する認識能が低い環境が形成されており，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が TLR-4 を発現して，この TLR-4 を介して M 細胞の分化が誘導される可能性を明らかにするとともに，リンパ小節における RANK/RANKL シグナリングが FAE におけるアポトーシスを抑制し，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。

（別紙１－１）　　論文審査の結果の要旨

| 氏名 | 湯浅　秀人 | | |
|---|---|---|---|
| 論文題目 | 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 | | |
| 審査委員 | 区　分 | 職　名 | 氏　　名 |
| | 主　査 | 教 授 | 北 川　浩 |
| | 副　査 | 教 授 | 河 野 潤 一 |
| | 副　査 | 教 授 | 星　信 彦 |
| | 副　査 | | 印 |

要　　旨

動物の消化管粘膜に存在するパイエル板は，食物抗原に対する免疫応答や経口免疫寛容の誘導に重要なリンパ組織である。このパイエル板のリンパ小節を被う濾胞被蓋上皮（FAE）には，消化管内腔に存在する抗原等を取り込み，免疫担当細胞へと送るＭ細胞が存在する。このＭ細胞への形態変化はFAE中に存在する微絨毛円柱上皮細胞が様々な腸管内腔の物質を取り込むことによって起こるとされるが，この取り込みに関与する受容体を含めた Ｍ 細胞への分化の仕組みついては殆ど明らかにされていない。近年，細菌やウイルスの構成成分である病原体関連分子パターンを認識するToll-like receptor (TLR) がFAEにおける腸管内腔に存在する物質の取り込みを増加させることが明らかにされているが，FAEの上皮細胞における TLR の発現と Ｍ 細胞への分化との関連については明らかにされていない。また，近年，RANK 及びRANKLがＭ細胞の分化に関与することが想定されてきたが，RANK/RANKLシグナルとＭ細胞への分化との関係については *in vivo* の観点からは明らかにされておらず，さらにRANK/RANKLシグナルのＭ細胞への分化に関わる仕組みについても明らかにされていない。一方，パイエル板の FAE では一般の腸絨毛の上皮に比べてアポトーシスの進行が遅れることが明らかにされており，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シグナルもまた上皮細胞のアポトーシスの抑制に関与することが明らかにされてきている。

前記の背景を受け，本博士論文の第Ｉ章では，常在細菌により誘導される Ｍ 細胞の分化に関与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及び-9の上皮細胞における発現状況を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等の上皮で調べ，FAEにおけるＭ細胞の分化と TLR との関係について明らかにすることを研究目的としている。また，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 及び-9 の発現状況を調べ，常在細菌の存在下における TLR の発現と Ｍ 細胞への細胞分化との関係を考察するとともに，RANK，RANKL 及び活性型 caspase 3 の詳細な局在を比較検討し，RANK/RANKLシグナルとＭ細胞への細胞分化，さらにはFAEにおけるアポトーシスとの関係について総合的に明らかにすることを研究目的としている。

第Ｉ章では，生理学的条件下のラット小腸を実験モデルとして，常在細菌が定着していないパイエル板のリンパ小節及びこれに付属する腸絨毛（FAIV）の上皮等における TLR-2，-4 及び-9 の局在を免疫組織化学的に精査している。その結果，パイエル板のリンパ小節を被うFAEではTLR-2，-4及び-9がＭ細胞の遊離縁側に発現するが，FAEの全長でＭ細胞の前駆細胞を含む微絨毛円柱上皮細胞にTLR-2，-4及び

（別紙１－２）　　論文審査の結果の要旨

| 氏名 | 湯浅　秀人 |
|---|---|

-9が発現しないことを明らかにしている。また，TLR-2は一般の腸絨毛及びFAIVの先端部を除く全長の微絨毛円柱上皮細胞で発現するが，FAIVのリンパ小節側の上皮におけるTLR-2の陽性強度が一般の腸絨毛及びFAIVの対リンパ小節側の上皮に比べて弱く，TLR-2陽性上皮細胞の出現頻度も有意に低いことを明らかにしている。さらに，リンパ小節に付属する腸陰窩 (FAIC) では一般の腸陰窩と同様に上皮細胞の線条縁及び内腔の物質がTLR-2，-4及び-9陽性を示し，パネート細胞の分泌顆粒もまたTLR-4陽性を示すことを明らかにしている。以上の所見から，第Ｉ章では，FAE 上に細菌が存在しないパイエル板のリンパ小節の FAE では，TLR-2，-4 及び 9 がＭ細胞への分化に直接的には関与せず，微絨毛円柱上皮細胞がＭ細胞へ分化した後に TLR が発現することを明らかにしている。また，FAIVのリンパ小節側上皮及びFAEは，一般の腸絨毛の上皮と比べて細菌に対する認識能が弱いことに加えて，FAICから分泌型TLRが分泌されることから，FAIVのリンパ小節側上皮とFAEとの間隙には一般の腸絨毛間の間隙に比べて常在細菌の定着を許容する環境が形成されていることを考察している。

第Ⅱ章では，生理学的条件下にあるラットを用いて，小腸パイエル板の FAE 上に常在細菌が存在しないリンパ小節（nb-LF）及び常在細菌が存在するリンパ小節（b-LF）等における TLR-2，-4，-9，RANK，RANKL 及び活性型 caspase 3 の局在を免疫組織化学的に精査し，比較検討している。その結果，FAE 上をグラム陰性菌がリンパ小節の深部まで増殖した場合には，FAE の微絨毛円柱上皮細胞に TLR-2 及び-9 は発現しないが，TLR-4 が発現し，さらに，Ｍ細胞の上流側に隣接する微絨毛円柱上皮細胞が TLR-4 を発現するとともに，この細胞の細胞質に TLR-4 陽性小胞が存在することを明らかにしている。また，nb-LF では FAE の全長で RANK が発現し，FAE 直下の間質細胞で発現する RANKL 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減弱するが，Ｍ細胞は主にリンパ小節基部から中部に集中して出現することも明らかにしている。一方，b-LF の FAE における RANK の発現は nb-LF の場合と同様であり，RANKL の発現が nb-LF と比べてリンパ小節の基部から中部で強くなるのに対して，Ｍ細胞がリンパ小節の頂部で顕著に増加することから，リンパ小節における RANKL の局在とＭ細胞の出現及び増加部位とが対応しないことを明らかにしている。加えて，RANK は FAE 及び腸絨毛の上皮で発現し，RANKL は FAE 直下の間質で発現するが，腸絨毛の間質では発現しないのに対して，活性型 caspase 3 はリンパ小節頂部の少数の上皮細胞に限局して発現するが，腸絨毛では全長の上皮細胞に発現することを明らかにしている。以上の所見から，第Ⅱ章では，パイエル板の FAE では，TLR-4 陽性の微絨毛円柱上皮細胞による TLR-4 リガンドの盛んな取り込みがＭ細胞への分化を誘導するが，RANK 及び RANKL がＭ細胞の分化を直接誘導するのではなく，Ｍ細胞の分化に必要とされる FAE でのアポトーシスを抑制して未分化な上皮内環境の維持に貢献することを考察している。

以上，本博士論文では，ラット小腸のパイエル板リンパ小節を被う FAE 及び FAIV の上皮における TLR 発現の特異性及び FAE におけるＭ細胞への分化の仕組みの一端を明らかにしている。したがって，本学位論文はヒトや動物の消化管における生体防御機構の解明に新たな基礎的知見を提供するとともに，畜産学，獣医学及び医学の発展に大きく貢献するものと考えられ，価値ある研究成果の集積であると認める。よって，学位申請者の湯浅秀人氏は，博士（農学）の学位を得る資格があると認める。