



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

(氏名：湯浅 秀人 NO. 2)

の陽性のみとめられた。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および活性化型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、活性化型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。

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			
<p>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に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係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<i>in vivo</i>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。</p> <p>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及び活性化型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。</p> <p>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</p>			

氏名	湯浅 秀人
<p>-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。</p> <p>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及び活性化型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、活性化型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細胞の分化に必要なとされる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。</p> <p>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。</p>	