

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07766

研究課題名(和文)消化管における分泌型の補体系による生体防御機構の解明

研究課題名(英文)Clarification of the secretory complement system in alimentary tract

研究代表者

北川 浩(KITAGAWA, Hiroshi)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：40125307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの消化器系及び呼吸系の全長における補体成分C3及びC4の分泌細胞を同定し、その分布を明らかにすることができた。また小腸及び大腸の全長においてアポトーシス後期の微絨毛円柱上皮細胞から腸管内腔の補体成分の吸収が起こることを免疫組織化学的に明らかにするとともに、上皮直下の粘膜固有層に存在する毛細血管へ直接輸送されることを明らかにした。さらに従来補体成分の主要な産生場所は肝臓とされてきたが、消化管内腔へは肝臓から分泌されないことも明らかにした。また、一部の補体成分や補体受容体の消化器系や呼吸器系の粘膜における詳細な分布を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：The research achievements on the secretory complement and complement receptors in alimentary tract and respiratory tract of rats are as follows: the clarification of the distribution of secretory cells of C3 and C4 throughout both rat alimentary tracts and respiratory tract, the clarification of the resorption of the luminal C3 and C4 by microvillous epithelial cells with late apoptosis stage and the direct transportation of C3 and C4 into the subepithelial blood capillaries, the clarification of no production of C3 and C4 into intestinal lumen from the liver which is the main production site of C3 and C4 in the body, the clarification of the distribution of some elements of complement and a part of complement receptors throughout both rat alimentary tracts and respiratory tract.

研究分野：組織生理学

キーワード：生体防御機構 消化器系 呼吸器系 補体 自然免疫 常在細菌 Toll-like receptor 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

人や動物の組織内では古くから補体系の詳細が明らかにされてきたが、近年、これとは別に消化管等の内腔に補体系の成分が存在することが報告されている。補体系は生体内の血液や組織では一連の反応過程を経て様々な病態や防御効果を作り出すとされるが、これらの複雑で繊細な一連の反応は物理・化学的変動の激しい消化管内腔では起こり得ないと考えられており、消化管内腔における補体系成分の役割については全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

従来申請者等が解明してきた常在細菌と宿主との応答や定着の仕組みに関する基礎的な研究成果を基に、*in vivo*での視点を基盤として消化管内腔における補体系成分の分泌部位並びに受容体等に関する基礎的知見を明らかにするとともに、常在細菌に対する各種防御応答への補体系の関与の有無等を探り、併せて最終的に消化管における分泌型補体系の役割の一端を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 健康なラットの回腸粘膜の凍結標本作製し、抗 C1q 抗体や各種遊走細胞マーカーに対する抗体等を用いて補体成分 C1q の分布を免疫組織化学的に調べた。

(2) 健康なラットの小腸全長の凍結標本作製し、各種補体受容体や遊走細胞マーカーに対する抗体等を用いて免疫組織化学的に調べた。

(3) 健康なラットの小腸パイエル板の凍結標本作製し、lysozyme や各種遊走細胞マーカーに対する抗体等を用いて主に遊走細胞を中心に免疫組織化学的に調べた。

(4) 健康なラットの小腸全長のパラフィン標本作製し、C3 及び C4 に対する抗体等を用いて分泌細胞等の分布を免疫組織化学的に調べた。

(5) 健康なラットの小腸パイエル板の凍結標本作製し、各種 Toll-like receptor や RANK 及び RANKL に対する抗体等を用いて M 細胞への分化の仕組みを免疫組織化学的に調べ、併せてパイエル板における常在細菌の増殖との関係を調べた。

(6) 健康なラットの呼吸器系の全長のパラフィン標本作製し、C3 及び C4 に対する抗体等を用いた免疫組織化学的方法によってその分泌部位を特定するとともに、粘膜上皮細胞における補体受容体の分布について調べた。

(7) 健康なラット空腸の凍結標本作製し、乳ビ球 (キロミクロン) の輸送経路と仕組みを探るために VLDL 受容体や LDL 受容体に対する抗体を用いて免疫組織化学的に調べた。

(8) 健康なラットの呼吸器系の全長のパラフィン標本作製し、lysozyme, phospholipase A2, β -defensin1 及び β -defensin2 に対する抗体を用いて分泌細胞の分布等を免疫組織化学的に精査した。

4. 研究成果

(1) 回腸の一般粘膜では上皮に C1q が存在せず、腸陰窩の上皮および内腔にも存在しないことから、回腸の内腔に存在する食餌性由来の抗原抗体複合体は C1q とは結合しておらず、腸管内腔より組織内に取り込まれた後に C1q と結合する可能性を明らかにした。粘膜固有層の遊走細胞のみに C1q 陽性が検出されたが、CD11b, CD11c 及び CD103 は陰性であった。一方、大部分の C1q 陽性細胞は CD68 陽性で、CD68 陰性・C1q 陽性遊走細胞に比べて多数存在し、特に腸絨毛頂部に多く分布することやその一部が上皮へ細胞突起を伸長していた。以上の所見と上皮細胞におけるアポトーシスの進行状況や特異抗体を介した内腔抗原の取込み部位とを比較した結果、CD68 陽性・C1q 陽性の食細胞は上皮細胞のアポトーシスの促進や制御に関与する食細胞であり、上皮へ細胞突起を伸長させることによって内腔から取り込まれた抗原抗体複合体を含む細胞断片等を捕捉して経口免疫寛容の維持等に貢献している可能性があることを明らかにした。

(2) 小腸全長の粘膜上皮には補体受容体 CD11b が存在せず、CD11b・CD68 陽性食細胞、CD11b・CD103 陽性樹状細胞、CD11b・CD8 陽性 T 細胞、CD11b・CD3 陽性好酸球及び CD11b・IgG ないし IgA 陽性形質細胞が特定部位の上皮や粘膜固有層に局在することを明らかにした。

(3) 小腸の腸絨毛には lysozyme 陽性の遊走細胞が存在が、パイエル板濾胞被蓋上皮直下には lysozyme 並びに pan-cytokeratin 陽性 CD11b/c 陽性樹状細胞が高密度に存在し、常在細菌の増殖に呼応して増数することを明らかにした。

(4) 消化管全長において、補体成分 C3 及び C4 を分泌する外分泌腺を特定することができた。また小腸及び大腸の全長においてアポトーシス後期の微絨毛円柱上皮細胞から腸管内腔の補体成分の吸収が起こることを免疫組織化学的に明らかにするとともに、上皮直下の粘膜固有層

に存在する毛細血管へ直接輸送されることを明らかにした。さらに従来補体成分の主要な産生場所は肝臓とされてきたが、消化管内腔へは肝臓から分泌されないことも明らかにした。

(5) 常在細菌が増殖していない条件下ではパイエル板濾胞被蓋上皮に存在する M 細胞の分化に Toll-like receptor は関与しないが、常在細菌が増殖している条件下では M 細胞の分化に Toll-like receptor 3 が関与することを明らかにするとともに、従来 M 細胞の分化に関与するとされてきた RANK 及び RANKL は M 細胞の分化に直接関与しないことを明らかにした。

(6) 呼吸器全長の粘膜における補体成分 C3 の腸管内腔への分泌源となる分泌細胞を特定し、さらに補体受容体 C3a 並びに CR3 のサブユニットである CD11b の粘膜上皮及び組織内遊走細胞における詳細な発現状況を明らかにした。加えてこれらの受容体を腸管内腔へ分泌する外分泌腺を特定し、Toll-like receptor と同様に補体受容体が腸管内腔へ分泌されることを明らかにした。

(7) 消化管の粘膜上皮からの補体成分の吸収・輸送経路を探る上での基礎的研究として、アポトーシス後期の上皮細胞直下に存在する毛細血管が、従来理論的に取り込みが不可能とされてきた乳ビ球を VLDL 受容体を介して取り込むことを明らかにした

(8) 呼吸器系の全長において、lysozyme, phospholipase A2, β -defensin1 及び β -defensin2 の分泌細胞を同定し、その分布を明らかにするとともに、従来全く不明であった粘膜上皮上に存在する粘液層・漿液層における抗菌物質の含有状況についても明らかにした。

<まとめと展望>

従来は補体系については血液や組織中での反応について研究されてきたが、一方では消化管内腔等の体外についてもその存在が認められてきている。本研究では、分泌型補体の分泌部位を同定し、補体成分の一部やその受容体に関する基礎的知見を得ることができたが、従来成書にも記載されてきた基礎的知見には再検討して修正すべき点がいくつか残されていた。分泌型補体系による消化管や呼吸器系における生体防御機構を解明するためには、これらの問題点にも目を向けた研究の展開が今後必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

MANTANI Youhei, NISHIDA Miho, YAMAMOTO Kyoji, MIYAMOTO Kazuki, YUASA Hideto, MASUDA Natsumi, OMOTEHARA Takuya, TSURUTA Hiroki, YOKOYAMA Toshifumi, HOSHI Nobuhiko, KITAGAWA Hiroshi

Ultrastructural and immunohistochemical study on the lamina propria cells beneath Paneth cells in the rat ileum.

The Anatomical Record, 2018, 査読有

DOI: 10.1002/ar.23778 *inpress*

MASUDA Natsumi, MANTANI Youhei, YUASA Hideto, YOSHITOMI Chiaki, NISHIDA Miho, ARAI Masaya, QI Wang-Mei, KAWANO Junichi, YOKOYAMA Toshifumi, HOSHI Nobuhiko, KITAGAWA Hiroshi

Immunohistochemical study on the distribution of β -defensin 1 and β -defensin 2 throughout the respiratory tract of healthy rats.

The Journal of Veterinary Medical Science 80 (3): 395-404, 2018, 査読有

DOI:10.1292/jvms.17-0686

MASUDA Natsumi, MANTANI Youhei, YOSHITOMI Chiaki, YUASA Hideto, NISHIDA, ARAI Masaya, KAWANO Junichi, YOKOYAMA Toshifumi, HOSHI Nobuhiko, KITAGAWA Hiroshi

Immunohistochemical study on the secretory host defense system with lysozyme and secretory phospholipase A2 throughout rat respiratory tract.

The Journal of Veterinary Medical Science 80 (2): 323-332, 2018, 査読有

DOI:10.1292/jvms.17-0503

YUASA Hideto, MANTANI Youhei, MASUDA Natsumi, NISHIDA Miho, ARAI Masaya, KAWANO Junichi, YOKOYAMA Toshifumi, HOSHI Nobuhiko, KITAGAWA Hiroshi

Mechanism of M-cell differentiation accelerated by proliferation of indigenous bacteria in rat Peyer's patches.

The Journal of Veterinary Medical Science 79(11): 1826-1835, 2017, 査読有

DOI:10.1292/jvms.17-0470

YUASA Hideto, MANTANI Youhei, MASUDA Natsumi, NISHIDA Miho, KAWANO Junichi, YOKOYAMA Toshifumi, HOSHI Nobuhiko, KITAGAWA Hiroshi

Differential expression of Toll-like receptor-2, -4 and -9 in follicle-associated epithelium from epithelia of both follicle-associated intestinal villi and ordinary intestinal villi in rat Peyer's patches.

The Journal of Veterinary Medical Science 78 (12) 1797-1804, 2016, 査読有

DOI: 10.1292/jvms.16-0349

MANTANI Youhei, ITO Eri, NISHIDA Miho, YUASA Hideto, MASUDA Natsumi, QI Wang-Mei, KAWANO Junichi, YOKOYAMA Toshifumi, HOSHI Nobuhiko, KITAGAWA Hiroshi

Ultrastructural study on the morphological changes in indigenous bacteria of mucous layer and chyme throughout the rat intestine. *The Journal of Veterinary Medical Science* 77 (9): 1121-1128, 2015, 査読有
DOI: 10.1292/jvms.15-0139

TAKAHARA Ei-ichirou, YUASA Hideto, NISHIDA Miho, MANTANI Youhei, UDAYANGA K. G. S., QI Wang-Mei, TAKEUCHI Takashi, YOKOYAMA Toshifumi, HOSHI Nobuhiko, KITAGAWA Hiroshi

Immunohistochemical and histoplanimetric study on the endothelial receptor involved in transportation of minute chylomicrons into subepithelial portal blood in intestinal villi of the rat jejunum.

The Journal of Veterinary Medical Science 77 (4): 387-393, 2015, 査読有
DOI: 10.1292/jvms.14-0432

MANTANI Youhei, ITO Eri, YUASA Hideto, MASUDA Natsumi, NISHIDA Miho, QI Wang-Mei, KAWANO Junichi, YOKOYAMA Toshifumi, HOSHI Nobuhiko, KITAGAWA Hiroshi

Ultrastructural study on the morphological changes in indigenous bacteria of mucous layer and chyme throughout the rat intestine.

The Journal of Veterinary Medical Science 77 (9): 1121-1128, 2015, 査読有
DOI: 10.1292/jvms.15-0139

〔学会発表〕(計 17件)

宮本和樹, 万谷洋平, 湯浅秀人, 西田美穂, 増田なつみ, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

ラットパイエル板における lysozyme 陽性細胞を介する生体防御機構に関する免疫組織化学的研究

第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 - 15 日 (鹿児島大学, 鹿児島県鹿児島市)

万谷洋平, 春田知洋, 西田美穂, 湯浅秀人, 増田なつみ, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

Serial block face-走査型電子顕微鏡を用いたラット回腸腸陰窩周囲の間質細胞に関する 3 次元超微形態学的解析

第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 - 15 日 (鹿児島大学, 鹿児島県鹿児島市)

吉富千晶, 増田なつみ, 湯浅秀人, 西田美穂, 万谷洋平, 河野潤一, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

生理的条件下のラット呼吸器系粘膜における補体成分 C3 と補体受容体 C3aR および CD11b の局在に関する免疫組織化学的研究

第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 - 15 日 (鹿児島大学, 鹿児島県鹿児島市)

田村彩貴, 万谷洋平, 西田美穂, 湯浅秀人, 増田なつみ, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

ラット大腸の上皮直下における間質細胞の部位差に関する免疫組織化学的研究
第 93 回日本解剖学会近畿支部学術集会 2017 年 11 月 25 日 (滋賀医科大学, 滋賀県大津市)

万谷洋平, 宮本和樹, 西田美穂, 湯浅秀人, 増田なつみ, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

ラット回腸における telocyte の免疫組織化学的同定

第 159 回日本獣医学会学術集会 2016 年 9 月 6 - 8 日 (日本大学生物資源科学部, 神奈川県藤沢市)

湯浅秀人, 増田なつみ, 西田美穂, 河野潤一, 横山俊史, 万谷洋平, 星 信彦, 北川 浩

生理的条件下のラットパイエル板における RANK/RANKL の発現および常在細菌の増殖による影響

第 159 回日本獣医学会学術集会 2016 年 9 月 6 - 8 日 (日本大学生物資源科学部, 神奈川県藤沢市)

増田なつみ, 万谷洋平, 西田美穂, 湯浅秀人, 河野潤一, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

ラット呼吸器における β -defensin 1 および β -defensin 2 を介した分泌型の生体防御機構に関する免疫組織化学的研究

第 159 回日本獣医学会学術集会 2016 年 9 月 6 - 8 日 (日本大学生物資源科学部, 神奈川県藤沢市)

万谷洋平, 宮本和樹, 西田美穂, 湯浅秀人, 増田なつみ, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

ラット回腸粘膜における各種間質細胞の局在

第 92 回日本解剖学会近畿支部学術集会 2016 年 11 月 27 日 (近畿大学東大阪キャンパス, 大阪府東大阪市)

湯浅秀人, 万谷洋平, 増田なつみ, 西田美穂, 河野潤一, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

ラットパイエル板における濾胞被蓋上皮

のアポトーシスと RANK/RANKL の発現との関係

第 92 回日本解剖学会近畿支部学術集会
2016 年 11 月 27 日 (近畿大学東大阪キャンパス, 大阪府東大阪市)

増田なつみ, 万谷洋平, 西田美穂, 湯浅秀人, 河野潤一, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

ラット呼吸器系粘膜を覆う粘液層における β -defensin 1 および β -defensin 2 の存在および分泌源の同定

第 92 回日本解剖学会近畿支部学術集会
2016 年 11 月 27 日 (近畿大学東大阪キャンパス, 大阪府東大阪市)

MANTANI Youhei, MIYAMOTO Kazuki, MATSUMORI Seiko, YUASA Hideto, Natsumi MASUDA, YOKOYAMA Toshifumi, HOSHI Nobuhiko, KITAGAWA Hiroshi

The short-term effect of peptidoglycan injected into the intestinal lumen against host defense responses.

17th International Congress of Mucosal Immunology July 15-18, 2015 (Maritim Hotel, Berlin, Germany).

万谷洋平, 西田美穂, 湯浅秀人, 増田なつみ, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩
ラット小腸の Paneth 細胞に連絡する粘膜固有層細胞の超微形態

第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 7 - 9 日 (北里大学獣医学部, 青森県十和田市)

増田なつみ, 万谷洋平, 西田美穂, 湯浅秀人, 河野潤一, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

ラット呼吸器系における lysozyme および sPLA2 の分泌上皮細胞に関する免疫組織化学的研究. 第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 7 - 9 日 (北里大学獣医学部, 青森県十和田市)

湯浅秀人, 万谷洋平, 増田なつみ, 西田美穂, 河野潤一, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

Toll-like receptor-2, -4 および -9 の発現に対する常在細菌増殖の影響

第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 7 - 9 日 (北里大学獣医学部, 青森県十和田市)

万谷洋平, 西田美穂, 湯浅秀人, 増田なつみ, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

ラット回腸における間質細胞 telocyte に関する超微形態学的研究

第 91 回日本解剖学会・近畿支部学術集会
2015 年 11 月 28 日 (京都繊維工芸大学, 京都府京都市)

増田なつみ, 万谷洋平, 西田美穂, 湯浅秀人, 河野潤一, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

ラット呼吸器系粘膜を覆う液相に含まれる lysozyme および sPLA2 の分泌源の特定

第 91 回日本解剖学会・近畿支部学術集会
2015 年 11 月 28 日 (京都繊維工芸大学, 京都府京都市)

湯浅秀人, 万谷洋平, 増田なつみ, 西田美穂, 河野潤一, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

生理学的条件下におけるラットパイエル板濾胞被蓋上皮における Toll-like receptor-4 の発現と M 細胞への分化との関係について

第 91 回日本解剖学会・近畿支部学術集会
2015 年 11 月 28 日 (京都繊維工芸大学, 京都府京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 浩 (KITAGAWA, Hiroshi)
神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号: 40125307

(2) 研究分担者

河野 潤一 (KAWANO, Junichi)
神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号: 40127361

万谷 洋平 (MANTANI, Youhei)
神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号: 30724948