

研究種目：若手研究(B)**研究期間**：2007～2009**課題番号**：19780229**研究課題名(和文)** 腸管免疫系の発生・発達と腸内細菌の相互作用**研究課題名(英文)** Intestinal immune system: its development and interaction with intestinal bacteria**研究代表者**

鈴木 穂高 (SUZUKI HODAKA)

国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・主任研究官

研究者番号：70342904

研究成果の概要(和文)：

申請者が以前より行ってきたマウスの小腸上皮細胞間リンパ球(IEL) subset の部位差に関する研究をさらに発展させ、盲腸、結腸を含めたマウスの消化管全体の IEL 分布について調べた。その結果、IEL subset の部位差は小腸内(小腸上部、中部、下部の間)でも、大腸内(盲腸と結腸の間)でも認められたが、小腸と大腸の間ではその違いが非常に顕著であった。このことから、小腸 IEL と大腸 IEL の分布は連続的なものではなく、その分布様式はまったく異なっていると考えられた。このような IEL subset の分布の傾向は加齢によって大きく変化するものではなく、3ヶ月齢から24ヶ月齢マウスまでほぼ同様に認められた。一方、IEL の細胞数については、6ヶ月齢をピークとして加齢に伴う減少が認められ、腸管免疫系の加齢性変化である可能性が示唆された。また、腸管免疫系の中で誘導部位としての働くパイエル板についても、部位により機能や平常時の活性化状態が異なるか、cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、発現に統計学的有意差が認められたのは187遺伝子(約37000スポット中)であった。そのうち、機能的に免疫系に関連した遺伝子は6遺伝子であったが、免疫機能や活性化状態に関する一定の傾向は認められなかった。このことから、マウスのパイエル板は平常時には、その免疫機能や活性化状態に部位による差はほとんどないと考えられた。IEL の分布に部位差が認められたのに対し、パイエル板の機能や活性化状態には部位差が認められなかったという結果は、腸管が体長の数倍という長い器官であり、部位によりその機能や腸内細菌叢に大きな違いがあることと併せて考えると、腸管免疫系の生物学的意義を考える上で、非常に興味深い知見である。

研究成果の概要(英文)：

In the previous study, regional differences in intraepithelial lymphocytes (IELs) were studied in the small intestine of mice. In this study, further studies were performed on the basis of the previous findings and IELs number and subsets distributed in the entire intestine, including cecum and colon, were studied. Most of the significant differences in phenotypic compositions were found between the small and large intestines, although some differences were found among the different parts of the small and large intestines. These results indicate that the differences between IELs in the small and large intestines are discontinuous. Such regional differences in IELs of mouse intestines were similar from young adult to aged mice, although the number of IELs was highest at 6 months old and then gradually decreased with age. Such decrease of the lymphocytes may be a kind of aging symptoms in intestinal immune system. Regional differences in gene expression profiles of Peyer's patches (PP), which act as inductive sites of intestinal immune network, were also determined in mice. Of the 187 genes that were expressed differently among the PPs from different regions, 6 genes were related to immune system process. These findings suggest that the regional differences among PPs in mice in terms of the

immunological activation status and/or immunological functions may be subtle in the normal state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	900,000	0	900,000
2009年度	1,100,000	0	1,100,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	0	3,100,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用獣医学

キーワード：疾病予防・制御

1. 研究開始当初の背景

腸管をはじめとする粘膜組織には全身免疫系とは別に、粘膜免疫系と呼ばれる独自の免疫系が発達している。中でも腸管は、常に腸内細菌や食物など大量の抗原に曝されており、腸管免疫系という特殊な免疫系が発達している。腸管免疫系は、上皮細胞間リンパ球 (IEL)、粘膜固有層リンパ球 (LPL)、パイエル板、腸間膜リンパ節 (MLN) 等によって構成されている。その役割は異物の侵入阻止や腸上皮の恒常性の維持など幅広く、食物アレルギーや自己免疫疾患 (潰瘍性大腸炎やクローン病など) の病態形成にも深く関与しているとされる。申請者は以前より、腸管免疫系の最表層、小腸上皮内に分布する IEL について、小腸の部位により subset の分布が異なること、およびその部位差の形成要因について研究を続けてきた。

2. 研究の目的

申請者は以前より、マウスの小腸上皮細胞間リンパ球 (IEL) subset の部位差に関する研究を進めてきたが、本研究では、それらの知見をさらに発展させ、盲腸、結腸を含めた消化管全体の IEL subset の分布について調べ、その形成要因と生物学的意義を探ることを目的とした。また、パイエル板の機能的な部位差について調べることにより、IEL 以外の腸管免疫系の部位差とその生物学的意義について探ることを試みた。腸管免疫系の重要な役割の 1 つに感染防御が挙げられるが、腸管内には多くの腸内細菌が棲息しており、宿

主との共生を図っている。本研究では、免疫不全マウスを用いて腸内細菌の体内移行について調べ、腸内細菌の侵入阻止への免疫系、特に腸管免疫系の関与について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスの小腸各部、盲腸、結腸に分布する IEL subset の違い

10~11 週齢、雌の BALB/c マウスから、小腸、盲腸、結腸を採材し、小腸はさらに上部、中部、下部に三等分した。各部位からそれぞれ IEL を分離し、蛍光抗体で染色、フローサイトメーターを用いて測定、解析した。

(2) マウスの小腸各部、盲腸、結腸に分布する IEL subset の加齢性変化

3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、18ヶ月、24ヶ月齢、雌の C57BL/6 マウスから、小腸、盲腸、結腸を採材し、小腸はさらに上部、中部、下部に三等分した。各部位からそれぞれ IEL を分離し、蛍光抗体で染色、フローサイトメーターを用いて測定、解析した。

(3) マウス小腸パイエル板の部位差

10 週齢、雌の C57BL/6 マウスから、小腸を採材し、最も幽門側のパイエル板、最も回盲部側のパイエル板、そして最も小腸の中央近くにあるパイエル板を分離した。分離したパイエル板から mRNA を採取し、cDNA マイクロアレイを用いて、その遺伝子発現の部位差について調べた。

(4) 免疫不全マウスにおける腸内細菌の体内移行(bacterial translocation)

SCID マウス、ヌードマウス、ALY マウス等の免疫不全マウスから、腸間膜リンパ節 (MLN)や肝臓、腎臓、脾臓等の臓器を採取し、細菌の体内移行について調べた。

4. 研究成果

(1) マウスの小腸各部、盲腸、結腸に分布する IEL subset の違い

分布する IEL の数は、小腸上部>中部>下部>盲腸>結腸の順であった(図 1)。これは小腸では十二指腸から回腸にかけて絨毛が徐々に短くなっていくことや径が小さくなっていくこと、大腸では絨毛が見られないこと等に相関した結果であると考えられた。IEL subset については、特に、 $\alpha\beta$ T 細胞中(図 2)と $\gamma\delta$ T 細胞中(図 3)の CD4、CD8 の発現割合に関して、大きな違いが認められた。IEL subset の部位差は小腸の部位間でも、盲腸と結腸の間でも若干認められたが、小腸と大腸の間ではその違いが非常に顕著であり、小腸 IEL と大腸 IEL の分布は連続的なものではなく、その分布様式はまったく異なっていると考えられた。

図 1 腸管各部位の IEL 数 ($\times 10^6$)

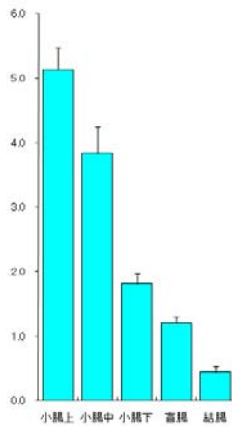


図 2 $\alpha\beta$ T 細胞中の subset 構成

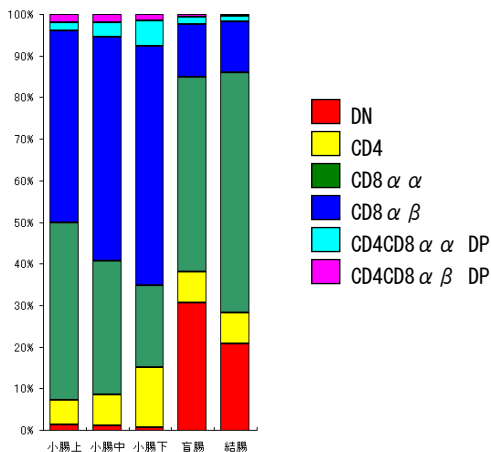
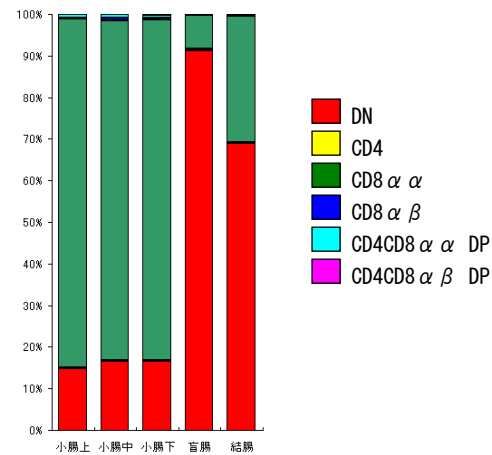


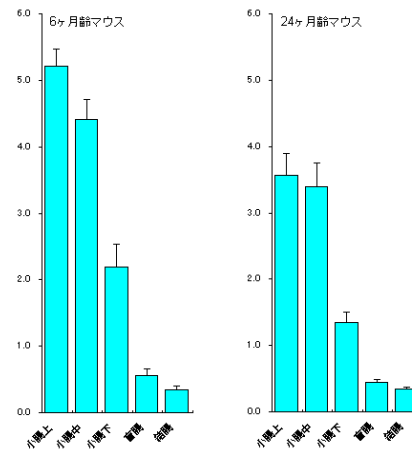
図 3 $\gamma\delta$ T 細胞中の subset 構成



(2) マウスの小腸各部、盲腸、結腸に分布する IEL subset の加齢性変化

IEL の数は、6 ヶ月齢マウスでピークを示し、その後は加齢とともに徐々に減少した(図 4)。このような細胞数の減少は、腸管免疫系の加齢性変化と言えるものかもしれない。一方、IEL subset の部位差の傾向は、加齢に伴って大きな変化は示さず、特定の subset が加齢に伴って減少するわけではなく、全体的に細胞数が減少することが明らかとなった。

図 4 6 ヶ月齢マウスと 24 ヶ月齢マウスの腸管各部位 IEL 数 ($\times 10^6$)



(3) マウス小腸パイエル板の部位差

10 週齢、雌の C57BL/6 マウスの上部、中部、下部のパイエル板の遺伝子発現を解析したところ、発現に統計学的有意差が認められたのは 187 遺伝子(約 37000 スポット中)であった。そのうち、機能的に免疫系に関連した遺伝子は 6 遺伝子であったが、免疫機能や活性化状態に関する一定の傾向は認められなかった。このことから、マウスのパイエル板は平常時にはその免疫機能や活性化状態に、部位による差はほとんどないと考えられた。小

腸の上部と下部では食物の消化の度合いが異なっていること、常在する腸内細菌の種類や数が異なっていることから、抗原性から見た腸内環境は異なっていると考えられるのだが、誘導部位であるパイエル板で機能、あるいは活性状態に部位差がほとんど見られないことは非常に興味深い知見である。

(4) 免疫不全マウスにおける腸内細菌の体内移行(bacterial translocation)

平常時の免疫不全マウスにおける、腸内細菌の体内移行(bacterial translocation; BTL)状況について調べた。正常のC57BL/6マウスでは腸間膜リンパ節(MLN)へのBTLが1/10に、臓器へのBTLが1/10に認められた。T細胞、B細胞を欠損するSCIDマウスでは、MLNにも臓器にもBTLは認められなかった(0/7)。T細胞を欠損するヌードマウスではMLNへのBTLが2/7、臓器へのBTLが3/7に認められた。パイエル板、MLN他、全身のリンパ節を欠損するALYマウスでは、臓器へのBTLは認められなかった(0/7)。ヌードマウスでBTLの頻度が若干高い傾向は見られたが、SCIDマウスやALYマウスではBTLは認められず、免疫不全とBTLの関係ははっきりしなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Suzuki, H.: "Differences in Intraepithelial Lymphocytes in the Proximal, Middle, Distal Parts of Small Intestine, Cecum, and Colon of Mice." Immunol. Invest. 38, 780-796 (2009) 査読あり

[学会発表] (計3件)

① 鈴木穂高、山本茂貴: "小腸上皮細胞間リンパ球(IEL)分布の部位差はマウスに普遍的な性質である" 第143回日本獣医学会(2007年4月) つくば市

② 大塚亮一、武田眞記夫、鈴木穂高: "マウス小腸パイエル板の部位差—マイクロアレイによる解析—" 第147回日本獣医学会(2009年4月) 宇都宮市

③ 鈴木穂高: "小腸、盲腸、結腸に分布する腸上皮細胞間リンパ球(IEL) subsetの違い" 第148回日本獣医学会(2009年9月) 鳥取市

[図書] (計1件)

① 鈴木穂高、他、丸善株式会社、リスク学用語辞典、2007、330

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 穂高 (SUZUKI HODAKA)

国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・主任研究官

研究者番号: 7 0 3 4 2 9 0 4

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: