

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590207

研究課題名（和文） マウス小腸絨毛各部の IEL の同定：部位の違いによる形態的性状と機能の差異

研究課題名（英文） Distribution of Intraepithelial lymphocytes in the murine small intestine: The variability of the morphological property and function

研究代表者

伊藤 恒敏 (ITO TSUNETOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90004746

研究成果の概要（和文）：

IEL の形態学的解析の結果、(顆粒の有無など) 存在する部位の違いで異なる IEL の亜群が存在する事が示唆された。またその活性化に伴う絨毛上皮細胞の DNA 断片化誘発機構には GrB が関与するが、既報の Pfn/GrB 系とは異なる「新たな DNA 断片化誘導機構」の可能性も示唆された。さらに生体防御の最前線に存在する IEL は、「易被刺激性」で、刺激を受けると周囲の絨毛上皮細胞に影響を与え、絨毛上皮内で細胞死を起し消滅するという「使い捨て」的な存在であることも明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Different intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) subgroups (presence of granules, etc.) in different villus sites were demonstrated by morphological analysis. Granzyme B (GrB) has been proved to be involved in the induction of DNA fragmentation of epithelial cells due to IEL activation, the results suggest the possibility of a new DNA fragmentation induction mechanism different from that of previously reported perforin (Pfn)/GrB system. We also found that IELs in the front line of the intestinal defense system are highly stimulus-sensitive, thus are disposable, and, when stimulated, finally causing DNA fragmentation in the surrounding villus epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：IEL、小腸、マウス、DNA 断片化、免疫組織化学、電子顕微鏡、Flow Cytometry

1. 研究開始当初の背景

小腸粘膜には、口腔から腸管粘膜に達した細菌やウイルスなどに対する免疫応答を誘

導する、腸管関連リンパ組織（GALT）とよばれる装置があり、絨毛上皮細胞間リンパ球（IEL）、粘膜固有層リンパ球（LPL）および

パイエル板などからなる。特に IEL は、小腸絨毛全体に存在し、腸管の最も表層に位置することから、外来抗原に対する防御、ウイルス等に感染した絨毛上皮の剥離・排除、上皮細胞のターンオーバー調節などの様々な役割が考えられているが、その詳細な機序は不明である。

本研究課題では、絨毛内の存在部位により異なる性状の IEL の亜群を形態組織学的に精査すると共に、先に確立している有用な *in vivo* 実験系を用いてそれらの機能的性状の解析を行ない、小腸絨毛における IEL の生物学的意義の解明を目指す。

2. 研究の目的

[IEL 亜群の形態的性状の解析]

絨毛上皮細胞 (IEC) に DNA 断片化を引き起こす因子を探索する中で、空腸絨毛に細胞性障害因子であるグランザイム B (GrB) を有する IEL が検出され、電子顕微鏡観察では絨毛内に顆粒を含有する IEL (LGL) と顆粒のない IEL (LC) が存在することも確認された。また抗 CD3 抗体投与により十二指腸および空腸でみられる上皮細胞の剥離は絨毛の上半分で誘発されるが (Yaguchi K et al: DNA fragmentation and detachment of enterocytes induced by anti-CD3 mAb-activated intraepithelial lymphocytes. Cell Tissue Res, 315: 71-84, 2004.)、 $\gamma\delta$ 型 IEL の存在密度の低い回腸では CD3 抗体投与による形態変化は全くみられない。これらの事実、小腸の各部位による差だけではなく、絨毛の高さによる部位の違いでも IEL に亜群が存在し、それら亜群間の機能にも差異が存在する可能性が強く示唆された。

したがって、IEL 亜群の同定を形態学的に詳細に検索することを目指した。

[DNA 断片化誘発機構]

IEL の細胞質には GrB が存在し、また抗抗体刺激後に IEL からは顆粒が細胞外に放出されることを電子顕微鏡的に観察しており、小腸絨毛上皮細胞の DNA 断片化誘導において IEL から分泌される細胞障害性顆粒 (perforin-granzyme 系) の関与が示唆された。

この顆粒を持った大型のリンパ球 ($\gamma\delta$ 型 IEL と推察) に注目し、IEL が含有する顆粒の性状について免疫組織化学的に解析し、また顆粒の放出・分泌について透過型電子顕微鏡による形態学的解析を行い、さらに DNA 断片化誘導に関与する因子の分子生物学的解析を行った。

[IEL の活性化と細胞死]

抗 CD3 抗体をマウス腹腔腔に投与して IEL を刺激すると、十二指腸および空腸の絨毛上皮細胞に DNA 断片化が誘発される。

そこで、1) 腸絨毛上皮細胞間に存在する IEL は真に活性化されるのか、活性化されるとすれば活性化に伴って起こると考えられる形態学的変化は確認できるか、2) T 細胞抗原受容体 (TCR) 関連抗原の発現は変化するか、3) 活性化された IEL はどのような転帰をたどるのかを調べるために、IEL の形態変化を光学および電子顕微鏡で観察し、T 細胞マーカーの発現変化を免疫染色で確認した。さらに、IEL を組織学的定義にしたがって同定、計数し、IEL 数およびフェノタイプ別の IEL の変化を調べた。

3. 研究の方法

IEL 活性化の生体内解析系を用いて、

(1) IEL 亜群の形態的性状の解析、(2) DNA 断片化誘発機構、および(3) IEL の活性化と細胞死の 3 点について検討した。

(1) IEL 亜群の形態的性状の解析

① (小腸各部、絨毛各部における) $\gamma\delta$ 型 IEL と $\alpha\beta$ 型 IEL の分布

「各種特異抗体 ($\gamma\delta$ -TCR mAb および $\alpha\beta$ -TCR mAb) を用いた免疫組織化学的解析」

② (小腸各部、絨毛各部における) LGL と LC の分布

「IEL 細胞質内における顆粒の存在およびその局在を電子顕微鏡で検索」

(2) DNA 断片化誘発機構

① IEL の顆粒にはどんな物質が含まれるか

「正常マウスの空腸に存在する IEL が含有する顆粒内の細胞傷害性因子の免疫組織化学的解析」

② 抗 CD3 抗体投与による IEL 刺激により顆粒が放出された後の空腸絨毛の形態変化

「IEL 刺激後における IEL の形態変化および顆粒放出像の電子顕微鏡観察」

「IEL 活性化に伴う上皮細胞の剥離および絨毛短縮化現象の形態組織学的解析」

③ 絨毛上皮細胞の DNA 断片化を直接誘導する因子の解明

「遺伝子操作マウスを用いた、DNA 断片化誘導に関与する細胞障害性因子の同定」

(3) IEL の活性化と細胞死

① 抗 CD3 抗体をマウス腹腔腔に投与することで IEL は活性化されるのか

「抗 CD3 抗体投与前後で IEL の基本的な形態変化を光学顕微鏡および電子顕微鏡で検索」

② 抗 CD3 抗体投与による IEL 刺激により TCR 関連抗原の発現は変化するか

「IEL 刺激前後の TCR および関連抗原の発現を免疫組織化学的に解析」

「正常および抗体投与後のマウスから分離分取した IEL における TCR および関連抗原の発現を Flow Cytometry で解析」

③ 活性化された IEL はどのような転帰をたどるのか

「ヘマトキシリン・エオシン (H-E) 染色像および免疫染色像から、IEL 刺激後の IEL 数の計測」

4. 研究成果

(1) IEL 亜群の形態的性状の解析

$\gamma\delta$ 型 IEL と $\alpha\beta$ 型 IEL を免疫染色した絨毛標本で計測した結果、絨毛各部位 (先端部、中間部、基部) におけるそれらの分布様式に差はみられなかったが、透過型電子顕微鏡による IEL の形態観察では、顆粒を有するリンパ球 (LGL) と顆粒のないリンパ球 (LC) が存在することが確認され、絨毛内での局在傾向も認められた (絨毛先端部には LGL が多く、絨毛基部には LC が多い)。IEC は陰窩に位置する幹細胞から分裂し、分化しながら絨毛の基部から先端部へと移動して最終的には管腔内へ脱落するとされていることから、上皮細胞間に局在する IEL も絨毛基部から先端部まで IEC と共に移動する過程で分化成熟を遂げる可能性が推察された。

また IEL の抗体刺激後の形態観察においては、IEL と隣接する IEC との間に隙間 (IEL から放出されたと推察される顆粒状の構造物も観察) が生じることが観察されたが、そのような形態変化は絨毛の中央部から先端部において多く確認されるなど、絨毛内での IEL が存在する部位 (絨毛の高さ) の違いで形態的にも機能的にも異なる IEL の亜群が存在する可能性が示唆された。

(2) DNA 断片化誘発機構

マウスに抗 CD3 抗体を投与して IEL を刺激すると、30 分以内に空腸の IEC に DNA 断片化が生じ、2 時間後には約半数の IEC が剥離する。

IEL の活性化に伴う IEC の DNA 断片化誘導については、IEL はグランザイム B (GrB) を含有しており、抗体刺激後に IEL からは GrB が放出されることが分かっている。さらに IEC での DNA 断片化の消長と GrB の放出動態が一致していることから、IEC の DNA 断片化誘導におけるパーフォリン (Pfn) /GrB 系の関与が強く示唆された。GrB の細胞傷害作用発現には、Pfn との共作用が必要とされているので、Pfn の絨毛内での存在およびその分布様式について免疫組織化学的に検討した。その結果、IEL 内に Pfn と GrB の共局在は認められず、抗体投与後の絨毛内においても Pfn の免疫陽性反応は全く検出されず、また IEL 刺激による Pfn 遺伝子の発現変動もなかった。さらに Pfn 欠損マウスを用いた実験では、抗 CD3 抗体投与後、正常マウスと同様に IEL が活性化されて GrB が放出され、IEC に DNA 断片化が誘導されることが確認され、この IEL 活性化

に伴う IEC の DNA 断片化現象は、Pfn なしで誘導される。このことはマウス小腸の IEL 活性化による IEC の DNA 断片化は、GrB 単独によるか、もしくは、他の因子との共作用による傷害活性という、「全く新たな DNA 断片化誘導機構」の可能性が示唆された。

またこの生体内での実験系では、① IEL 活性化後の標的細胞 (IEC) における DNA 断片化誘導時間が 10~30 分と非常に早い反応である (既報の *in vitro* 実験系は、GrB による標的細胞の細胞傷害性の発現は 5~24 時間後)。また、② 細胞傷害活性を調べる実験系も、*in vitro* 系では、エフェクター細胞と標的細胞の比 (E/T 比) が通常は (10:1 ~ 50:1) であるのに対し、本実験系では、IEL (エフェクター細胞) と IEC (標的細胞) の存在割合は (1:10 ~ 1:20) と、全く逆である。これらのことも本実験の細胞傷害性機構が、これまでの主に *in vitro* での機序とは全く異なる機構で DNA 断片化が起きていることが示唆される。

(3) IEL の活性化と細胞死

正常マウスの空腸絨毛では、IEL は隣接する IEC と密接に接合しており、またその細胞質には多くの顆粒が観察されるのに対して、抗 CD3 抗体をマウス腹腔内に投与すると、30 分後に IEL と IEC との間には隙間が生じ始め、またその隙間には顆粒状の構造物が電顕的に確認された (GrB が隙間に放出されることを免疫電顕で確認)。一方、IEL の細胞質からは顆粒が消失している像が観察され、抗体刺激により IEL が脱顆粒を起こしたものと考えられる。抗体投与 60 分後には隙間はさらに広がり、IEL は収縮し、核が凝縮した像も観察された。IEL における TCR の免疫組織化学的解析の結果、CD3、TCR $\gamma\delta$ 、TCR $\alpha\beta$ の染色性は抗体投与 60 分後以降に弱くなり、90 分後にはさらにそれらの陽性細胞数が激減することが確認された。一方 CD8 α は抗体投与後も変化はみられず、抗 CD3 抗体が TCR-CD3 複合体に結合して IEL が刺激を受けて活性化したものと考えられた (分離分取した IEL の Flow Cytometry 解析でも同様の結果を得ている)。

IEL 数は、抗体刺激 2 時間後から激減し、72 時間後にはほとんどすべての IEL が、残存する絨毛上皮内から消失することが確認され、生体防御の最前線に存在する IEL は、「易被刺激性」で、刺激を受けると周囲の絨毛上皮細胞に影響を与え、絨毛上皮内で自らが死滅するという、「その場限りの」で「使い捨て」な存在であることが明らかとなった。

また TUNEL 染色法での検討の結果、抗体刺激後 30 分以内にほぼすべての IEL においても IEC と同様に、DNA 断片化が誘発されることを確認した。刺激後 60 分以降には IEL に

DNA 断片化は検出されなかった。H&E 染色および CD8 α の免疫染色の観察より、抗体刺激 48 時間後までは時間経過に伴って数は減少するものの、長時間にわたって IEL が絨毛上皮内に存在し続けることが確認されたので、絨毛上皮細胞と同様に、IEL においても一旦 DNA の断片化が誘導されても迅速に DNA 修復が行われている可能性が示唆された (Ogata M et al: DNA repair after DNA fragmentation in mouse small intestinal epithelial cells. Cell Tissue Res, 335(2): 371-82, 2009.)。

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 9 件)

- ① Matsutani T, Ogata M, Fujii Y, Kitaura K, Nishimoto N, Suzuki R, Itoh T. Shortening of complementarity determining region 3 of the T cell receptor α chain during thymocyte development. 査読有 Molecular Immunology. 48(4): 623-629. 2011.
- ② 尾形雅君, 大田祐太, 松谷隆治, 伊藤恒敏 マウス小腸絨毛における iIEL の分布および形態学的性状. 査読有 リンパ学. 34(1): 49-52, 2011.
- ③ Fujii Y, Matsutani T, Kitaura K, Suzuki S, Itoh T, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. Comprehensive analysis and characterization of the TCR alpha chain sequences in the common marmoset. 査読無 Immunogenetics. (6): 383-395. 2010.
- ④ 尾形雅君, 大田祐太, 松谷隆治, 伊藤恒敏 iIELによる小腸絨毛上皮細胞のDNA断片化後のDNA修復. 査読有 リンパ学. 32: 71-74. 2009.
- ⑤ Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R. The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. 査読無 Immunology. 128: e315-24. 2009.
- ⑥ Kitaura K, Kanayama K, Fujii Y, Shiobara N, Tanaka K, Kurane I, Suzuki S, Itoh T, Suzuki R. T cell receptor repertoire in BALB/c mice varies according to tissue type, sex, age, and hydrocortisone treatment. 査読無 Experimental Animals. 58: 159-168. 2009.
- ⑦ 北浦一孝、金山喜一、藤井克樹、塩原教之、田中こなき、倉根一郎、鈴木さつき、伊藤恒敏、鈴木隆二

BALB/c マウスにおける T 細胞レセプターレパートア解析 組織・性別・週齢およびヒドロコルチゾン投与による影響. 査読無

Experimental Animals. 58: 159-168. 2009.

⑧ 会津清英、伊藤恒敏.

培養細胞株の微細形態学的検索. 査読無 医学と生物学. 153: 488-492. 2009.

⑨ Ogata M, Oomori T, Soga H, Ota Y, Itoh A, Matsutani T, Nanno M, Suzuki R, Itoh T. DNA repair after DNA fragmentation in mouse small intestinal epithelial cells. 査読有

Cell and Tissue Research. 335: 371-382. 2009.

[学会発表] (計 6 件)

① 尾形雅君、伊藤恒敏.

腸上皮細胞間リンパ球 (IEL) による新たな DNA 断片化誘導機構.

第 117 回日本解剖学会総会・全国学術総会、甲府(2012. 3. 28)

② 尾形雅君、大田祐太、伊藤恒敏.

マウス腸上皮細胞間リンパ球 (IEL) の活性化および細胞死.

第 35 回日本リンパ学会総会、東京(2011. 6. 4)

③ 尾形雅君、大田祐太、松谷隆治、伊藤恒敏.

マウスの小腸絨毛における iIEL の分布および形態学的性状.

第 34 回日本リンパ学会総会、東京(2010. 6. 26)

④ 大田祐太、尾形雅君、松谷隆治、伊藤恒敏.

マウス小腸絨毛における腸上皮細胞間リンパ球の解析.

第 115 回日本解剖学会総会、盛岡(2010. 3. 30)

⑤ Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Takasaki T, Ogata M, Suzuki S, Itoh T, Kurane I, Suzuki R.

コモンマーモセット T 細胞受容体 α 鎖および β 鎖配列の網羅的解析.

第 39 回日本免疫学会総会、大阪(2009. 12. 3)

⑥ 尾形雅君、大田祐太、松谷隆治、伊藤恒敏.

iIELによる小腸絨毛上皮細胞のDNA断片化後のDNA修復.

第 33 回日本リンパ学会総会、大阪(2009. 7. 28)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 恒敏 (ITO TSUNETOSHI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90004746

(2) 研究分担者

尾形 雅君 (OGATA MASAKI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50311907

笠原 森 (KASAHARA SHIGERU)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：70372290

松谷 隆治 (MATSUTANI TAKAJI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70372290
(H21～H22)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：