

令和元年6月12日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18813

研究課題名(和文) 間質細胞telocyteの小腸内細胞間ネットワークに関する形態学的研究

研究課題名(英文) The morphological study on the intracellular network of stromal cell telocyte in the small intestine

研究代表者

万谷 洋平 (MANTANI, Youhei)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：30724984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腸管粘膜の結合組織中には様々な線維芽細胞様細胞(FBLC)が局在し、細網状構造を形成して、腸管の恒常性維持に貢献しているとされている。本研究では、serial block-face走査型電子顕微鏡(SBF-SEM)を用いて、特殊な間質細胞として報告されるtelocyteを含めたFBLCの網羅的分類をラット小腸粘膜内で試みた。その結果、形態学的に4種類のFBLCが見出され、各種細胞マーカーの発現パターンからさらに細分化された。加えて、免疫担当細胞や神経線維と接着するFBLC種も同定し、SBF-SEMが細胞の特徴づけや細胞間相互作用を調べる上で有用な手法であることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では小腸粘膜内のFBLCを形態学的観点から網羅的に分類することができ、腸管粘膜内のFBLCに関する基盤的な情報を提供することができた。また、本研究で実施したSerial block-face走査型電子顕微鏡と細胞マーカーの併用によって、FBLCのような複雑な形状を示す細胞集団のより詳細な細胞分類が可能となることも示され、これらの解析が生体内における組織構造や細胞間相互作用の精査に有用であることが示された。本手法を駆使することにより、今後は腸管内における細胞間相互作用に関する研究を推進することで、FBLCなどが発揮する腸管粘膜内の恒常性維持機構の解明につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Various fibroblast-like cells (FBLCs) are localized in the lamina propria of the animal intestine, form the reticular structure and are known to contribute to the maintenance of intestinal homeostasis. In the present study, FBLCs in the rat small intestine, including peculiar stromal cell telocyte, were classified by serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM) and several cellular markers. The results indicated that four types of FBLCs were morphologically detected in the lamina propria of rat small intestine and subdivided by several cellular markers. Furthermore, several FBLCs attached to immunocompetent cells and nerve fibers. These results indicated that SBF-SEM was useful microscopy for definition of cells and examination of the intracellular network.

研究分野：動物組織学

キーワード：腸管 線維芽細胞様細胞 三次元解析 SBF-SEM 組織学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜の結合組織中には様々な間質細胞 (線維芽細胞様細胞 (FBLC)) が局在し、細網状の構造を形成して、腸管粘膜の恒常性維持に貢献しているとされている。その中には telocyte など特殊な細胞の存在も報告されているが、FBLC がどのような細胞種で構成されるのかについての全容は明らかにされておらず、またそれらが形成するとされる細胞間ネットワークの詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究ではラット腸管粘膜内の FBLC の網羅的分類と各種 FBLC の形成する細胞間ネットワークの特徴を明らかにすることを目的とした。加えて、本研究の成果から FBLC と免疫系や神経系との関連性が見出されたため、将来的に FBLC を主軸とした細胞間相互作用の研究を展開することを想定して、免疫担当細胞や神経系に関する基礎的な研究も実施した。

3. 研究の方法

研究計画当初は telocyte と呼ばれる特殊な FBLC に着眼した研究課題を計画していたが、Serial block-face 走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM) を用いることで、FBLC の網羅的な解析が可能となったため、計画を他の FBLC にも拡張して実施した。

(1) ラットの小腸粘膜において、常在細菌の定着制御に関わる Paneth 細胞の機能を制御し得る結合組織性の細胞種を同定するため、透過型電子顕微鏡下で Paneth 細胞に近接する細胞種の観察を行った。

(2) ラットの小腸粘膜における FBLC を SBF-SEM を用いた三次元超微形態学的観点から網羅的に分類した。加えて、これらの分類に基づき、細胞同士の相互作用関係に関する情報も精査した。

(3) ラットの小腸および大腸各部位 (盲腸, 上行結腸, 下行結腸など) の FBLC をいくつかの細胞マーカーを用いて免疫組織化学的に分類した。

(4) ラット小腸粘膜の上皮下 FBLC に投射する神経に含まれる神経伝達物質を免疫組織化学的に調べた。

(5) ラットの腸絨毛間隙やパイエル板濾胞被蓋上皮 (FAE) の表面では常在細菌の過剰な増殖が度々認められる。このような常在細菌の増殖に伴い、いくつかの免疫担当細胞の局在が変動するか否かを調べた。

(6) ラットのパイエル板円蓋域に存在する間質細胞の誘導する RANK/RANKL シグナリングが M 細胞の分化に果たすメカニズムを、常在細菌との関連などにも着目しながら免疫組織化学的に調べた。

4. 研究成果

「研究の方法」の番号と対応させて記載する。

(1) Paneth 細胞の直下には毛細血管が高頻度で存在すること、好酸球、形質細胞と接着する特殊な FBLC (telocyte に相当すると考えられる) が Paneth 細胞の伸長する細胞突起と接着していることを明らかにし、この FBLC が Paneth 細胞の活動を制御している可能性を明らかにした。

(2) ラット小腸粘膜内の FBLC は SBF-SEM による解析から、type I~IV の 4 種類の細胞に分類されることが示された (図 1)。この内、type I, II, IV は結合組織中の免疫担当細胞 (大食細胞, 形質細胞, リンパ球, 好酸球など) と接着していること、type II, III, IV には神経線維が投射することを見出した。さらに、上皮下 FBLC は上皮直下で細網状構造を形成することが知られているが、type III が腸陰窩の側面から腸絨毛の先端にまで細網状構造を形成するのに対し、腸陰窩の底部では type I および II がバスケット状の細網状構造を形成することを明らかにし、上皮下の FBLC が形成する細網状構造が 2 つの構成要素に分けられることも明らかにした。

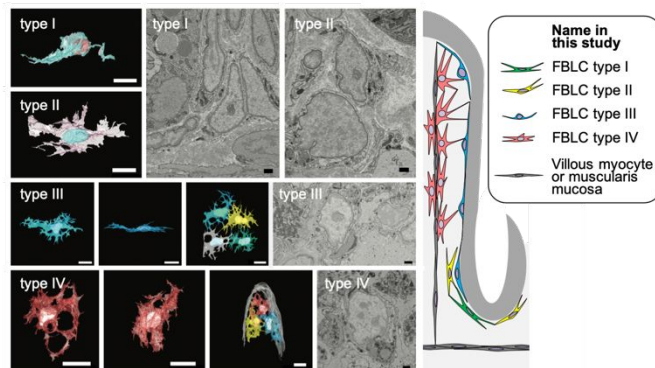


図1: SBF-SEMによるFBLCの三次元解析 (Mantani et al., 2019, J. Vet. Med. Sci.より改変)

これらの成果は SBF-SEM が FBLC のような形状の複雑な細胞種を正確に特徴づける上で非常に有用な手法であることを示しており、今後様々な細胞種へ応用していく予定である。

(3) ラットの小腸の粘膜上皮直下の FBLC が PDGFR α + α SMA+FBLC, PDGFR α + α SMA-FBLC, CD34+CD31-FBLC に分類されることを見出し、前者 2 種は(2)の FBLC type III に、後者 1 種は FBLC type I ないし II に相当する可能性を報告した。また、大腸各部位では FBLC の細胞構成が異なる可能性も細胞マーカーレベルで明らかにした。以上の成果から、細胞マーカーによる細胞分類と SBF-SEM による三次元超微形態学的な細胞分類を併用することで、より詳細な細胞分類を実現できる可能性が示された。また、本手法を FBLC だけではなく単核食細胞系列にも応用し、この細胞集団もいくつかの種類に分類できることを報告した。

(4) 上記の成果から PDGFR α +FBLC および CD34+FBLC には神経線維が投射することが示唆されたことから、この神経線維に含まれる神経伝達物質を調べた結果、いずれの細胞種にもアセチルコリン, vasoactive intestinal peptide, neuropeptide Y, calretinin を含む神経線維が投射すること、さらに CD34+FBLC には somatostatin 陽性の神経線維が投射することも明らかにした。

(5) ラットの小腸絨毛間隙に常在細菌が増殖すると、IgA⁺形質細胞や CD8⁺T 細胞の局在が変動すること、また小腸に付属するリンパ組織パイエル板では、L-selectin+CD19⁺B 細胞や L-selectin+TCR $\alpha\beta$ +T 細胞が傍濾胞域から濾胞付随粘膜の腸絨毛内へと遊走することを明らかにした(図2)。加えて、ラットパイエル板 FAE 上に常在細菌が増殖した場合には、lysozyme+樹状細胞が FAE 直下に局在することも明らかにした。これらの成果を元に、今後は腸管内における各種免疫担当細胞の動態や局在を制御するメカニズムについて、FBLC などとの関連から解析していく予定である。

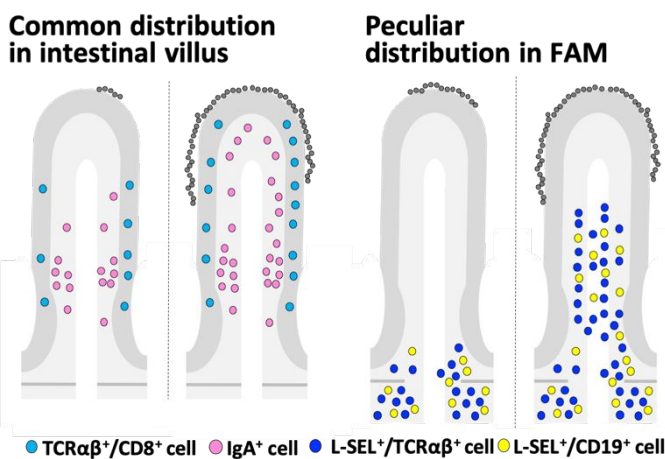


図2: 常在細菌(灰色丸で図示)の増殖に伴うリンパ球の局在変動 (Yuasa et al., 2019, J. Vet. Med. Sci.より改変)

(6) パイエル板の円蓋域の間質細胞が誘導する RANK/RANKL シグナリングが、M 細胞の分化に必要であると考えられている FAE における「上皮細胞のアポトーシスの抑制」を誘導することにより、M 細胞の分化に貢献している可能性を報告した。また、FAE 上における常在細菌の増殖に伴って、FAE の未分化円柱上皮細胞における TLR-4 発現が増加し、これに伴い TLR-4 リガンドの取り込みが促進されることによって M 細胞の分化が促進される可能性も見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. Mantani, Y., Haruta, T., Nishida, M., Yokoyama, T., Hoshi, N., Kitagawa, H.: Three-dimensional analysis of fibroblast-like cells in the lamina propria of the rat ileum using serial block-face scanning electron microscopy. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 81: 454-465, 2019.
2. Yuasa, H., Mantani Y., Miyamoto, K., Nishida, M., Arai, M., Tsuruta, H., Yokoyama, T., Hoshi, N. and Kitagawa, H.: Effects of the expansion of bacterial colonies into the intervillous spaces on the localization of several lymphocyte lineages in the rat ileum. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 81: 555-566, 2019.
3. Mantani, Y., Nishida, M., Yamamoto, K., Miyamoto, K., Yuasa, H., Masuda, N., Omotehara, T., Tsuruta, H., Yokoyama, T., Hoshi, N., Kitagawa, H.: Ultrastructural and immunohistochemical study on the lamina propria cells beneath Paneth cells in the rat ileum, *The Anatomical Record*, 301: 1074-1085, 2018.
4. Yuasa, H., Mantani, Y., Masuda, N., Nishida, M., Arai, M., Yokoyama, T., Tsuruta, H., Hoshi, N., Kitagawa, H.: Mechanism of M-cell differentiation accelerated by proliferation of indigenous bacteria in rat Peyer's patches, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79: 1826-1835, 2017.

[学会発表](計 14 件)

1. 万谷洋平, 春田知洋, 中西怜稀, 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粘膜における単核食細胞系列の細胞の三次元的観察, 第

- 124 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2019
2. 万谷洋平, 春田知洋, 西田美穂, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩: ラット回腸絨毛における上皮下および非上皮下線維芽細胞様細胞の三次元的解析, 第 161 回日本獣医学会学術集会、2018
 3. 中西怜稀, 万谷洋平, 田村彩貴, 荒井真也, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩: ラット回腸の上皮直下における線維芽細胞様細胞への神経投射に関する免疫組織化学的研究, 第 161 回日本獣医学会学術集会、2018
 4. 荒井真也, 万谷洋平, 西田美穂, 湯浅秀人, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩: ラット小腸粘膜における CD11b 陽性細胞を中心とした各種免疫担当細胞の組織内配置に関する免疫組織化学的研究, 第 161 回日本獣医学会学術集会、2018
 5. 中西怜稀, 万谷洋平, 田村彩貴, 荒井真也, 横山 俊史, 星 信彦, 北川 浩: ラット回腸の上皮下線維芽細胞様細胞を制御し得る神経伝達物質の同定, 第 94 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2018
 6. 荒井真也, 万谷洋平, 西田美穂, 湯浅秀人, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩: ラット回腸粘膜における好酸球系列の細胞の組織学的研究, 第 94 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2018
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. 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: ラット回腸における間質細胞を介した細胞間ネットワーク解析への Serial Block Face 走査型電子顕微鏡の有用性, 第 93 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2017
 11. 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
 12. 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
 13. 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: 生理学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
 14. 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

〔図書〕(計 0 件)

〔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)研究分担者

なし

(2)研究協力者

- ・春田知洋 (HARUTA, Tomohiro)
- ・大野伸彦 (Ohno, Nobuhiko)
- ・古瀬幹夫 (FURUSE, Mikio)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。