



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	RANKL regulates the differentiation of microfold cells in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue(NALT) [an abstract of entire text]
Author(s)	武藤, 麻未
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12148号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62051
Type	doctoral thesis
File Information	Mami_Mutoh_summary.pdf



学位論文内容の要約

学位論文題目

RANKL regulates the differentiation of microfold cells in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT)
(RANKL はマウス鼻咽頭関連リンパ組織の M 細胞分化を調節する)

博士の専攻分野名称 博士（歯学） 氏名 武藤 麻未

学 位 論 文 題 名

RANKL regulates the differentiation of microfold cells in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT)

(RANKL はマウス鼻咽頭関連リンパ組織の M 細胞分化を調節する)

【緒言】

口腔・鼻腔は外界とつながる体内への物質の主要な導入部である。特に鼻腔は鼻孔近傍のごく一部が皮膚から連続する厚い重層扁平上皮であるが、その奥は単層の多列繊毛上皮で形成され物理的に弱い構造をとる。そのため他の粘膜組織と同様に免疫システムが高度に発達している。実際に、ヒトではワルダイエル咽頭輪と呼ばれるリンパ性器官が口腔・鼻腔を取り囲むように配置されている。

マウスには鼻腔奥に一對のリンパ濾胞が存在し鼻咽頭関連リンパ組織 Nasal-Associated Lymphoid Tissues (NALT) と呼ばれる。NALT は鼻腔からの細菌・ウイルス感染に対する免疫応答の中心的な役割を果たすことから、ワルダイエル咽頭輪に相当する器官であると考えられている。NALT を覆う濾胞被蓋上皮には Microfold 細胞(M 細胞)が存在し、管腔内抗原の取り込みはこの細胞を通じて行われている。M 細胞は粘膜組織において抗原に最初に接触し体内へと取り込むことで免疫機構を開始する細胞である。ここ数年の研究で NALT と類似した器官である腸管パイエル板の M 細胞の解析が進んでおり、Glycoprotein2 (GP2)、Tnfaip2 などの信頼できるマーカー分子が発見された。さらに、Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) およびそのリガンドである RANKL が腸管 M 細胞の分化に必須であることが明らかにされた。一方で、M 細胞解析は腸管に偏重し、NALT M 細胞の研究はほとんど行われていない。本研究では NALT M 細胞の組織学的形態、発現分子、分化制御機構を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

実験動物

7 週齢～20 週齢の BALB/c 系統の雄マウスを使用した。

使用抗体およびレクチン

Tnfaip2 に対する抗体は医学研究科解剖学講座の木村が作成した。大腸菌で発現させたマウス Tnfaip2 タンパク質を抗原として、常法に従いウサギへと 3 ヶ月間免疫した後に抗血清を回収した。抗血清は抗原タンパク質を用いて精製することで抗 Tnfaip2 抗体を得た。抗 GP2 抗体は MBL ライフサイエンス社 (Cat No.D278-3)、抗 Spi-B 抗体と RANK 抗体は R&D Systems (それぞれ AF7204、AF692)、抗 RANKL 抗体は BioLegend 社 (510002) から抗 RelB 抗体はサンタクルズ社 (SC-226)、抗 Ki-67 抗体は Thermo Scientific 社 (RM-9106)、UEA-I レクチンは Vector 社(RL-1062)からそれぞれ購入した。

免疫染色法・免疫電子顕微鏡法

麻酔下で 4% パラホルムアルデヒドによる灌流固定後、頭部を摘出し 12 時間の浸漬固定を行い、5% EDTA にて 2 週間以上脱灰処理し頭部脱灰標本を作成した。30%ショ糖に置換し OCT コンパウンドに包埋、凍結ブロックを作成後、12 μ m 厚の薄切切片を作成し、免疫染色へと用いた。

免疫電子顕微鏡法には GP2 抗体を用い、金コロイド増感法にて GP2 に対する反応部位を標識した標本をエポン樹脂に包埋、ウルトラミクロトームによる超薄切片を作成し、常法に従って電子顕微鏡による解析を行った。

走査電子顕微鏡法

麻酔下のマウス鼻腔を 37°C 生理食塩水で洗浄し、粘液を除去、2.5% グルタルアルデヒドによって灌流固定、浸漬固定を行った。頭部は鼻腔を露出させた後タンニン・オスミウム法によって表面の導電染色をおこなった。液化炭酸ガスによる臨界点乾燥を行い、オスミウムコーティング後、走査電子顕微鏡による解析を行った。

管腔内物質の取り込み解析

直径 20 nm の蛍光ポリスチレンビーズを懸濁した PBS 溶液を、計 3 回点鼻投与し 30 分静置したマウスを標本として免疫染色法を用い観察を行った。

RANKL-RANK シグナルによる分化制御

マウス RANKL の細胞外領域（アミノ酸 137-316）とグルタチオン S トランスフェラーゼ（GST）の融合タンパク質、GST-RANKL を大腸菌で作成した。GST-RANKL は 3 日間連続で 10 mg/kg 腹腔内投与し、最後の投与から 24 時間後にマウスを安楽死させ標本を作成し、免疫染色を行った。対照実験として GST のみを同様に投与したマウスを使用した。

【結果】

走査電子顕微鏡による解析では NALT 濾胞上皮には、線毛を持たない細胞が点在し、周辺の線毛上皮とは表面構造が異なる細胞が存在していた。免疫組織染色によって GP2 と Tnfaip2 で染色される細胞がこの部位に存在しており、この細胞はパイエル板 M 細胞マーカーである UEA-I レクチンと反応した。免疫電子顕微鏡法による解析では、濾胞上皮の GP2 陽性細胞は線毛を持たず、リンパ球と密に接する構造を持ち、腸管パイエル板 M 細胞とよく似た特長を呈した。また GP2 陽性細胞は鼻腔内の蛍光ビーズを取り込む能力を有した。これより NALT 濾胞上皮の GP2 陽性細胞は腸管 M 細胞に相当する細胞であると考えられる。

続いて鼻腔における RANKL、RANK の発現を免疫組織法によって解析した。受容体 RANK は濾胞上皮に点在し、Tnfaip2、GP2 陽性細胞とよく一致した。RANKL は濾胞上皮下のストローマ細胞で発現が認められた。また RANKL 腹腔内投与により NALT M 細胞の増加が認められたことから、NALT M 細胞分化は RANKL-RANK シグナルが制御していると考えられた。さらに、腸管 M 細胞の分化において RANKL-RANK シグナルの下流で働く分子である転写因子 RelB と Spi-B が NALT 濾胞上皮に発現していた。

RANKL 投与時には濾胞上皮の肥厚化と Ki-67 陽性細胞の増加が確認された。GST 投与マウスの濾胞上皮では分裂中の細胞はほとんど認められなかった。この結果は RANKL による NALT M 細胞の分化誘導は細胞分裂を伴うものであることを示す。

【考察】

NALT M 細胞とパイエル板 M 細胞は RANKL-RANK シグナルによる分化機構と基礎的な発現分子がよく一致した。これは鼻腔と腸管という異なる粘膜組織間で M 細胞分化制御機構が共通することを示す。一方で、鼻腔粘膜を覆う上皮は通常時ほとんど分裂することは無く、腸管上皮が 3 日で入れ替わることとは環境が異なる。RANKL 投与時には鼻腔上皮の基底細胞における増殖が認められたことから、NALT M 細胞の増加は新たな細胞分裂を伴う可能性があることを示している。RANKL に対するこの応答は濾胞上皮に限られ、周辺の鼻腔上皮、嗅上皮には認められなかった。これは濾胞上皮が周辺の鼻腔上皮とは性質を異にしており、さらには RANKL に反応する M 細胞前駆細胞が存在している可能性を示唆している。

【結語】

腸管と鼻腔の粘膜組織における M 細胞の発現分子と分化制御機構は共通している。