

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	三好恭子
学位論文題目			
ヒト消化管粘膜上皮細胞における Toll 様受容体の発現に関する研究			
未公表			
研究目的			
<p>生体が病原体の侵入を防ぐ免疫系には、自然免疫と獲得免疫の二つがある。宿主は、病原体に曝露されるとまず自然免疫を発動する。自然免疫は、獲得免疫と異なり昆虫から哺乳類まで認められることなどから、刺激に対して受動的、非特異的に反応するだけと考えられていた。Toll は、1996 年にショウジョウバエの微生物に対する感染防御に必須であることが示された分子である。哺乳類におけるホモログである Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) は、微生物感染に対する宿主の自然免疫に関与している。すなわち、マクロファージなど食細胞では、TLR が様々な微生物由来物質を検出して自然免疫系を活性化させることが示され、その過程に CD14, MD2 及びシグナル分子である MyD88 が関与する。しかし、これまで消化管粘膜上皮の TLR についてはほとんど知られていない。消化管を構成する 4 系統の上皮細胞の一つであるパネート細胞は、小腸クリプトの最基底部に認められる顆粒を有する細胞であり、その顆粒中には α-defensin 等の内因性抗菌ペプチドが含まれる。最近、マウス小腸パネート細胞が <i>ex vivo</i> 細菌感染に反応して内因性抗菌ペプチドを分泌し、自然免疫による感染防御に貢献していることが明らかになった。本研究の目的は、ヒト腸管上皮細胞の自然免疫機構における TLR の関与を、ヒト正常小腸粘膜から得た単離小腸クリプトおよび単離パネート細胞を用いて解明することである。</p>			
材料・方法			
<p>1. ヒト小腸クリプトおよびパネート細胞の単離 インフォームド・コンセントの下に切除回腸 (9 例) または内視鏡生検回腸 (6 例) の新鮮材料から EDTA 分離法で 1 個の小腸クリプトを単離した。また、100 個以上のクリプトから collagenase 分離法で単一細胞としてパネート細胞を単離した。</p> <p>2. nest PCR 法を組み合わせた RT-PCR 法 1 個の単離クリプト及び 4 個の単離パネート細胞から total RNA を抽出した。Toll 様受容体 (TLR1-10), CD14, MD2 及び MyD88 を検出する primer を作製し RT-PCR を行った後、nest primer で二次 PCR を施行した。最終産物を 2% agar gel で電気泳動しエチジウムブロマイドで染色した。</p> <p>3. 免疫化学的解析 単離小腸クリプトと単離パネート細胞における TLR2 及び TLR4 の免疫局在をパネート細胞特異的 α-defensin (HD5) との免疫二重染色で、共焦点レーザー顕微鏡を用いて</p>			

解析した。抗 TLR2 抗体と抗 TLR4 抗体は Texas Red 標識アビジンビオチン系で、抗 HD5 抗体は FITC 標識二次抗体で反応させた。

4. ヒト小腸パネート細胞分泌誘導と殺菌アッセイ系を用いた阻害実験

700 個の単離小腸クリプトを *Salmonella typhimurium* *phoP*⁻ (*S. typhimurium*) に曝露してパネート細胞分泌を誘導した群、非曝露群及び 5 μ g/ml 抗 TLR2 抗体を前処置してから細菌曝露した群を培養した。回収した上清と 1 \times 10³ CFU の *S. typhimurium* の反応物をプレート培地で培養し、結果は生存 CFU で示した。また、それぞれの上清は生化学的解析に用いた。

5. Western-blot 法

方法 4 で得た各群上清から蛋白を抽出し、5M urea 含有 Acid-urea PAGE を行った後、nitrocellulose 膜に転写し、HD5 の免疫反応性を chemiluminescence 法で検出した。

6. 統計

測定値は平均値 \pm 標準誤差で示し、統計学的検討は Student's t-test を用いて行い、P < 0.05 を統計学的に有意とした。

成 績

1. ヒト単離小腸クリプト及び単離パネート細胞における TLR 遺伝子発現

位相差顕微鏡観察で、コントラストの強い顆粒を持つパネート細胞を最基底部に含む単離小腸クリプトは容易に他と区別できた。単離細胞分画においてパネート細胞はコントラストの強い顆粒の存在によって他の細胞と識別できた。正常ヒト小腸クリプトは、TLR1~8, TLR10, CD14, MyD88 の遺伝子を発現した。TLR9 と MD2 は発現しなかった。単離パネート細胞の TLR および CD14, MD2, MyD88 遺伝子発現パターンは小腸クリプトの場合と一致した。

2. パネート細胞における TLR2 及び TLR4 の免疫局在

ヒト単離小腸クリプトにおける TLR2 と TLR4 はどちらも小腸クリプトの最基底部にのみ免疫局在を認めた。さらに単一細胞レベルでの単離パネート細胞における TLR の局在を、共焦点レーザー顕微鏡で HD5 との免疫二重染色により検討した結果、TLR2 及び TLR4 は HD5 陽性細胞のみに発現していた。TLR2 または TLR4 と、HD5 の染色局在は独立していた。また、TLR4 は細胞膜だけでなく、細胞質内において顆粒のすぐ近傍にも局在を認めた。

3. パネート細胞からの TLR2 を介した内因性抗菌ペプチド分泌反応

小腸クリプトと *S. typhimurium* を、抗 TLR2 抗体で前処置してから *ex vivo* 曝露した場合には、パネート細胞分泌物由来の抗菌活性が、前処置しなかった場合に比較して有意に (約 70%) 抑制された。Western blot 法により、抗 TLR2 抗体で前処置した場合には *ex vivo* 細菌曝露によるパネート細胞分泌物中の HD5 バンドの濃さが減弱した。細菌曝露しなかった対照上清中には HD5 は認められなかった。

考 案

食細胞の TLR の機能は、ノックアウトマウスの解析で、それぞれの TLR は様々な微生物の構成成分を認識し、シグナルは共通に MyD88 分子を介することが知られている。食細胞では CD14 と TLR4 アダプター分子として MD2 の存在が示された。しかし、ヒト消化管粘膜上皮の TLR と関連分子については知られていなかった。消化管は、腸内細菌や様々な病原体由来物質に常に曝露されている。Ayabe らはマウスのパネート細胞機能を検討し、*ex vivo* 細菌感染が起こるとすみやかにパネート細胞から内因性抗菌ペプチド (α -defensin) が分泌され、曝露細菌を死滅させることを示した。Akira ら

は食細胞における TLR の細胞内局在を検討して、ある種の TLR は、細胞膜上で極性を持って局在することや細胞膜上ではなく細胞質に存在することを示した。本研究で、ヒト小腸クリプトにおいて TLR 発現はパネート細胞にのみ認められ、そのパネート細胞内の局在を明らかにした。さらに、消化管自然免疫に貢献しているパネート細胞に発現する TLR の機能を解析し、顆粒分泌反応に TLR2 が関与することをはじめて明らかにした。

TLR 発現パターンの違いが、ある微生物に特異的感染の成立や、宿主の感染部位の決定、さらには疾患の原因と関連する可能性がある。ヒトのパネート細胞になぜ細菌由来の CpG DNA を認識する TLR9 遺伝子が欠除しているのかは不明であるが、本研究により、今後、パネート細胞上の TLR の発現パターンやその異常が腸管感染症や炎症性疾患と関連するか否かを明らかにすることが可能となろう。

結 論

ヒト単離小腸クリプトは TLR1~8, TLR10, CD14, MyD88 遺伝子を発現した。TLR2 と TLR4 はパネート細胞に免疫局在を認めた。Ex vivo 細菌刺激によるパネート細胞からの α -defensin 分泌反応は TLR2 抗体により著明に抑制された。これらの結果より、ヒトの消化管粘膜において TLR が微生物認識と感染防御に重要な役割を果たしていることが示唆された。




引用文献

- 1) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. (1997): A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388: 394-397.
- 2) Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. (2000): Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nature Immunol 1: 113-118.
- 3) Akira S, Takeda K, Kaisho T. (2001): Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nature Immunol 2: 675-680.

参考文献

- 1) 齊藤裕輔, 野村昌史, 藤谷幹浩, 渡 二郎, 泉 信一, 柴田直美, 三好恭子, 藤谷佳織, 佐藤智信, 前本篤男, 綾部時芳, 蘆田知史, 高後 裕: 小腸の良性腫瘍および腫瘍様病変: 胃と腸 第 36 巻第 7 号:959-966, 2001.
- 2) 藤谷幹浩, 齊藤裕輔, 前本篤男, 三好恭子, 藤谷佳織, 渡 二郎, 綾部時芳, 蘆田知史, 野村昌史, 高後 裕: 潰瘍性大腸炎における拡大内視鏡診断: 消化器内視鏡 Vol 13.No 3 :410-417, 2001.
- 3) 藤谷幹浩, 齊藤裕輔, 渡 二郎, 三好恭子, 藤谷佳織, 前本篤男, 綾部時芳, 蘆田知史, 上垣正彦, 太田智之, 折居 裕, 高後 裕: sm massive 以深に浸潤した 10mm 以下の大腸癌の X 線診断: 胃と腸 第 36 巻第 11 号:1371-1379, 2001.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	三好 恭子
<p style="margin: 5px 0;">審査委員長 <u>高 後 裕</u> </p> <p style="margin: 5px 0;">審査委員 <u>若 宮 伸 隆</u> </p> <p style="margin: 5px 0;">審査委員 <u>伊 藤 亮</u> </p>			
<p style="font-size: 1.2em; margin: 0;">学 位 論 文 題 目</p> <p style="margin: 10px 0 0 40px;">ヒト消化管粘膜上皮細胞における Toll 様受容体の発現に関する研究</p>			
<p>自然免疫は、これまで刺激に対して受動的、非特異的に反応するだけと考えられていたため獲得免疫に比べてよく理解されていなかった。近年、Toll様受容体 (TLR) が微生物感染に対する宿主の病原体認識受容体であること、食細胞では TLR 関連分子の CD14, MD2 及びシグナル分子である MyD88 が関与することが知られるようになった。一方、消化管粘膜上皮における自然免疫担当細胞である小腸パネート細胞が <i>ex vivo</i> 細菌感染に反応して内因性抗菌ペプチドを分泌し感染防御に貢献していることが明らかになった。しかし、ヒト消化管粘膜における Toll 様受容体の発現の有無や役割は未だに不明である。本研究では、ヒト正常小腸粘膜から得た単離小腸クリプトおよび単離パネート細胞を用いて、消化管粘膜における Toll 様受容体及び関連分子の発現と機能を検討したもので、以下の結果を得た。</p> <p>① Toll 様受容体 (TLR) および CD14, MyD88 の遺伝子発現が単離小腸クリプトに認められた。単離パネート細胞の検討により、パネート細胞における TLR, CD14, MyD88 遺伝子発現を確認した。パネート細胞には MD2 遺伝子</p>			

は発現を認めなかった。

- ② 免疫化学的検討により、TLR2 および TLR4 蛋白は、パネート細胞表面および細胞内に局在していた。
- ③ *ex vivo* 細菌刺激によるパネート細胞分泌アッセイ系を用いてパネート細胞顆粒からの抗菌活性放出反応を検討した結果、その過程に TLR2 分子が関与していた。
- ④ Western blot 法により、抗 TLR2 抗体で前処置した場合には前処置しなかった場合と比べて、*ex vivo* 細菌曝露によるパネート細胞分泌物中の alpha-defensin 量が明らかに減少していた。

本研究結果は、ヒトの消化管粘膜上皮においてパネート細胞の TLR が微生物認識と感染防御機能に関わることを明らかにした最初の報告である。得られた成績は、消化管粘膜上皮における微生物感染に対する自然免疫系のよく制御されたダイナミックな作用を示唆し、消化管自然免疫機構の分子基盤と機能の理解に大きく貢献するものと考えられる。また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に対する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。