

課題番号 45

M 細胞を起点とする加齢時のパイエル板の形態維持機構の解明

[1] 組織

代表者：古川 睦実

(東北大学大学院農学研究科)

対応者：小笠原 康悦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

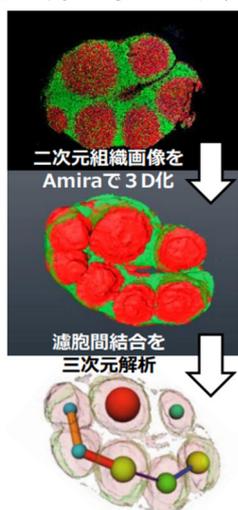
野地 智法 (東北大学大学院農学研究科)

小山 真 (東北大学大学院農学研究科)

研究費：共通研究施設利用費 15 万円

[2] 研究経過

加齢は腸内の免疫および微生物環境に多大な影響を与える。申請者はこれまで、加齢医学研究所が有する組織イメージング技術(共焦点レーザー顕微鏡および 3D 可視化解析システム Amira)を駆使し、腸管での免疫誘導および、腸内微生物との共存関係の構築に重要な役割を有するパイエル板(腸管に存在する二次リンパ組織)の 3D 立体構築技術を確認することで、若齢時と加齢時のパイエル板の構造を比較することに成功してきた(右図)。



今年度は、パイエル板の濾胞随伴上皮細胞層に存在し、管腔内の抗原を組織内に取り込むため、腸管の免疫応答に重要である M 細胞に着目し、確立した組織学的解析技術を駆使することで、マウスのパイエル板における濾胞構造と細胞増殖領域の形態形成機序および、M 細胞がそれらに与える影響を明らかにすることを目的とした研究を実施した。

本研究では 2,4,7,10 週齢と 20 ヶ月齢のマウスの小腸パイエル板を採取し、免疫組織化学染色に供すことで、形態変化を組織学的に解析した。また、パイエル板に発達する B 細胞領域および増殖細胞領域の形成過程を明らかにすべく、B 細胞を検出するための抗 B220 抗体および増殖細胞を検出するための抗 Ki67 抗体、老齢細胞を検出するための抗 p21 抗体を用いた

免疫組織化学的染色を行った。さらに、染色画像を 3D 解析ソフトウェア Amira による 3 次元的解析に供した。なお、本課題は加齢医学研究所教授の小笠原康悦先生(生体防御学)が受入教員として参画し、メール等を介した研究打ち合わせを通して、免疫学的観点からの研究アドバイスをを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

Amira を用いたパイエル板の立体構築で得られた結果から、濾胞の重心点及び、立体表面の各頂点の座標を取得することで、計算論的学習理論との融合が可能となった。これにより、定性的解析技術を構築し、1つ1つの濾胞がどのような形態学的変化を遂げているのか、詳細な形状評価を行った。

各濾胞の重心点から全頂点までの距離をもとに算出した変動係数の散布図を作成し、変動係数が 0 に近づけば近づくほど、真球の形をとる解析方法を使用した。その結果、週齢を追うごとに濾胞形状はきれいな球体に変形していくことが見出され(図 2)、臓器形態形成過程は、ある一定の形状になるための成長過程がプログラムされていることが示唆された。

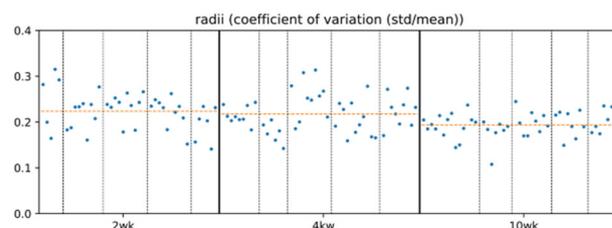


図 2：パイエル板濾胞の性状解析

また、パイエル板の濾胞内に存在する増殖細胞領域(胚中心)形成に対し、M 細胞が与える影響を評価するため、免疫組織化学染色および Amira による立体

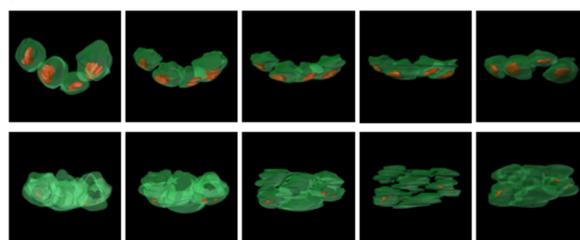


図 3：パイエル板の 3D 画像

(上：野生型 下：M 細胞欠損群、緑：B 細胞 赤：増殖細胞)

再構築を行ったところ、4週齢において野生型ではすべての濾胞で胚中心が形成される一方で、M細胞欠損群では胚中心形成にばらつきが確認された(図3)。

また、4週齢から7週齢にかけては、楕円形の胚中心が形を保ったまま拡大し、発達していくことを示唆する染色結果が得られた。一方、老齢期である20ヶ月齢の胚中心は、大きさこそ維持されているが、形は歪なものとなっていることが明らかになった。さらに、M細胞の有無は離乳後の胚中心形成には重要となる一方で、成熟期や老齢期の胚中心形成には大きく影響しないことが示唆された。(図4)

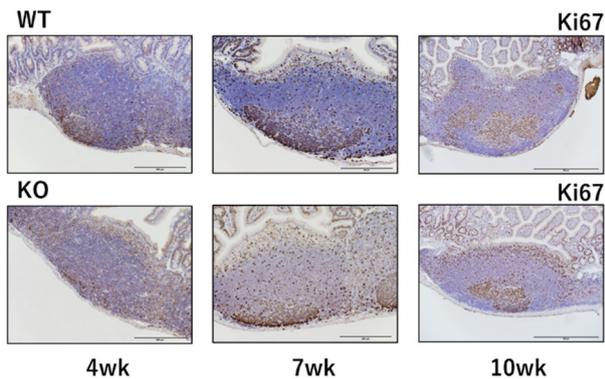


図4：パイエル板内の胚中心領域
(上：野生型 下：M細胞欠損群)

次に、老化細胞の存在領域を免疫組織化学により解析したところ、7週齢のパイエル板内にはほとんど検出されなかったのに対し、20ヶ月齢のパイエル板内には、濾胞随伴上皮細胞と胚中心領域において、老化マーカーを発現する細胞集団が存在することが示された。また、この存在領域は胚中心領域の崩壊と一致するように存在していた(図5)。

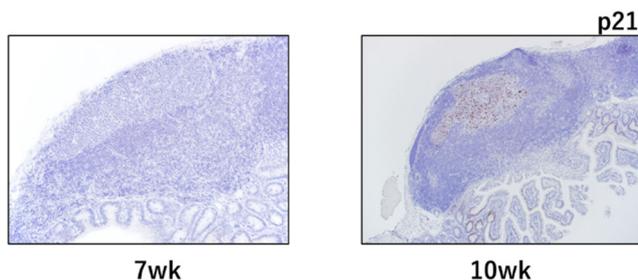


図5：老化マーカーの存在領域

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、加齢に伴うパイエル板内の濾胞と胚中心の形態形成には、一定の形状を目指して成長する段階とそれを維持することができずに崩壊していく段階とが存在することが明らかとなった。本研究により、免疫応答誘導のため、時期に応じた異なるアプローチの必要性が示唆されたことは、インパクトの

大きなものであった。また、令和4年度の東北大学加齢医学研究所共同利用・共同研究としても、代表者(古川睦実)が申請した関連課題を採択して頂いており、家畜を対象とした粘膜免疫学の発展につながる研究成果の蓄積が、今後も期待される。

[4] 成果資料

現在、Amiraを用いた免疫臓器の3D可視化に関する論文を作成中であることから、直接的な成果論文(原著論文)は無いが、以下の学会で口頭発表を行っている。

1. 勅使河原杏莉、古川睦実、野地智法：3D可視化技術を用いた幼若期のパイエル板の形態学的解析、第70回東北畜産学会福島大会、福島、2021年9月