

氏名(本籍)	の野 ち地 とも智 のり法
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博第802号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	農学研究科資源生物科学専攻 (博士課程)
学位論文題目	腸管上皮細胞層における細胞間相互ネットワーク 新規上皮細胞-リンパ球間接着メカニズムとしてのEp- CAMの生物学的役割
論文審査委員	(主査) 教授 山口 高 弘 (副査) 教授 佐藤 英 明 教授 小原 嘉 昭 助教授 麻生 久

論文内容要旨

緒論

消化器、呼吸器、泌尿・生殖器などの広大な面積を有する粘膜面は、「内なる外」と称され、絶えず病原微生物、異種抗原などの侵入に曝されている。生体はこれらの危機に応答するため、粘膜免疫システムと呼ばれる巧妙な免疫機構を駆使することにより、第一線バリアを形成する。消化管、特に小腸粘膜上皮層には、栄養素の取り込みを行う吸収上皮細胞や、粘液を分泌する杯細胞などの上皮系細胞以外に、上皮細胞間リンパ球 (Intraepithelial lymphocyte; IEL) が数多く存在し、相互依存的に粘膜クロストークシステムを形成し、病原微生物感染時には細胞障害活性 (cytotoxic activity) を発揮するなど免疫的防御能を有している。

マウス IEL には、脾臓、リンパ節、末梢血などと比較して高頻度に $\gamma\delta$ 型の T 細胞レセプター (TCR) を有する $\gamma\delta$ T 細胞 ($\gamma\delta$ IEL) が存在する。 $\gamma\delta$ IEL が欠損した TCR δ マウスでは、腸管上皮細胞の分裂増殖能が著しく低下することから、 $\gamma\delta$ IEL は腸管上皮細胞の発達分化に必須と考えられている。近年、 $\gamma\delta$ IEL が産生する角化細胞増殖因子 (KGF) が、腸管上皮細胞の分裂増殖に深く関与することが報告された。一方、腸管上皮細胞が産生する IL-7, IL-15, SCF 等は IEL の成熟・活性化を促進する。このように、腸管上皮細胞と IEL 間のサイトカインを介した細胞間クロストークは、粘膜免疫システムにおける第一線バリアとしての粘膜上皮の形態形成に必須である。しかしながら、IEL の腸管上皮層への遊走ならびに、上皮細胞間での接着メカニズムは未だほとんど解明されておらず、そのメカニズムを究明することは粘膜バリアとしての腸管上皮の形態形成機序ならびに、感染防御メカニズムを解明する上で重要であるだけでなく、IEL の粘膜免疫システムにおける機能的役割をさらに理解する上でも重要である。

本研究では、腸管上皮細胞の細胞表面分子を認識するモノクローナル抗体を多数作製することにより、腸管上皮細胞と IEL 間における新規細胞接着メカニズムを探求することを目的とした。

第一章 ブタ腸管上皮細胞の単離精製法の確立と、特異的モノクローナル抗体の作製

腸管上皮層は、吸収上皮細胞、杯細胞、消化管ホルモンを内分泌する基底顆粒細胞、抗菌物質を分泌する陰窩のパネート細胞といった少なくとも 4 種類の細胞集団から構成され、病原微生物の侵入に対する最前線での一層の防御バリアを形成している。今日、リンパ球・単球などの免疫担当細胞の細胞表面分子が次々と同定され、CD (cluster of differentiation) 分類化が進む中で、上皮細胞特異的膜表面分子、ならびにその認識モノクローナル抗体に関する報告は未だ少ない。

本章では、近年、ヒト遺伝子との相同性が高く、臓器移植の分野で特に注目されているブタ (3 元交雑) を用い、小腸組織より各種酵素 (コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、パンクレアチン) を組み合わせて細胞を単離した後、比重遠心法ならびに MACS システムを用いて、腸管上皮細胞の単離精製法を確立した。次に精製上皮細胞をマウスに免疫することにより、腸管上皮細胞特異的モノクローナル抗体を作製し、腸管上皮細胞と IEL 間の細胞間接着に参与する分子を探求することを試みた。

その結果、約 90% の腸管上皮細胞の精製に成功し、またそれを免疫することにより、計 10 クローンのモノクローナル抗体の作製に成功した。中でも、#5-15-1 抗体は、腸管上皮細胞の側面および基底膜を強く認識し (Fig. 1)、その認識抗原は、非還元状態で約 41-43kDa であった (Fig. 2)。さらに、#5-15-1 抗体は、小腸以外では、大腸および肺の上皮細胞で反応特異性を示したが、食道、胃では、その特異性は認められなかった (Fig. 3, 4)。本研究は、腸管上皮細胞と IEL 間の新規細胞接着メカニズムを解明することが最終目的であり、特異性と反応性を考慮して、この #5-15-1 抗体を用いてさらに詳細な解析を進めた。

第二章 #5-15-1 抗体の腸管上皮細胞間リンパ球 (IEL) での反応特異性と、その認識分子の同定

腸管上皮細胞間に存在するリンパ球 (IEL) は、種々の病原菌ならびにウイルスの侵入に対して細胞障害活性 (cytotoxic activity) を発揮するなど、生体防御能を有している。腸管上皮細胞間は、密着結合 (tight junction) 等の細胞接着装置によって互いが結合することにより、強固な上皮層を形成しているのに対し、IEL に関しては、腸管上皮層にどのように遊走し、また腸管上皮細胞と、どのような細胞間接着装置を有しているのかは未だ明らかではなく、IEL のみが完全に欠損したモデルマウスは今日までのところ存在しない。IEL の上皮間での定着性の解明は、粘膜上皮の形態形成の解明にもつながることから、本章では、前章で作製した#5-15-1 抗体の IEL に対する特異性を検討し、さらには本抗体の認識分子を同定することを目的とした。

単離した腸管上皮細胞、IEL、脾細胞ならびに末梢血リンパ球を#5-15-1 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した結果、本抗体は腸管上皮細胞のみならず IEL にも反応特異性を示した。しかしながら、脾細胞ならびに末梢血リンパ球には、全く反応性が認められなかった (Fig. 5)。また、Affinity chromatography により#5-15-1 抗体の認識分子を精製し、トリプシン消化後、MALDI-TOF-MS および tandem MS によりペプチド分子量ならびにアミノ酸配列の推測により、本分子の同定を試みた結果、本分子がヒト Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) のホモログである可能性が示唆された (Fig. 6)。そこで、ブタ Ep-CAM 遺伝子のクローニングを行い (Fig. 7)、その ORF を形質導入したトランスフェクタントを#5-15-1 抗体で染色した結果、このトランスフェクタントは本抗体に特異的に認識されることが示された (Fig. 8)。以上の結果より、#5-15-1 抗体が抗ブタ Ep-CAM 抗体であることを直接的に証明することに成功した。さらに、#5-15-1 抗体および抗ブタ CD45 モノクローナル抗体を併用した二重免疫染色法により、小腸での Ep-CAM の発現を詳細に検討した結果、CD45 陽性の IEL に陽性反応が認められたのに対し、粘膜固有層の CD45 陽性リンパ球 (LPL) では、陽性反応は全く認められなかった (Fig. 9)。

第三章 マウス小腸での Ep-CAM の発現解析

抗ブタ Ep-CAM モノクローナル抗体 (#5-15-1) を用いた解析から、上皮細胞間接着分子の一つである Ep-CAM が腸管上皮細胞のみならず IEL にも発現することが初めて明らかにされ、Ep-CAM を介した腸管上皮細胞と IEL 間における新規接着メカニズムの存在が証明された (前章)。そこで本章では、マウスにおける、Ep-CAM を介する腸管上皮細胞と IEL 間の細胞接着メカニズムを解析することを目的とした。近年の遺伝子工学分野の目覚ましい発展により、遺伝子欠損マウスの作成が容易な今日、Ep-CAM を介した腸管上皮細胞と IEL 間の細胞接着メカニズムを分子レベルで解明することは、そう困難ではない。本章では、その基礎実験として、ブタ同様の Ep-CAM の発現が異種動物であるマウスでも認められるか否かを、タンパクレベルおよび遺伝子レベルで解析した。

マウスより単離した腸管上皮細胞、IEL ならびに LPL を抗マウス Ep-CAM 抗体で染色した後、フローサイトメトリーを用いて Ep-CAM の発現を解析した結果、ブタでの結果同様、腸管上皮細胞と IEL において、Ep-CAM の発現が認められたのに対し、LPL ではその発現は検出されなかった (Fig. 10)。また、抗マウス Ep-CAM 抗体と抗マウス CD45 抗体とを併用した二重免疫染色法により、マウス小腸での Ep-CAM の発現を検討した結果も、ブタでの結果同様、CD45 陽性の IEL に陽性反応が認められたのに対し、CD45 陽性 LPL では、陽性反応は全く認められなかった (Fig. 11)。さらには、小腸上皮層より単離した CD45 陰性細胞と陽性細胞を、それぞれ腸管上皮細胞および IEL として分離精製した後、RT-PCR 法を行った結果、両細胞において Ep-CAM 特異的 mRNA の発現が認められた (Fig. 12)。

総合考察

本研究は、粘膜免疫システムにおいて多機能性を発揮している腸管上皮細胞と IEL の細胞間接着メカニズムを解明することを目的とした。近年、腸管上皮細胞が発現する E-cadherin が腸管上皮細胞間の接着のみならず、IEL が発現する $\alpha_E\beta_7$ integrin との異種タンパク間で結合することにより、腸管上皮細胞と IEL 間の接着に関与していることが報告された。事実、 α_E integrin 遺伝子欠損マウスを用いた解析では、IEL 数は約半数にまで減少する。しかしながら、IEL は完全には消失しない。このことは、未解明な腸管上皮細胞と IEL 間の細胞間接着メカニズムが存在することを強く示唆する。

本研究で作製に成功した抗ブタ Ep-CAM モノクローナル抗体は、腸管上皮細胞のみならず、IEL にも特異性を有することが、フローサイトメトリー解析および免疫組織学的解析から示され、Ep-CAM を介する腸管上皮細胞と IEL 間の新規細胞間接着メカニズムの存在が証明された。さらには、マウスを用いた解析でも、ブタ同様、腸管上皮細胞と IEL において、Ep-CAM がタンパクレベルならびに mRNA レベルで発現していることを突き止めた。このことは、種間を超えて、Ep-CAM が腸管上皮細胞と IEL 間の細胞接着に関与していることを証明するものであり、ヒトにおいても、本メカニズムが存在することが推測される。

しかしながら、本研究成績を確証するためには、Ep-CAM 遺伝子欠損マウスの作成とそれを用いた個体レベルでの直接的解析が必須であり、Ep-CAM 分子に関して細胞間接着の観点だけでなく感染抵抗性あるいは粘膜免疫応答誘導能等、詳細に解析していく必要があると考える。本研究ではさらなる展開として、すでに Ep-CAM 遺伝子欠損マウスの作製を開始しており、腸管上皮細胞と IEL 間の細胞間接着メカニズムが近い将来全解明できるものと期待される。

Fig. 1

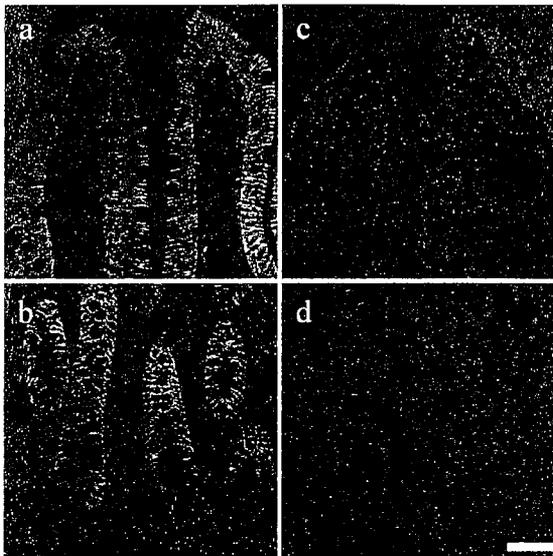


Fig. 1. Immunoreactivity of newly established mAb #5-15-1. mAb #5-15-1 specifically reacted with basolateral surface of IECs from crypt to villi. Bar=50 μ m

Fig. 3

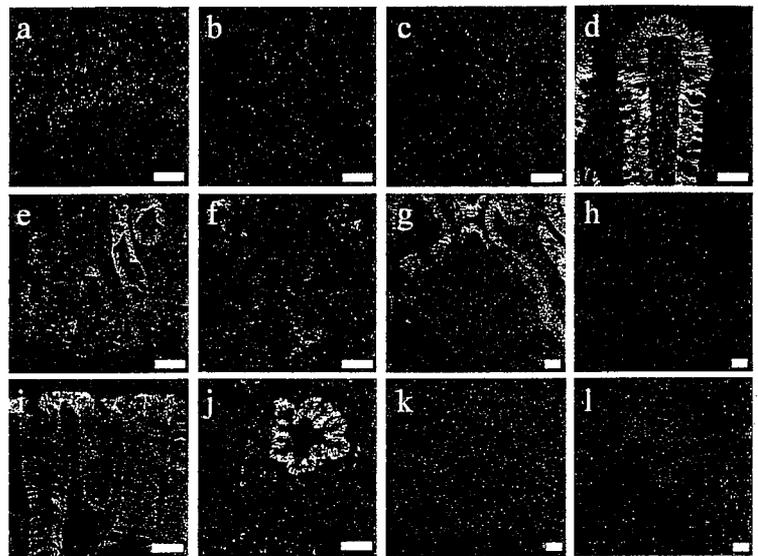


Fig. 3. Immunoreactivity of mAb #5-15-1 for different mucosa-associated tissues. Almost all of the epithelial tissues except esophagus and stomach were reacted with #5-15-1. (a) Esophagus epithelium, (b) stomach epithelium, (c) fundic gland in stomach, (d) epithelium in duodenum, (e) crypt in duodenum, (f) gloandulae deodinales in duodenum, (g) follicle-associated epithelium (FAE) in Peyer's patch, (h) lymphoid follicle in Peyer's patch, (i) epithelium in colon, (j) epithelium in lung, (k) hepatocyte in liver, (l) splenocyte in spleen. Bar=50 μ m.

Fig 2

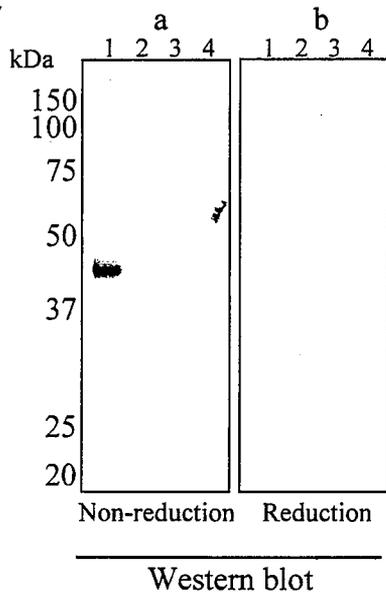


Fig. 2. Immunoprecipitation and western blot analyses of newly established mAb #5-15-1. The lysate of small intestine (lanes 1 and 2) or PBS (lanes 3 and 4) were immunoprecipitated with #5-15-1 (lanes 1 and 3) and isotype control (mouse IgG2b; lane 2 and 4) and then analyzed by western blot with biotinylated #5-15-1 and ABC-AP under reducing (right panel) or non-reducing (left panel) condition. A protein measuring approximately 41-43 kDa was visible by mAb #5-15-1 under non-reducing but not reducing condition.

Fig 4

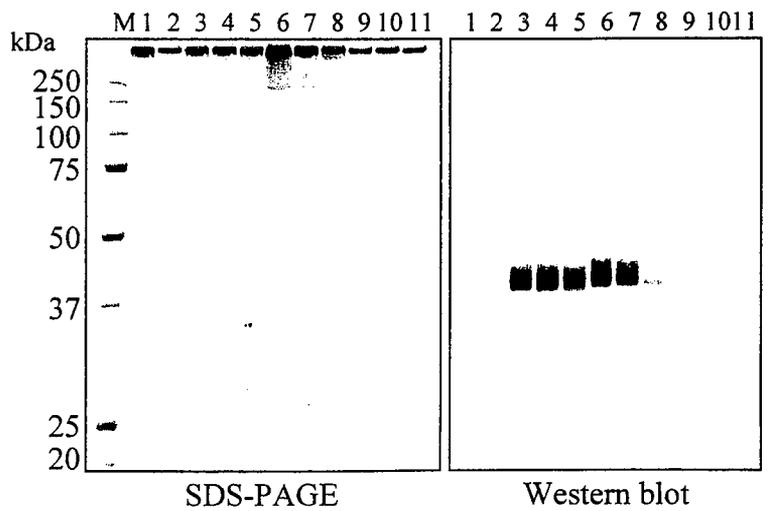


Fig. 4. Immunoprecipitation and western blot analysis of different mucosa-associated tissues with mAb #5-15-1. The left panel shows the data obtained using SDS-PAGE, while the right panel indicated the data obtained by using western blot analysis. A protein with a molecular mass of 41-43 kDa was visible in the duodenum, jejunum, ileum, appendix, colon, and lung but not in the esophagus, stomach, liver and spleen under non-reducing condition. (1) Esophagus, (2) stomach, (3) duodenum, (4) jejunum, (5) ileum, (6) appendix, (7) colon, (8) lung, (9) liver, (10) spleen, (11) mAb alone.

Fig. 9

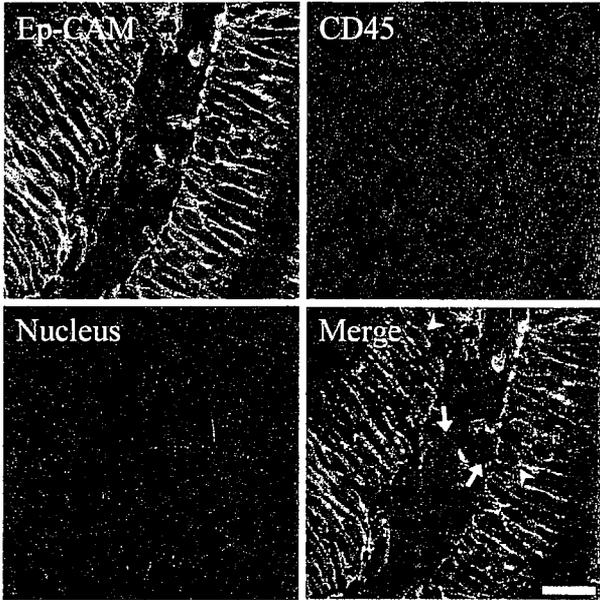


Fig. 9. Double immunohistochemical analysis of porcine small intestine and spleen with anti-porcine Ep-CAM (#5-15-1) and anti-porcine CD45. Tissues section (5 μ m) were incubated with these mAbs followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG2b and rhodamine-conjugated anti-mouse IgG1, respectively. The slides were then counterstained by DAPI. In the small intestine, CD45-positive IEL (arrowhead) were co-stained by anti-porcine Ep-CAM (#5-15-1), but such co-localization was not seen for lamina propria lymphocytes (LPL, arrow). Bar=20 μ m.

Fig. 10

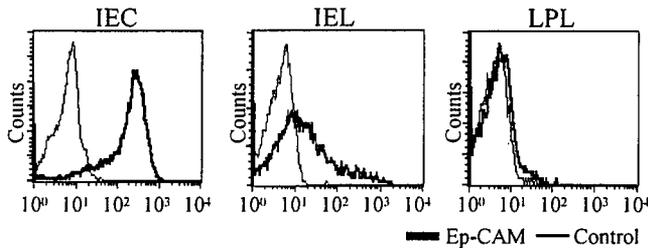
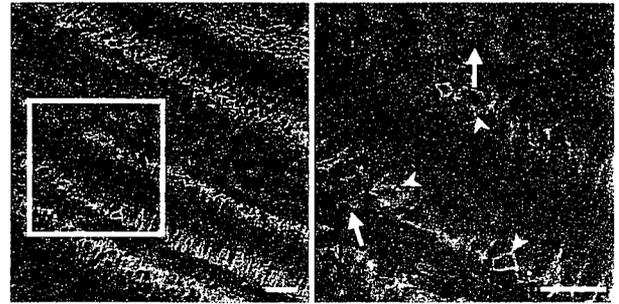


Fig. 10. Immunoreactivity of anti-murine Ep-CAM mAb against isolated IEC, IEL and LPL. IEC and IEL were reacted with anti-murine Ep-CAM mAb. In contrast, LPL were not reacted with anti-murine Ep-CAM mAb.

Fig. 11



Ep-CAM, CD45, Nucleus

Fig. 11. Double immunohistochemical analysis of murine small intestine with anti-murine Ep-CAM (rat IgG2a) and APC-conjugated anti-murine CD45. Tissues section (5 μ m) were incubated with these mAbs followed by FITC-conjugated anti-rat IgG2a. The slides were then counterstained by DAPI. In the small intestine, CD45-positive IELs (arrow) were co-stained with anti-murine Ep-CAM, but such co-localization was not seen for lamina propria lymphocytes (LPLs, arrowhead). Bar=20 μ m.

Fig. 12

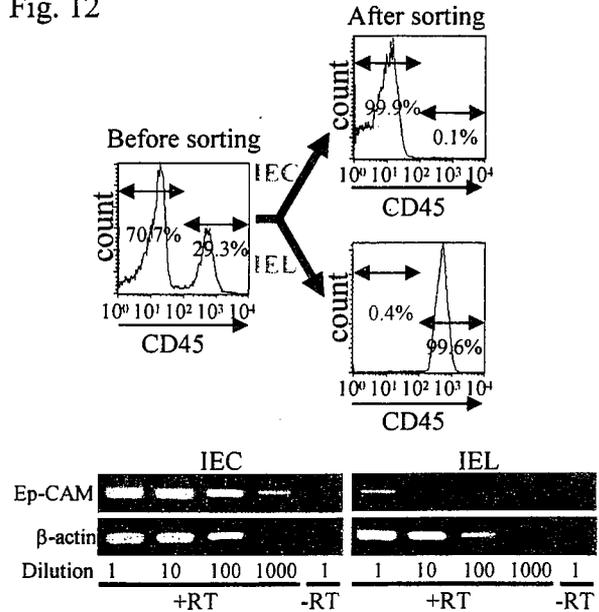


Fig. 12. Expression of murine Ep-CAM mRNA in purified IEC and IEL. After isolation with EDTA, murine IEC and IEL were negatively and positively purified by FACSaria using PE-conjugated anti-murine CD45, respectively. Expression of Ep-CAM mRNA was analyzed by RT-PCR. Both IEC and IEL expressed Ep-CAM mRNA. However expression level in IEC was higher than that in IELs.

論文審査結果要旨

消化管、特に小腸粘膜上皮層には、摂取した栄養素の取り込みを専門とする吸収上皮細胞、粘液を分泌する杯細胞などの上皮系細胞以外に、上皮細胞間リンパ球 (Intraepithelial lymphocyte ; IEL) が数多く存在し、相互依存的に粘膜クロストークシステムを形成し、病原微生物感染時には細胞障害活性 (cytotoxic activity) を発揮し、免疫防御能を司っている。腸管上皮細胞と IEL のサイトカインを介した細胞間クロストークは、粘膜免疫システムの第一線バリアとして粘膜上皮の形態形成に必須である。しかしながら、IEL が腸管上皮層にどのように遊走し、また上皮細胞間にどのように定着するのかは、未だほとんど解明されていない。その機構解明は、粘膜バリアとしての腸管上皮の形態形成や感染防御のメカニズムを解明するだけでなく、IEL の粘膜免疫システムにおける機能的役割をさらに理解する上でも極めて重要である。本研究では、腸管上皮細胞の細胞表面分子を認識するモノクローナル抗体を樹立し、腸管上皮細胞および IEL 間における新規細胞接着メカニズムを探求することを目的とした。

初めに、ブタの腸管から約 90% の精製度の上皮細胞を単離し、マウスに免疫することにより、10 クローンの腸管上皮細胞特異的モノクローナル抗体を樹立した。この中から、腸管上皮細胞の側面と基底膜を強く認識する抗体 (# 5-15-1) に着目し、その認識抗原 (非還元状態で約 41-43kDa) を明らかにした。腸管上皮細胞ならびに IEL 間の細胞間接着に関与する分子はこの抗体の反応特異性を中心に探求した。IEL が腸管上皮層で腸管上皮細胞と、どのような細胞間接着メカニズムを有するかは明らかではないことから、新規 # 5-15-1 抗体の IEL に対する反応特異性をフローサイトメトリーで、またその認識分子を Affinity chromatography, MALDI-TOF-MS ならびに tandem MS 法で同定した。さらに、cDNA のクローニングを行い、# 5-15-1 がブタ Ep-CAM を認識する抗ブタ Ep-CAM モノクローナル抗体であることを突き止めた。また、ブタ Ep-CAM のトランスフェクタントを作成し、本抗体の反応特異性を証明した。二重免疫染色法により、Ep-CAM 発現は CD45 陽性の IEL でのみ認められ、CD45 陽性粘膜固有層リンパ球 (LPL) では認められないことを確認した。

次に、ブタの Ep-CAM 発現がマウスでも同様に認められるかを、タンパク質と遺伝子のレベルで解析した。二重免疫染色法により、ブタと同様に、マウス腸管上皮細胞と IEL でのみ、Ep-CAM の発現が認められた。また、精製したマウス腸管上皮細胞と IEL において、Ep-CAM 特異的 mRNA が発現した。以上のことより、腸管上皮細胞と IEL 間での Ep-CAM を介した細胞接着メカニズムの存在が遺伝子とタンパク質レベルの両面から証明された。

本研究では、抗ブタ Ep-CAM を認識するモノクローナル抗体が作成され、Ep-CAM を介した腸管上皮細胞および IEL 間の新規な細胞間接着の存在がブタとマウスで明らかにされた。このことは、種間を超えて、Ep-CAM が腸管上皮細胞と IEL 間の細胞接着に関与することを証明するものであり、ヒトにおいても、その存在が推測される。今後、Ep-CAM 遺伝子欠損マウスの作成とそれを用いた個体レベルでの直接的解析により、Ep-CAM が細胞間接着だけでなく、感染抵抗性あるいは粘膜免疫応答誘導能等への関与など、新しい研究展開が期待される。

以上、本論文は Ep-CAM が腸管上皮細胞と IEL 間の新しい細胞間接着因子として関与することを証明した。このことは、腸管上皮層での粘膜免疫の機能分化に新たな研究展開を提示するものであり、高く評価される。よって、審査員一同は、これを博士(農学)の学位を授与するに値するものと判定した。