

審査の結果の要旨

氏名 永島 一樹

本研究は、腸管関連リンパ組織において、腸内細菌への免疫応答が誘導される機序を明らかにするために、細胞種特異的に TNF ファミリーサイトカイン RANKL (およびその受容体 RANK) を欠損するマウスを作成し、腸内細菌に対する免疫応答や腸内細菌叢を解析し、以下の結果を得ている。

1. RANKL が腸管関連リンパ組織の上皮 (濾胞関連上皮) に誘導する分子群を明らかにする為に、腸管上皮特異的に RANK を欠損するマウス (*Vill-Cre Tnfrsf11a^{flx/Δ}*) の、濾胞関連上皮を RNA-seq 解析法によって分析し、腸管上皮への RANKL 刺激がケモカイン CCL20 発現と M 細胞分化を誘導することを見出した。
2. 可溶性・膜結合型のどちらの RANKL が腸管において重要なのかを明らかにするために、可溶性 RANKL を特異的に欠損するマウスを作成したところ、濾胞関連上皮の CCL20 発現や M 細胞分化に異常が認められなかったため、膜結合型 RANKL の重要性が示唆された。
3. 膜結合型 RANKL を細胞間直接相互作用によって濾胞関連上皮に供給する細胞を同定するために、上皮ドーム領域を組織学的に解析したところ、濾胞関連上皮に接する podoplanin⁺MAdCAM-1 の間葉系細胞が RANKL を強く発現していた。さらに、フロサイトメトリー法で単離した間葉系細胞に RNA-seq 解析を行い、podoplanin⁺MAdCAM-1 の間葉系細胞が、腸管関連リンパ組織の既知の間葉系細胞とは異なる遺伝子プロファイルを示すことから、この間葉系細胞は新規の間葉系細胞であることが示された。
4. 間葉系細胞から放出される RANKL の重要性を検証する為に、細胞種特異的に RANKL を欠損するマウスを作成した。間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウス (*Twist2^{+Cre} Tnfsf11^{flx/Δ}*) では、濾胞関連上皮の CCL20 発現が低下し M 細胞分化が障害されていたが、血球系細胞特異的 RANKL 欠損マウス (*Vav-iCre Tnfsf11^{flx/Δ}*) では CCL20 発現・M 細胞分化が正常であったため、間葉系細胞から供給される RANKL が重要であることが証明された。
5. 間葉系細胞由来の RANKL が腸管関連リンパ組織での免疫応答に与える影響を調べた。*Twist2^{+Cre} Tnfsf11^{flx/Δ}* マウスのパイエル板上皮下ドーム領域では M 細胞による 200nm 蛍光ビーズの取り込みが減少しており、B 細胞と樹状細胞間の相互作用も減少し

ていた。また、孤立リンパ濾胞の成熟にも異常が認められた。

6. 腸内細菌に対する IgA 産生について検討した。 *Twist2^{+Cre} Tnfrsf11^{fllox/Δ}*マウスのパイエル板では B 細胞の AID 発現が減少しており IgA へのクラススイッチの減少が示唆された。小腸粘膜固有層では IgA 陽性形質細胞が著減しており、糞便中の IgA 濃度も大きく減少していた。IgA の結合している腸内細菌の割合をフローサイトメトリー法で計測したところ、 *Twist2^{+Cre} Tnfrsf11^{fllox/Δ}*マウスでは IgA 結合細菌の割合が低かった。IgA 産生の減少は *Vill-Cre Tnfrsf11a^{fllox/Δ}*マウスでも同様に確認された。これらの結果は、濾胞関連上皮の RANK に対する間葉系細胞からの RANKL 刺激が、腸内細菌特異的な IgA 産生に必須であることを示す。
7. 間葉系細胞の発現する RANKL の腸内細菌叢に与える影響を評価した。腸内細菌の 16s rRNA 遺伝子の主座標分析により、 *Twist2^{+Cre} Tnfrsf11^{fllox/Δ}*マウスの腸内細菌叢が変化していることが示された。特に腸内細菌叢の多様性の低下が顕著であることが明らかになった。同様の腸内細菌叢変化は *Vill-Cre Tnfrsf11a^{fllox/Δ}*マウスにおいても認められた。

以上、本論文は、M 細胞誘導細胞として機能する新規間葉系細胞が腸内細菌叢への IgA 産生を誘導することで腸内細菌叢の多様性を維持していることを明らかにした。M 細胞誘導細胞の同定は、IBD の病態解明・新規治療法開発やワクチン開発に繋がる可能性があり、学位の授与に値するものと考えられる。