

審査の結果の要旨

氏名 金戸 聡

本研究は腸管粘膜免疫機構において抗原特異的免疫応答の惹起に重要な役割を担っていると考えられる M 細胞に高発現する分子 MLP の腸管上皮細胞特異的遺伝子欠損マウスおよび MLP 強制発現腸管上皮細胞 (MODE-K) 株をそれぞれ作製し、MLP の機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 作製した腸管上皮細胞特異的 MLP 欠損マウスよりパイエル板を摘出し、パイエル板上皮細胞より cDNA を調製した。Mlp 遺伝子の mRNA 量を定量的 RT-PCR 法により解析したところ、Control マウスの 8 分の 1 程度に減少した。また、免疫組織化学染色法により、腸管上皮細胞特異的 MLP 欠損マウスのパイエル板上皮細胞を観察したが、MLP のタンパク発現は検出できなかった。Cre タンパクにより Mlp 遺伝子領域の相同組み替えが正しくおきていることが示された。

2. 成熟した M 細胞を認識する抗マウス Gp2 抗体を用いて、ホールマウント染色を行った。作製した MLP 欠損マウスのパイエル板内に Gp2 陽性 M 細胞の存在を確認した。また、走査型電子顕微鏡法および透過型電子顕微鏡法それぞれによる観察から、M 細胞に特徴的な短く不揃いな微絨毛構造およびリンパ球を内包するポケット構造が確認された。MLP は M 細胞の分化・成熟、および形態形成に関与していないことが示された。

3. ナノパーティクルおよびサルモネラ菌をマウスに経口投与し、パイエル板内に取り込まれたパーティクル数および菌数を計数・比較したが、Control マウスと作製した MLP 欠損マウスとの間で有意な差は認められなかった。同様にして、エルシニア菌をマウスに経口投与し、パイエル板内に取り込まれた菌数を計数・比較したところ、Control マウスに比べ作製した MLP 欠損マウスではエルシニア菌の取り込みが 3 分の 1 程度に減少した。

4. エルシニア菌の外膜タンパク認識受容体として知られる  $\beta 1$  インテグリンの、M 細胞における発現局在について免疫組織化学染色法により解析を行った。Control マウスの Gp2 陽性 M 細胞で観察された腸管管腔側でのインテグリン分子の発現は、作製した MLP 欠損マウスの Gp2 陽性 M 細胞では認められなかった。また、マウスよりクリプト細胞を調製し、腸管オルガノイド培養を行い、リコンビナントマウス RANKL で 2 日間刺激し、M 様細胞を誘導した。免疫組織化学染色法により同様に解析を行ったところ、RANKL 刺激後の Control マウス由来オルガノイドの Gp2 陽性 M 様細胞で観察された内腔側でのインテグリン分子の発現は、RANKL 刺激後の作製した MLP 欠損マウス由来オルガノイドの Gp2 陽性 M 様細胞では認められなかった。

5. 腸管上皮細胞 (MODE-K) 株に MLP を強制発現し、インテグリンのリガンドに対する細胞応答について解析を行った。 $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンのリガンドであるフィブロネクチンでコートしたペトリ皿上において、細胞を播種し、20 分後細胞の形態を顕微鏡下で観察したところ、MLP 強制発現株は Control 株に比べて細胞伸展率が 1.5 倍程度増加した。定量的 RT-PCR 法によるインテグリン分子の遺伝子発現解析を行ったところ、MLP の強制発現により、インテグリン分子の遺伝子発現に有意な差は認められなかった。腸管上皮細胞において MLP は  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンの遺伝子発現量ではなく、活性状態を制御していることが示された。

以上、本論文はパイエル板 M 細胞において、MLP が腸管管腔側で  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンを活性化し、次いで活性化したインテグリンをエルシニア菌が認識しパイエル板内へと侵入するという感染経路の一端を明らかにした。本研究は M 細胞の抗原取り込み機構に関する情報基盤の構築ならびに効果的な経口ワクチン開発への応用に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。