

論文審査の結果の要旨

氏名 吉田 理人

生体内で最も広大な粘膜面に覆われた消化管には、病原性微生物などの多種多様な外来抗原の生体内への侵入を防ぐために、粘膜免疫系という抗原特異的に機能する生体防御システムが備わっている。抗原特異的な粘膜免疫応答が誘導されるには、抗原がパイエル板などの腸管関連リンパ組織(gut-associated lymphoid tissue; GALT)へと送達される必要があるが、小腸上皮層に存在するパイエル板 M 細胞、絨毛 M 細胞は、自身の抗原取り込み能を介して、腸管管腔の抗原をパイエル板などの GALT に送達し、抗原特異的な粘膜免疫応答、全身免疫応答の誘導に重要な役割を果たしている。

M 細胞に関する研究は、これまで組織形態学的な解析を主体として進められてきた。しかし、実験動物におけるパイエル板 M 細胞の存在頻度は非常に低く、M 細胞の安定した培養系も存在しないことから、M 細胞特異的遺伝子などの分子生物学的な特徴に関する情報は極めて乏しく、M 細胞の単離精製法すら確立されていなかった。

本論文は 2 章からなり、第 1 章はパイエル板 M 細胞の単離精製法の確立、第 2 章は DNA マイクロアレイによるパイエル板 M 細胞での包括的な遺伝子発現解析、およびパイエル板 M 細胞特異的 surface marker Gp2 の同定について述べられている。

第 1 章では、マウスから M 細胞を含むパイエル板被覆上皮層(follicle-associated lymphoid tissue; FAE)を調製する方法について、組織学的解析および FACS 解析によって最適な条件を詳細に検討した結果、0.5 mM EDTA を含む PBS 溶液中で攪拌させた場合に、パイエル板 FAE 細胞を生きた状態で最も効率よく取得出来ることを明らかにした。次に、FACS ソーティングによって、マウスの M 細胞上の糖鎖構造を認識するレクチン UEA-1 と、モノクローナル抗体 NKM16-2-4 の両方に対して反応性を示すパイエル板 FAE 細胞を高純度に単離精製した。そして、単離精製した細胞の形態解析、および既知のマウスパイエル板 M 細胞特異的遺伝子の定量的な発現解析を通して、NKM16-2-4 陽性 UEA-1 陽性細胞画分の中には、パイエル板 M 細胞が高い割合で含まれていることを証明し、マウスからパイエル板 M 細胞を生きた状態で高純度に単離精製する技術を世界に先駆けて確立することに成功した。

第 2 章では、DNA マイクロアレイを用いて、単離精製したパイエル板 M 細胞と、NKM16-2-4 陰性 UEA-1 陰性の吸収上皮細胞での遺伝子発現プロファイルを比較・検討し、パイエル板 M 細胞特異的遺伝子の同定、特に本研究では、M 細胞に関する研究を進める上で有用な情報となりうる、特異的な surface marker をコードする遺伝子の同定を試みた。その結果、定量的 real-time PCR 法、*in situ* ハイブリダイゼーション法によって、GPI アンカー型タンパク質をコードする *Glycoprotein2* (*Gp2*) 遺伝子が、パイエル板 M 細胞特異的遺伝子の候補の 1 つであることを見出した。そして、抗マウス Gp2 特異的モノクローナル抗体 10F5-9-2 を独自に樹立し、免疫組織学的解析を行った結果、Gp2 タン

パク質は、パイエル板 M 細胞に加えて、大腸に存在する GALT である colonic patch の M 細胞の管腔膜に特異的に発現していることを明らかにした。さらに、マウスでは腸内細菌叢の影響によって、M 細胞以外の小腸上皮細胞にも UEA-1 のリガンドの発現が誘導されるが、無菌マウスを用いた実験から、GALT の M 細胞に対する Gp2 の発現特異性は、腸内細菌叢による影響を受けないことを明らかにした。一方、Gp2 の発現は絨毛 M 細胞には認められなかったことから、Gp2 の発現を指標にすることで、GALT の M 細胞と絨毛 M 細胞を識別出来ることを初めて明らかにした。

本研究は、参考文献などの情報が乏しかった中で進められてきたが、パイエル板 M 細胞の単離精製法を独自に確立したことで、パイエル板 M 細胞での包括的な遺伝子発現プロファイルの作製が可能になった。また本研究の結果に基づいて、アカゲザルとヒトのパイエル板 M 細胞での Gp2 の特異的発現も報告され、Gp2 は解剖学的部位や腸内環境に加え、生物種を越えた GALT M 細胞の普遍的な表面マーカーとして広く注目されている。このように、本研究の成果は M 細胞研究の先駆的役割を果たし、M 細胞に関する分子生物学についての新たな知見と、今後の研究の方向づけをより明確にすると同時に、抗原を M 細胞に標的することで、病原性微生物の主要な侵入部位である消化管や呼吸器での粘膜免疫応答と全身免疫応答の両方を誘導し、新興・再興感染症を含めた疾患の予防・治療に有用であるとされる粘膜ワクチンの開発にも大きく貢献するものと評価出来る。

なお、本論文は、寺原和孝、五十嵐脩、野地智法、Gemilson Soares Pontes、長谷耕二、大野博司、黒河志保、目島未央、高山尚子、幸義和、Anson W. Lowe、清野宏各氏との共同研究であるが、本論文を作成する際の要となる、パイエル板 M 細胞の単離精製法の確立および GALT M 細胞特異的 surface marker Gp2 の同定は、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。