

図3.腸管粘膜組織切片のHE染色によるクリプトパッチの同定

表面抗原	陽性細胞の比率 (%)
LFA-1	70 - 80
c-kit	60 - 70
IL-7R	60 - 70
Thy-1	60 - 70
Pgp-1	40 - 50
HSA	20 - 30
CD4	15 - 20
IL-2R α	10 - 20
CD8 α	3 - 5
CD3	0 - 2
TCR $\alpha\beta$ 鎖	0 - 2
TCR $\gamma\delta$ 鎖	0 - 2
μ 鎖	0 - 2
κ 鎖	0 - 2
CD11c	20 - 30

クリプトパッチ細胞の特性

クリプトパッチに集積するリンパ球の特性を追求するために各種モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検索が行われた。クリプトパッチリンパ球の大多数は骨髄の幹細胞や胸腺の未分化細胞が発現する受容体型チロシンキナーゼである c-kit や IL-7 受容体 (IL-7R)、主としてT細胞が発現する Thy-1、および白血球標識である LFA (lymphocyte function-associated antigen)-1 を発現していることが明らかとなった(図4)(表3)。

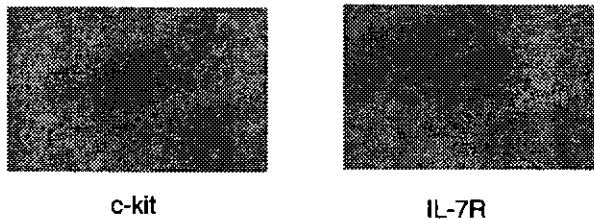


図4. 抗 c-kit 抗体および抗 IL-7R 抗体によるクリプトパッチの免疫組織化学染色

表3. 小腸クリプトパッチ細胞の表面分子の発現

また、成熟したT細胞でも活性化により発現がみられるが、胸腺 T 細胞の分化系譜においても分化段階の標識となっている Pgp-1 や HSA (heat stable antigen) 分子の発現も一部の細胞でみられた。これに対し、TCR 複合体の構成分子である CD3、TCR $\alpha\beta$ 鎖、TCR $\gamma\delta$ 鎖、あるいは B 細胞の抗原受容体の構成分子である μ 鎖や κ 鎖などの成熟した T 細胞あるいは B 細胞の標識を発現するクリプトパッチリンパ球はごく少数であった。胸腺 T 細胞分化で T 細胞の成熟に重要なサイトカインの産生や、正の選択・負の選択に関わるストローマ細胞の標識である CD11c を発現する細胞も 20 - 30 % 存在した。また、クリプトパッチには CD8⁺細胞はたかだか 3 - 5 % であるにもかかわらず、CD4⁺細胞が 15 ~ 20 % 存在したことから、クリプトパッチには CD3⁻CD4⁺CD8⁻リンパ球が存在することを

が判明した。胸腺における T 細胞分化の系譜においてもっとも未分化の細胞の表現型は CD3⁻CD4^{low}CD8⁻であり、これらの特徴から判断してクリプトパッチ細胞には未分化 T 細胞が分布する可能性が高いと考えられた。

クリプトパッチリンパ球の増殖およびアポトーシス

我々はさらにクリプトパッチリンパ球の増殖とアポトーシスを検索した。BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) を 6 時間ごと 5 回腹腔内投与したマウスから腸管の凍結切片を作製して、抗 BrdU 抗体による免疫組織染色を行い、S 期細胞の存在を調べた。その結果、クリプトパッチには胸腺皮質 (~35%) には及ばないものの、胸腺髄質 (~15%) に匹敵する S 期細胞が存在することが明らかとなった。次に、TUNEL 法 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling method) を用いてアポトーシスを起こしている細胞の検索が行われた。胸腺ではアポトーシス細胞が多数検出されたにもかかわらず、クリプトパッチでは検出限界以下であった。

クリプトパッチの組織形成期

マウス腸管のパイエル板は胎児期後半にその原型が見とめられ、出生後腸内細菌の増殖・定住化に伴ってリンパ濾胞が形成され、生後約 3 週齢でその組織形成が完了する。これに対し、胎生期マウスの腸管には

クリプトパッチは認められなかった。C57BL/6 (B6) マウスでは生後 10 日までは c-kit⁺リンパ球の集積は認められないが、生後 17 日ではクリプトパッチは検出され、その後次第にクリプトパッチの数が増加した。

以上のこれまでの研究から、クリプトパッチが消化管免疫系、特に IEL の発達分化に重要な役割を担っていることが推測された。そこで、食品成分がクリプトパッチ細胞の状態に何らかの作用を及ぼすならば、消化管免疫系全体に影響を与えることが予想される。もし、食品成分がクリプトパッチからの T 細胞分化のバランスを過剰な反応(アレルギー反応など)を抑制する方向に作用するならば、これらの食品はアレルギー予防食品として用いることができる。また、免疫機能を向上させることにより、病原性腸内細菌による感染に対し抵抗性を持たせることも可能となる。このような食品成分の評価を *in vitro* で簡易に行うためには、クリプトパッチ細胞を分離する方法の開発が不可欠である。本研究では、クリプトパッチ細胞の分離方法の開発と、このように採取されたクリプトパッチ細胞の性質の同定を行った。

B. 研究方法

マウス

6-15 週齢の雄の BALB/c マウスは日本クレア株式会社より購入した。

腸管の凍結ブロックの作成

腸管壁に対し水平に切断面をつくるための凍結ブロックは以下のように作製した。マウス小腸は 1~1.5 cm の長さに切り、腸管膜接合部に従って縦に切り開き、1 枚のシートとした。紙タオルを用いて腸管内容物を取り除いた後、絨毛側にろ紙を張りつけ、凍結用包埋剤を薄くひいたプラスチック皿に腸管が下側になるように置いた。凍結用包埋剤を注入して包埋し、ドライアイスにて-80℃に冷却したヘキサンに浸すことにより凍結ブロックを作製した。

腸管壁に対し、垂直に切断面を作るための凍結ブロックは、開いた腸管シートをだて巻状に巻き、これを凍結用包埋剤に包埋し、ドライアイスにて-80℃に冷却したヘキサンに浸すことにより凍結ブロックを作製した。

ヘマトキシリン-エオジン染色

組織凍結ブロックをクリオスタットを用い標本の厚さ 6 μm で薄切し、ポリ-L-リジンコートスライドグラス(マツナミガラス)に張り付けた。30 分以上室温で風乾した後、10%ホルマリンで 5 分間固定した。水道水で洗浄した後、ヘマトキシリン溶液(サクラ精機、東京)で 4 分染色し、水道水で洗浄した。続いて、エオジン溶液(サクラ精機、東京)で 4 分間染色し、100%エタノールで 4 回、キシレンで 3 回洗浄した後、HSR 包埋剤(ミドリ十字、大阪)にて封入した。

組織免疫染色

組織凍結ブロックをクリオスタットを用い標本の厚さ 6 μm で薄切し、ポリ-L-リジンコート

スライドグラスに張り付けた。30 分以上室温で風乾した後、アセトンに浸し室温で 10 分間固定し、PBS で洗浄した。一次抗体の非特異的吸着を防止するため Block-ace (大日本製薬、大阪)で 37℃ 10 分間保温し、PBS で洗浄した。一次抗体としてラットまたはハムスターモノクローナル抗体で 37℃、30 分間保温し、PBS で洗浄した。二次反応はビオチン化ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canada)またはビオチン化ヤギ抗ハムスターIgG抗体(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)で 37℃、30 分間保温し、PBS で洗浄した。内在性ペルオキシターゼを非活性化するため 0.3% 過酸化水素、0.1%アジ化ナトリウム水で室温 10 分保持し、PBS で洗浄した。三次反応はアビジン-ビオチン-ペルオキシターゼ複合体 (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Inc.)で室温 30 分間保持し、PBS で洗浄した。発色は Vectastain DAB (3,3'-Diaminobenzidine) substrate kit (Vector Laboratories, Inc.)で 2 分間行い、水道水で洗浄した。その後、酢酸加クラジスヘマトキシリンで 30 秒間核染色を行った後、水道水で洗浄した。100%アルコールで脱水、キシレン透徹後、HSR 包埋剤にて封入した。

細胞調製

胸腺細胞、脾臓細胞、腸管膜リンパ節細胞、パイル板細胞の採取

マウスから各リンパ組織を摘出し、5%

FCS 含有ハンクス(Hank's)溶液中で上下から網目間隔 200 μm のナイロン網にはさみ、10 ml プラスチック注射筒用ピストンのゴム部を用いてすりつぶした。細胞を 200 μm のナイロン網に通し、単細胞浮遊液とした。

骨髄細胞の採取

マウス大腿骨および上腕骨を摘出し、骨両端を切断した。切断端より 23 G の注射針を用い 5 % FCS 含有ハンクス溶液を 4~5 ml 注入し、もう一方の切断端から骨髄細胞を回収した。細胞を 200 μm のナイロン網に通し、単細胞浮遊液とした。

IEL の精製

我々の開発した方法に従い、以下のように IEL を採取した。

1. マウスを頸椎脱臼で殺し、正中線に沿って開腹した。胃の幽門部直下と盲腸直前を手術用ハサミで切断し、小腸を摘出した。摘出した小腸は 4 $^{\circ}\text{C}$ に保冷したハンクス溶液で維持した。

2. 摘出した小腸の盲腸側よりハンクス溶液を管腔内に流すことにより、小腸内を洗浄した。ポリエチレンチューブ (PE-60, Becton) を用い小腸を反転し、腸管腔側を露出した。露出した管腔面をろ紙 (Whatman Absorbent protect sheet) に 4~5 回接触させることにより、腸内容物を軽く除去した。

3. 37 $^{\circ}\text{C}$ に保温した 5 % FCS 含有ハンクス溶液を 45 ml 入れた 50 ml プラスチック遠心管に、小腸を 4~8 等分して入れ、

回転振盪機を用い 37 $^{\circ}\text{C}$ で 45 分間、160 rpm で振盪した。

4. 手首を用いて 50 ml チューブをよく振盪した後、ガラスウールカラムに腸管振盪液を通し、接着性の細胞や腸管組織の破片などの夾雑物を除去した。これには、10 ml シリンジのシリンダー内部に二重にしたガーゼを敷き、さらに約 0.1 g のガラスウールを軽く詰めたものをカラムとした。さらに、5 ml の 5 % FCS 含有ハンクス溶液でカラムから細胞を洗い流し、先にもろ過した細胞浮遊液と合わせて総量 50 ml の細胞浮遊液とした。

5. 室温において 1,200 rpm で 10 分遠心した後、3 ml を残して上清を除去し、細胞を懸濁した。この細胞浮遊液と 3 ml の 100 % パーコール (ファルマシア社パーコール原液と 10 倍濃度のハンクス溶液を 9:1 の割合で混合したもの) を合わせ、5 % FCS 含有ハンクス溶液で 10 ml にした。

6. 室温において、スイングローターを用いて 1,500 rpm で 18 分遠心分離した後、2 ml を残して上清を除去し、細胞を懸濁した。これに、100 % パーコールを 3.8 ml 加え、さらに 5 % FCS 含有ハンクス溶液を加えて 10 ml にした。密度が均一になるように慎重に攪拌し、細胞浮遊液とした。

7. 上記の細胞浮遊液の下層に、2 ml の 70 % 濃度パーコールを静かに配置し、室温にて 1,500 rpm で 18 分間遠心分離した。遠心後、4 ml 残して上清を除

去し、パーコール界面に存在する細胞層をパスツールピペットを用い回収した。

8. 5 % FCS 含有ハンクス溶液を加えて 15 ml にし、1,200 rpm で 10 分間遠心し、細胞を洗浄した。

クリプトパッチ細胞の採取

マウス小腸を長さ 1 cm 程度に切断し、縦方向に切り開いてシート状にした。この腸管シートの管腔面を濾紙に張り付けることにより粘液を取り除いた後、細胞培養用 6 cm プラスチック皿の上に平らになるように置き、透過照明型実体顕微鏡(拡大率約 20~30 倍)で観察した。クリプトパッチを視認しながら、21 G 注射針を加工して作製した金属筒を用いてクリプトパッチを含む腸管組織を打ち抜いた。このクリプトパッチを含む組織を 100% FCS 下、超精密ピンセットの先を用いて組織を掻き、クリプトパッチに切れ目を入れた。崩れたクリプトパッチ組織から出てきた単細胞を回収してクリプトパッチ細胞とした。

フローサイトメーターによる細胞表面分子の解析

フローサイトメーターは FACScan (Becton) を使用し、解析には LYSIS II プログラムを用いた。4 x 10⁴ ~ 5 x 10⁵ 個の細胞に FACS 用緩衝液 (1 % FCS と 0.02 % のアジ化ナトリウム含有ハンクス溶液) を 4 ml 加え 1,200 rpm で 8 分遠心して洗浄した。Fc 受容体を介した抗体の吸着を防止するため Fc Block を 50 µl 加え、4 °C で 20 分間保温し、

FACS 用緩衝液で洗浄した。ビオチン化モノクロナール抗体または PE 標識モノクロナール抗体を 50 µl 加え、4 °C で 20 分間保温し、FACS 用緩衝液で洗浄した。ビオチン化モノクロナール抗体を使用した場合その後streptavidin PE を 50 µl 加え、4 °C で 20 分間保温し、FACS 用緩衝液で洗浄した。続いて FITC 標識モノクロナール抗体を 50 µl 加え、4 °C で 20 分間保温し、FACS 用緩衝液で洗浄した。最後に 0.1 µg/ml PI 含有 PBS 4ml で死細胞核を染色した後、FACS 用緩衝液に細胞を懸濁し、解析に用いた。

クリプトパッチ細胞による SCID マウスにおける IEL の再構成

若齢ヌードマウスよりクリプトパッチ細胞を採取し、抗 c-kit 抗体および抗 Lineage marker (Lin; CD3, B220, Mac-1, GR119) にて蛍光染色し、セルソーター (Vantage; Becton) にて c-kit⁺ Lin⁻ 画分を分取した。これを 2.5 Gy 放射線照射した SCID (severe combined immunodeficient) マウスの静脈内へ 1 匹あたり 10,000 細胞移入した。5 週間後、IEL を採取し、その表面マーカーをフローサイトメーターにて解析した。

半定量的 RT-PCR

全 RNA は単離した細胞 5 x 10⁴ ~ 5 x 10⁶ 個より、RNeasy ミニキット (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を用い、付属の手順書に従い抽出した。この方法はグアニジンチオシアネート含有試料溶解液で細

胞を溶解した後、試料中の全 RNA をマイクロチューブサイズのシリカ樹脂カラムへ吸着させ、洗浄用緩衝液でカラムを洗浄後、純水で溶出する方法である。RNA のチューブあるいはカラムへの非特異的吸着による損失を抑制するため、試料溶解液に 10 $\mu\text{g}/\text{tube}$ で poly (A) (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) を添加した。また、カラム洗浄の各操作段階ごとにカラム内に残存している洗浄液をピペットマンを用い注意深く吸い出し、それから次の操作段階に進むようにした。これは洗浄用緩衝液が残存することで続いての逆転写反応、PCR 反応が阻害され測定 of 定量性が損なわれることを防ぐために重要な操作である。RNA 抽出は 50 μl の純水でおこない、溶出後直ちに 2 μl の 50 U/ μl ribonuclease (RNase) 阻害剤 (タカラ酒造, 京都)、100 mM dithiothreitol (DTT) 水溶液を添加した。混入 DNA を除去するため、10 U deoxyribonuclease (DNase) (RT Grade) (日本ジーン, 富山)、DNase 緩衝液 (終濃度 40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 2 mM DTT, 0.2 mg/ml アセチル化 BSA) を加え 37 °C で 5 分処理した後、再度 RNeasy ミニキットを用いて RNA を精製した。RNA 溶液は 10 μl x 5 本に分注して -80 °C で保存し、凍結・融解操作を最小限に抑えた。

半定量的に RT-PCR を行うため、逆転写反応は順次希釈 (x 5) した RNA 希釈液 (4 列以上) を鋳型にして行った。RNA 希釈液

には 100 ng/ μl poly (A)、2 mM DTT、2 U/ μl RNase 阻害剤水溶液を用いた。反応条件は最終反応容量 20 μl とし、5 μl 全 RNA、20 U RNase 阻害剤、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、2.5 mM MgCl₂、1 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (タカラ)、5 μM ランダムヘキサマー (タカラ)、100 U モロニーマウス白血病ウイルス由来逆転写酵素 (Gibco BRL, Lifetechnologies, Inc., Gaithersburg, MD) にて、23 °C で 10 分プライマーの RNA へのアニーリング反応を行った後、42 °C で 30 分伸長反応を行った。逆転写反応終了後直ちに PCR 反応を行った。PCR 反応は最終容量 100 μl とし、逆転写反応液全量 (20 μl)、1 mM センスプライマー、1 mM アンチセンスプライマー、2.5 U Taq DNA ポリメラーゼ (タカラ)、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂ にて行った。なお dNTP は逆転写反応液に存在するものをそのまま用いた。これは逆転写反応での消費を無視すると 0.2 mM となる。増幅はサーマルサイクラー (タカラ TP-3000) を使い、初めに 94 °C にて 4 分の熱変性反応の後、94 °C ; 15 秒、60 °C ; 30 秒、72 °C ; 1 分を 1 サイクルとし、35 サイクル行った。PCR 反応後 20 μl の反応溶液を 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ エチジウムブロマイド含有 TAE 緩衝液にて 2 % アガロースゲル上で電気泳動を行い、その後紫外線ランプにて PCR 産物を確認した。

PCR のプライマーは以下の塩基配列のオリゴヌクレオチドを用いた。

β-アクチン

センス 5'-TGG AAT CCT GTG GCA
TCC ATG AAA C-3'; アンチセンス 5'-
TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG
TCC G-3'

CD3ε

センス 5'-ATG GCC AAG AGC TGC
CT-3'; アンチセンス 5'-AGA ATA CAG
GTC CCG CT-3'

RAG-2

センス 5'-CAC ATC CAC AAG CAG GAA
GTA CAC-3'; アンチセンス 5'-GGT TCA
GGG ACA TCT CCT ACT AAG-3'

pTα

センス 5'-GTG TCA GGC TCT ACC ATC
AGG-3'; アンチセンス 5'-GCA GAA GCA
GTT TGA AGA GGA-3'

TdT

センス 5'-ACA GCG AGA AGA GCG GCC
AGC AG-3'; アンチセンス 5'-CCA TGG
TTC AAT GTA GTC CAG TC-3'

C. 研究結果

クリプトパッチ細胞の分離法の確立

クリプトパッチは直径 100 μm 程度の大きさしかないため、その細胞採取は容易ではないことがたやすく推測される。しかし、我々はマウス小腸を縦方向に切開してシート状にした腸管を実体顕微鏡で観察すると、クリプト

パッチをかりうじて認識できることを見出した(図5)。

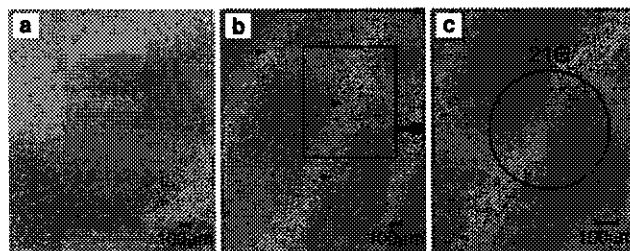


図5. マウス小腸の実体顕微鏡像
a)パイエル板、B), C) クリプトパッチ

これより、以下のようなクリプトパッチ細胞の採取法を開発した(図6)。実体顕微鏡下クリプトパッチが存在する腸管部を 21 G 注射針(内径 570 μm)を研磨して作製した金属筒を用いて打ち抜いた。

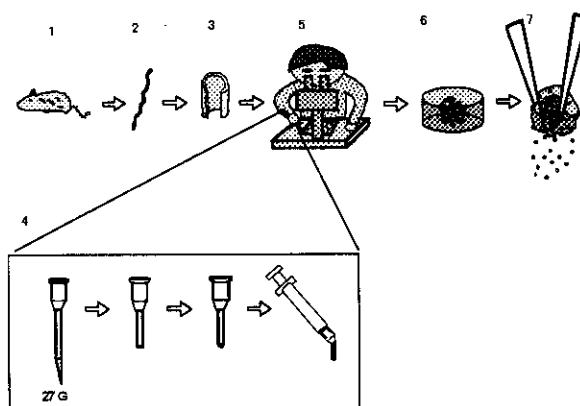


図6. クリプトパッチ細胞単離方法の概念図

1) マウスより、2) 腸管を取りだし、3) 約1cm程度の長さにして腸管を開き、シート状に
4) 27 Gの注射針を加工して作製した金属筒を用い、5,6) 実体顕微鏡下クリプトパッチ
存在する腸管を打ち抜く。7) 切り出したクリプトパッチを精密ピンセットの先を用いてほく
単離細胞として回収する。

この実体顕微鏡下で目視される構造物がまさにクリプトパッチであることは、打ち抜いた腸管組織から凍結切片を作製し、これを抗 c-kit 抗体で免疫組織染色することに

より確認した。

クリプトパッチ組織を4℃ 100% FCS(ウシ胎児血清)中で微小手術用ピンセットを用いて一つ一つ丹念にほぐすと、打ち抜いた腸管から単細胞のリンパ球が崩れ出てきた。この手法により1つのクリプトパッチ組織から約1,000個のリンパ球を得ることに成功した。これにより、クリプトパッチ細胞をフローサイトメトリーで解析することや、RNAを抽出してRT-PCRを行うことが可能となった。

クリプトパッチ細胞のFACS解析

フローサイトメトリーによる解析は、個々の細胞において複数の表面あるいは細胞内マーカーの存在の有無・強度を定量的に調べることができることに利点がある。そこで、若齢ヌードマウスより上記の方法によって採取されたクリプトパッチ細胞にT細胞マーカーが発現しているかどうかをFITC標識抗c-kit抗体との二重染色によって検討した(図7)。

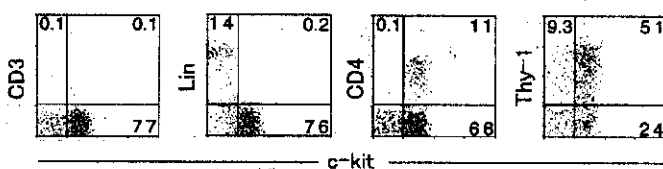


図7.ヌードマウスクリプトパッチ細胞のFACS解析

クリプトパッチ c-kit⁺細胞の中には主にT細胞系列が発現するCD4陽性、Thy-1陽性細胞が存在することが確かめられ、免疫組織化学的検索からの予想と一致した。一

方、成熟したT細胞が発現するCD3の発現はみられず、これらは未熟なT細胞系列の細胞であることがあらためて確認された。

クリプトパッチ c-kit⁺細胞による IEL の再構成

クリプトパッチ細胞に IEL 前駆細胞が含まれているかどうかを確認するために、4週齢ヌード(nu/nu)マウスからクリプトパッチ細胞を調製し、セルソーター(Vantage)により c-kit⁺ Lin⁻ (Lin; lineage marker)細胞を純化した。LinはT細胞系列の標識であるCD3分子、B細胞系列の標識であるB220分子、マクロファージ系列の標識であるMac-1分子、ミエロイド系列での標識であるGr-1分子、そして赤血球系列であるTER-119分子の総称であり、Lin⁻画分を分取することにより成熟血球系細胞を除外した。この c-kit⁺ Lin⁻ 細胞10,000個を成熟T細胞が存在しない2.5 Gy放射線照射したSCID(severe combined immunodeficient)マウスの静脈内へ移入した。5週間後、IEL画分および腸管膜リンパ節細胞を調製し、FACSにてTCRの発現を解析したところ、通常のSCIDマウスには成熟T細胞が存在しないのに対し、クリプトパッチ細胞の c-kit⁺ Lin⁻画分を移入したSCIDマウスにおいては、成熟IELが再構成されていた。このIELはαβ-IEL, γδ-IELどちらも再構成されていた(図8)。また、腸管膜リンパ節においても成熟T細胞の再構成が観察されたが、胸腺細胞や脾臓細胞には成熟T細胞の再構成はみられなかった。B細胞はどの画分にも再構成されなかった。クリプトパッチ細胞の c-kit⁺画

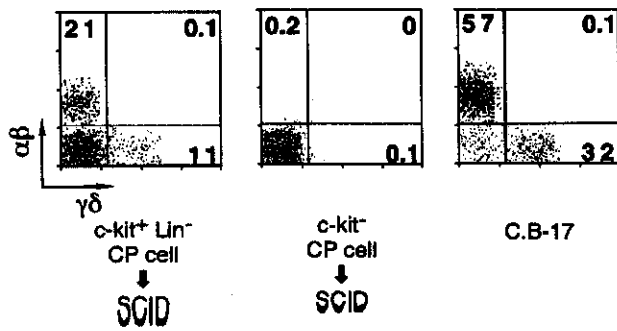


図 8. c-kit⁺クリプトパッチ細胞を SCID マウスに移入したときの IEL の再構成

分を同様に放射線照射 SCID マウスに移入しても、IEL の再構成はみられなかった。また、パイエル板細胞や腸管膜リンパ節細胞を移入しても IEL は再構成されなかった。

クリプトパッチ細胞および IEL における T 細胞発生初期マーカーの解析

胸腺における T 細胞の発達分化は詳しく調べられており、その過程において発達段階に特異的なマーカーがいくつか知られている。RAG-2 タンパク質は RAG-1 タンパク質と共同ではたらき、TCR 遺伝子の再構成を媒介する。pTα (pre-T cell receptor α) は TCR-β 鎖組換え後、TCR-α 鎖の組換えが起きるまで TCR-β 鎖と会合している分子で、β 鎖組換え成功のシグナル伝達を担っている。また、TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) は TCR 遺伝子組換え時にランダムに塩基を付加する働きを持っている。そこでクリプトパッチおよび IEL においてこれらの T 細胞の発生初期マーカーの発現がみられるかを半定量的 RT-PCR を用いて探索した。

BALB/c マウスから胸腺細胞、脾臓細胞、

腸管膜リンパ節細胞、パイエル板細胞、クリプトパッチ細胞、IEL を採取し、RNA の段階希釈法による半定量的 RT-PCR により RAG-2, pTα, TdT の mRNA の発現を解析した。結果は使用した RNA 量 (細胞数換算) に対する PCR バンドの強度として比較した (図 9)。なお、β-アクチンはどの細胞でもほぼ同程度の発現がみられた。

RAG-2 mRNA の発現

RAG-2 mRNA はクリプトパッチ細胞および IEL において測定に供した RNA 量の上限である 20,000 細胞相当の RNA で弱いバンドが見られた。これは胸腺細胞 32 細胞からのバンドとほぼ等しいので、その発現量は胸腺細胞の $32/20,000 = 1/625$ と判断した。一方、脾臓細胞、腸管膜リンパ節細胞、パイエル板細胞の末梢リンパ組織細胞では 20,000 細胞相当の RNA からの RT-PCR でも RAG-2 mRNA のバンドは検出されなかった (胸腺細胞比: $< 1/625$)。

pTα mRNA の発現

pTα mRNA はクリプトパッチ細胞および IEL において胸腺細胞に対し $1/5 \sim 1/25$ の強度で発現がみられた。パイエル板細胞においても胸腺に対し $1/625$ の弱い発現がみられた。脾臓細胞、腸管膜リンパ節細胞では調べた上限である 20,000 細胞相当の RNA からの RT-PCR でも pTα mRNA は検出されなかった (胸腺細胞比 $< 1/625$)。

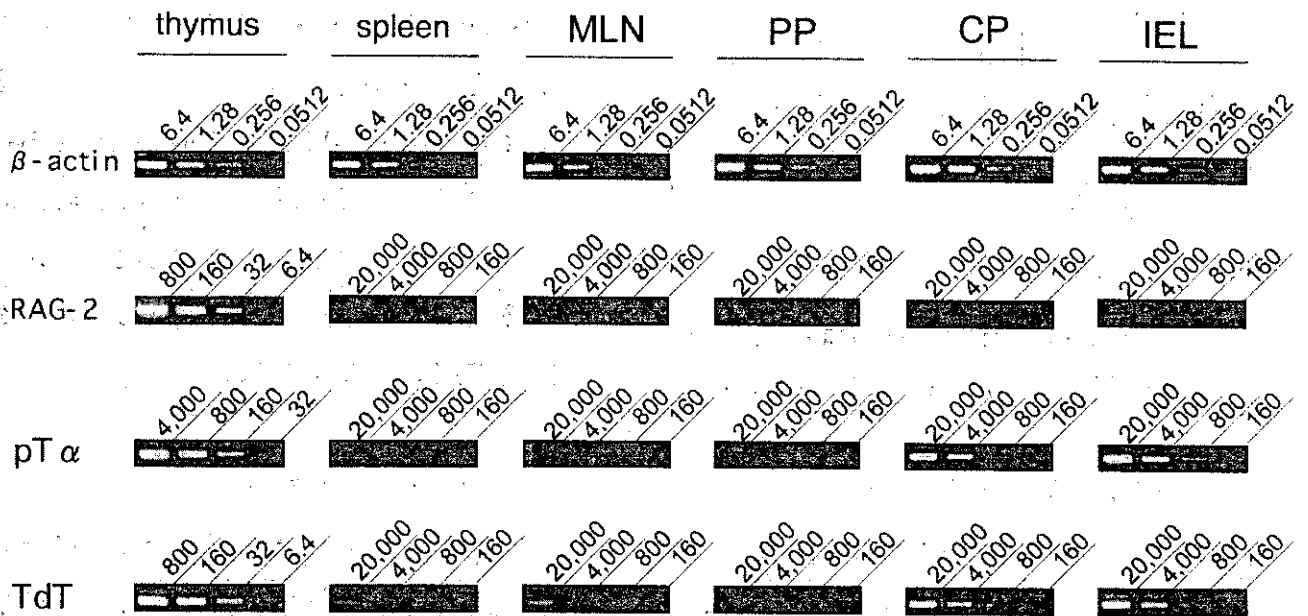


図9. BALB/c マウスにおける RAG-2, pTα, TdT mRNA 発現の半定量的 RT-PCR による解析

Thymus: 胸腺細胞, Spleen: 脾臓細胞, MLN: 腸管膜リンパ節細胞, PP: パイエル板細胞, CP: クリプトパッチ細胞, IEL: 小腸上皮間 T 細胞

TdT mRNA の発現

TdT mRNA はクリプトパッチ細胞および IEL において胸腺細胞に対し 1/125 の強度で発現がみられた。脾臓細胞、腸管膜リンパ節細胞、パイエル板細胞での発現はそれぞれ胸腺細胞に対し 1/3, 125、1/625、1/3, 125 であった。

D. 考察

消化管は食品が消化・分解されて体内に取り込まれる前に接触する生体表面である。消化管は細胞1層の上皮細胞によってのみ覆われており、皮膚と比較しそのバリアー能は必ずしも高いわけではない。腸内細菌や各種アレルギー物質への暴露を考えると確固たるバリアー能を要求される

べきだが、この機能は分厚い物理的障壁によってではなく、複雑な免疫系を絡めた動的な防御システムの構築によってなされているようである。事実、腸管にはパイエル板のように積極的に腸管管腔内の抗原を摂取し、免疫担当細胞に抗原提示を行う器官が存在し、また、粘膜固有層にはパイエル板で感作・誘導された IgA 産生プラズマ細胞が豊富に存在する。さらに、現在ではその生理的機能は不明なもの、小腸上皮間には IEL とよばれる T 細胞が多数存在する。小腸上皮もまた、その表面に各種のサイトカインレセプターを発現し、また刺激に応じてサイトカインを産生する。このことを考慮するならば、食品成分がこの消化管内の免疫ネットワークのシグナル伝達に介在し、消化管免疫系、ひいては全身免疫系を調整することが日常的に起きていることは容易に推測され

る。このような食品成分を同定し、その作用機序を求めることにより、特定の健康促進を目的とした食品の開発を行うことは、現代のライフスタイル改善に意義深いことである。しかしながら、食品は単一化学物質と異なり多種多様な成分よりなり、また、応答する消化管免疫系は複雑なネットワークを構成している。このため、*in vitro*における簡便な評価方法の確立が望まれている。本研究では、腸管からの免疫担当細胞の分離法の開発の一翼として、我々が近年新たに見い出したマウスの腸管に存在するリンパ組織であるクリプトパッチ細胞の分離方法の確立と、分離されたクリプトパッチ細胞の特性解析を行った。

クリプトパッチ細胞の分離法の開発

クリプトパッチはマウス腸管に散在するリンパ球小集積で、小腸あたり 1,500 個存在する。1 クリプトパッチあたりの細胞数は約 1,000 細胞であり、胸腺や脾臓の 10^8 細胞と比較しごくわずかしか構成細胞は存在しない。このような組織から純度よく構成細胞を採取する方法は至難であることが予想された。我々は、マウス腸管を切り開き、粘液を十分にはがした腸管壁を透過照明型実体顕微鏡で観察すると、クリプトパッチが小腸あたり約 200 個視認できることを見い出した。さらに、21G の注射針を研磨して作製した金属筒を用いることにより、実体顕微鏡下クリプトパッチを含む腸管組織を打ち抜くことに成功した。この組織片を実体顕微鏡下、超精密ピンセットを用いてクリプトパッチ部分の組織を挿き開くと、浮遊性の細胞が FCS 中に放出された。このように回収された浮遊細胞は、c-kit の発現に富むことから、真にクリプトパッチ細胞であることが照明された。

クリプトパッチ細胞の FACS による解析

クリプトパッチ細胞は FACS で解析すると、c-kit⁺画分に CD4⁺および Thy-1⁺細胞を認めるが、これらはすべて CD3⁻, Lin⁻であった。IEL は以前より胸腺外分化する集団が存在することが知られており、おそらくは腸管局所において発達分化しているのではないかと推測されてきた。このような背景より、未熟なリンパ球マーカーを発現するクリプトパッチ細胞は、IEL の前駆細胞ではないかと推測された。

クリプトパッチ細胞による IEL の再構成

次に、クリプトパッチが IEL の前駆細胞を含むかどうかを確認するため、成熟 T 細胞を持たない免疫不全 SCID マウスに分離・精製したクリプトパッチ c-kit⁺Lin⁻細胞を移入したところ、IEL 画分に成熟 T 細胞が出現するのを確認した。このことより、クリプトパッチは IEL が腸管局所で分化発達する場であることが示された。

クリプトパッチの T 細胞分化初期マーカーの RT-PCR による解析

胸腺における TCR $\alpha\beta$ T 細胞発達分化は詳しく調べられている(図 10)。胸腺細胞の 80~90 %は CD4⁺CD8⁺ double positive (DP)細胞が占めており、残りは約 10 %の CD4⁺CD8⁻ または CD4⁻CD8⁺ single positive (SP)細胞、2~4 %の CD3⁻CD4⁻CD8⁻ triple negative (TN)細胞、および約 1%の CD8⁺ immature single positive (ISP)細胞よりなる。TN 胸腺細胞は DP 細胞より幼若な細胞群であり、その

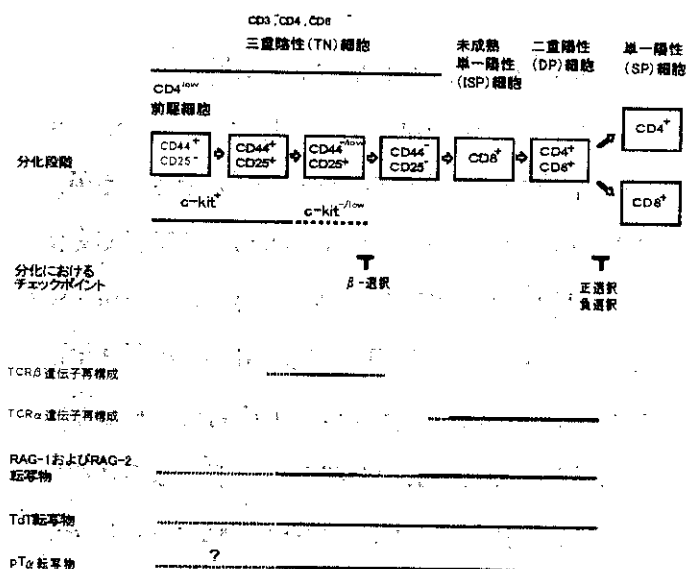


図 10. マウス胸腺における T 細胞の発達分化

CD44 (別名 Pgp-1) と CD25 (別名 interleukin-2 receptor α chain; IL-2R α) の発現によりさらに CD44⁺CD25⁻ TN, CD44⁺CD25⁺ TN, CD44^{-low}CD25⁺ TN, CD44⁻CD25⁻ TN 細胞の 4 つに区別される。ただし、もっとも未熟な細胞集団であり、CD4 を弱く発現している CD4^{low} 細胞は CD44⁺CD25⁻ TN 細胞画分に含まれるとみなしている。これらの TN 細胞を放射線照射したマウスの胸腺に移入した時の成熟 T 細胞再構成能、細胞周期状態、TCR 遺伝子再構成の状態から TN 細胞は次のような分化段階を経て成熟することが判明している; CD44⁺CD25⁻ TN \rightarrow CD44⁺CD25⁺ TN \rightarrow CD44^{-low}CD25⁺ TN \rightarrow CD44⁻CD25⁻ TN。c-kit の発現は CD44⁺CD25⁻ TN 期、CD44⁺CD25⁺ TN 期に強くみられ、CD44^{-low}CD25⁺ 期ではごく弱くなり、CD44⁻CD25⁻ TN 期以降は発現がなくな

る。

RAG-1 および RAG-2 は、V(D)J 再構成に必須の遺伝子である。2 つのうちどちらの遺伝子を欠いても TCR 遺伝子再構成はみられない。胸腺 T 細胞の分化において RAG-1/RAG-2 mRNA の発現には 2 つのピークが存在する。初めのピークは CD44^{-low}CD25⁺ TN 期であり、これは TCR β 、TCR γ 、TCR δ の再構成期に対応する。2 つめのピークは DP 期であり、これは TCR α 遺伝子再構成期に対応する。SP 胸腺細胞や末梢の成熟 T 細胞では RAG-1/RAG-2 mRNA の発現は消失する。

CD44^{-low}CD25⁺ TN 期の胸腺細胞はまだ TCR α 鎖を発現しておらず、TCR β 鎖は pT α 鎖とジスルフィド結合を介し会合している。pT α は TCR α と異なりそれをコードする遺伝子は再構成を受けず、多様性はない。pT α -TCR β 異種二量体は CD3 サブユニットと合わせ pre-TCR 複合体を形成している。

pT α mRNA の発現は RAG^{-/-} マウスの胸腺細胞では CD44⁺CD25⁻ TN 期、CD44⁺CD25⁺ TN 期の分化の初期段階でも弱いながらも発現がみられるが、正常マウスの胸腺細胞では CD44^{-low}CD25⁺ TN 期、CD44⁻CD25⁻ TN 期、DP 期でその発現が検出される。pT α mRNA の発現は T 細胞の発達過程に限定されており、CD4⁺CD8⁻ あるいは CD4⁻CD8⁺ SP 胸腺細胞、末梢の二次リンパ組織にはその発現はみられない。興味深いことに、pT α mRNA の発現は IEL や臓内リンパ球、骨髄細胞でもみられ、これらの部位での胸腺外分化を示唆している。

TCR 遺伝子再構成時に遺伝子セグメントの両端は通常塩基の付加、塩基の欠失、あるいはその両方が起こる。塩基の付加は TdT によってなされる。胸腺細胞における TdT mRNA の発現は CD44⁺CD25⁻ TN 期から DP 期にわたってみられるが成熟した CD4⁺CD8⁻/CD4⁻CD8⁺ SP 期にはみられない。

正常マウス(BALB/c マウス)の各リンパ組織における T 前駆細胞標識遺伝子として RAG-2、pTα、TdT mRNA の発現を解析した。クリプトパッチ細胞および IEL において腸管膜リンパ節細胞と比較し強い RAG-2、TdT、pTα mRNA の発現がみられた。ただし、それらの発現は胸腺細胞と比較し弱いものであった。胸腺細胞における RAG-2、TdT、pTα mRNA の発現は上記説明のように胸腺細胞の分化段階によって異なる。c-kit⁺である CD44⁺CD25⁻ TN 期、CD44⁺CD25⁺ TN 期には RAG-1/RAG-2 mRNA の発現はみられるもののその発現強度は弱く、強い発現は c-kit^{-low} である CD44^{-low}CD25⁺ TN 期および c-kit⁻である DP 期にみられる。TdT mRNA の発現も c-kit⁺である CD44⁺CD25⁻ TN 期にみられるという報告が存在するものの、強い発現は c-kit^{-low} である CD44^{-low}CD25⁺ TN 期から DP 期にかけてである。pTα mRNA についても、RAG 欠損マウスの胸腺細胞では c-kit⁺である CD44⁺CD25⁻ TN 期、CD44⁺CD25⁺ TN 期においても発現しているという報告が存在するが、正常マウスの胸腺細胞で強い発現がみられるのは c-kit^{-low} である CD44⁻CD25⁺

TN 期細胞以降である。クリプトパッチ細胞や IEL においても pTα および TdT mRNA の発現は c-kit⁺画分よりも c-kit⁻画分に強くみられた(データ省略)。このことより c-kit⁺クリプトパッチ細胞は c-kit⁻クリプトパッチ細胞より未熟な細胞であると推測される。しかしながら、胸腺では分化段階が初期の細胞だけが c-kit を発現しているのみで、分化段階が進んだ胸腺細胞や末梢二次リンパ組織に存在する成熟 T 細胞は c-kit⁺であるのに対し、成熟 IEL には c-kit⁺細胞が高割合で存在する。このため胸腺細胞の発達分化との類似性だけからクリプトパッチの c-kit⁺細胞が c-kit⁻細胞よりも未熟な細胞だということは現段階では断言できない。この点を明らかにするには、クリプトパッチ細胞の培養系を確立し c-kit⁺細胞、c-kit⁻細胞の細胞の発達を追跡する必要があると考えられる。

E. 結論

新たに発見された腸管リンパ組織“クリプトパッチ”の細胞分離方法を確立し、その特性を明らかにした。クリプトパッチ細胞は、1)その表現型が未熟な Tリンパ球の様相を示し、2)免疫不全 SCID マウスの IEL を再構成し、3)T 細胞分化初期マーカーである RAG-2、pTα、TdT の mRNA を発現する。これらのことは、クリプトパッチが IEL の発達分化する場であることを支持する。このクリプトパッチ細胞に対する食品成分の作用を解析することにより、食品の免疫系に対する機能の評価系を築くことが可能であると考えられる。

F. 研究発表

1. 発表論文

Saito, H., Kanamori, Y., Takemori, T., Nariuchi, H., Kubota, E., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., and Ishikawa, H. (1998). Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. Science 280, 275-278.

2. 学会発表

1998年度 農芸化学会

・新しい腸管リンパ組織 (cryptopatch) 未分化リンパ球の TCR 遺伝子再構成に関与する遺伝子発現の検索 種田貴徳, 加藤真吾, 斉藤恒, 石川博通, 上野川修一

1998年度 日本免疫学会

・腸管リンパ組織 cryptopatch リンパ球と上皮間 T 細胞の T 前駆マーカー遺伝子発現と TCR 遺伝子再構成 種田貴徳, 鈴木健司, 斉藤恒, 石丸薫, 久保田英郎, 伊藤守, 石川博通, 上野川修一

・腸管リンパ組織 cryptopatch 欠如マウスにおける上皮間 T 細胞の発達分化 鈴木健司, 石丸薫, 種田貴徳, 斉藤恒, 南野昌信, 上野川修一, 久保田英郎, 石川博通

・マウス腸管リンパ組織 cryptopatch と上皮間 T 細胞の細胞学および免疫組織化学的検索 石丸薫, 鈴木健司, 斉藤恒, 金森豊, 久保田英郎, 石川博通

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし