

学 位 論 文 題 名

Functional analyses of mucosal immune cells isolated from rat intestine: Populations, cytotoxicity, and its contribution to chemokine expression in the villus epithelia

(ラット腸管粘膜免疫系細胞の機能解析：

細胞構成、細胞傷害性及び絨毛上皮におけるケモカイン発現への寄与)

学位論文内容の要旨

We are always exposed to various kinds of environmental factors. Epithelial cells and immune cells residing within intestinal mucosa should appropriately respond to such exogenous factors to maintain the intestinal homeostasis. As one of the environmental factors, food factors might modulate function of mucosal immune system. In fact, it has been found that localization of intraepithelial lymphocytes (IELs) along the longitudinal axis of crypts in the large intestine depends on lymphocyte phenotype, and that ingestion of some dietary fibers promotes the frequency of CD8 α^+ IELs located in the differentiated epithelial region of large intestinal crypt. However, there was no information on their precise population and function in the mucosa. Isolation technique for mucosal immune cells is required to explore those characteristics in maintaining intestinal mucosal homeostasis. Currently reported methods for isolating mucosal immune cells need to be modified for use in rats. In this study, a reliable isolation protocol is established for mucosal leukocytes from rat intestine. Then, fundamental characteristics were investigated of the isolated immune cells. Moreover, their contribution to chemokine expression within the intestinal mucosa was evaluated.

1. Establishment of isolation method for mucosal immune cells from rat intestine.

The improved isolation protocol of lamina propria leukocytes (LPLs) from rat intestine required all the following steps; i) Dithiothreitol (DTT) treatment for removing mucins from mucosa, ii) EDTA treatment for eliminating epithelial cells, iii) collagenase treatment for disrupting extracellular matrix in lamina propria region, iv) settlement step for collecting mainly single cells, and v) density gradient centrifugation for collecting the leukocyte population. Despite of taking several steps mentioned above and spending relatively longer time for isolation from rats, isolated LPLs successfully maintained their cellular function, such as cytotoxicity against tumor cells. Two distinct subpopulations were found in the isolated fraction within gated region for lymphocytes. Proportion of each population depended on the isolated fraction. The DTT fraction

mainly contained smaller lymphocytes; meanwhile, the collagenase fraction, as considered LPLs, contained relatively larger cells than the DTT fraction. EDTA fraction contained both populations equally. Cells in DTT fraction isolated from small intestine are appeared as IELs due to quantitative comparison of the cell population in combination with histological analysis. The proportion of the smaller cells was higher in EDTA fraction as compared to those in the collagenase fraction isolated from large intestine. Major population of isolated lymphocytes in the EDTA fraction from large intestine seems comparable with those in DTT fraction from the small intestine. Surface markers of the isolated lymphocyte fractions were also determined. Thereby, a reliable protocol is established for isolating mucosal leukocytes from rat intestine.

2) CD8 α^+ cells in small intestinal mucosa are involved in secretion of chemokine at the intestinal villi.

In a histochemical analysis, a large population of CD8 α^+ IELs located in villi, but not in crypts under a physiological condition. Such regional distribution of lymphocytes may be due to the different patterns of chemokines or adhesion molecules between villus and crypt epithelia. At the beginning, chemokine expression of villus and crypt epithelia was measured. As a result, different expressions of CCL9 and CCL28 were detected between crypt and villus fractions in qRT-PCR analysis. To investigate whether presence of the CD8 α^+ IELs influence on epithelial function such as chemokine ligand expression, CD8 α -depletion study was conducted using specific anti-CD8 α antibody. CD8 α^+ cells completely disappeared after injection of the specific antibody. Interestingly, influence of the CD8 α -depletion was different between CCL9 and CCL28 expressions. Depletion of CD8 α^+ cells reduced CCL28 expression only in the villus fraction, but did not modulate CCL9 expression in any fraction. These data indicate that CD8 α^+ IELs localized to the villus epithelia maintain the CCL28 expression. Recovery of the CD8 α^+ cells was observed just behind of villus epithelia on 8 days after the antibody injection. Considering phenotypic data of IELs and LPLs, the recovered cells in the sub-epithelial region of villus were considered as CD8 α^+ CD45RA $^+$ $\gamma\delta^+$ T cells. It is proposed that CD8 α^+ $\gamma\delta$ T cells localized adjacent to the villus epithelia are involved in attracting IgA $^+$ B cells by supporting CCL28 expression in villus epithelial cells. Previous study in our lab revealed that the frequency of CD8 α^+ IELs localized among differentiated epithelia cells in rat large intestine were increased by ingestion of sugar beet fiber. It is suggested that higher frequency of CD8 α^+ cells induced by food factors results in increase in accumulation of IgA $^+$ B cells to the intestinal mucosa.

In conclusion, a reliable protocol is established to isolate not only IELs and LPLs from the small intestine, but also LPLs from the cecum and colon in rats. To analyze nutritional influence on the mucosal immune system, rat could be used as a representative animal model. The isolation protocols of immune cells from rat intestinal mucosa are expected to be a fundamental technique to elucidate novel roles of food

factors in maintaining the intestinal mucosal homeostasis.

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	石 塚	敏
副 査	教 授	川 端	潤
副 査	教 授	原	博
副 査	准教授	園 山	慶

学 位 論 文 題 名

Functional analyses of mucosal immune cells isolated from rat intestine: Populations, cytotoxicity, and its contribution to chemokine expression in the villus epithelia

(ラット腸管粘膜免疫系細胞の機能解析：

細胞構成、細胞傷害性及び絨毛上皮におけるケモカイン発現への寄与)

本論文は、英文 103 頁、図 21、表 2、3 章からなり、参考論文 2 編が添えられている。

本論文の研究目的は、消化管粘膜に散在する免疫系細胞の機能が特定の食品成分の摂取により影響を受けるか否かを評価するため、ラットをモデル系としてその腸管粘膜からの免疫系細胞分取法を最適化すること、さらにその手法を用いて分取した粘膜免疫系細胞の機能解析を、細胞表面分子、細胞傷害性、及び絨毛粘膜におけるケモカイン分泌への関与について検討することである。これまでの研究から大腸陰窩内に存在する上皮間白血球 (IEL) の中でも、増殖を終了した上皮細胞近傍には $CD8\alpha^+$ IEL が存在する一方、増殖中の上皮細胞近傍には $CD161^+$ 細胞の局在が報告されている。また、大腸内での有機酸発酵を促すような難消化性糖類の摂取により、その中でも $CD8\alpha^+$ IEL 頻度が有意に増加することが明らかとなっている。このような食餌制御による腸粘膜免疫系細胞の機能調節機構を明らかにするためには当該細胞を分取解析する必要がある。一般に、粘膜免疫系の解析は主にマウスを用いて行われているが、臓器から分取される細胞数の多さ、食餌制御や手術の容易さはラットを用いる利点と考えられる。しかしながら、マウスで従来用いられている腸粘膜免疫系細胞分取法をそのままラットに適用しただけは機能解析に用いるための細胞を得られないことが問題となっていた。本研究では、既存の方法を改変してラット腸粘膜からの免疫系細胞分取に最適な方法を見いだした。また、その手法を用いて、腸粘膜に存在する免疫系細胞の機能評価を併せて行い新規な知見を得ている。

1. ラット腸管粘膜からの免疫系細胞分取法の確立

パイエル板を除くラット小腸粘膜固有層からの免疫系細胞分取には以下のステップが重要であることを見いだした。1) 粘液の除去として還元剤である Dithiothreitol (DTT) をもちいる。2) 上皮の除去に EDTA を用いる。3) 粘膜固有層を破壊するためにコラゲナーゼを用いる。4) 分取画分をしばらく静置した上清から single cell を回収する。5) 密度勾配遠心法を用いて白血球画分を回収する。このようにかなり多くの段階を経るにもかかわらず、分取された粘膜固有層白血球 (LPL) は腫瘍細胞傷害性等の機能を損なうことなく分取された。また、分取細胞画分のフローサイトメトリーによる解析から、このリンパ球画分は大きさの異なる二つの細胞群からなることを見いだした。この二つの細胞集団の比率は分取される画分ごとに異なることが明らかとなった。即ち、DTT 画分では小さい細胞群、コラゲナーゼ画分では大きい細胞群が主要な細胞集団であった。その中間のステップである EDTA 画分からは大きさの異なる二つの細胞集団を同じ比率で含んでいた。ラット小腸から得られる DTT 画分中の白血球は IEL を含む画分と考えられた。大腸から分取された DTT 画分は殆ど白血球を含まず、前述の小さな細胞群はむしろ EDTA 画分に含まれていた。組織化学的解析を分取と同時にを行い、粘膜からの白血球分取過程で早期に得られる小さな細胞群は上皮間由来である可能性が高いと結論された。これら分取細胞群の表面分子解析から各白血球画分の細胞構成を明らかにするとともに、小腸及び大腸粘膜から分取解析された IEL 及び LPL 画分について、いずれの画分においても腫瘍細胞に対する細胞傷害性を持つことを確認した。

2. 小腸絨毛粘膜でのケモカイン発現における $CD8\alpha^+$ 細胞の関与

組織化学的解析の結果、多くの $CD8\alpha^+$ 細胞は IEL として絨毛部位に局在することを見いだした。そこで、この $CD8\alpha^+$ 細胞の絨毛粘膜での遊走機構を解明するための試みとして、特異抗体を投与することで一過性に当該細胞を欠損させ、分離した絨毛及び陰窩画分において白血球遊走に関わる因子であるケモカインの発現を解析した。絨毛部位で陰窩部位に比べて発現の高いケモカインを見いだすことはできなかったが、絨毛粘膜におけるケモカイン発現に及ぼす $CD8^+$ 細胞の役割に関する興味深い現象を発見した。抗 $CD8\alpha$ 抗体を投与することで腸管粘膜における $CD8\alpha^+$ 細胞を一時的に欠損したことを確認し、その時点で絨毛及び陰窩を分離して qRT-PCR 解析を行った。その結果、抗 $CD8\alpha$ 抗体の投与は絨毛及び陰窩画分における CCL9 発現には全く影響を及ぼさなかったが、絨毛部位の CCL28 発現を有意に減少させた。抗 $CD8\alpha$ 抗体投与から 8-10 日後には、腸粘膜における $CD8\alpha^+$ 細胞の存在が絨毛直下のみに見いだされたが、同じ時点ではパイエル板において $CD8\alpha^+$ 細胞は検出されなかった。そこで、抗 $CD8\alpha$ 抗体投与 8 日後の小腸粘膜における $CD8\alpha^+$ 細胞を分取解析したところ、その細胞は $CD8\alpha\alpha^+$ 細胞であることが明らかとなった。正常ラット小腸粘膜の IEL 及び LPL 解析から、この細胞群は $CD8\alpha\alpha^+CD45RA^+\gamma\delta$ T 細胞であることが示唆された。CCL28 は粘膜への IgA^+ B 細胞の遊走に関与することが知られていることから、 $CD8\alpha\alpha^+CD45RA^+\gamma\delta$ IEL が絨毛粘膜からの CCL28 発現を介して、当該粘膜における IgA^+ B 細胞の誘因に寄与する経路が提案された。

以上の研究では、基盤技術としてまずラット小腸及び大腸粘膜からの免疫系細胞分取法を確立した。この手法はラットをモデル系とした腸管粘膜免疫系の機能解析に適用可能であるばかりでなく、食餌を介した腸内環境の変化が粘膜免疫系に及ぼす作用を解析する上で極めて有用な手段となることが期待される。また、その方法をもとに腸管免疫系細胞の腸粘膜での新たな

役割を解明したことで、本研究は高く評価される。

よって、審査員一同は、Jae-Sung Lee が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。