

ライフサイクルに伴う腸管組織内 コラーゲンと免疫細胞の変化

[1] 組織

代表者：古川 睦実

(東北大学大学院農学研究科)

対応者：小笠原 康悦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

野地 智法 (東北大学大学院農学研究科)

平川 良太 (東北大学大学院農学研究科)

勅使河原 杏莉

(東北大学大学院農学研究科)

久松 基史 (東北大学大学院農学研究科)

太田 実友子 (東北大学大学院農学研究科)

研究費：共通研究施設利用費 13万円

[2] 研究経過

パイエル板は腸管免疫の中核であり、B細胞が集積した濾胞領域と、T細胞が集積した傍濾胞領域が基本構造となっている。その形態形成には細網細胞などの非免疫細胞の存在も欠かせない。申請者は、これまで、加齢医学研究所が有する 3D 可視化解析システム (Amira) を駆使し、腸管免疫臓器の 3D 立体構築技術を確立することで、形態変化を経時的かつ立体的に詳細に解析することが可能となった。

今年度は、細胞外マトリクスであるコラーゲンのパイエル板発達および構造維持への影響を明らかにするために、コラーゲンと B 細胞に着目し、3D 構築を行うことで、ライフサイクルに伴うパイエル板の形態成長・維持プロセスの解明を目的とした研究を実施する予定であった。研究開始当初は出生後 1 週齢から 20 ヶ月齢までのマウスからパイエル板を採材し、コラーゲンを染色した後に Amira に供する予定であった。しかしながら、コラーゲンなどの細胞外マトリクスを広く染色する手法であるアザン染色を行ったところ、微細な構造を有するコラーゲンがパイエル板内には分布しており、これらはパイエル板全体を撮影することができる低倍率では観察できず、また、3D 可視化解析システム (Amira) で 3 次元立体構築をすることは難しいと判断した。

パイエル板について、パイエル板を欠損したマウス

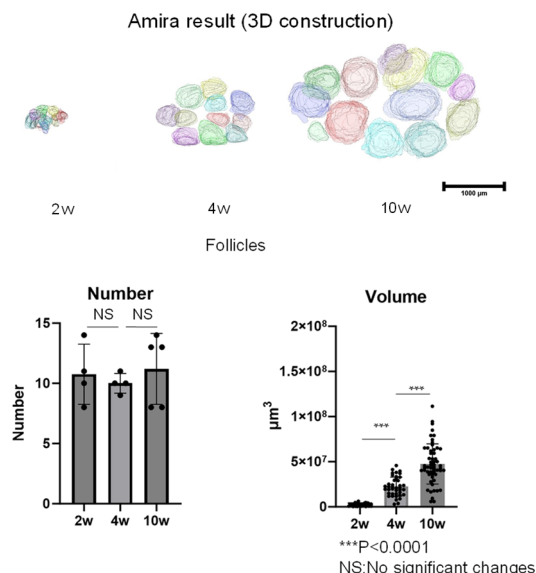
では出生後 5 週齢は糞便中 IgA 濃度が著しく減少する一方で、その後、通常マウスと変化がないレベルまで、糞便 IgA 濃度が回復することが明らかとなっている。そこで、パイエル板を欠損した際に腸管免疫を補う他の腸管免疫臓器が何かを調べるために、盲腸に存在する Cecal Patch (CP) についてパイエル板の発達との比較を行うことにした。

具体的には、2、4、10 週齢のマウスから CP を採材し、B 細胞を認識する Anti-B220 抗体および増殖マーカーである抗 Ki67 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。さらに、組織染色画像を 3D 解析ソフトウェア Amira により、3 次元的解析を行った。なお、本課題は加齢医学研究所教授の小笠原康悦先生が受入教員として参画し、メール等を介した研究打ち合わせを通して、免疫学観点からの研究アドバイスをいただいた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

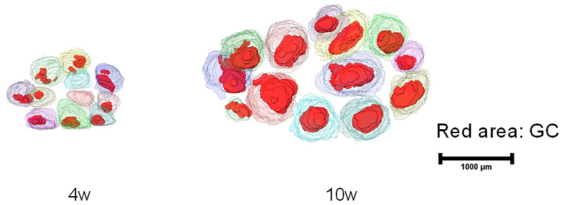
Amira を用いた CP の立体再構築から、CP の濾胞構造は 2 週齢から形成が開始され、4 週齢ではその構造が明瞭になっていることが明らかとなった。加えて、濾胞の数および体積を解析したところ、各週齢で CP に存在する濾胞の数には変化が無かった一方で、濾胞のサイズは週齢とおもに増大していくことが明らかとなった (下図)。



また、濾胞内の活性化領域（GC）を調べた結果、その領域は4週齢以降に形成されていることが明らかとなった。さらに、GCが確認された4週齢と10週齢においてGC領域の体積を解析したところ、その体積は有意に増加していた（下図）。

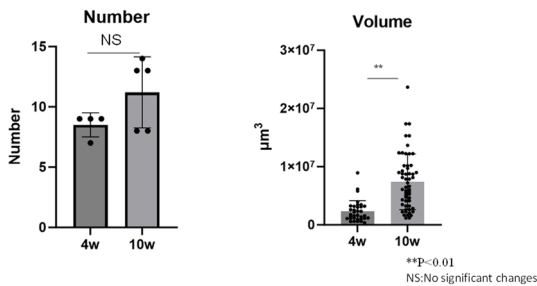
CP's germinal center development process

Amira result (3D construction)



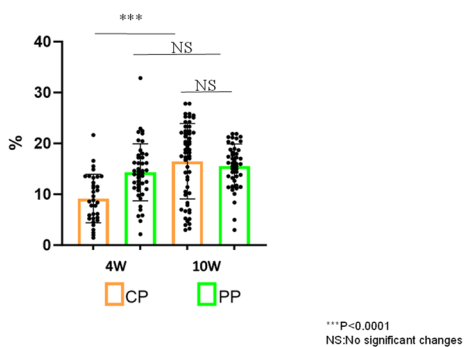
CP's germinal center development process

Germinal center



さらに、これまでAmiraを利用し、得てきたパイエル板のデータと今年度得てきたCPのデータを比較した。その結果、各濾胞におけるGCの割合はパイエル板（PP）では変化が無かった一方で、CPでは4週齢から10週齢にかけて増加していることが明らかとなった（下図）。

Germinal center's proportion



これらの結果により、パイエル板欠損時に週齢に伴い回復していたIgAは、CPによって補われていた可能性が示唆された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、CPの発達時期がパイエル板とは異なるということが3次元解析により明らか

となった。さらには、腸管関連リンパ組織の代表として、多くの研究が小腸に存在するパイエル板に着目してきたが、本研究の結果は腸管免疫におけるCPの重要性を示唆するものであった。今後は、PPとCPの分泌するIgAの違いなどについて比較・解析していくことで、幼若期におけるCPの機能をより詳細に解析していく予定である。

代表者（古川睦実）が申請した関連課題はまた、令和6年度の東北大学加齢医学研究所共同利用・共同研究として採択して頂いており、Amiraを用いた三次元立体構築による粘膜免疫学の発展につながる研究成果の蓄積が、今後も期待される。

[4] 成果資料

現在、Amiraを用いた免疫臓器の3D可視化に関する投稿中である。また、本研究課題とは別課題であるが、研究分担者がAmiraを用いた課題について口頭発表を行った。

1. 久松基史、平川良太、前川紗佳子、古川睦実、野地智法、3D可視化技術を用いたニワトリ盲腸扁桃の形態形成機序の解明、日本畜産学会第131回大会 2023年9月19日
2. 太田実友子、古川睦実、岡田拓歩、神山結斗、久松基史、平川良太、野地智法、乳腺房の形態及び免疫担当細胞の局在に関する組織学的特徴の解明、第72回東北畜産学会、令和5年8月30日