

氏名（本（国）籍）	梶 田 和 彌（東京都）
主 指 導 教 員 名	岐阜大学 教授 五十君 静 信
学 位 の 種 類	博士（獣医）
学 位 記 番 号	獣医博甲第330号
学位授与年月日	平成23年3月14日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	<i>In vitro</i> ヒト M 細胞モデルの確立及び M 細胞標的型 遺伝子組換え細菌の評価に関する研究
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 山 本 茂 貴 副査 帯広畜産大学 教 授 武 士 甲 一 副査 岩 手 大 学 教 授 原 澤 亮 副査 東京農工大学 教 授 藤 川 浩 副査 岐 阜 大 学 教 授 五十君 静 信 副査 岐 阜 大 学 教 授 福 士 秀 人

論 文 の 内 容 の 要 旨

腸管関連リンパ組織は生体内最大のリンパ組織であり、抗原の認識及び腸管粘膜免疫の惹起に重要な役割を果たしている。腸管内の抗原は主にパイエル板を覆う濾胞関連上皮に存在する M 細胞により取り込まれると考えられている。M 細胞は基底膜側に免疫担当細胞を含むポケット構造を備えている。また、M 細胞内はリソソームなどの細胞小器官が未発達なことから、M 細胞により取り込まれた抗原はほとんど分解されることなく、免疫担当細胞に受け渡される。その結果抗原特異的な粘膜免疫が惹起される。そのため M 細胞を標的としてワクチン抗原を投与することにより、効果的な粘膜免疫の誘導が期待される。ヒトの M 細胞は数が少なく、初代培養も困難なことから、*in vitro* においてヒト M 細胞との作用を観察可能な評価系が望まれている。本研究では培養細胞を用いた *in vitro* ヒト M 細胞モデルを確立しその機能の評価を行った。また、M 細胞を標的とする遺伝子組換え細菌を作出し、その抗原運搬体としての評価を作成したモデルにより行った。

<第1章>

In vitro ヒト M 細胞モデルを培養細胞により作成するため、ヒト結腸がん由来の腸管上皮細胞株 Caco-2 細胞と、ヒトバーキットリンパ腫由来の細胞株 Raji B 細胞の共培養系を検討した。モデル作成に用いる Caco-2 細胞のサブクローンを検討した結果、共培養時に単層膜の電気抵抗値を安定に保つ C2BBel 細胞を選抜した。単層膜の M 細胞モデルとしての評価は、M 細胞マーカーの観察及び微粒子の透過を機能面の指標とした。共培養後の C2BBel

細胞単層膜ではヒト M 細胞マーカーである sialyl Lewis A 抗原(SLAA)の発現量が上昇した。マウス M 細胞マーカーであるハリエニシダレクチン(UEA-1)の結合量は減少した。また、SLAA と UEA-1 の局在は異なっていた。機能面では共培養後の単層膜は、微粒子数の透過数が単独培養の単層膜に比べ有意に増加した。C2BBel 細胞の単層膜は Raji 細胞との共培養により M 細胞様の性質を示したことから、非侵入性細菌である乳酸菌の透過菌数を共培養モデルにより観察した。その結果、共培養後の単層膜による乳酸菌の透過菌数は有意に増加した。以上の結果から、Raji 細胞との共培養により C2BBel 細胞の単層膜は、M 細胞様の機能を持った細胞への分化が促されることが示唆された。

<第2章>

作成した M 細胞モデルの特異的な透過能を検討するため、M 細胞への侵入因子である *Yersinia Invasin* を発現する組換え大腸菌を作出した。Invasin 遺伝子を導入した大腸菌は Invasin を菌体表面に発現した。Invasin の発現による Raji 細胞への細胞毒性は確認されず、Invasin 発現株は HeLa 細胞による取り込み菌数が増加した。また、Invasin 抗体によりその取り込みが阻害されたことから、Invasin が大腸菌で機能していることが確認された。さらに M 細胞モデルでは非発現株に比べ Invasin 発現株の透過菌数が増加した。In vivo M 細胞では Invasin による M 細胞の取り込み菌数の増加が確認されており、本 M 細胞モデルにおいても同様の傾向が観察された。そのため本 M 細胞モデルは Invasin を介した抗原取り込み機構を有することが示唆された。

<第3章>

M 細胞を標的とする遺伝子組換え乳酸菌を作出し、その抗原運搬体としての評価を M 細胞モデルにより行った。Invasin の N 末端を細胞表層に固定して発現する遺伝子組換え乳酸菌を作出した。Invasin 発現乳酸菌は大腸菌と同様に HeLa 細胞による取り込み菌数が増加した。Invasin 発現乳酸菌の抗原運搬体としての機能を M 細胞モデルへの接着菌数、取り込み及び透過菌数により評価した。Invasin 発現株の M 細胞モデルへの接着菌数は増加した。しかし、Invasin 発現乳酸菌の M 細胞モデルによる取り込み菌数に有意な差は見られなかった。また、大腸菌とは異なり、Invasin 発現乳酸菌の透過菌数の割合は非発現株に比べ減少し、M 細胞モデルは宿主となる細菌に応じて異なる反応を示した。

<結論>

本研究では C2BBel 細胞と Raji 細胞の共培養による *in vitro* ヒト M 細胞モデルを確立しその機能の評価を行った。作成した M 細胞モデルはヒト M 細胞マーカーである SLAA の発現が上昇し、微粒子及び非侵入性細菌の単層膜を介した透過能を示した。さらに M 細胞への侵入因子である *Yersinia Invasin* を発現する大腸菌の透過菌数は、*in vivo* と同様に M 細胞モデルでも増加した。このように作成したモデルは M 細胞様の表現形質及び機能を示すことから、*in vitro* ヒト M 細胞モデルとして利用することが可能であると考えられる。

また、M 細胞を標的とする遺伝子組換え乳酸菌を作出し抗原運搬体としての機能を作成したモデルにより評価した。乳酸菌の M 細胞モデルへの接着菌数は Invasin の発現により増加した。一方、透過菌数は大腸菌と乳酸菌では異なる結果が得られた。

審 査 結 果 の 要 旨

論文の内容については以下の通りである。

腸管粘膜免疫は M 細胞が抗原を取り込むことにより惹起される。そのため M 細胞を標的としたワクチン抗原の投与は、効果的な免疫誘導が期待される。ヒトの M 細胞は数が少なく、初代培養も困難なため、*in vitro* のヒト M 細胞系が望まれている。本研究では培養細胞を用い *in vitro* ヒト M 細胞モデルを作成し、その機能評価を行った。また、M 細胞を標的とする遺伝子組換え細菌を作出し、その抗原運搬体としての評価を行った。

<第1章>

ヒト C2BBel 細胞と、ヒト RajiB 細胞の共培養によるヒト M 細胞モデルの作成を検討した。共培養後の C2BBel 細胞単層膜ではヒト M 細胞マーカー sialyl Lewis A 抗原の発現量が上昇した。また、共培養後の単層膜では微粒子、及び乳酸菌の透過数が増加した。以上の結果から、C2BBel 細胞の M 細胞様細胞への分化が示唆された。

<第2章>

M 細胞への侵入因子 *Yersinia* Invasin を発現する組換え大腸菌を作出し、M 細胞モデルの特異的な透過能の検討を行った。Invasin 発現株は M 細胞モデルによる透過菌数が増加した。従って M 細胞モデルは Invasin を介した抗原取り込み機構を有することが示唆された。

<第3章>

Invasin を菌体表面に発現する遺伝子組換え乳酸菌を作出し、その評価を M 細胞モデルにより行った。Invasin 発現株の M 細胞モデルへの接着菌数は増加したが、取り込み菌数は変化が見られず、透過菌数は減少した。宿主による差異は、菌体表層の性状の影響が考えられ、M 細胞モデルは評価対象の細菌に応じて異なる反応を示した。

<結論>

本研究において確立した M 細胞モデルはヒト M 細胞マーカーの発現が上昇し、微粒子及び細菌の単層膜を介した透過能を示した。さらに M 細胞への侵入因子である *Yersinia* Invasin を発現する大腸菌の透過を促進した。このように本 M 細胞モデルは M 細胞様の表現形質及び機能を示すことから、*in vitro* ヒト M 細胞モデルとして利用できる可能性が示唆された。また、作成した M 細胞モデルを用いて Invasin 発現遺伝子組換え乳酸菌の機能を評価した。Invasin の発現により M 細胞モデルへの接着菌数の増加が観察され、透過菌数は大腸菌とは異なる結果が得られた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Establishment and evaluation of an *in vitro* M cell model using C2BBel cells and Raji cells

著 者 名 : Masuda, K., Kajikawa, A. and Igimi, S.

学術雑誌名 : Bioscience and Microflora

巻・号・頁・発行年 : 30 (2) : 2011 (in press)

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant *Lactobacillus casei* secreting biologically active murine interleukin-1 β

著 者 名 : Kajikawa, A., Masuda, K., Katoh, M. and Igimi, S.

学術雑誌名 : Clinical and Vaccine Immunology

巻・号・頁・発行年 : 17 (1) : 43-48, 2010