

## RANKL-RANK-OPG による腸上皮バリア維持と破綻による腸炎発症機構の解明

木村俊介

北海道大学大学院医学研究科 組織細胞学分野

### 【研究の背景】

腸管における物理的バリアは腸上皮の管腔を覆う粘液と上皮細胞の糖衣で保護された密な微絨毛に依存する。一方で腸管には液性の免疫システムも重要な防御機構として機能している。適切な腸管免疫応答のためには上皮下のリンパ装置が管腔内の抗原情報を把握することで特異的 IgA 抗体を産生する必要がある。リンパ濾胞上皮の M 細胞は管腔内抗原を取り込むことで免疫応答の開始に働く。M 細胞表面は糖衣が薄く疎な微小突起で覆われ、高分子の接触を許容する。つまり、取り込みに特化した M 細胞はバリアが脆弱で異物や微生物の侵入が容易な細胞である。正常時は M 細胞は濾胞上皮に限局するが、炎症時にリンパ濾胞と無関係な通常上皮に M 細胞様の細胞が出現することが報告されている。

M 細胞分化は RANKL-RANK シグナルによって制御される。受容体 RANK は腸管全域の上皮細胞で発現し、リガンドの RANKL は濾胞上皮下のストローマ細胞が産生することで、M 細胞の濾胞上皮への局在が決定する。マウスへの RANKL 投与は腸上皮全域への M 細胞の形成を誘導する。つまり、濾胞上皮に限らず腸上皮は RANKL による M 細胞への分化能を本質的に備えていることを示す。M 細胞の分化は上皮バリアの維持に重要であることから、通常上皮では M 細胞への分化が抑制されているはずである。そこで、我々は RANKL-RANK シグナルの抑制に働く Osteoprotegerin (OPG) に着目をした。

### 【目的】

本研究では腸管における OPG の発現分布を解析し、炎症時におけるその変動を解析することで、RANKL-RANK-OPG による腸上皮バリアの維持機構を明らかにすることを目指す。

### 【方 法】

#### [1] Osteoprotegerin (OPG) の腸管における発現分布

C57BL/6N マウスを安樂死後 4%パラフォルムアルデヒドによる灌流固定を行い、十二指腸から直腸までを採取後、凍結法による薄切切片を作製した。Osteoprotegerin 抗体による免疫組織染色を行い、OPG の腸管における発現分布を解析した。

#### [2] デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) による潰瘍性大腸炎の実験モデルの構築

C57BL/6N 系統のマウスを用い、1.5%、2.5%DSS を飲水によって摂取させ、体重減少、大腸の長さを指標に最適な DSS 投与の条件検討を行った。

#### [3] DSS モデルにおける M 細胞発現分子の発現量変動の解析

方法 2 で決定した DSS 腸炎モデルから腸上皮を EDTA 法によって分離し、OPG 並びに M 細胞発現分子の発現変動を定量的 PCR 法と免疫組織化学によって解析を行った。

## 【結 果】

腸管における OPG の発現が腸上皮に点在して認められた。形態学的な特徴から腸上皮内分泌細胞であると想定されたため、マーカー分子である Chromogranin A と OPG の共染色を行い、一致することが確認できることから、腸上皮内分泌細胞が OPG を発現すると考えられた。これは *in situ hybridization* 法によって mRNA レベルでも同様な結果が得られている。

続いて DSS 腸炎モデルでは 2.5%DSS によって 8 日間で顕著な腸炎を誘導する条件が得られた。この条件下で DSS 投与 4 日目から大腸上皮における OPG mRNA の発現上昇が認められた。小腸では OPG の発現上昇は認められなかつた。M 細胞発現分子として Spib、Gp2、Tnfaip2 の mRNA 発現を解析したが、有意な上昇は認められなかつた。一方で免疫組織学的解析では GP2、Tnfaip2 陽性細胞が大腸上皮で認められた。

## 【考 察】

OPG は腸上皮内分泌細胞が発現していた。これは分泌顆粒で認められることから、粘膜固有層へと分泌されていると想定される。DSS による腸炎モデルでは大腸上皮における OPG の発現上昇が認められた。このとき GP2、Tnfaip2 陽性の M 細胞様細胞の異所的な出現が大腸上皮で認められたが極少数であった。これは炎症によって OPG の発現が上昇することで、M 細胞の異所的な分化が抑制されていると考えられる。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

炎症性大腸炎においては血中 OPG の濃度が上昇することが報告されている<sup>1)</sup>。本研究は腸上皮内分泌細胞がその一因である可能性を示している。さらに、OPG は炎症時の M 細胞の異所性分化を抑制していると想定される。大腸炎患者の臨床検体の解析では M 細胞の増加を認められている<sup>2)</sup>。しかしながら、大腸炎における M 細胞の役割については未だ不明なままである。本研究アプローチを発展させることで、新たな大腸炎の発症、増悪のメカニズムが明らかになる可能性がある。

## 【参考・引用文献】

- 1) Gut 54:479-87, 2005
- 2) Gut 32:724-732, 1996