

課題番号 28

3D 可視化解析システムを駆使した加齢に伴うパイエル板の形態変化に関する組織学的研究

[1] 組織

代表者：野地 智法

(東北大学大学院農学研究科)

対応車：小笠原 康悦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

馬場 柚里 (東北大学大学院農学研究科)

古川睦実 (東北大学大学院農学研究科)

研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

腸内の免疫・微生物環境に与える加齢の影響は大きく、そのことは、腸管での免疫誘導を目的とした高齢者用ワクチンや、腸内の微生物環境の向上を目的とした高齢者用プロバイオティクス開発が容易でない一つの要因である。申請者はこれまで、加齢医学研究所が有する組織イメージング技術（共焦点レーザー顕微鏡および 3D 可視化解析システム Amira）を駆使し、腸管での免疫誘導および、腸内微生物との共存関係の構築に重要な役割を有するパイエル板（腸管に存在する二次リンパ組織）の 3D 立体構築技術を確立することで、若齢時と加齢時のパイエル板の構造を比較することに成功してきた（図1）。

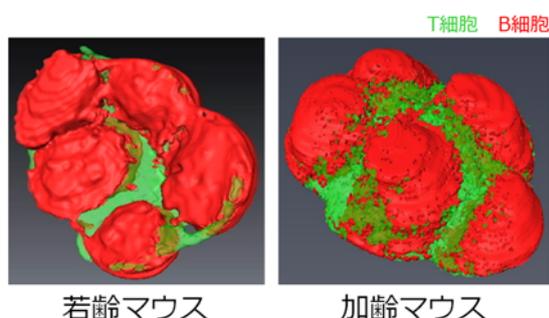


図1：パイエル板の 3D 立体構築

2019 年度の研究では、2018 年度の共同研究・共同利用事業（課題番号 37）を通して確立した 3D 立体構築技術を駆使することで、パイエル板内に発達するリ

ンパ濾胞構造に加え、パイエル板内にリンパ球を運ぶ血管およびリンパ管の走行を、MAdCAM1 および Podoplanin に対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に解析することで、加齢に伴うパイエル板の形態学的特徴および、免疫細胞のパイエル板内へのおよびパイエル板外への遊走に関わる組織学的ユニーク性を明らかにする。これらの研究を通して、腸内の免疫応答の加齢に伴う機能および組織構造変化を解明することで、高齢者を対象とした新たな免疫・微生物戦略を構築するための手がかりを得ることを目指している。なお、本課題は、加齢医学研究所教授の小笠原康悦先生（生体防御学）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、腸管免疫と加齢の観点からの研究アドバイスをを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

若齢マウスおよび加齢マウスよりパイエル板を採取し、それを 4%パラフォルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋した。その後、パイエル板全てを 5 μ m 厚で薄切し（約 150 枚/パイエル板）、5 枚に 1 枚を選抜し、T 細胞を染色するための抗 CD3 抗体および、B 細胞を染色するための抗 B220 抗体を用いて免疫組織学的に染色（間接法）を行った。T 細胞および B 細胞の局在は、加齢医学研究所の共通機器室に設置されている共焦点レーザー顕微鏡（Leica SP8）を用いて画像を取得後、得られた全ての画像を解析ソフト（Amira）用いて連結させることで立体構築を試みることで解析した。その後、様々な三次元解析を実施することで、パイエル板の形態構造の特殊性と加齢に伴う変化を解析した。

得られた 3D 画像を Amira の機能を駆使して様々な角度から展開解析した結果、若齢マウスおよび加齢マウスともに、B 細胞が集積するパイエル板の濾胞構造（赤）には、複数の連結部位（白矢印）が認められることが明らかになった（図2）。このことは、濾胞内に存在する B 細胞は自由に濾胞間を移動できる可能性を示唆していた。また、T 細胞からなる傍濾胞領域（緑）は、パイエル板構造の中央部に発達しており、T 細胞がパイエル板の中核的機能を有していることが推測された。

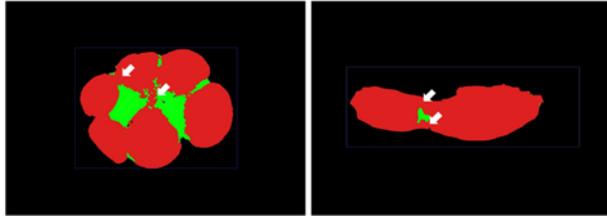
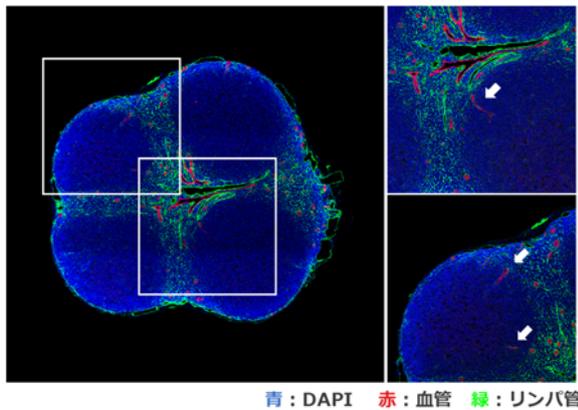


図2 : Amira を用いたパイエル板の構造解析

次にパイエル板内の血管およびリンパ管の走行性を理解すべく、血管を識別するための抗 MAdCAM1 抗体およびリンパ管を識別するための抗 Podoplanin 抗体を用いた二重染色（間接法）を実施することで、パイエル板内に流入する、もしくはパイエル板外に流出する細胞の遊走性を理解するための組織学的研究を実施した。画像は、加齢医学研究所に設置されている共焦点レーザー顕微鏡（Leica SP8）を用いて取得した。その結果、血管およびリンパ管は、傍濾胞領域に特に発達しており、傍濾胞領域が免疫細胞の出入口であることが推測された。また、一部の血管は、濾胞領域に介入しており（白矢印）、濾胞領域内への細胞供給（濾胞領域からの細胞排出）に関わる血管の局在が示された（図3）。



青 : DAPI 赤 : 血管 緑 : リンパ管

図3 : パイエル板内に発達する血管およびリンパ管

本研究では、各濾胞は連結されることで、濾胞内に存在する免疫細胞は自由な移動度を有していることを示唆する結果を得てきたが、この仮説に矛盾することなく、濾胞間を繋ぐ血管の存在は示されなかった。このことは、パイエル板内では血管に依存しない細胞の自由な移動が認められることを強く示唆していた（図4）。

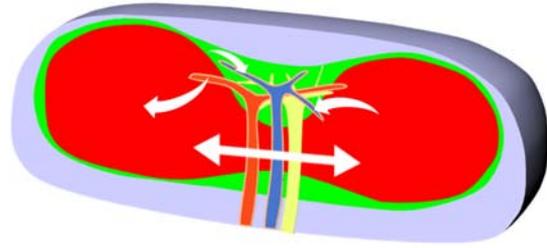


図4 : 3D 解析から示されたパイエル板の立体構造
赤 : 濾胞領域、緑 : 傍濾胞領域、オレンジおよび黄 : 動脈および静脈、青 : 輸出リンパ節

（3-2）波及効果と発展性など

本共同研究により、粘膜免疫システムに備わる免疫臓器を組織学的に解析するための解析基盤が確立された。現在は、濾胞領域、傍濾胞領域のみならず、パイエル板内の血管走行にも着目した組織学的解析を開始しており、本年度の成果を発展させたそれらの課題は、令和2年度の東北大学加齢医学研究所共同利用・共同研究課題の継続採択にも結び付いており、今後のさらなる発展が期待されるものである。

〔4〕 成果資料

1. **Nochi T**, Shuzuki S, Ito S, Morita S, Furukawa M, Fuchimoto D, Sasahara Y, Usami K, Niimi K, Itano O, Kitago M, Matsuda S, Matsuo A, Suyama Y, Sakai Y, Wu G, Bazer FW, Watanabe K, Onishi A, Aso H. Elucidation of the effects of a current X-SCID therapy on intestinal lymphoid organogenesis using an *in vivo* animal model. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* in press, 2020