

---

反芻動物の空腸及び回腸パイエル板単離リンパ濾胞  
の多様性とその機能

---

18580292

平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (c)) 研究成果報告書

平成 20 年 3 月

研究代表者 保田 昌宏

宮崎大学 農学部 助教

---

反芻動物の空腸及び回腸パイエル板単離リンパ濾胞  
の多様性とその機能

---

18580292

平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (c)) 研究成果報告書

平成 20 年 3 月

研究代表者 保田 昌宏

宮崎大学 農学部 助教

### <はしがき>

獣医畜産領域の主な動物種である偶蹄類、鳥類、食肉類などでは2種類の腸管関連リンパ器官が存在する。一つはB細胞が分化し多様性を獲得する場である一次リンパ器官であり、もう一つは局所免疫を担う二次リンパ器官である。この2種類の腸管附属リンパ器官の機能を比較研究することは、動物の外来抗原認識および環境適応機構の解明となり、動物粘膜ワクチン応用への道程とも言える。本研究の目的は、反芻動物をモデル動物とし、個体発生を追って空腸及び回腸パイエル板リンパ濾胞を単離し、B細胞のクローナリティと多様性獲得機構および自己反応性B細胞の排除機構を解明し、2種類の腸管関連リンパ器官の機能差を明らかにし、得られた基礎的結果をこれらの動物種の損耗防止疾患の予防に演繹することにある。

### 研究組織

研究代表者：保田 昌宏（宮崎大学 農学部 助教）

研究協力者：John Reynolds (Calgary University, IRG)

研究協力者：Laurie Kennedy (Calgary University, IRG)

研究協力者：Crig Jenne (Calgary University, IRG)

研究協力者：村上 隆之（宮崎大学）

研究協力者：那須 哲夫（宮崎大学）

研究協力者：高梨 資子（宮崎大学）

研究協力者：小塚 祐利子（宮崎大学）

研究協力者：笠 伸之（宮崎大学）

### 交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	2,500,000	0	2,500,000
平成19年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

## 研究発表

### (1)雑誌論文

1. M. Yasuda, M. Takanashi, T. Nasu and T. Murakami. Histological studies on the ontogeny of bovine palatine and pharyngeal tonsil: germinal center formation, IgG and IgA mRNA expression. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 29; 279-293, 2006
2. M. Takanashi, T. Nasu, T. Murakami and M. Yasuda. Secondary lymphoid areas in calf ileal Peyer's patch. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2008  
印刷中
3. M. Yasuda, T. Nasu and T. Murakami. Difference cytokine mRNA expressions in calf ileal and jejunal Peyer's patch single lymphatic follicles. *Submitted*
4. M. Yasuda, C. N. Jenne, L. J. Kennedy and J. D. Reynolds. Immunoglobulin receptor editing ongoing within sheep ileal Peyer's patch follicle. *Submitted*

### (2)学会発表

1. 保田昌宏、CN Jenne, LJ Kennedy, JD Reynolds. 羊空腸及び回腸パイエル板リンパ濾胞内 B 細胞のダイナミクス。日本比較免疫学会、第 18 回学術集会講演要旨。2006 年 8 月 広島市
2. 保田昌宏、CN Jenne, LJ Kennedy, JD Reynolds. 羊空腸および回腸パイエル板リンパ濾胞内 B 細胞レパトリーの解析。第 142 回日本獣医学会学術集会。2006 年 9 月 山口市
3. 保田昌宏、CN Jenne, LJ Kennedy, JD Reynolds. 羊の免疫グロブリン鎖の解析 V $\lambda$ -J $\lambda$  の組み合わせはターミナルである。第 143 回日本獣医学会学術集会。2007 年 4 月 つくば市
4. M Yasuda, CN Jenne, LJ Kennedy, JD Reynolds. Immunoglobulin receptor editing ongoing within sheep ileal Peyer's patch follicle. 13<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology. 2007 年 7 月 Tokyo, Japan
5. M Yasuda, CN Jenne, LJ Kennedy, JD Reynolds. Dynamics of B-cell repertoire in sheep jejunal and ileal Peyer's patch single follicle. 13<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology. 2007 年 7 月 Tokyo,

Inetrnational Congress of Mucosal Immunology. 2007年7月 Tokyo, Japan

6. M Yasuda, CN Jenne, LJ Kennedy, JD Reynolds. Dynamics of B-cell repertoire in sheep jejunal and ileal Peyer's patch single follicle. 8<sup>th</sup> Inetrnational Veterinary Immunology Symposium. 2007年8月 Ouro Preto, Brazil
7. M Yasuda, CN Jenne, LJ Kennedy, JD Reynolds. Immunoglobulin receptor editing ongoing within sheep ileal Peyer's patch follicle. 13<sup>th</sup> Inetrnational Congress of Immunology. 2007年8月 Rio de Janeiro, Brazil
8. 保田昌宏、CN Jenne, LJ Kennedy, JD Reynolds. 羊回腸パイエル板リンパ濾胞でレセプターエディティングがおこっているか? 第144回日本獣医学会学術集会。2007年9月 江別市

## 研究成果

反芻動物では空腸および回腸領域にパイエル板があり、前者が局所免疫を担う二次リンパ器官で、後者はB細胞が分裂増殖しプライマリーレパトリーを形成する一次リンパ器官であるとされている。しかしながら、胎生中期にまず二次リンパ器官である空腸パイエル板が形成され、胎生後期に一次リンパ器官の回腸パイエル板が形成される。まず、胎生期における両パイエル板リンパ濾胞内B細胞のクローナリテイやレパトリーの比較解析を実施すると共に、出生後にリンパ濾胞内のそれらがどのように変化あるいは進化していくかについて解析した。ヒツジの空腸及び回腸パイエル板リンパ濾胞を単離し、RT-PCR法で免疫グロブリン $\lambda$ 軽鎖抗体遺伝子を増幅し塩基配列を決定した。胎齢100日（この時期一次リンパ器官である回腸パイエル板リンパ濾胞は観察されない）の空腸パイエル板リンパ濾胞内B細胞はオリゴクローナルであったが、胎齢120日～135日および出生後ではポリクローナルとなった。いっぽう回腸パイエル板では個体発生を通して濾胞内B細胞はオリゴクローナルであった。胎生期の両パイエル板リンパ濾胞内B細胞で点突然変異が観察され、出生後では特に可変領域の相補性決定領域に多くの点突然変異が蓄積されていた。このように空腸と回腸パイエル板リンパ濾胞内B細胞のクローナリテイは異なるが、胎生期より両パイエル板リンパ濾胞内でB細胞のレパトリーが形成されていることが明らかにした。次に、ヒトやマウスの骨髄（一般的な有顎脊椎動物におけるB細胞の一次リンパ器官）では、自己反応性B細胞はレセプターエディティング機構によって回避されることが知られている。反芻動物でもパイエル板で産生されるB細胞の中には自己反応性B細胞が出現すると考えられているが、回避機構については明らかにされていない。そこで、回腸パイエル板から単離したリンパ濾胞内の免疫グロブリン $\lambda$ 軽鎖の可変領域の解析を進めた。さらに、免疫グロブリン可変領域をコードする遺伝子断片の組み換え、突然変異や塩基対の挿入に關与する遺伝子（RAG1, RAG2, TdTおよびAID）の発現も観察した。その結果、ヒツジ回腸パイエル板においても、レセプターエディティング機構が起こっていることを示唆する結果が得られた（投稿中）。これらの研究内容は、第13回国際免疫学会や第8回国際獣医免疫学シンポジウムで口頭発表演題として採択された（学会発表参照）。次に、ウシの空腸および回腸パイエル板の単離リンパ濾胞を用いて、これらのリンパ濾胞の機能差を解析するために、13種類のサイトカインの発現を調べた。その結果、免疫グロブリンのクラススイッチ

に関するサイトカインが回腸パイエル板で検出できなかった。つまり、空腸と回腸にあるパイエル板リンパ濾胞内ではB細胞の機能や成熟度に差があると考えられる(投稿中)。さらに、ウシの一次リンパ器官である回腸パイエル板内を肉眼解剖学および組織学的に精査し、一次リンパ組織内に二次リンパ組織と非常に類似した部位があることも発見し、論文として発表した(J Vet Med Sci 70巻9月号に掲載予定)。また、牛の口蓋扁桃や咽頭扁桃の個体発生を免疫組織化学的に解析し、一次リンパ器官である回腸パイエル板のそれと比較し、論文として発表した(Comp Immun Microbiol Infect Dis 2006; 29: 279-293)。