

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790521

研究課題名（和文） パイエル板M細胞と免疫細胞の相互作用の機能解析

研究課題名（英文） Study on the interaction between M cells and immune cells in Peyer's patch.

研究代表者

木村 俊介 (KIMURA SHUNSUKE)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40444525

研究成果の概要（和文）：パイエル板 M 細胞の分化と機能発現には、基底面でのリンパ球との相互作用が重要である。本研究では M 細胞で高発現するケモカイン CCL9 の受容体 CCR1 を発現する細胞の同定を試みた。その結果、パイエル板の CCR1 陽性細胞は上皮下領域に多く存在し、多くが M 細胞と接していることが免疫組織染色から明らかになった。さらに、CCR1 陽性細胞は抗体産生を行う形質細胞の一種であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Peyer's patch (PP) in the small intestine is a primary site for the intestinal immune system. The luminal side of PPs is covered by the follicle-associated epithelium (FAE), which contains M cells, which uptake antigens or macromolecules, and deliver them to dendritic cells inhabiting subepithelial dome region under FAE. CCR1 is a receptor of Ccl9 which is belonging to the CC chemokine family and highly expressed in M cells. We found that CCR1 positive cells inhabit subepithelial dome region, and some of them contact with M cells. Moreover, our study suggests that CCR1 positive cell belongs to a subtype of antigen-producing plasma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：パイエル板、M 細胞

1. 研究開始当初の背景

腸管は外界とつながっており、食物とともに多くの抗原や微生物が入ってくる。これらの抗原や微生物に対して生体は、免疫システムを使うことで恒常性を維持している。そのため、腸管には生体防御を担うリンパ球が多く常駐し、この場所における免疫応答は厳密な調節を受けている。パイエル板の管腔側で

は上皮細胞がドーム状にふくれ、円柱上皮細胞と M 細胞がモザイク状に混ざっている。M 細胞は基底膜面がえぐれた M 細胞ポケットと呼ばれる特徴的な構造をもち、ここにリンパ球や樹状細胞が基底膜を通過して M 細胞の底部と密に接している様子が観察される。M 細胞表面は通常の円柱上皮と比べ微絨毛が疎であることに加えて、粘膜表面の糖衣

が薄く抗原や微生物が細胞に接触しやすい構造をもつ。実際に、形態学的な解析からしばしば微生物が選択的に M 細胞内に侵入している様子が観察される。以上のことからこの細胞は管腔内の抗原を吸着した後に取り込んで、底部に接している抗原提示細胞へと伝えることで、腸管免疫応答の最前線を展開している細胞であると考えられている。

基底面、M 細胞ポケットにおけるリンパ球との相互作用は M 細胞の特長の一つである。しかしながら、この相互作用の意義は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では M 細胞ポケットにおけるリンパ球と M 細胞相互作用の生理的意義を明らかにすることを目的とした。そのため、M 細胞で高発現するケモカイン CCL9 に着目し、その受容体である CCR1 を発現する細胞の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1)マウス CCR1 に対する抗血清を作製し、免疫組織染色によって CCR1 陽性細胞の局在決定を行った。さらに *in situ hybridization* 法によって CCR1 mRNA の発現部位を明らかにした。

(2) CCR1 陽性細胞のフローサイトメトリー解析を行うため、CCL9 にヒト IgG Fc 領域を融合した CCL9-Fc 蛋白質を作製した。免疫組織染色と合わせて、フローサイトメトリー解析を行うことで各種のリンパ球マーカー分子と比較することで、CCR1 陽性細胞の同定を試みた。

4. 研究成果

(1)マウス CCR1 の N 末端に相当するペプチドを合成し、ウサギに免疫を行い免疫抗血清を得た。抗原ペプチドとのアフィニティー精製を行い抗 CCR1 抗体を得た。得られた抗体はマウス CCR1 を強制発現させた HeLa 細胞を特異的に染色することが確認できた。この抗体をパリエル板を標本として免疫組織染色に適用したところ、パリエル板上皮下領域と絨毛の粘膜固有層で陽性シグナルが確認できた。これらの陽性シグナルは抗原ペプチドを用いて吸収実験を行うことで消失したため、抗原特異的な反応であると考えられた。マウス CCR1 を標的とした放射線標識したアンチセンスオリゴプローブを作製し、*in situ hybridization* 法によって CCR1 mRNA の発現部位を調べたところ、上皮下領域での発現が認められ免疫組織染色と一致していたが、上皮下粘膜固有層では mRNA の発現は確認できなかった。この結果は CCR1 陽性細胞が上皮下領域に存在していることを確信させるものではあったが、粘膜固有層における発現は不明であり、得られた CCR1 抗体の特異性には疑問が残るものになった。上皮下領域の CCR1 陽性細胞は基底膜を超えて M 細胞ポケットに入り込み、接しているものが多く認められた。

(2) CCL9-Fc 蛋白質によって表面を標識された細胞をセルソーターによって分離し、定量的 RT-PCR 法によって発現するケモカイン受容体を調べたところ CCR1 が最も濃縮されていた。Fc 蛋白質では陽性シグナルが得られなかった。CCL9-Fc 陽性細胞は B220 を発現していたため、B 細胞の一種であると推測された。さらに解析を進めたところ形質細胞マーカーである CD138 の発現が高いことがわかった。IgA、IgM、CXCR4 のような形質細胞マーカーの発現もみとめられ、免疫組織染色でも CCR1 陽性細胞は CD138、IgA、IgM

陽性でアルことが確認でき、さらに形質細胞の最終分化に関わる転写因子 **Blimp1** の発現が核内に認められた。単離した **CCL9-Fc** 陽性細胞は核のクロマチン構造がはっきりとしており、形態的にも形質細胞と良く似ていた。以上の結果から **CCR1** 陽性細胞は形質細胞の一種であることを明らかにした。**Blimp1** が発現していること、最終分化が終わると消失する **B220** の発現が残っていること、形態観察からは細胞質の発達が認められないことから未熟な形質細胞である形質芽細胞と推測される。

パイエル板における抗体産生細胞の成熟過程を考えると、まず、濾胞領域で **B** 細胞の体細胞超変異、クラススイッチ、増殖が起き、細胞表面に **IgA** を発現した **IgA** 前駆 **B** 細胞となる。その後 **IgA** 前駆細胞は実効組織である粘膜固有層へ移動する。パイエル板には成熟した形質細胞はほとんど存在せず、最終的な形質細胞への成熟は粘膜固有層でおこるとの考えが一般的である。しかしながら、形質細胞に傾倒した **IgA** 前駆 **B** 細胞が、粘膜固有層へとどのような経路で移動し、形質細胞へと成熟するかに関する情報は少ない。我々の見いだした **CCR1** 陽性細胞は、クラススイッチに必要な **AID** の発現が認められず、形質細胞の成熟に必要な転写抑制因子 **Blimp1** の発現が核に、細胞表面と内部に **IgA** が確認できること、さらに、形態学的な特徴をあわせると形質細胞もしくは形質芽細胞である。**IgA** 前駆細胞から段階の進んだ形質(芽)細胞が **M** 細胞ポケットに存在していることは、**M** 細胞との相互作用が形質細胞の成熟、機能発現に関与している可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Kimura S, Hase K, Ohno H.
The molecular basis of induction and formation of tunneling nanotubes
Cell Tissue Res 2013 Apr;352(1):67-76.
doi: 10.1007/s00441-012-1518-1.
査読有り

2. Kimura S, Hase K, Ohno H.
Tunneling nanotubes: Emerging view of their molecular components and formation mechanisms.
Exp Cell Res. 2012 Aug 15;318(14):1699-706.
doi: 10.1016/j.yexcr.2012.05.013.
査読有り

3. Takahashi D, Hase K, Kimura S, Nakatsu F, Ohmae M, Mandai Y, Sato T, Date Y, Ebisawa M, Kato T, Obata Y, Fukuda S, Kawamura YI, Dohi T, Katsuno T, Yokosuka O, Waguri S, Ohno H.
The epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B controls gut immune homeostasis in mice.
Gastroenterology. 2011 Aug;141(2):621-32.
doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.056.
査読有り

[学会発表] (計2件)

1. Hiroshi Ohno, Koji Hase, Shunsuke Kimura, Shuya Fukai. The role of M-Sec in tunneling nanotube formation
the EMBO meeting 2011 9月11日 Austria Center (オーストリア)

2. Shunsuke Kimura, Takako Amada, Koji Hase, Toshihiko Iwanaga, Hiroshi Ohno. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex
第63回日本細胞生物学会大会 2011 6月29日北海道大学(札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 俊介 (KIMURA SHUNSUKE)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40444525