

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20113003

研究課題名（和文） 上皮細胞極性物流システムによる粘膜免疫制御機構の研究

研究課題名（英文） Regulation of mucosal immune system by polarized sorting in epithelial cells

研究代表者

大野 博司 (OHNO HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・免疫系構築研究チーム・チームリーダー

研究者番号：50233226

研究成果の概要（和文）：

上皮細胞における極性物流システムについて、AP-1B 欠損マウスならびに、特殊な腸管上皮 M 細胞特異的に発現する GP2 および M-Sec に関する研究を行った。その結果、AP-1B は上皮細胞の極性と増殖をリンクすること、AP-1B を欠損するとサイトカイン受容体のミスソーティングの結果腸炎を自然発症することが明らかとなった。また、GP2 は細菌の取り込み受容体としてその後の細菌特異的粘膜免疫応答の誘導に重要なこと、M-Sec は遠隔細胞の細胞膜を物理的に連結する細胞ナノチューブの形成制御因子として重要なことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have studied the regulation of mucosal immune system by polarized sorting in epithelial cells using AP-1B, M-cell-specific GP2 and M-Sec as molecular targets. AP-1B was revealed to connect cellular polarity and proliferation. We have also shown that AP-1B KO mice suffer from spontaneous colitis because of mis-sorting of cytokine receptors. GP2 has been shown to serve as a bacterial uptake receptor on M cells important for subsequent specific mucosal immune responses. We were also able to show that M-Sec is an important regulator for the formation of tunneling nanotubes connecting remote cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	35,100,000	10,530,000	45,630,000
2009 年度	24,600,000	7,380,000	31,980,000
2010 年度	24,600,000	7,380,000	31,980,000
2011 年度	24,600,000	7,380,000	31,980,000
2012 年度	24,600,000	7,380,000	31,980,000
総計	133,500,000	40,050,000	173,550,000

研究分野：生物学・医歯薬学

科研費の分科・細目：生物科学・基礎医学・細胞生物学・医化学一般

キーワード：細胞内ロジスティクス、上皮細胞極性輸送、AP-1B、GP2、M-Sec、粘膜免疫系

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞極性物流システムは、消化器系、呼吸器系、泌尿生殖器系など外界に直接暴露される組織において、体内外の境界を形成する粘膜上皮細胞の特徴を決定づける細胞内

ロジスティクス機構である。上皮細胞の細胞膜はタイト・ジャンクションにより、体外と接する頂端面と体内に面する側底面という 2 つの領域に仕切られており、両者はその膜タンパク質組成も異なる。上皮細胞は、このよ

うに細胞内に“細胞極性”と呼ばれる不均一性を産み出すことにより、体内外という全く異なる環境の境界面（バリアー）として機能している。この細胞極性の形成・維持を制御しているのが極性物流システムである。細胞極性の形成・維持を支える極性物流システムは、多細胞生物においては細胞機能としてのみならず、組織・器官の形成や機能発現にも重要である。極性物流システムは、主として新たに合成されたタンパク質の頂端面あるいは側底面細胞膜領域への選別輸送と、一方の細胞膜領域から他方への細胞質を縦断しての輸送であるトランスサイトーシスに大別される。側底面への選別輸送研究は、分子・細胞レベルでの解明は進んできたが、個体レベルでの役割は現在に至るまでほとんど解明されていなかった。一方トランスサイトーシスは、栄養素の吸収やIgA抗体の分泌など、上皮バリアーを超えての物質輸送を制御する。中でも特殊な例として、パイエル板に代表される粘膜リンパ組織を覆う特殊な上皮細胞であるM細胞は、発達したトランスサイトーシスにより細菌などの腸内抗原を盛んに取り込んで免疫系に受け渡すことで、粘膜免疫系の恒常性維持に極めて重要な役割を果たすと考えられるが、その分子機構は全くわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が最近樹立したAP-1B欠損マウス、ならびにM細胞特異的分子であるGP2とM-Secを対象に、個体レベルにおける細胞極性物流システムの役割の理解とイメージング、さらにはその破綻に起因する病態発現のメカニズム解明について研究を進めた。予備的検討の結果、AP-1B欠損マウスでは腸管上皮細胞における膜タンパク質の局在異常とともに、上皮細胞の増殖異常や大腸炎が認められていた。そこで本研究では第1に、AP-1B欠損マウスをモデルとして、側底面への選別輸送による細胞増殖制御の仕組みと、その破綻による癌化や腸炎などの病態形成の分子機序について詳細な解明を行った。

第2に、M細胞特異的な新規の物流制御関連因子であるGP2ならびにM-Secの機能解析を行う。研究代表者のこれまでの研究から、GP2はある種の細菌の受容体としてそのトランスサイトーシスへの関与が示唆される(図2)。またM-Sec(上皮細胞における側底面への選別輸送制御に関わるexocystと呼ばれる分子複合体のサブユニットであるSec6と相同性を示すことから命名)は、M細胞での選別輸送やトランスサイトーシスを制御する可能性がある。そこで本研究では、M細胞の極性物流システムにおけるGP2、M-Secの分子機能の解析を進めると同時に、

欠損マウスを樹立し個体レベルでの役割も解析した。

3. 研究の方法

AP-1B欠損マウスではE-cadherinの局在異常に伴い、 β -cateninのタンパク量ならびに核移行量の増大が認められ、これがAP-1B欠損マウスにおける上皮細胞の増殖亢進の原因と考えられた。そこで、これら分子のAP-1B欠損マウスにおける局在や、AP-1B認識配列の有無について詳細に検討した。また、AP-1B欠損マウスにおける腸炎の原因を解明するために、腸内細菌の組織へのトランスロケーションの有無、炎症性サイトカインの分泌やサイトカイン受容体の分布などを調べた。

GP2に関しては、M細胞特異的に発現するサルモネラなどの細菌受容体であることを明らかにした。そこでサルモネラを経口感染させ、その免疫応答を測定した。

M-Secは、前述のように側底面への選別輸送制御に関わるexocyst複合体のサブユニットであるSec6と相同性を示すこと、またM-Secを強制発現させたHeLa細胞では細胞膜が細長くチューブ状に伸長して周辺の細胞の細胞膜と融合し細胞間を連結することから、細胞膜の特定部位に膜成分を供給する物流システムへの関与が示唆された。そこでM-Secがexocyst複合体に含まれるか否かを、他のexocystサブユニットであるSec8やExo70がM-Secと同じゲル濾過画分に検出されるか、あるいはM-Sec抗体により免疫共沈降されるかを、それぞれの抗体によるウェスタンブロットにて検討した。

4. 研究成果

AP-1B欠損マウスでは、腸管上皮細胞における膜タンパク質の局在異常とともに、腸管上皮細胞の増殖能の亢進が認められ、本来は増殖性を持つ腸管上皮幹細胞が存在するクリプト底部に留まるべき増殖細胞が広く絨毛上部にまで分布していた。AP-1B欠損マウスの腸管上皮では、E-カドヘリンの側面細胞膜への局在が低下し、細胞質面分が増加しており、それに伴って β -カテニンがE-カドヘリンから解離し、細胞増殖を促進する β -カテニンの核移行が有意に亢進していることから、細胞極性の形成・維持と上皮細胞の増殖は密接に関係していることが示唆された。さらに、マウス及びヒト大腸がん組織における細胞極性やAP-1B特異的サブユニット μ 1Bの発現を解析した結果、AP-1Bはがんの悪性化を制御している可能性が示唆された。

また、1B欠損マウスではクローン病に類似の腸炎が自然発症するが、これは上皮細胞におけるサイトカイン受容体や多量体Ig受容体の御輸送により、上皮細胞からの抗菌ペプ

チドの産生や IgA の分泌が減少するために、腸内細菌が粘膜内に侵入して炎症を起こすためと考えられる。AP-1B 欠損マウスは未だ発症原因に不明な点の多いクローン病の新たな研究モデルとして役立つことが期待される。

GP2 に関しては、GP2 欠損マウスにおいては経口投与したサルモネラのパイエル板への取り込みや、その後のサルモネラ特異的 T 細胞の増殖ならび IgA の分泌が野生型マウスに比べて有意に抑制されていたことから、GP2 を介するサルモネラへの取り込みがその後の粘膜免疫応答の効率的な誘導に重要であることが示唆された。

M-Sec に関しては、さまざまな細胞機能の調節に重要な役割を果たす低分子量 GTPase の 1 つ RalA や exocyst 複合体と相互作用することで細胞膜ナノチューブの形成を制御しているが、exocyst 複合体に含まれてはいないことを明らかにした。

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 29 件)

1. Hase, K., Nakatsu, F., Ohmae, M., Sugihara, K., Shioda, N., Takahashi, D., Obata, Y., Furusawa, Y., Fujimura, Y., Yamashita, T., Fukuda, S., Okamoto, H., Asano, M., Yonemura, S., Ohno, H. AP-1B-mediated protein sorting regulates polarity and proliferation of intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterol.* 2013 (in press) (査読あり)
2. Ouchida, R., Mori, H., Hase, K., Takatsu, H., Kurosaki, T., Tokuhisa, T., Ohno, H., Wang, J. Y. Critical role of the IgM Fc receptor in IgM homeostasis, B-cell survival, and humoral immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: E2699-2706, 2012 (査読あり)
3. Honjo, K., Kubagawa, Y., Jones, D. M., Dizon, B., Zhu, Z., Ohno, H., Izui, S., Kearney, J. F., Kubagawa, H. Altered Ig levels and antibody responses in mice deficient for the Fc receptor for IgM (Fc γ R). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:15882-15887, 2012 (査読あり)
4. Mimura, M., Masuda, A., Nishiumi, S., Kawakami, K., Fujishima, Y., Yoshie, T., Mizuno, S., Miki, I., Ohno, H., Hase, K., Minamoto, T., Azuma, T., Yoshida, M. AP1B plays an important role in intestinal tumorigenesis with

the truncating mutation of an APC gene. *Int. J. Cancer* 130: 1011-1020, 2012 (査読あり)

5. 95. 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, Y., Dohi, T., Katsuno, T., Tokosuka, O., Waguri, S., Ohno, H. The epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B controls gut immune homeostasis in mice. *Gastroenterol.* 141: 621-632. 2011 (査読あり)
6. Shima, H., Takatsu, H., Fukuda, S., Ohmae, M., Hase, K., Kubagawa, H., Wang, J.-Y., Ohno, H. Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. *Int. Immunol.* 22: 149-156, 2010 (査読あり)
7. Hase, K., Kimura, S., Takatsu, H., Ohmae, M., Kawano, S., Kitamura, H., Ito, M., Watarai, H., Hazelet, C. C., Yeaman, C., Ohno, H. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nature Cell Biol.* 11: 1427-1432, 2009 (査読あり)
8. Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S. I., Lowe, A. W., Waguri, S., Itoh, K., Kiyono, H., Ohno, H. Uptake through Glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462: 226-230, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計 35 件)

1. Ohno, H. The role of M cells in intestinal immunity. International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting 2012, Homeostatic Inflammation Symposium, Japan Endotoxin and Innate Immunity Society 2012. Tokyo, Japan, 2012 年 10 月 26 日 (招待講演)
2. Ohno, H. Function and differentiation of M cells, a unique subset of intestinal epithelial cells specialized for mucosal antigen-uptake. The 12th International Symposium on Dendritic Cells. Daegu, Korea, 2012 年 10 月 11 日 (招待講演)

3. Ohno, H. Antigen delivery to the gut immune system through epithelium: M cells vs FAE? Gordon Research Conference, Lysosomes & Endocytosis Andover, NH, USA, 2012年6月21日 (招待講演)
4. Ohno, H. M cells, a unique subset of intestinal epithelial cells specialized for mucosal antigen-uptake. The 2012 Spring Conference of the Korean Association of Immunologists. Seoul, Korea, 2012年4月13日 (招待講演)
5. Ohno, H. Function and differentiation of M cells, a unique subset of intestinal epithelial cells important for mucosal immunity. ComBio2011, Plenary Lecture, Cairns, Australia, 2011年9月28日 (招待講演)
6. Ohno, H., Hase, K., Kimura, S., Fukai, S. The role of M-Sec in tunneling nanotube formation. EMBO Meeting 2011 Workshop 'Role of nanotubes in intercellular signaling' Vienna, Austria, 2011年9月10日 (招待講演)
7. Hase, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Kiyono, H., Ohno, H. GP2-dependent antigen transcytosis by M cells initiates antigen-specific mucosal immune response. 14th International Congress of Immunology (ICI 2010) 神戸、2010年8月26日
8. Shima, H., Takatsu, H.*, Fukuda, S., Ohmae, M., Hase, K., Kubagawa, H., Wang, J.-Y., Ohno, H. Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. 14th International Congress of Immunology (ICI 2010) 神戸、2010年8月25日
9. Hase, K., Kawano, K., Ebisawa, M., Ohno, H. M Cells and Antigen Delivery to DCs in the Gut. Keystone Symposia 'Dendritic Cells and the Initiation of Adaptive Immunity (J7)' Santa Fe, NM, USA, 2011年2月16日 (招待講演)
10. Ebisawa, M., Hase, K., Takahashi, D., Kitamura, H., Williams, I. R., Ohno, H. CCR6^{hi} CD11c⁺ B cells promote M-cell differentiation in Peyer's patch. 第32回日本分子生物学会年会ワークショップ 横浜、2009年12月9日
11. Hase, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Kiyono, H., Ohno, H. GP2-dependent antigen transcytosis

- by M cells initiates antigen-specific mucosal immune response. 第39回日本免疫学会総会学術集会シンポジウム 大阪、2009年12月2日
12. 長谷耕二、高津宏之、木村俊介、大野博司 M-Secによる細胞間ナノチューブ形成促進の分子機構。第61回日本細胞生物学会大会ワークショップ 名古屋、2009年6月3日

[その他]
ホームページ等
<http://leib.rcai.riken.jp/riken/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
大野 博司 (OHNO HIROSHI)
独立行政法人理化学研究所・免疫系構築研究チーム・チームリーダー
研究者番号：50233226
- (2) 研究分担者
木村 俊介 (KIMURA SHUNSUKE)
北海道大学・医学研究科・助教
研究者番号：40444525