

令和元年6月5日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05207

研究課題名(和文) 抗原取り込みに特化した特殊腸管上皮M細胞の分化と機能

研究課題名(英文) Differentiation and function of M cells, a unique intestinal epithelial cell subset for antigen uptake

研究代表者

大野 博司 (Ohno, Hiroshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50233226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：M細胞分化にはNFκBの古典的・非古典的両経路が関与すること、転写因子SpiBはM細胞の分化に必要なが十分ではないこと等を明らかにした。

M細胞上に発現するUmodという分子が乳酸桿菌の取り込み受容体として機能することを明らかにし、またM細胞の分化を誘導したエンテロイドの2次元単層培養系を確立し、M細胞へのピースの取り込みを確認した。

無抗原マウスを樹立し、無抗原マウスでは無菌マウスよりさらに著しいIgAの低下に伴い、パイエル板のB細胞数も大幅に減少し、B細胞から抗体産生形質細胞への分化に重要な胚中心の発達もほとんど認められないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、M細胞の分化や機能の基礎研究であるが、その成果はM細胞を介する経粘膜感染症・食物アレルギーの効果的なワクチン送達法の開発といった医学研究・応用研究へと発展する可能性がある。したがって最終的には、M細胞を標的とする新たな粘膜ワクチン開発や、食物アレルギーに対する特異的経口免疫寛容誘導などの臨床応用へと繋がり、国民の健康にも貢献できると考えられることから、医療経済的、社会的にも意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：We have found that both NFκB canonical and noncanonical pathways are required, and that the transcription factor SpiB is necessary but not sufficient, for M-cell differentiation.

We found that M cell-specific surface molecule Umod acts as an uptake receptor for Lactobacillus acidophilus expressing SIpA. We also established the monolayer culture of enteroids with M-cell induction.

We have established "antigen-free" mice colony and found that fecal IgA was profoundly decreased in these mice, concomitant with marked reduction in the number of Peyer's patch B cells and germinal center formation.

研究分野：腸管免疫学

キーワード：腸管免疫系 腸管関連リンパ組織 M細胞 濾胞関連上皮 RANKL NF-κB IL-22 食物抗原

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体外環境との境界をなす消化管粘膜上皮は、100兆個以上にも及び腸内常在細菌叢や食物抗原、さらには経口的に侵入する細菌やウイルスなどの大量の異物抗原に常に曝されている。消化管にはパイエル板をはじめとする腸管関連リンパ組織が発達しており、腸内の微生物や食餌性高分子などの抗原に対する適切な免疫応答により、腸管免疫恒常性の維持に重要な役割を果たしている。パイエル板を覆う濾胞上皮領域にはM細胞と呼ばれる特殊な上皮細胞が点在している。M細胞はトランスサイトシスという細胞内輸送系を発達させて微生物などの腸内抗原を積極的に取り込み、濾胞上皮直下に存在する樹状細胞に受け渡すことにより、腸管免疫応答の始動に主要な役割を担う。一方、こうしたM細胞の性質を逆手に取り、サルモネラや赤痢菌などM細胞を介して体内に侵入・感染すると考えられてきた病原体も少なくないが、これが実際にこれら病原体の感染に働くのか、あるいは逆に病原体に対する免疫応答に重要なのか、結論は得られていない。この理由として、M細胞は絶対数が少なく特異的な表面マーカー分子も無かったことから、従来の研究は光学顕微鏡や電子顕微鏡などを用いた形態学的解析に留まっており、M細胞特異的な機能発現や細胞分化のメカニズムがほとんど解明されてこなかったこと、またM細胞を持たないマウスなどのモデル生物が存在しなかったことなどが挙げられる。

そこで応募者は、M細胞を含む濾胞上皮領域と絨毛上皮領域を、実体顕微鏡観察下に分離回収する方法を開発し、抽出したRNAを用いたマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析とリアルタイム定量PCR法、in situ hybridization (ISH)法、免疫染色法を組み合わせることで、**世界に先駆けてM細胞特異的に発現する遺伝子群の同定に成功した** (Hase et al., DNA Res., 2005)。その後の解析から、GP2という分子が哺乳類のM細胞に共通の特異的な表面マーカーであり、大腸菌、サルモネラなど一部のグラム陰性桿菌の取り込み受容体として機能することを世界に先駆けて明らかにした (Hase et al., Nature, 2009) (図1)。また、M細胞にはプリオン蛋白質も強く発現しており (Nakato et al., DNA Res., 2009)、人獣共通感染症の原因菌であるブルセラの取り込み受容体として機能すること (Nakato et al., J. Immunol., 2012) さらには、ポツリヌス毒素もM細胞を介して取り込まれること (Matsumura et al., Nat. Commun., 2015) を明らかにしてきた。

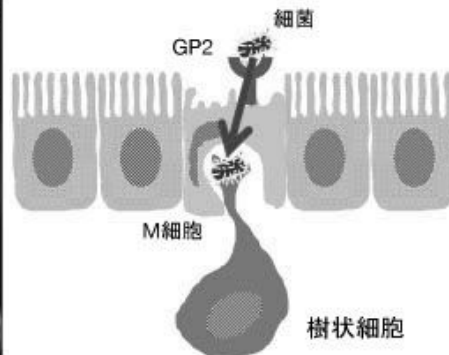
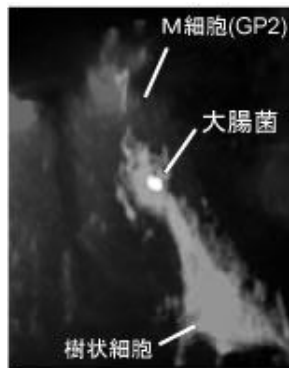


図1 M細胞上に発現する細菌取り込み受容体 GP2 (左)パイエル板のホールマウント染色像。GP2 依存的にトランスサイトシスされた大腸菌が、M細胞から樹状細胞の樹状突起に受け渡されている。(右) M細胞状

に発現した GP2 による細菌取り込みの模式図。(Hase et al., Nature, 2009)

GP2、プリオン蛋白質は GPI アンカー蛋白質であるが、応募者は Umod、Msln などその他の GPI アンカー蛋白質も M細胞上に強く発現していることを見出しており、予備実験の結果、これらの GPI アンカー蛋白質がそれぞれ異なる腸内細菌群と結合することを示唆する結果も得られている。したがって、これらが分子パターン認識受容体として種々の腸内細菌やウイルスに対する免疫監視に重要な役割を果たしている可能性がある。

M細胞の分化に関しては、Emory大学のWilliams博士らが、サイトカインである RANKL の重要性について報告した (Knoop et al., J. Immunol., 2009)。応募者は Williams博士との共同研究で RANKL 投与によるマウス in vivo M細胞分化誘導系を構築し、M細胞分化に必須の転写因子として Spi-B を同定した (Kanaya et al., Nat. Immunol., 2012) (図2)。しかし、研究計画に詳述するように、応募者らのその後の研究から、Spi-B は M細胞分化に必要なが十分ではないことがわかっていった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、応募者のこれまでの M細胞研究成果に立脚し、M細胞の分化と機能の分子メカニズムについてさらに詳細に検討を加えた。具体的には、エンテロイド培養系 (ex vivo/in vitro) (詳細は研究計画に記載) およびマウス個体レベル (in vivo) での解析から、M細胞分化における Spi-B 以外の因子の同定とその詳細な分子メカニズムの解析、M細胞の機能に関する研究、ならびに M細胞の分化・機能における微生物・食餌性抗原の役割に関する解析を行った。

3. 研究の方法

(1) M細胞分化の分子メカニズムの研究

RANKL の下流では NF- κ B 経路が働いていることが知られている。NF- κ B には古典的経路と非古典的経路が存在する。応募者らの検討の結果、古典的経路のシグナル伝達に必須の TRAF6 遺伝子欠損マウスでは M 細胞は存在しないことがわかった。一方、非古典的経路の NIK あるいは RelB 欠損マウスではパイエル板自体が形成されないため、マウス個体レベルでは M 細胞の分化への影響を検証できない。そこで、腸管上皮幹細胞を含むクリプトを回収し、R-spondin1、EGF、Noggin という液性因子存在下にマトリゲル中で培養することで、吸収上皮細胞や杯細胞、パネート細胞などの腸管上皮細胞系列の分化を試験管内で再現できるエンテロイド培養系（図 3）に RANKL を添加し *in vitro* で M 細胞分化を誘導する系を構築して検討した結果、野生型のマウスから作成したエンテロイドでは RANKL により M 細胞が効率よく誘導されるのに対し、NIK あるいは RelB 欠損マウスのエンテロイドでは RANKL を投与しても M 細胞の分化は認められなかったことから（未発表）M 細胞の誘導には古典的経路・非古典的経路の両方が必要なことが示唆される。（図 3）さらにエンテロイドの RANKL 刺激によって Spi-B の発現が誘導されるとともに M 細胞が分化してくるが、エンテロイドにウイルスベクターで Spi-B を強制発現させるだけでは M 細胞の分化誘導には不十分であることもわかった。

そこで、ウイルスベクターで TRAF6, p50/p60 (RelA), NIK, p52/RelB などをエンテロイドに単独あるいは複数同時に強制発現させることにより、RANKL による Spi-B の発現に古典的経路、非古典的経路のどちらか一方、あるいは両方が必要なかを検討した。

(2) M細胞の機能に関する研究

Umod の乳酸桿菌の M 細胞受容体としての可能性の検討: 応募者らは M 細胞表面に発現する GPI アンカー蛋白質が腸内細菌受容体として重要であるという知見を報告してきたが、そのひとつである Umod が乳酸桿菌の受容体として M 細胞への菌の取り込みに働く可能性を示唆する予備的結果を得た。そこで、リコンビナント Umod 蛋白質を用いた乳酸桿菌との *in vitro* 結合実験や、乳酸桿菌のマウス（野生型および Umod 欠損マウス；Umod 欠損マウスは米国との共同研究で入手済み）への経口投与、あるいは麻酔下でのマウス腸管内への直接投与（腸管ループ法）を用いて、乳酸桿菌の M 細胞への特異的取り込みを検討した。

エンテロイドを用いた M 細胞培養系の確立: M 細胞の研究の中でもとりわけ抗原取り込みやトランスサイトーシスの詳細などの分子・細胞レベルでの研究には、*in vitro* 培養系が重要な役割を果たすが、これまで再現性・信頼性のある M 細胞の培養系は確立されていなかった。そこで、エンテロイドを trypsin/EDTA 処理後にトランスウェル・フィルターメンブレン上で再培養することにより上皮細胞の単層培養に成功し、さらに液性因子を培養液から除去し RANKL 刺激を加えることで M 細胞の分化が誘導されることを確認した。しかし、このエンテロイド単層培養系における M 細胞誘導はまだ効率が悪く、かつ成功の確率も 50% 程度であり、初年度は至適条件を探るために trypsin/EDTA 処理条件、1 ウェル当りの細胞数、液性因子を抜くタイミングや RANKL 添加のタイミングと添加量、添加の回数などの条件検討を行い、エンテロイド単層培養の最適化を図った。

(3) M細胞の分化・機能に及ぼす腸内細菌・食物抗原の影響の研究

食物抗原が M 細胞に及ぼす影響はこれまで調べられていない。そこで、腸内細菌を有する SPF マウス、腸内や皮膚の常在菌を全く有さない無菌マウス、さらに、無菌マウスをアミノ酸やビタミンなどの成分栄養で飼育することで、蛋白質などの食物抗原の影響も排除した無抗原マウスにおける M 細胞の比較検討を行った。無菌マウス飼育系は既に確立しているが、無抗原マウスの飼育系は保有しておらず、無抗原マウスを確立している韓国のグループを訪問しノウハウを修得した。具体的には、文献に基づき、また韓国グループのノウハウを基に各成分を混合し、ろ過により無菌化した液体成分餌を SPF マウスあるいは無菌マウスに与えることで、無抗原マウス飼育系を樹立した。得られた無抗原マウスを用いて、各種免疫細胞や IgA 産生などの免疫応答を測定した。

4. 研究成果

(1) M細胞分化の分子メカニズムの研究

M 細胞分化における Spi-B の役割については、腸管上皮幹細胞を *ex vivo* で培養することにより形成される腸管上皮オルガノイドへの Spi-B の強制発現系を用いて、Spi-B は M 細胞の分化に必要なが十分ではないことを示した。また、NF- κ B の古典的経路・非古典的経路の必要性に関しては、M 細胞の分化にはこの両方が必要であることを、古典的経路の最上流に位置する Traf6 の腸管上皮特異的欠損マウスや、非古典的経路の NIK や RelB 欠損マウスから作製した腸管上皮オルガノイドの RANKL 刺激系を用いて明らかにした。腸管上皮オルガノイドに非古典経路の NF κ B2 を強制発現差させても Spi-B の発現は見られるが M 細胞の最終分化誘導には至らないことから、非古典経路のみでは M 細胞の分化には不十分であり、古典経路の活性化により発現する未知の転写因が Spi-B と協働することが必要であると考えられる (Kanaya et al., J. Exp. Med. 2018)。さらに、離乳後間もない若齢マウスでは、Sox8 が M 細胞の成熟および迅速な IgA 応答に必須なことも示した (Kimura et al., J. Exp. Med. 2019)。

M 細胞を有する濾胞関連上皮は絨毛上皮と異なり、粘液産生する杯細胞やその粘液産生が少なく、また上皮細胞からの Reg3 γ などの抗菌ペプチドの分泌が少ないなど、腸内細菌が近づきやすいような性質を有している。Th17 細胞や自然免疫細胞のひとつ ILC3 から分泌される

IL-22 が上皮細胞上の IL-22 受容体に作用すると、粘液の構成成分である Muc3 や抗菌ペプチド Reg3 γ の発現が上昇する。我々は、パイエル板の CD11b⁺CD8 α 樹状細胞が IL-22BP を分泌し、IL-22 と IL-22 受容体との結合に拮抗することで、濾胞関連上皮では IL-22 シグナルが入らず、その結果粘液や抗菌ペプチドの産生を抑えることで、腸内細菌取り込みに適した濾胞関連上皮に特徴的な性質を持つようになることを明らかにした (Jinnohara et al., J. Exp. Med. 2017)。

(2) M細胞の機能に関する研究

M細胞の機能に関しては、腸管上皮細胞の中でM細胞上に特異的に発現する Umod という GPI アンカー型タンパク質が、*Lactobacillus acidophilus* の表層タンパク質である SlpA との相互作用によりその取り込み受容体として機能することを、リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 結合実験ならびにマウスの *in vivo* 腸管ループアッセイを用いて示した (Yanagihara et al., Int. Immunol, 2017)。

また、鼻咽頭部のリンパ組織粘膜にも M 細胞が存在し、この部位で抗原感作された B 細胞が「粘膜免疫循環帰巣経路」により腸管粘膜固有層に移行して IgA 産生細胞となり、抗原特異的 IgA を産生することで、感染防御に寄与することを示した (Date et al., Int. Immunol. 2017)。

エンテロイドを用いた M 細胞の抗原取り込みの分子機構についても、エンテロイドの RANKL 刺激により M 細胞を誘導しトランスウェル上で 2 次元単層培養することで、エンテロイド由来の M 細胞がビーズを効率的に取り込むことを明らかにしており、今後この手法により M 細胞の抗原取り込みの分子機構の解明を進めたい。

(3) M細胞の分化・機能に及ぼす腸内細菌・食物抗原の影響の研究

M細胞やパイエル板の分化・機能における、食物抗原の影響は調べられていない。食物抗原の影響を調べるには、高分子蛋白質の代わりに各種アミノ酸を配合し、さらにビタミンや脂質などの栄養成分を添加した、いわゆる「無抗原餌」を与えることで、食物抗原の影響を排除した「無抗原マウス」を用いる必要がある。無抗原マウスは飼育が難しく、世界的にもあまり確立されていなかったが、無抗原マウスの飼育・繁殖に成功し論文を出している韓国のグループとの共同研究により昨年度韓国を訪問・見学し、そのノウハウを習得し、無抗原マウス系を昨年度に樹立した。無菌マウスでは SPF マウスと比較して、腸管免疫系の機能に重要な免疫グロブリンである IgA の糞便内濃度が低下するが、無菌・無抗原マウスではさらに著しい IgA の低下が認められた。また、無菌マウス、無菌・無抗原マウスとも、腸管免疫の誘導組織として重要なパイエル板の数は SPF マウスと不変であるが、その大きさは、無菌マウスでは SPF マウスと遜色ないのに対し、無菌・無抗原マウスでは顕著に小さくなっていた。それに伴い、パイエル板の B 細胞数も無菌・無抗原マウスでは大幅に減少し、B 細胞から抗体産生形質細胞への分化に重要な胚中心の発達も無菌・無抗原マウスではほとんど認められなかった (論文投稿中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Kimura, S., Kobayashi, N., Nakamura, N., Kanaya, T., Takahashi, D., Fujiki, R., Mutoh, M., Obata, Y., Iwanaga, T., Nakagawa, T., Kato, N., Sato, S., Kaisho, T., Ohno, H., Hase, K. Sox8 is essential for M-cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice. **J. Exp. Med.** 2019 (印刷中)(査読有)
2. Kanaya, T., Sakakibara, S., Jinnohara, T., Hachisuka, M., Tachibana, N., Hidano, S., Kobayashi, T., Kimura, S., Iwanaga, T., Nakagawa, T., Katsuno, T., Kato, N., Akiyama, T., Sato, T., Williams, I. R., Ohno, H. Development of intestinal M cells and follicle-associated epithelium is regulated by TRAF6-mediated NF- κ B signaling. **J. Exp. Med.** 215:501-519, 2018 (査読有)
3. Date Y, Ebisawa M, Fukuda S, Shima H, Obata Y, Takahashi D, Kato T, Hanazato M, Nakato G, Williams IR, Hase K, Ohno H. NALT M cells are important for immune induction for the common mucosal immune system. **Int. Immunol.** 29: 471-478, 2017 (査読有)
4. Yanagihara S, Kanaya T., Fukuda S, Nakato G, Hanazato M, Wu XR, Yamamoto N, Ohno H. Uromodulin-SlpA binding dictates *Lactobacillus acidophilus* uptake by intestinal epithelial M cells. **Int. Immunol.** 29: 357-363, 2017 (査読有)
5. Jinnohara, T., Kanaya, T., Hase, K., Sakakibara, S., Kato, T., Tachibana, N., Sasaki, T., Hashimoto, Y., Sato, T., Watarai, H., Kunisawa, J., Shibata, N., Williams, I. R., Kiyono, H., Ohno, H. IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. **J. Exp. Med.** 163(2): 367-380, 2017 (査読有)
6. Kimura, S., Yamashita, M., Yamakami-Kimura, M., Sato, Y., Yamagata, A., Kobashigawa, Y., Inagaki, F., Amada, T., Hase, K., Iwanaga, T., Ohno, H., Fukai, S. Distinct Roles for the N- and C-terminal Regions of M-Sec in Plasma Membrane Deformation during Tunneling Nanotube Formation. **Sci. Rep.** 6: 33548, 2016 (査読有)
7. Okai, S., Usui, F., Yokota, S., Hori-I, Y., Hasegawa, M., Nakamura, T., Kurosawa, M., Okada, S., Yamamoto, K., Nishiyama, E., Mori, H., Yamada, T., Kurokawa, K., Matsumoto, S., Nanno, M.,

- Naito, T., Watanabe, Y., Kato, T., Miyauchi, E., Ohno, H., Shinkura, R. High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. **Nat. Microbiol.** 1: 16103, 2016 (査読有)
8. Nakato, G., Hase, K., Sato, T., Kimura, S., Sakakibara, S., Sugiyama, M., Obata, Y., Hanazato, M., Iwanaga, T., Ohno, H. Epithelium-Intrinsic MicroRNAs Contribute to Mucosal Immune Homeostasis by Promoting M-Cell Maturation. **PLoS One** 11: e0150379, 2016 (査読有)

9.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 金谷高史 . 腸管免疫を発動する M 細胞の分化機構に関する研究 . 第 47 回日本免疫学会学術集会 (福岡) 2018 年
2. Kanaya T., Ohno H. The crucial role of NF-κB in M cell differentiation. International Symposium “Forefront of M cell biology”, The 22nd Annual meeting of Intestinal Microbiology (招待講演) (東京) 2018 年
3. Ohno, H., Kanaya, T. Characteristics of M cells and follicle-associated epithelium .第 46 回日本免疫学会学術集会 (招待講演)(宮城) 2017 年
4. Kanayak T., Jinnohara, T., Hase, K., Sasaki, T., Watarai, H., Shibata, N., Kunisawa, J., Kiyono, H., Ohno, H. IL-22 binding protein (IL-22BP) regulates the properties of follicle-associated epithelium (FAE) to facilitate antigen uptake into Peyer's patches. 第 46 回日本免疫学会学術集会 (宮城) 2017 年
5. 柳原沙恵、金谷高史、弘田辰彦、山本直之、大野博司 . Lactobacillus acidophilus L-92 株の小腸パイエル板の M 細胞からの取り込みに関与する生体分子の探索 . 第 13 回日本食品免疫学会学術大会 (東京) 2017 年
6. Ohno H. The function of M cells in host-microbe interaction. Falk Foundation Symposium 207 Gut Microbiome and Mucosal or Systemic Dysfunction: Mechanisms, Clinical Manifestations and Interventions (Brisbane, Australia) 2017 年
7. 柳原沙恵、福田真嗣、金谷高史、弘田辰彦、山本直之、大野博司 . Lactobacillus acidophilus L-92 株の表層蛋白質が小腸パイエル板の M 細胞からの取り込みに与える影響 . 日本乳酸菌学会 2016 年度大会 (東京) 2016 年
8. 大野博司 . 腸管免疫と M 細胞 . 第 40 回日本リンパ学会総会 (招待講演)(東京) 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：金谷 高史

ローマ字氏名：Takashi Kanaya

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命医科学研究センター

職名：上級研究員

研究者番号（8桁）：20553829

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。