

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08457

研究課題名(和文) 腸管特殊上皮M細胞成熟過程における転写制御機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying differentiation of intestinal M cells

研究代表者

木村 俊介 (Kimura, Shunsuke)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：40444525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管管腔内の抗原取り込みを行う特殊上皮M細胞は特異的IgA抗体の産生に重要である。本研究によってM細胞からの抗原取り込みに転写因子Sox8が必要であることを明らかにした。Sox8はGP2を含むM細胞機能発揮に必要な分子を制御していた。そのため、Sox8欠損マウスでは管腔内物質の取り込み能が低下し、腸内細菌特異的IgA産生能が低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

M細胞分化を制御する機構には不明な点が多かった。本研究によってSox8がM細胞の機能的な成熟に関与していることが明らかになった。Sox8によって制御される分子の解析を今後続けていくことで、M細胞がどのようにして抗原取り込み能を獲得していくかが明らかになると期待できる。Sox8欠損マウスでは特に離乳後のIgA抗体産生能力が低下していた。これは生後の免疫を獲得するために必要であることから、今後の乳幼児医療に有用な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Microfold (M) cells residing in the follicle-associated epithelium (FAE) of the gut-associated lymphoid tissue are specialized for antigen uptake to initiate mucosal immune responses. The molecular machinery and biological significance of M cell differentiation, however, remain to be fully elucidated. Here, we demonstrate that Sox8, a member of the SRY-related HMG box transcription factor family, is specifically expressed by M cells in the intestinal epithelium. Sox8 directly binds the promoter region of Gp2 to increase Gp2 expression, which is the hallmark of functionally mature M cells. Furthermore, genetic deletion of Sox8 causes a marked decrease in the number of mature M cells, resulting in reduced antigen uptake in Peyer's patches. Consequently, juvenile Sox8-deficient mice showed attenuated germinal center reactions and antigen-specific IgA responses. These findings indicate that Sox8 plays an essential role in the development of M cells to establish mucosal immune responses.

研究分野：組織細胞学

キーワード：M細胞 パイエル板 Sox8 IgA

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

1. 研究開始当初の背景

消化管は高度な免疫システムを備え、生体恒常性の維持に貢献する。腸管免疫システムの誘導装置として機能するリンパ組織 パイエル板は、絶えず外来抗原をモニターし、抗原特異的分泌型 IgA の産生を行う。こうした免疫監視が正常に機能するためには粘膜上の抗原が上皮層を越えて、リンパ濾胞に取り込まれる必要がある。パイエル板を覆う濾胞上皮には M 細胞と呼ばれる特殊な上皮細胞が存在し、粘膜面に存在する抗原を細胞内に取り込み、上皮の下へと排出する「トランスサイトーシス経路」を通して、管腔内の抗原を上皮下の樹状細胞に受け渡す役割を担う。

M 細胞は抗原取り込みに特化するための様々な特徴を備える。M 細胞表面には Glycoprotein 2 (GP2) を始めとする病原性微生物に対する受容体が発現しており [Nature, 462:226, 2009]、M 細胞からの抗原取込みを促進する。その一方で、バリアが脆弱な M 細胞の構造は異物が侵入しやすいという側面も持ち合わせている。実際にある種の病原微生物は選択的に M 細胞を標的として生体内に侵入する。このような理由から生理的条件下では M 細胞の分化は厳密な制御下におかれ濾胞上皮に限局する。ところが、炎症性腸疾患、感染症においてはパイエル板濾胞上皮ではない通常上皮における M 細胞の異所性の出現が認められる [Gut, 328:724, 1996; Cell Host & Microbe., 12:607, 2012]。そのため、M 細胞分化制御システムの異常が生体恒常性の破綻を引き起こす可能性が示唆されている。

細胞の分化を決定づける因子として転写因子が知られる。転写因子は細胞核で各種の遺伝子の産生を制御する因子である。申請者はこれまでの研究から転写因子 Sox8 が M 細胞に高く存在していることを見出していた。

2. 研究の目的

- (1) 腸管における Sox8 の分布を明らかにする。
- (2) Sox8 と腸管免疫系の関係を明らかにする。
- (3) Sox8 が関係する遺伝子発現制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Sox8 に対する免疫抗血清を作成し、マウス腸管組織における Sox8 発現細胞の同定を行った。大腸菌を用いてマウス Sox8 の N 末端部に対するペプチドを作成した (Sox8N1-60)。Sox8N1-60 をモルモットへと免疫し、抗血清を作成した。得られた抗血清はすでに Sox8 が存在していることが報告されている精巢を試料として免疫組織染色を行うことで、性能の評価をおこなった。続いて得られた Sox8 抗血清を用いて、マウス腸管の免疫組織染色を行った。各種細胞マーカーを用いて、Sox8 を強く発現する細胞の同定を行った。

(2) Sox8 欠損マウスを導入し [Dev Biol. 316(2): 359, 2008.], Sox8 発現細胞の性状を野生型マウスと比較した。導入した Sox8 欠損マウスをもちい Sox8 陽性細胞の性状解析、腸管免疫系の解析を行った。

Sox8 陽性細胞の性状解析

本来 Sox8 を発現する細胞が Sox8 を失うことでどのように性状が変化するかを調べた。腸管の上皮細胞は腸陰窩底部の上皮幹細胞から生まれ、押し出されるようにして絨毛の頭頂部へと移動していく。したがって、腸陰窩に近い部分の上皮細胞は比較的若い細胞であり、成熟した細胞は陰窩から離れた場所に位置する。そこで、Sox8 発現細胞の陰窩からの距離を計測した。続いて細胞の持つ機能を解析した。

Sox8 欠損マウスからパイエル板を構成するリンパ球を採取し、構成細胞の数と割合をフローサイトメトリー法によって解析した。さらに IgA 産生量の測定を行った。

(3) Sox8 欠損マウスと野生型マウスにおける発現分子の解析を RNAseq 法および定量的 PCR 法を用いて行い、細胞機能に必要な遺伝子の発現の変化を解析した。変化のあった遺伝子について、その遺伝子の発現調節をおこなうプロモータ部位に Sox8 が結合するかを免疫共沈降法をもちいて解析した。さらに、培養細胞への Sox8 の強制発現によって、プロモータ部位の活性化を解析した。

4. 研究成果

(1) 免疫組織染色の結果、Sox8 は腸管上皮で強く検出された。とくに腸管のリンパ濾胞上皮において強かった。そこで、次に濾胞上皮に存在する M 細胞に対するマーカー分子を用いて、多重染色を行った結果、Spi-B、GP2 と Sox8 はよく一致していた。以上の結果から M 細胞は Sox8 を発現していることが明らかになった。

(2)

Sox8 は M 細胞の機能獲得、成熟に必要な転写因子である。Sox8 欠損マウスにおける M 細胞の性状解析を行った。M 細胞には少なくとも二つの状態があり、GP2 を発現した M 細胞はその取り込み能力が高い成熟 M 細胞である。Sox8 欠損マウスでは GP2

陽性 M 細胞がほとんど認められなかった。さらに Spi-B で標識される M 細胞においても陰窩からの距離が近い部分にしか存在せず、成熟した細胞が出現する濾胞ドーム頭頂部にはほとんど存在していなかった。欠損マウスにおける M 細胞は管腔内に投与したラテックスビーズの取り込みが有意に減少していたことと合わせて、Sox8 は M 細胞の機能獲得もしくは成熟機構に必要であると考えられた。

Sox8 による M 細胞の成熟は離乳後の IgA 産生の確立に必要である。Sox8 欠損マウスにおけるパイエル板リンパ球の組成は IgA 産生細胞が減少していた。これはマウスの離乳後初期に認められたが、成長するに連れて野生型マウスと同等まで回復した。

(3) Sox8 は GP2 の発現を制御する。

Sox8 欠損マウスの濾胞上皮において低下する遺伝子 114 種が確認できた。その中には成熟 M 細胞マーカーである GP2 が含まれていた。GP2 はマーカー細胞表面に存在し、微生物受容体として働く分子である。解析の結果、Sox8 は GP2 のプロモーター部位に結合し活性化することが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 4 件)

Kimura S*, Kobayashi N, Nakamura Y, Kanaya T, Takahashi D, Fujiki R, Mutoh M, Obata Y, Iwanaga T, Nakagawa T, Kato N, Sato S, Kaisho T, Ohno H, and Hase K*., Sox8 is essential for M-cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice. *J Exp Med* 216(4): 831-846, 2019 査読あり DOI: 10.1084/jem.20181604

Ogasawara R, *Hashimoto D, Kimura S, Hayase E, Ara T, Takahashi S, Ohigashi H, Yoshioka K, Tateno T, Yokoyama E, Ebata K, Kondo T, Sugita J, Onozawa M, Iwanaga T, and *Teshima T., Intestinal Lymphatic Endothelial Cells Produce R-Spondin3. *Sci Rep.* 8(1):10719, 2018 査読あり DOI: 10.1038/s41598-018-29100-7

Kishimoto A, Kimura S, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Park AM, and *Iwanaga T., Histochemical characteristics of regressing vessels in the hyaloid vascular system of neonatal mice: Novel implication for vascular atrophy. *Exp Eye Res.* 27; 172:1-9, 2018 査読あり DOI: 10.1016/j.exer.2018.03.024.

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 IR, and *Ohno H. Development of intestinal M cells and follicle-associated epithelium is regulated by TRAF6-mediated NF- κ B signaling. *J Exp Med.* 215(2):501-519, 2018 査読あり DOI: 10.1084/jem.20160659

*Kimura S., Molecular insights into the mechanisms of M-cell differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues., *Anat Sci Int.* 3(1):23-34, 2018 査読あり DOI: 10.1007/s12565-017-0418-6.

Nakamura Y, Kimura S, *Hase K., M cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance., *Inflamm Regen.*, 38:15, 2018 査読あり DOI: 10.1186/s41232-018-0072-y. eCollection 2018.

Ariazi J, Benowitz A, De Biasi V, Den Boer ML, Cherqui S, Cui H, Douillet N, Eugenin EA, Favre D, Goodman S, Gousset K, Hanein D, Israel DI, Kimura S, Kirkpatrick RB, Kuhn N, Jeong C, Lou E, Mailliard R, Maio S, Okafo G, Osswald M, Pasquier J, Polak R, Pradel G, de Rooij B, Schaeffer P, Skeberdis VA, Smith IF, Tanveer A, Volkmann N, Wu Z, *Zurzolo C., *Front Mol Neurosci.* 10:333, 2017 査読あり DOI: 10.3389/fnmol.2017.00333

*Maeda E, Kimura S, Yamada M, Tashiro M, and Ohashi T., Enhanced gap junction intercellular communication inhibits catabolic and pro-inflammatory responses in tenocytes against heat stress., *J Cell Commun. Signal.* 11: 369-380, 2017 査読あり DOI: 10.1007/s12079-017-0397-3.

*Takahashi-Iwanaga H, Kimura S, Konno K, Watanabe M, and Iwanaga T., Intrarenal signaling mediated by CCK plays a role in salt intake-induced natriuresis., *Am J Physiol Renal Physiol.* 313(1): F20-F29, 2017 査読あり DOI: 10.1152/ajprenal.00539.2016

Saito N, Kimura S, Miyamoto T, Fukushima S, Amagasa M, Shimamoto Y, Nishioka C, Okamoto S, Toda C, Washio K, Asano A, Miyoshi I, Takahashi E, and *Kitamura H., Macrophage ubiquitin-specific protease 2 modifies insulin sensitivity in obese mice.,

Biochem Biophys Res Commun 9:322-329, 2017 査読あり DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.01.009
Kimura S, Nio-Kobayashi J, Kishimoto A, and *Iwanaga T., The broad distribution of GP2 in mucous glands and secretory products., *Biomed Res.* 37(6):351-358, 2016 査読あり DOI: 10.2220/biomedres.37.351
*Yajima M, Karaki SI, Tsuruta T, Kimura S, Nio-Kobayashi J, Kuwahara A, Yajima T., Diversity of the intestinal microbiota differently affects non-neuronal and atropine-sensitive ileal contractile responses to short-chain fatty acids in mice., *Biomed Res.* 37(5):319-328, 2016 査読あり DOI: 10.2220/biomedres.37.319
Ohashi W, Kimura S, Iwanaga T, Furusawa Y, Irié T, Izumi H, Watanabe T, Hijikata A, Hara T, Ohara O, Koseki H, Sato T, Robine S, Mori H, Hattori Y, Watarai H, Mishima K, Ohno H, *Hase K, and *Fukada T., Zinc transporter SLC39A7/ZIP7 promotes intestinal epithelial self-renewal by resolving ER stress., *PLoS Genetics* 12(10):e1006349s, 2016 査読あり DOI: 10.1371/journal.pgen.1006349
Kimura S, Yamashita M, Yamakami-Kimura M, Sato Y, Yamagata A, Kobashigawa Y, Inagaki F, Amada T, Hase K, Iwanaga T, *Ohno H and *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 査読あり DOI: 10.1038/srep33548

[学会発表](計21件)

小林伸英, 木村俊介, 中村有孝, 岩永敏彦, 長谷耕二., Sox8 は腸管上皮 M 細胞の分化に必須であり離乳直後の腸管 IgA 産生に寄与する., 第 4 回 日本骨免疫学会ウインターセミナー., 2019 年
木村俊介, 中村有孝, 小林伸英, 武藤麻未, 岩永ひろみ, 岩永敏彦, 長谷耕二., RANKL-OPG バランスによる腸管免疫系の制御., 第 4 回 日本骨免疫学会ウインターセミナー., 2019 年
木村俊介, 小林伸英, 中村有孝, 武藤麻未, 岩永敏彦, 長谷耕二., マウス Sox8 は腸管 M 細胞の成熟に必須であり、離乳後 IgA 産生の構築に関与する., 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会., 2019 年
久本 芽璃, 木村俊介, 岩田航, 小林純子, 岩永俊彦, 横山敦郎., 卵巣摘出マウスにおける抗 RANKL 抗体および抗 Sema4d 抗体の顎堤吸収抑制効果の検証., 第 124 回日本解剖学会総会全国学術集会., 2019 年
Nobuhide Kobayashi, Shunsuke Kimura, Yutaka Nakamura, Takashi Kanaya, Tsuneyasu Kaisho, Hiroshi Ohno, Koji Hase., Sox8 is essential for the differentiation of M cells and antigen-specific IgA response., 第 47 回日本免疫学会学術集会, 2018 年
Shunsuke Kimura, Yutaka Nakamura, Nobuhide Kobayashi, Katsuyuki Shiroguchi, Shintaro Sato, Tsuneyasu Kaisho, Koji Hase., Osteoprotegerin-dependent M-cell self-regulation balances gut infection and immunity., 第 47 回日本免疫学会学術集会, 2018 年
久本 芽璃, 木村俊介, 岩田航, 小林純子, 岩永俊彦, 横山敦郎., 卵巣摘出による骨粗鬆症モデルマウスでは抜歯窩の治癒が遅延し、顎堤吸収が長期間継続する., 第 4 回日本骨免疫学会., 2018 年
木村俊介, 中村有孝, 小林伸英, 武藤麻未, 岩永敏彦, 長谷耕二., RANKL-OPG バランスによる濾胞上皮 M 細胞数の調節と腸管免疫系の制御., 第 3 回日本免疫学会ウインターセミナー., 2018 年
木村俊介, 武藤麻未, 岩永敏彦., 呼吸上皮における Microfold 細胞の性状解析とその基礎研究への応用., 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術総会., 2018 年
木村俊介, 武藤麻未, 岩永敏彦., パイエル板 M 細胞の成熟過程の可視化., 日本顕微鏡学会第 73 回学術講演会., 2017 年
久本 芽璃, 木村俊介, 小林純子, 岩田航, 武藤麻未, 岩永敏彦, 横山敦郎., マウス卵巣摘出モデルは抜歯窩修復後の顎堤過吸収を引き起こす., 第 3 回日本骨免疫学会., 2017 年
久本芽璃, 木村俊介, 岩田航, 後藤まりえ, 横山敦郎., 抜歯後の顎骨骨代謝機構の解明を目的としたマウス抜歯モデルの作製., 日本補綴歯科学会第 126 回学術大会., 2017 年
木村俊介, 武藤麻未, 岩永敏彦., RANKL-OPG バランスによる腸管上皮 M 細胞の分化制御機構., 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会., 2017 年
木村俊介, 武藤麻未, 岩永敏彦., RANKL-RANK シグナルによる腸上皮特殊細胞 M 細胞の分化制御., 第 2 回日本骨免疫学会ウインターセミナー., 2017 年
久本芽璃, 木村俊介, 岩田航, 中村祐介, 杉山孝博, 小林純子, 岩永敏彦, 横山敦郎., 抜歯後の骨代謝機構を解明するための顎堤吸収モデルの構築., 第 122 回 日本解剖学会総会・全国学術集会., 2017 年
武藤麻未, 木村俊介, 岩永敏彦, 飯田順一郎., 特殊粘膜上皮 M 細胞の体内分布およ

び RANKL によるマウス気管・気管支上皮からの M 細胞分化誘導., 第 122 回日本解剖学会
総会・全国学術集会., 2017 年

木村俊介, 武藤麻未, 岩永敏彦., Osteoprotegerin による腸管上皮 M 細胞の分化抑制機構
とその意義., 第 58 回歯科基礎医学会学術大会., 2016 年

久本芽璃, 木村俊介, 岩田航, 岩永敏彦, 横山敦郎., 抜歯後の顎骨再生機構の解析を目的
とした動物実験モデルの開発., 第 39 回 日本分子生物学会年会., 2016 年

武藤 麻未, 木村 俊介, 岩永 敏彦, 飯田 順一郎., Receptor activator of NF B ligand
(RANKL)によるマウス気管・気管支上皮からの M 細胞分化誘導., 第 58 回歯科基礎医学会
学術大会., 2016 年

Mami Mutoh, Shunsuke Kimura, Hiromi Takahashi-Iwanaga, Toshihiko Iwanaga, and
Junichiro Iida, RANKL regulates microfold cells in the pseudostratified epithelium
lining the trachea of mouse, The 49th Annual Scientific Congress, Korean Association
of Orthodontists, 2016 年

- ⑳ Shunsuke Kimura, Mami Mutoh, and Toshihiko Iwanaga, Osteoprotegerin regulates the
differentiation of Peyer ' s patch M cell., 10th European Mucosal Immunology Group
Meeting, 2016 年

〔図書〕(計 2 件)

岩永 敏彦, 小林 純子, 木村 俊介, 「マウス組織アトラス」, 医学書院 2018/12/28, 160 ペー
ジ

岩永 敏彦, 木村 俊介, 小林 純子, 「新編カラーアトラス組織・細胞学」, 医歯薬出版,
2017/9/8, 412 ページ

〔その他〕

プレスリリース

離乳期における抗体の空白期間を埋めるしくみを解明

https://www.hokudai.ac.jp/news/190326_pr.pdf

Research Press Release,

[https://www.global.hokudai.ac.jp/blog/identifying-a-key-player-in-gut-defense-develo
pment/](https://www.global.hokudai.ac.jp/blog/identifying-a-key-player-in-gut-defense-development/)

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：小林 伸英

ローマ字氏名：KOBAYASHI, nobuhide