

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07239

研究課題名(和文)呼吸器M細胞の分化機構と疾患における機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of differentiation and function of M cell in the airway

研究代表者

木村 俊介 (Shunsuke, Kimura)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・准教授

研究者番号：40444525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：パイエル板、扁桃のリンパ濾胞上皮に存在するM細胞は管腔内抗原の取り込みを行うことで、粘膜免疫応答の開始に働く。近年の研究から腸管におけるM細胞の解析が進み、腸管におけるリンパ濾胞成熟、IgA産生、感染症におけるM細胞の重要性が明らかになってきている。一方で、呼吸器におけるM細胞の理解は不十分である。本研究ではインフルエンザ感染時に気管・気管支にM細胞が誘導されることを見いだした。そして、その分化を制御する分子を明らかにし、さらには前駆細胞の同定に至った。これらの成果は呼吸器における粘膜免疫応答機構を理解する上で重要な知見になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまで腸管で発展した粘膜免疫研究を呼吸器へと発展させたものである。これまで、下気道にM細胞が存在するという報告はなく新規性の高い成果である。さらには、その分化機構の解明、前駆細胞の同定に至り、それらの知見を基にM細胞欠損マウスの作製に成功している。呼吸器疾患は生活の質へ与える影響が大きい。さらに、呼吸器感染症は致死率が高いだけでなく、伝播力が強く社会的な影響も大きい。本研究の成果を基に、今後呼吸器の粘膜免疫応答、感染機構が明らかになることで、将来的な予防法、治療方法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Microfold (M) cells residing in the follicle-associated epithelium of mucosa-associated lymphoid tissues are specialized for sampling luminal antigens to initiate mucosal immune responses. In the past decade, RANKL-RANK signaling is essential for M-cell differentiation from the intestinal stem cells. However, the molecular characterization and differentiation mechanisms of M cells in the lower respiratory tract remain to be fully elucidated. Here we identified a progenitor cells which is differentiated to M cells by RANKL-RANK signaling. Furthermore, influenza infection differentiated the progenitor cells into functional M cells that efficiently ingest inhaled microparticles. We further confirmed that M cell induction by RANKL administration is suppressed in the progenitor cell-specific RANK deficient mice. Our research shed light on the new role of airway epithelial cells in the respiratory diseases.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：M細胞 呼吸器 インフルエンザ

### 1. 研究開始当初の背景

内なる外である呼吸器、消化器は多くの外来抗原や微生物と接する。これらの異物に対する個体防御のため、粘膜組織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。免疫システムの誘導装置として機能するパイエル板などのリンパ組織は、絶えず外来抗原をモニターし抗原特異的 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を越えて、リンパ濾胞に取り込まれる必要がある。そのためリンパ濾胞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取り込み、トランスサイトーシス経路を通して上皮下の樹状細胞に受け渡す役割を担う。

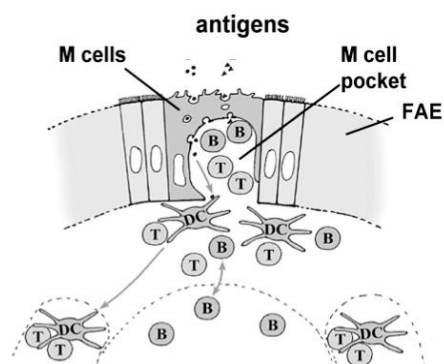


図1 濾胞上皮と M 細胞の模式図

M 細胞は管腔内の抗原を取り込み、深層の抗原提示細胞(DC)へ受け渡す。

M細胞からの抗原取込みはリンパ濾胞の成熟、腸粘膜における特異的 IgA 抗体の産生に寄与し、感染性細菌に対する生体防御、常在菌叢の制御などの恒常性維持に重要な役割を果たす。腸管と同じ管腔状の粘膜組織である気管・気管支には空気中の粒子、抗原物質、微生物が多く入り込み大量の IgA 抗体が存在する。一方で、気管・気管支にはパイエル板のような発達した粘膜リンパ組織は定常時には存在せず、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、感染症などの呼吸器系疾患において後天的に気管支随伴リンパ組織(iBALT)が誘導されるという特徴を持つ。そのため気管・気管支における M 細胞の存在、抗原取り込み機構、ならびに粘膜免疫誘導機構には不明な点が多かった。

### 2. 研究の目的

気管 M 細胞はダニ抗原による iBALT 誘導モデルマウス、自己免疫系疾患モデルマウスにおいて形成される iBALT にも認められたため、呼吸器疾患との関与が想定された。そこで、気管 M 細胞の研究を遂行することで難治性呼吸器疾患における iBALT 形成の意義、粘膜免疫応答の理解につながると考えた。そこで本研究では呼吸器 M 細胞の分化機構、ならびに呼吸器疾患における気管 M 細胞の病理的条件下での機能を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 呼吸器 M 細胞分化機構の解明

予備的検討から呼吸器 M 細胞の分化開始には RANKL が必要であることを明らかにしていた。そこで、以下のように研究を進めた。

##### RANK の発現細胞の探索

免疫組織染色により呼吸器上皮細胞において RANK を発現する細胞の探索を行った。

##### RANKL-RANK シグナルが活性化する細胞の探索

これまでの研究から、マウスへの RANKL の腹腔内投与が呼吸器上皮に M 細胞を誘導することを明らかにしていた。そこで、RANKL-RANK シグナル下流で機能する RelB の核移行を指標に前駆細胞の探索を行った。

##### 前駆細胞特異的に RANKL の受容体 RANK を欠損する遺伝子改変マウスの作成

見出した前駆細胞で特異的に Cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウスを作成し、RANK flox/flox マウスと掛け合わせることで、前駆細胞特異的 RANK 欠損マウスを作成した。このマウスに RANKL を投与したときに M 細胞の誘導が抑制されるかを検証した。

##### 系統追跡モデルマウスの作成

同様に、前駆細胞特異的に Cre ERT を発現するマウスを作成した。本マウスは抗エストロゲン剤であるタモキシフェンの存在下で Cre リコンビナーゼが活性化するマウスである。本マウスと Rosa26-stop-tdTomato マウスを掛け合わせたマウスでは、タモキシフェンの投与により前駆細胞を赤色蛍光タンパク質 tdTomato で標識することが可能である。前駆細胞の標識後、RANKL の投与により M 細胞を誘導し、赤く標識された M 細胞が出現するかを検証した。

##### シングルセル RNAseq 解析を実施し、in silico 解析による系統追跡を行った。

RANKL 投与後のマウスから気管上皮細胞をセルソーターにより分離した。得られた細胞は先進ゲノム支援により scRNAseq 解析を行った。

#### (2) 呼吸器 M 細胞と疾患の関係性

インフルエンザ感染における M 細胞の誘導  
新たな呼吸器疾患モデルとしてマウスへのインフルエンザ感染モデルを構築し、組織学的解析と免疫染色により M 細胞の出現を検証した。

インフルエンザ感染 M 細胞の機能解析  
インフルエンザ感染により誘導された M 細胞において、経気管投与した微粒子を取り込むかどうかを検証した。

インフルエンザ感染 M 細胞の分化機構の解明  
(1)- の系統追跡モデルを用いて、インフルエンザ感染における M 細胞前駆細胞の検証を行った。

#### 4. 研究成果

本研究課題の遂行によって、呼吸器上皮における M 細胞の前駆細胞を同定するに至った。この前駆細胞は RANK を発現し RANKL の刺激によって M 細胞へと分化する細胞であった。インフルエンザ感染においても、同様な分化機構によって高い取り込み能力を持つ M 細胞が誘導されることが明らかになった。前駆細胞が明らかになったことで、呼吸器 M 細胞を特異的に欠損するマウスを作製することに成功した。本マウスを用いて、インフルエンザ感染などの呼吸器疾患モデルを作出することで、M 細胞の呼吸器疾患における役割を明らかにできることが期待される。

また、本研究の遂行において、呼吸器だけではなく頭部、鼻涙管に存在する粘膜リンパ組織において、同様に M 細胞が存在することが明らかになった。呼吸器 M 細胞欠損マウスの作製において、副次的にこの鼻涙管、また鼻腔に存在する M 細胞を欠損するマウスを作出するに至った。これらの研究成果から、これまで未解明であった呼吸器、頭部の粘膜免疫機構の理解が進むと考えられる。

本研究はこれまで腸管で発展した粘膜免疫研究を発展させるものである。呼吸器疾患は生活の質へ与える影響が大きい。さらに、呼吸器感染症は致死率が高いだけでなく、伝播力が強く社会的な影響も大きい。呼吸器の粘膜免疫応答、感染機構が明らかになることで、将来的な予防法、治療方法の開発につながる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Hisamoto Meri, Kimura Shunsuke, Iwata Kai, Iwanaga Toshihiko, Yokoyama Atsuro	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibition of RANKL and Sema4D improves residual ridge resorption in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08016-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oya Yuki, Kimura Shunsuke, Nakamura Yutaka, Ishihara Narumi, Takano Shunsuke, Morita Ryo, Endo Mayumi, Hase Koji	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of M Cells in Tear Duct-Associated Lymphoid Tissue of Mice: A Potential Role in Immunosurveillance on the Ocular Surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 779709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.779709	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Daisuke, Kimura Shunsuke, Hase Koji	4. 巻 33
2. 論文標題 Intestinal immunity: to be, or not to be, induced? That is the question	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 755 ~ 759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Atsuo, Kurihara Shin, Takahashi Daisuke, Ohashi Wakana, Nakamura Yutaka, Kimura Shunsuke, Onuki Masayoshi, Kume Aiko, Sasazawa Yukiko, Furusawa Yukihiko, Obata Yuuki, Fukuda Shinji, Saiki Shinji, Matsumoto Mitsuharu, Hase Koji	4. 巻 12
2. 論文標題 Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22212-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Barutta Federica, Kimura Shunsuke, et al.,	4. 巻 32
2. 論文標題 Protective Role of the M-Sec?Tunneling Nanotube System in Podocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 1114 ~ 1130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2020071076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Atsuo, Kurihara Shin, Takahashi Daisuke, Ohashi Wakana, Nakamura Yutaka, Kimura Shunsuke, Onuki Masayoshi, Kume Aiko, Sasazawa Yukiko, Furusawa Yukihiko, Obata Yuuki, Fukuda Shinji, Saiki Shinji, Matsumoto Mitsuharu, Hase Koji	4. 巻 12
2. 論文標題 Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22212-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Federica Barutta, Shunsuke Kimura, Koji Hase, Stefania Bellini, Beatrice Corbetta, Alessandro Corbelli, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Protective Role of the M-Sec - Tunneling Nanotube System in Podocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2020071076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hashimoto Mayuko, Kimura Shunsuke, Kanno Chihiro, Yanagawa Yojiro, Watanabe Takafumi, Okabe Jun, Takahashi Eiki, Nagano Masashi, Kitamura Hiroshi	4. 巻 78
2. 論文標題 Macrophage ubiquitin-specific protease 2 contributes to motility, hyperactivation, capacitation, and in vitro fertilization activity of mouse sperm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 2929 ~ 2948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-020-03683-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 木村 俊介, 長谷 耕二	4. 巻 75
2. 論文標題 OsteoprotegerinによるM細胞数の自己調節は粘膜免疫応答と上皮バリア機構のバランスを制御する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 194-200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大谷祐貴, 木村俊介, 長谷 耕二	4. 巻 75
2. 論文標題 自己免疫疾患における粘膜免疫系の関与：M細胞の潜在的役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Shunsuke, Mutoh Mami, Hisamoto Meri, Saito Hikaru, Takahashi Shun, Asakura Takanori, Ishii Makoto, Nakamura Yutaka, Iida Junichiro, Hase Koji, Iwanaga Toshihiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Airway M Cells Arise in the Lower Airway Due to RANKL Signaling and Reside in the Bronchiolar Epithelium Associated With iBALT in Murine Models of Respiratory Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01323	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishida K, Hasegawa A, Yamasaki S, Uchida R, Ohashi W, Kurashima Y, Kunisawa J, Kimura S, Iwanaga T, Watarai H, Hase K, Ogura H, Nakayama M, Kashiwakura J, Okayama Y, Kubo M, Ohara O, Kiyono H, Koseki H, Murakami M, Hirano T	4. 巻 9
2. 論文標題 Mast cells play role in wound healing through the Znt2/GPR39/IL-6 axis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47132-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Nobuhide、Takahashi Daisuke、Takano Shunsuke、Kimura Shunsuke、Hase Koji	4. 巻 10
2. 論文標題 The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 2345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.02345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Shunsuke、Nakamura Yutaka、Kobayashi Nobuhide、Shiroguchi Katsuyuki、Kawakami Eiryō、Mutoh Mami、Takahashi-Iwanaga Hiromi、Yamada Takahiro、Hisamoto Meri、Nakamura Midori、Udagawa Nobuyuki、Sato Shintaro、Kaisho Tsuneyasu、Iwanaga Toshihiko、Hase Koji	4. 巻 11
2. 論文標題 Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13883-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 木村俊介, 山田恭央, 中村有孝, 河合真悟, 長谷耕二
2. 発表標題 下気道における M 細胞の分化機構の解明
3. 学会等名 第6回日本骨免疫学会ウインターセミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村 俊介, 中村 有孝, 小林 伸英, 岩永 敏彦, 長谷 耕二
2. 発表標題 OsteoprotegerinによるM細胞数の制御による腸管恒常性の維持
3. 学会等名 第58回 日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 俊介、中村 有孝、小林 伸英、岩永 敏彦、長谷 耕二
2. 発表標題 OPGによるM細胞分化制御は腸管における感染と免疫のバランスを調節する
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 俊介
2. 発表標題 RANKL-OPGバランスによる腸管恒常性維持
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会 アップデートシンポジウム1 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村 俊介、中村 有孝、小林 伸英、岩永 敏彦、長谷 耕二
2. 発表標題 OstoprotegerinによるM細胞数の制御による腸管恒常性の維持
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村 俊介、中村 有孝、小林 伸英、岩永 敏彦、長谷 耕二
2. 発表標題 腸管ならびに呼吸器粘膜における RANKL-RANK-OPG による M 細胞の分化制御機構
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Kimura S, Kobayashi N, Nakamura Y, and Hase K.
2. 発表標題 Sox8 is essential for M-cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice
3. 学会等名 International Congress of Immunology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kimura S, Kobayashi N, Nakamura Y, and Hase K.
2. 発表標題 Sox8 is essential for M-cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>腸内細菌由来ボリアミンが大腸粘膜を健全に保つことを発見  <a href="https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2021/4/9/28-79235/">https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2021/4/9/28-79235/</a>          空気中の異物を体内に取り込む細胞を発見  <a href="https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2019/6/13/190613-1.pdf">https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2019/6/13/190613-1.pdf</a>          腸管免疫の活性化と感染のバランスを制御する仕組みを発見  <a href="https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2020/1/14/200114-2.pdf">https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2020/1/14/200114-2.pdf</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久本 芽璃  (Hisamoto Meri)  (00754920)	北海道大学・歯学研究院・学術研究員    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------