

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24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390155

研究課題名（和文） 特殊腸管上皮M細胞の機能と分化

研究課題名（英文） Function and differentiation of a specialized subset of intestinal epithelial M 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）：

RANKL 投与によりマウス小腸に異所性に特殊な上皮細胞である M 細胞が出現することを利用して M 細胞の分化を経時的に観察する系を確立した。この系を用いてマイクロアレイならびに qPCR 解析により、転写因子 Spi-B が M 細胞特異的に発現することを見出した。さらに Spi-B 欠損マウスを用いた解析から、Spi-B が M 細胞の分化に必須の転写因子であること、Spi-B 欠損マウスでは、M 細胞から取り込まれるネズミチフス菌に対する免疫応答が著明に傷害されることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Taking advantage of the fact that exogenously administered RANKL induces ectopic M-cell differentiation in murine small intestinal epithelium, we established an evaluation system for M-cell differentiation. By using the system, we have identified the transcription factor Spi-B to be specifically expressed in M cells and essential for their differentiation. Spi-B KO mice, lacking M cells, failed to evoke normal immune responses toward orally infected Salmonella Typhimurium, indicating that antigen uptake by M cells is critical for efficient intestinal immune responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：腸管免疫系、M細胞、抗原取り込み、RANKL、Spi-B、遺伝子欠損マウス、腸管免疫応答

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大量の食餌性抗原や腸内細菌叢、さらには外来性の細菌やウイルスなどの病原体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を取り込んでモニターすることにより、免疫監視に重要な役割を果たしている。パイエル板を覆う上皮領域 (follicle-associated epithelium; FAE) 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特殊な細胞内輸送系を発達させて積極的に腸内抗原を取り込み、自身の基底膜側細胞膜が大きくくびれてできた「M細胞ポケット」に存在する樹状細胞 (DC) などの抗原提示細胞に受け渡すことにより、免疫監視の発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、M細胞を介して体内に侵入・感染する病原体も少なくない。しかしながら、M細胞はその絶対数が少なく、また特異的な表面マーカー分子も無いため濃縮が困難であることから、これまでの研究は電子顕微鏡などの手法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はほとんど解明されていなかった。しかし最近、FAE直下の間質細胞に発現するサイトカインRANKLがM細胞の分化誘導に重要であること、マウスにRANKLを投与すると小腸絨毛上皮に異所性にM細胞が誘導されることが示された (Knoop et al., J. Immunol., 2009)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、RANKL投与による異所性M細胞分化誘導系を用いてM細胞の分化を経時的に観察することにより、M細胞の分化誘導に重要な転写因子を同定することを試みた。

3. 研究の方法

GST-RANKLをマウス腹腔内に投与し、経時的に小腸上皮組織を採取し、マイクロアレイおよびqPCRにより、RANKLによるM細胞の分化誘導後に特異的に発現が誘導される転写因子の同定を試みた。

転写因子Spi-Bの遺伝子欠損マウスのパイエル板を単離し、M細胞マーカーGP2の免疫染色を行なった。

Spi-B欠損マウスにネズミチフス菌を経口投与後、パイエル板へのネズミチフス菌の取り込み数やネズミチフス菌特異的T細胞活性化を野生型マウスと比較検討した。

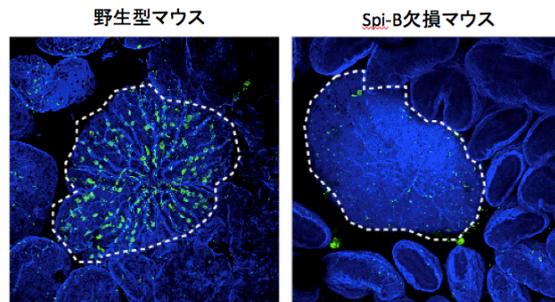
4. 研究成果

GST-RANKL投与により誘導される異所

性M細胞において、転写因子Spi-Bが早期に発現誘導されることが明らかとなった。Spi-Bはパイエル板に存在するM細胞においても高発言していた。

そこでSpi-B欠損マウスのパイエル板におけるM細胞特異的マーカーGP2の発現を免疫組織染色出検討したところ、Spi-B欠損マウスではGP2陽性のM細胞がほぼ消失していることが明らかとなった (図1)。

図1. Spi-B欠損マウスパイエル板におけるM細胞の消失



それに付随して、Spi-B欠損マウスでは経口投与後にパイエル板に取り込まれるネズミチフス菌が野生型マウスと比較して著明に減少し (図2左)、さらにネズミチフス菌特異的T細胞の活性化も有意に障害されていた (図2右)。

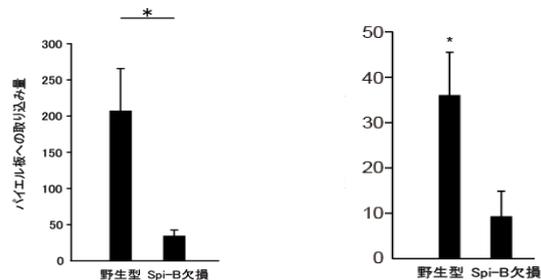


図2. Spi-B欠損マウスパイエル板へのネズミチフス菌の取り込み (左) およびネズミチフス菌特異的T細胞活性化 (右)

以上の結果から、Spi-BはM細胞分化に必須の転写因子であること、M細胞は腸管免疫応答を誘導するための抗原取り込みに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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8件)

1. Kanaya, T., Hase, K., Takahashi, D.,

- Fukuda, S., Hoshino, K., Sasaki, I., Hemmi, H., Knoop, K. A., Kumar, N., Sato, M., Katsuno, T., Yokosuka, O., Toyooka, K., Nakai, K., Sakamoto, A., Kitahara, Y., Jinnohara, T., McSorley, S. J., Kaisho, T., Williams, I. R., Ohno, H. The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal M cells. **Nat. Immunol.**, in press (査読あり)
2. Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. **Nature**, 469:543-547, 2011 (査読あり)
 3. Ebisawa, M., Hase, K., Takahashi, D., Kitamura, H., Knoop, K. A., Williams, I. R., Ohno, H. CCR6hiCD11c^{int} B cells promote M-cell differentiation in Peyer's patch. **Int. Immunol.** 23: 261-269, 2011 (査読あり)
 4. Fukuda S, Hase K, Ohno H. Application of a mouse ligated Peyer's patch intestinal loop assay to evaluate bacterial uptake by M cells. **J Vis Exp.** 17; 3225, 2011 (査読あり)
 5. 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)
 6. 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., Imura, 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)
 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. Nakato, G., Fukuda, S., Hase, K., Goitsuka, R., Cooper, M.D., Ohno, H. New approach for M-cell-specific molecules screening by comprehensive transcriptome analysis. **DNA Res.** 16 (4): 227-235, 2009 (査読あり)
- [学会発表] (計 19 件)
1. Ohno, H. (2012) Role of Commensal Microbiota in Intestinal Immunity and Host Defense. The 3rd International Forum, The 98th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology 東京、2012年4月20日
 2. 中藤学、長谷耕二、鈴木道夫、西田教行、堀内基広、阿戸学ぶ、大野博司 (2011) M細胞に発現するプリオンタンパク質は *Brucella abortus* の取り込み受容体として機能する。第40回日本免疫学会学術集会 千葉、2011年11月29日
 3. 伊達康博、海老澤昌史、福田真嗣、尾畑祐樹、高橋大輔、嶋秀明、花里美紗穂、中藤学、常田聡、Williams, I. R.、長谷耕二、大野博司 NALTにおけるM細胞を介した粘膜免疫応答。第40回日本免疫学会学術集会 千葉、2011年11月28日
 4. 尾畑祐樹、海老澤昌史、杉山真知子、長谷耕二、大野博司 腸管関連リンパ組織形成における上皮性Notchシグナルの役割。第40回日本免疫学会学術集会 千葉、2011年11月28日
 5. Ouchida, R., Mori, H., Hase, K., Kurosaki, T., Tokuhisa, T., Ohno, H., Wang, J.-Y. (2011) The Fc receptor for IgM (Fc α R) plays an important role in humoral immune responses to low-dose antigen. 第40回日本免疫学会学術集会 千葉、2011年11月28日
 6. 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
 7. 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
 8. 大野博司 食物アレルギーと腸管免疫・経口免疫寛容。第18回日本免疫毒学会シンポジウム 千葉、2011年9月8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
10. 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
 11. 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
 12. Nakato, G., Hase, K., Ohno, H. Distinct miRNA expression Profiles of Follicle-associated Epithelium (FAE) and Villous Epithelium (VE). 19th CDB Meeting: RNA Sciences in Cell and Developmental Biology 神戸、2010年5月12日
 13. Hanazato, M., Nakato, G., Nishikawa, F., Hase, K., Nishikawa, S., Ohno, H. Identification of RNA aptamers targeting mouse GP2 proteins by SELEX. 第32回日本分子生物学会年会横浜、2009年12月11日
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. Yamazaki, R., Kimura, S., Hase, K., Ebisawa, M., Date, Y., Tsuneda, S., Suzuki, H., Ohno, H. (2009) Functional analysis of CCL9 in the intestinal immune system. 第61回日本細胞生物学会大会 名古屋、2009年6月2日
 18. Kimura, S., Sakamoto, A., Yamazaki, R., Kawano, K., Hase, K., Ohno, H. Study on the process of antigen transcytosis by M cells. 第61回日本細胞生物学会大会 名古屋、2009年6月2日
 19. Yamazaki, R., Kimura, S., Ebisawa, M., Date, Y., Tsuneda, S., Suzuki, H., Hase, K., Ohno, H. Functional analysis of CCL9 in the intestinal immune system. 第39回日本免疫学会総会学術集会 大阪、2009年12月2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
なし
- (3) 連携研究者
なし