

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 6 月 7 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590186

研究課題名（和文） パイエル板上皮の免疫応答切り替え分子スイッチの解明

研究課題名（英文） Epidermal fatty acid binding protein (EFAP/FABP5) expression is associated with differential transcytosis of M cells in C57BL/6 mice Peyer's patch.

研究代表者

鈴木 良地 (SUZUKI RYOJI)

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20396550

研究成果の概要（和文）：C57BL/6 マウスパイエル板 M 細胞における表皮型脂肪酸結合タンパク質：Epidermal fatty acid binding protein (EFAP/FABP5)発現は腸管内細菌叢変化に呼応して増強する。 EFABP は M 細胞 apical 側に偏在するが、これは EFABP-galectin4 複合体形成によると考えられた。 抗原負荷実験の結果からこれらの所見は抗原取り込み能と正に相関する。

研究成果の概要（英文）：Epidermal fatty acid binding protein (EFAP/FABP5) expression in M cell in C57BL/6 mice Peyer's patch drastically increased during intestinal flora conversion. Terminal web accumulation of EFABP in M cell might be driven by EFABP-galectin4 complex synthesis. Both in vivo and in vitro study showed that above EFABP expression conversion and EFABP-galectin4 complex were associated with intestinal antigen transcytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：組織学、M 細胞

1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜ではどちらも非自己である、常在細菌や食餌由来する外来抗原に対して免疫寛容を、病原微生物にたいして特異的 IgA が誘導されるといった、異なる免疫応答を同一の組織が担っている。

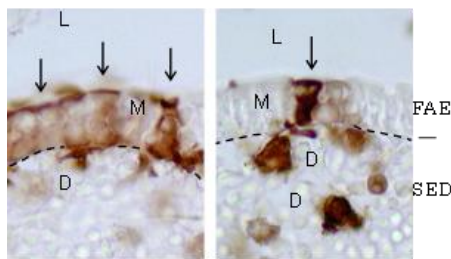
上記の組織は mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) と総称される 2 次リンパ組織であり、パイエル板はその代表的なものであ

る。パイエル板は follicular associated epithelium (FAE) と呼ばれる上皮と、上皮下のリンパ濾胞からなる。

パイエル板の免疫応答多様性は粘膜下の細胞の相互作用の多様性として説明されてきた。腸管内抗原取り込み担当細胞である M 細胞の抗原取り込みには選択性があることが分かっていたが (Kunisawa et al. 2002; Nagai et al. 2007) その仕組みについては不明であった。これは M 細胞の機能解析ツ

ールとして適当なタンパク質が同定されなかったからである。

Fatty acid binding protein (FABP)は～15kDa の一群のタンパク質であり、現在 12 つの isoform が知られている。FABP family のうち epidermal type FABP (EFABP) は keratinocyte より単離されたが、多様な組織で発現していることが分かっていた。申請者らは C57BL マウス パイエル板において EFABP が発現することを示した(Suzuki et al. 2009)。EFABP 発現細胞はその形態学的特徴や、細胞マーカーとの二重染色所見より、FAE 内の M 細胞、上皮下、および濾胞内の樹状細胞とマクロファージであると考えられた。



D, 樹状細胞
FAE, follicular associated epithelium
L, 腸管腔; M, M細胞
SED, subepithelial dome

FAE 下の EFABP 陽性細胞の集積はしばしば FAE 内 EFABP 陽性細胞直下に見られた(上図)。また、FAE 内 EFABP 陽性細胞で、小腸管腔内(上図、L)に接した領域で強い陽性反応が観察され(図中矢印)抗原取り込みとの関連が示唆された。FAE 内、SED の EFABP 陽性細胞がそれぞれ M 細胞、樹状細胞であることを考えると EFABP 陽性部位は外来抗原の提示経路に一致すると考えられた。

EFABP はこれまでの研究の成果によりその生化学的特性が明らかになっており、本来疎水性である脂肪酸に結合して親水性を獲得させることで、細胞内外のコンパートメント間の移動を促進すると考えられる。(Coe and Bernlohr 1998; Glatz and van der Vusse 1996; Hertz and Bernlohr 2000)。

上述と、EFABP のパイエル板での発現局在から、EFABP の on/off が冒頭に述べた、免疫応答様式の切り替えスイッチとして働くことが考えられた。

2. 研究の目的

パイエル板 M 細胞における EFABP 発現が M 細胞の抗原取り込み能のスイッチ機構として働いていることを示す。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

C57BL/6 マウス(生後 0 日、1 日、3 日、15 日、16 日、17 日、18 日、19 日、21 日、8 週、12～15 週)を使用した。4% paraformaldehyde/0.1M phosphate buffer (7.4)にて灌流固定後、Peyer 板を摘出。30% sucrose/0.1M phosphate buffer に浸漬、20 μ m の凍結切片とした

(2) 免疫組織化学

切片を風乾後、0.3% TritonX-100/PBS に 60min 浸漬した後、0.3% H₂O₂/methanolにて内因性 peroxidase をブロック。5% normal goat serum / PBS にて 30 min インキュベート後一次抗体と反応させた。

(2) -1 EFABP:ABC 法

抗 EFABP rabbit IgG (0.5mg/ml : 0.5% BSA, 0.05% sodium azide/PBS) を室温、overnight で反応させた。ビオチン化抗 rabbit IgG (Vector Laboratories) と反応後、VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector Laboratories)にて免疫陽性反応を検出した。

(2) -2 蛍光免疫組織化学

(2) -1 と同様の切片(内因性 peroxidase ブロックは省略、一次抗体が goat IgG の場合はブロッキング試薬を horse serum に変更)に抗 EFABP 抗体(rabbit IgG, 0.5mg/ml)、抗 Cytokeratin19 抗体(goat IgG, Santa Cruz, 1:100)、抗 Galectin4 抗体(goat IgG, R&D, 1 : 50)、TROMA1 (抗 EndoA cytokeratin 抗体)(rat IgG, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:100)、と反応させた。それぞれの免疫陽性反応を Alexa 488 ないし Alexa594 標識抗 rabbit IgG(1:500, Invitrogen)、Alexa594 標識抗 goat IgG, Alexa488 標識 rat IgG(1:500, Invitrogen)にて検出した。

また、loop assay におけるビオチン標識タンパク質を Alexa 488 ないし Alexa 405 標識 streptavidin (1:500)で検出した。蛍光免疫陽性反応の観察を LSM510 レーザー共焦点顕微鏡で観察した。

(4) Loop assay

パイエル板を含む 8、15 週齢(♂)、生後 16 日、19 日 C57BL/6 マウスのパイエル板を含む小腸を頭側、尾側で栄養血管を生かして結紮し、BSA, cholera toxin B subunit(CTB) (List biological Laboratories, Inc., 103A), IgA (Sigma, M1421-1MG)、IgG (I5381-1MG), ovalbumin(OVA)(Sigma, A5503)をビオチン標識 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Biotin labeling kit-NH2, LK03 使用)して注入(100 μ g/ml、150 μ l/匹)し 50 分後に摘出 4% paraformaldehyde/0.1M phosphate buffer (7.4)にて 2 時間浸漬固定、30% sucrose/0.1M

phosphate buffer に浸漬、20 μ m の凍結切片とした。

(5) 免疫沈降、質量分析

C57BL/6 (♂ 8-9 週齢)12 匹のパイエル板を剖出し、30mMEDTA/PBS 中 37°C で 20 分振盪し上皮を上清中に回収した。上皮と上皮下の組織をそれぞれプロテアーゼ阻害剤 (Roche, Complete mini®) を添加した 10 mM Tris-HCl(7.5), 150mM NaCl, 1% NP40, 0.5% Sodium deoxycholate 中で超音波破碎する。1ml lysate あたり、EFABP 抗体 2 μ g を加え ProteinG-Sepharose 4 B (Sigma, P3296-5ML) にて免疫沈降を行う。回収した免疫複合体を 12%polyacrylamide gel 電気泳動で分離し、銀染色(WAKO, Silver Stain MS kit, #299-58901)を施す。上皮特異的なバンドを切り出し株式会社リバネス (Leave a nest Co., Ltd.) に委託して質量分析によるタンパク同定を試みた。

(4) 遺伝子導入

EFABP (nt 35-439, Acc. No. NM_010634) を pAcGFP1C1 の EcoRI サイトに, cytokeratin19 (nt 61-1269, Acc. No. NM_008471) EndoA cytokeratin (nt 1-1470, Acc. No. D90360.1) galectin4 (nt 1-978, Acc. No. AF510729.1) をそれぞれ pDsRed monomer N1 の EcoRI サイトにサブクローニングした。Caco2 細胞 (Riken BioResource Center, # RCB0988) を CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) 内 5.0x10⁵cells / 500 μ l /well で 24well プレートに播き、24 時間後に Lipofectamine LTX (500ng: plasmid DNA + 0.5 μ g, Plus reagent + 1.75 μ l, Lipofectamine LTX / well)にて transfection した。Transfection 後 48 時間食能の測定を行った。

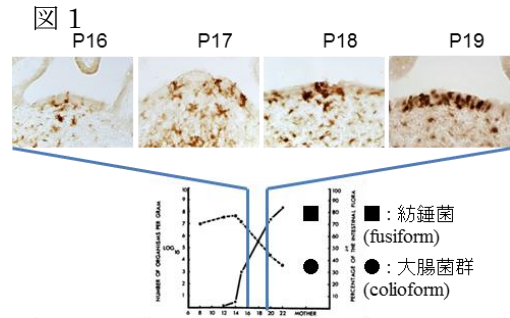
(6) 食能測定

Polystyrene microbeads (Invitrogen, FluroSpheres® Carboxylate-Modified Microspheres, 1.0 μ m, blue fluorescent(350/440), 2% solids, F8815)、BSA 吸着 polystyrene microbeads, OVA 吸着 polystyrene microbeads をそれぞれ 9.83 x 10⁸ / well で加え、24 時間後 LSM510 レーザー共焦点顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

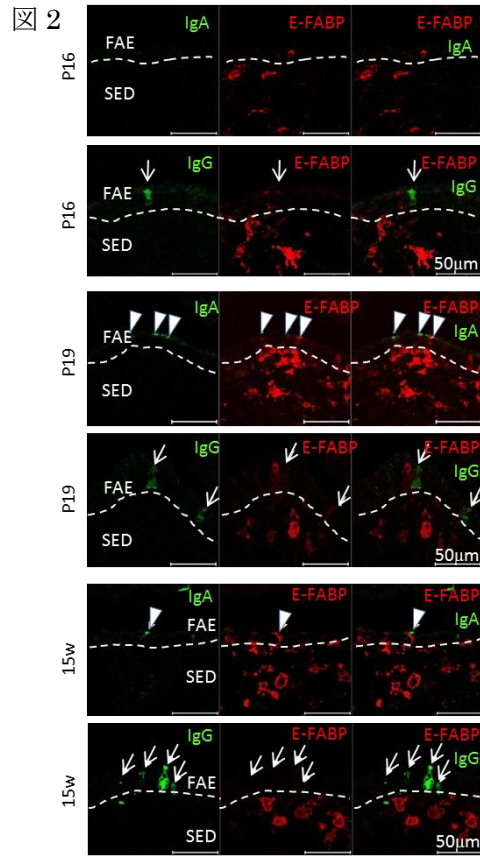
(1) 離乳期パイエル板 M 細胞での EFABP 発現変化と抗原取り込み能

離乳期の C57BL/6 マウス腸管内抗原環境は大きく変化する。このときパイエル板 M 細胞の EFABP 発現増強が観察された (図 1、P16,生後 16 日 ; P17,生後 17 日 ; P18,生後 18 日 ; P19,生後 19 日)。



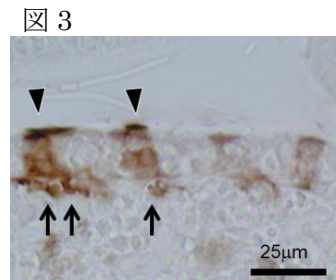
INFECTION AND IMMUNITY, Jan. 1972, p. 1-7 改編

この発現変化に同期して M 細胞は IgA (図 2、▼) 取り込み能を獲得するが IgG (図 2、↓) 取り込みは EFABP 発現と関係なく観察された (図 2)。



(2) M 細胞 apical 側への EFABP 偏在と抗原取り込み

研究の背景の頁に記したように EFABP はしばしば M 細胞の apical 側に偏在し (図 3、▼)、直下に粘膜下の EFABP 陽性細胞が集積する (図 3、↑) 傾向がみられる。



EFABP の apical 側への偏在を実現する共役タンパク質を抗 EFABP 抗体による免疫沈降での同定を試みた (図 4)。

Subepithelial dome:SED 由来のバンドと比較して、

Follicular associated epithelium:FAE 特異的なバンド (図 4、▶) のうち 1: endoA' cytokeratin, 2: elongation

factor Tu, 3: cytoskeletal 19, 4: fructose-bisphosphate aldolase B, 5: galectin-4 であった。その他のバンドは特定不能だった。

これらのタンパク質は蛍光免疫 2 重染色で M 細胞 apical 側で EFABP と共存することが確認され、また、Loop assay による抗原負荷でこれらの共存部位に一致して BSA, IgA, OVA の取り込み像 (図 5、) が観察された。CTB の取り込み像は一致しなかった (図 5)。

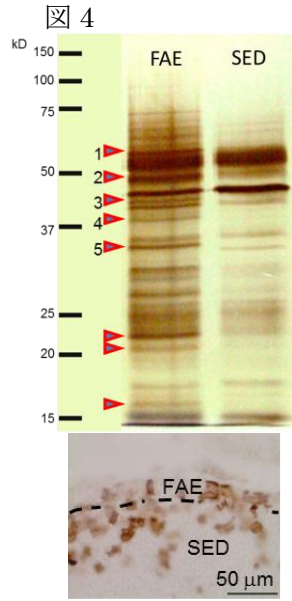
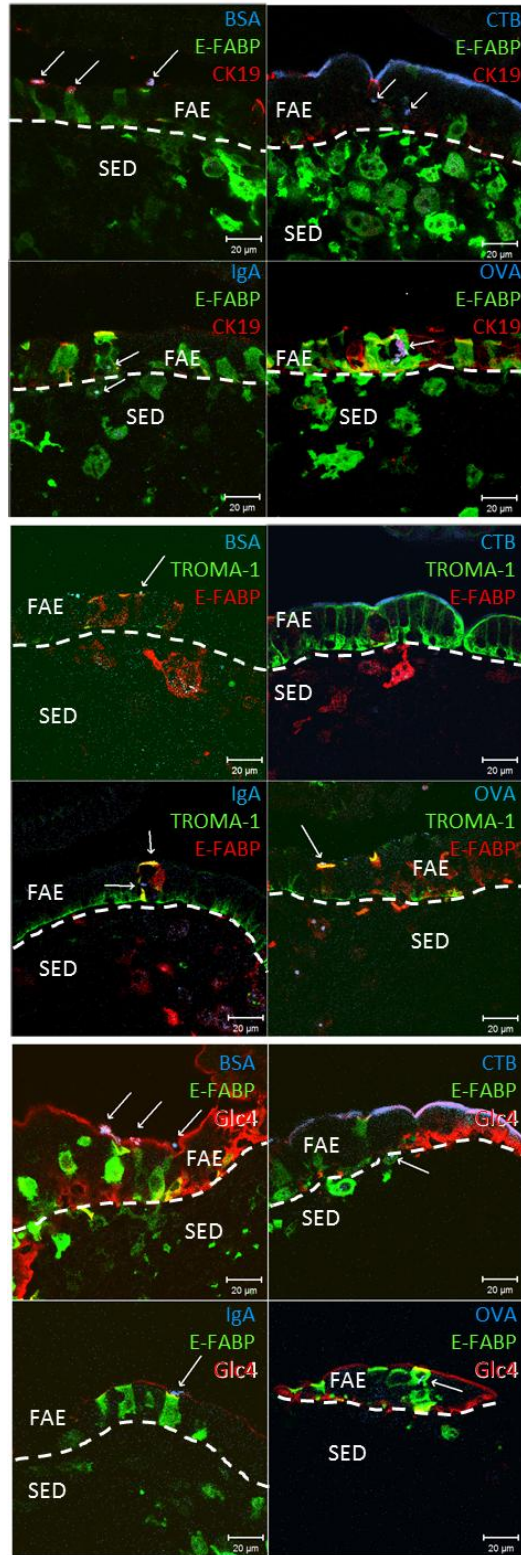


図 5



(3) 培養細胞での強制発現系における EFABP と cytokeratin19, EndoA cytokeratin, galectin4 の共存と抗原吸着ビーズ取り込み

Caco2 細胞を用いた強制発現系で

EFABP、cytokeratin19, EndoA cytokeratin, galectin4 をそれぞれ単独で GFP あるいは DsRed 融合タンパク質として Caco2 細胞に強制発現させた (図 6)。EFABP-GFP は細胞全体にびまん性に観察された。cytokeratin19-DsRed, EndoA cytokeratin-DsRed はともに線維状の構造物として観察

されたが、cytokeratin19-DsRed の方がより細胞膜近傍に局在する傾向にあった。Galectin4-DsRed は EFABP-GFP 同様にびまん性の分布様態を示した。

EFABP-GFP と galectin4-DsRed を Caco2 細胞に 2 重強制発現させたときのみ、それぞれを単独で発現させたときと異なり、両者は共に細胞辺縁に粒状ないし帯状に局在した (図 7、↑)。

観察頻度が少なく今後さらに検討が必要であるが EFABP-GFP と galectin4-DsRed の共存部位で BSA 吸着ビーズの取り込み像が観察された (図 8、↑)。

図 6

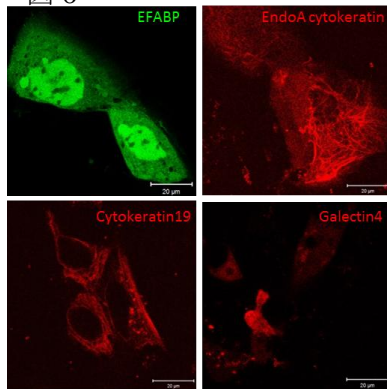


図 7

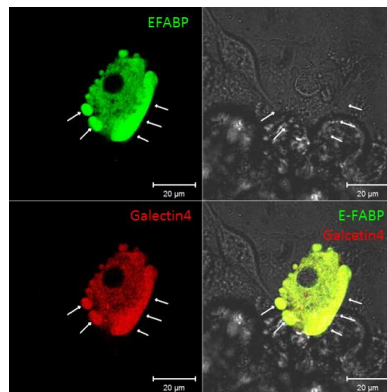
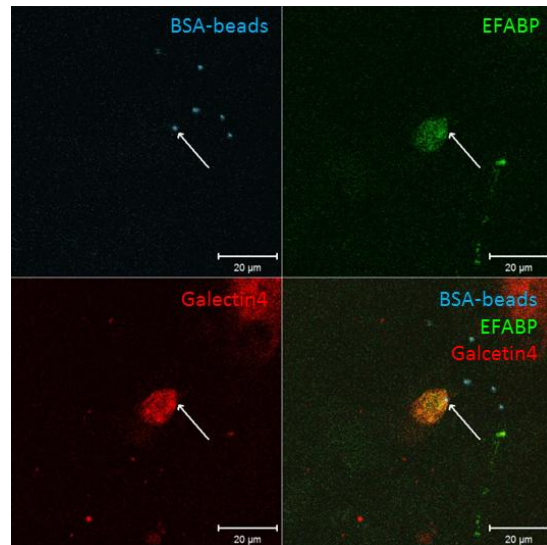


図 8



(4) まとめ

- ① C57BL/6 マウスパイエル板 M 細胞における EFABP 発現は腸管内の細菌叢の転換期である生後 16 日から 19 日の間に劇的に増加する。
 - ② EFABP の生後発達期の発現変化に相関して M 細胞は IgA 取り込み能を獲得する。
 - ③ M 細胞 apical 側への EFABP 偏在は in vivo, in vitro の実験結果より EFABP と galectin4 の相互作用によるものと考えられる。
 - ④ EFABP と galectin4 の共存部位は in vivo, in vitro 双方で M 細胞の抗原取り込み部位と一致した。
- 以上①～④より M 細胞における EFABP 発現が M 細胞取り込み能と正に相関し、特に EFABP-galectin4 複合体が M 細胞 apical 側に形成されることで抗原取り込みが促進されることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

① 鈴木良地、大和田祐二、阿部寛、M 細胞における表皮型脂肪酸結合タンパク質発現と腸管内外来抗原取り込み能、第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013 年 3 月 29 日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場

② 鈴木良地、大和田祐二、阿部寛、生後発達期マウスパイエル板 M 細胞 apical 側における Epidermal fatty acid binding protein (EFABP/FABP5) 発現、日本解剖学会、第 58 回東北・北海道連合支部学術集会、2012 年 9 月 23 日、山形大学医学部大講義室

③ 鈴木良地、大和田祐二、阿部寛、生後発達期マウスパイエル板 M 細胞 Epidermal typEFABP(EFABP/FABP5) 発現と腸管内抗原取り込機構の関与、第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012 年 3 月 27 日、山梨大学甲府キャンパス

④ Ryoji SUZUKI, Yuji OWADA, Hiroshi ABE, Epidermal fatty acid binding protein (EFABP/FABP5), as a regulator of antigen processing in murine Peyer's patch., 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2011 年 3 月 30 日、The Journal of Physiological Sciences 誌上にて

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 良地 (SUZUKI RYOJI)
秋田大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：20396550

(2) 研究分担者

阿部 寛 (ABE HIROSHI)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40151104

(3) 連携研究者

大和田 祐二 (OWADA YUJI)
山口大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号：20292211