

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：12601
 研究種目：若手研究(A)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22689017
 研究課題名（和文） 膜ナノチューブを介した免疫ネットワークの構築原理と生体内イメージング

研究課題名（英文） The role of membrane nanotubes in the immune system

研究代表者

長谷 耕二 (HASE KOJI)
 東京大学・医科学研究所・特任教授
 研究者番号：20359714

研究成果の概要（和文）：

最近の研究から、離れた細胞間に細長い膜ナノチューブが形成されることで、細胞間相互作用が促進されることが報告されている。この細胞と細胞を繋ぐ細管は、膜ナノチューブ（tunneling nanotube; TNT）と呼称され、免疫細胞における新たな情報伝達手段として大きな注目を集めている。研究代表者は、M細胞に発現する遺伝子群のうち、M-SecがTNT形成を促進することを見出し、その分子機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Cell-to-cell communication is essential for the development and maintenance of multicellular organisms. The tunneling nanotube (TNT) is a recently recognized distinct type of intercellular communication device. We have recently shown that M-Sec (also called TNFaip2) is a key molecule for TNT formation. We also elucidated the molecular machinery of M-Sec-dependent TNT formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2012年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
総計	1,9200,000	5,760,000	24,960,000

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：粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

最も発達した高次生命機能の一つである免疫系では、リンパ組織の形成、免疫応答の開始とその終結など、あらゆる局面において細胞間の情報伝達が重要な役割を果たしている。免疫担当細胞間における情報

の伝達手段はこれまで複数知られていた。代表的なものとして、サイトカイン・エキソソームの分泌や、免疫シナプスを介した細胞間接着による相互作用が挙げられる。さらに最近の研究で、離れた細胞間に細長い膜ナノチューブが形成されることで、細

胞間相互作用が促進されることが報告されている。この細胞と細胞を繋ぐ細管は、**tunneling nanotube (TNT)**と呼称され、免疫細胞における新たな情報伝達手段として大きな注目を集めている。TNTの直径は**50-200 nm**であり、長さは最長で**100 μm**にも達する。活性化した樹状細胞やマクロファージは、**Ca²⁺**流入に代表される細胞内活性化シグナルを、TNTを介して素早く近隣細胞に伝達し活性化を促す。これは、外来抗原を感知した少数の細胞が、瞬時に周辺細胞にシグナルを伝えて多くの細胞に活性化を促すことで、更なる侵襲に備える生体防御機構と考えられる。こうした本来の作用とは逆説的に、**HIV-1**などのレトロウイルスや変異型プリオン蛋白質は、宿主の細胞間膜ナノチューブの形成を促進し、効率的に細胞間を移動することで感染を拡大することが知られている。しかし、これまでのTNTに関する報告は主として培養細胞系での現象論に留まっており、TNT形成の分子機構についてはほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

免疫系細胞において形成される膜ナノチューブ(TNT)は、活性化シグナルの伝達や細胞膜分子の輸送等に重要な役割を果たしているが、その形成機構や生体内での役割については不明な点が多い。本研究では、TNT形成因子であり、M細胞やマクロファージに発現する**M-Sec**の機能解析を通じて、TNT形成の分子メカニズムを明らかにする。また生体内でのTNTの可視化を試みるために、M細胞レポーターマウスの樹立を試みる。

3. 研究の方法

(1) M-Secによる膜ナノチューブ形成機構の解析

M-Secと結合して膜ナノチューブ形成を促進する低分子GTPaseを同定する。これらの低分子GTPaseに対するRNA干渉を行い、TNT形成に対する影響を調べるとともに、その下流のエフェクター分子についても同定を試みる。

(2) 化合物アレイによるM-Sec結合物質の探索

TNT阻害作用を有する低分子化合物を探索するために、理化学研究所で設立された

化合物バンク(NPDepo)を利用して、M-Secに結合する低分子化合物を網羅的に探索・解析する

(2) M細胞レポーターマウスの作成

M細胞マーカー分子の遺伝子座に**IRES-Venus**を組み込んだマウスの作成を試みる。

4. 研究成果

(1) M-Secと低分子GTPaseとの相互作用の解析

TNTの形成にはアクチンのリモデリングが重要と考えられる。アクチンのリモデリングは**RhoファミリーGTPase (RhoA, Cdc42, Rac1)**や**RalファミリーGTPase(RalA, RalB)**によって制御されている。そこでこれら低分子GTPaseとM-Secの相互作用を調べた結果、M-Secは**RhoA**以外の分子GTPaseとの共局在を示した。そこでRNA干渉により、低分子GTPaseのノックダウンを行ったところ、**RalA**を抑制した場合に、TNTの形成が阻害されることが判明した。これより**M-Sec**は**RalA**と相互作用することでTNT形成を促進することが判明した。

(2) RalA下流エフェクター因子の探索

RalAはこれまで**exocyst**複合体と相互作用してリサイクリングエンドソームの細胞膜への輸送を制御することが知られている。また**exocyst**複合体を構成する**Sec5**と相互作用して**filopodia**形成を促すとの報告もある。そこで**Sec5**と結合できない**RalA**変異体を過剰発現させてTNTの形成を調べた結果、TNTの形成が阻害された。**Sec5**をノックダウンしても同様の現象が観察された。以上の結果より、**M-Sec**は**RalA**と結合した後、**Exocyst**複合体のリクルートを促し、アクチンリモデリングを促進するとともに、リサイクリングエンドソームから伸張する突起へと膜を供給させるとのモデルが示唆される。

(3) TNT阻害作用を有する低分子化合物の探索

22,000以上の合成および天然化合物ライブラリーを数千個ずつ1枚のスライドガラス上に配置した化合物アレイを用いて、**M-Sec**結合化合物のハイスループットなスクリーニングを行った。その結果2種類の化合物が結合活性を示した。これらのうち、1種類はTNT形成阻害作用を示した。

(4) M細胞レポーターマウスの作成

M細胞特異的マーカー分子である**Gp2**遺伝子下流に**IRES-Venus**をノックインしたM細胞レポーターマウスを樹立した。これ

より生体内で M 細胞を共焦点顕微鏡にて観察することが可能となった。

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 10 件)

- ① Ohno H. and Hase K. et al. M-Sec, a key molecule for tunneling nanotubule formation. *Communicat. Integrat. Biol.* 査読無, 2010, 3 巻, 231-233.
- ② Takahashi D. and Hase K. et al. The Epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B controls gut immune homeostasis in mice. *Gastroenterology*, 査読有, 141 巻, 2011, 621-632.
DOI:
10.1053/j.gastro.2011.04.056
- ③ Obata Y. et al. Epithelial cell-intrinsic notch signaling plays an essential role in the maintenance of gut immune homeostasis. *J. Immunol.* 査読有, 188 巻, 2012, 2427-2436.
DOI: 10.4049/jimmunol.1101128
- ④ Fukuda S. and Hase K. et al. Application of a mouse ligated Peyer's patch intestinal loop assay to evaluate bacterial uptake by M cells. *J. Vis. Exp.* 査読有, 2011, Dec 17
DOI: 10.3791/3225
- ⑤ Fukuda S. et al. Bifidobacteria protect host from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 査読有, 469 巻, 2011, 543-547.
DOI: 10.1038/nature09646
- ⑥ Ebisawa M. and Hase K. et al. CCR6^{hi}CD11c^{int} B cells promote M-cell differentiation in Peyer's patch. *Int. Immunol.* 査読有, 2011, 23 巻, 2011, 261-269.
10.1093/intimm/dxq478
- ⑦ Ouchida R. et al. Critical role of the IgMFC receptor in IgM homeostasis, B-cell survival, and humoral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 査読有, 109 巻, 2012, E2699-E2706.
10.1073/pnas.1210706109
- ⑧ Kanaya. T. et al. The Ets Transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold(M) cells. 査読有, 13 巻, 2012, 729-736.
10.1038/ni.2352
- ⑨ Nakato G. et al. Cutting Edge: *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as

an invasive receptor. *J. Immunol.* 査読有, 189 巻, 2012, 1540-1544.

10.4049/jimmunol.1103332

- ⑩ Okada T. et al. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat. Commun.* 査読有, 4 巻, 2013, 1654.
10.1038/ncomms2668

[学会発表] (計 13 件)

- ① Hase K., Specialized epithelial M cells contribute to immunosurveillance on the mucosal surface. The Japanese Society for Immunology 2010 Symposium for "Cutting edge of immunology; innate immunity and immune regulation" 2010 年 12 月 3 日、東京
- ② Hase K., Antigen transcytosis by M cells: from molecular entities to biological significance. 4th Symposium of Immunology Frontier Research Center (IFReC) 2010 年 6 月 1 日-2 日、大阪
- ③ 長谷耕二、特殊上皮 M 細胞による粘膜表面の免疫監視機構、第 16 回日本ヘリコバクター学会学術集会、2010 年 6 月 24 日-25 日、京都
- ④ Hase K., M-Sec sec-ures membrane nanotubes with Ra1A and exocyst. International Symposium on Organelle Network : Microbiology, Immunology & Cell Biology. 2010 年 7 月 12 日- 13 日、大阪
- ⑤ Hase K. et al. Essential Role of Membrane Trafficking Factor Ap-1B in Gut Immune Homeostasis. Biochemistry and Molecular Biology 2010, 2010 年 12 月 6 日-10 日、神戸
- ⑥ 長谷 耕二、感染マトリクス成果報告研究項目(B)細菌、感染現象のマトリックスシンポジウム「感染症研究の未来」、2011 年 12 月 3 日、東京
- ⑦ Koji Hase, Epithelial immune functions at the interface between self and non-self. 2nd CSI/JSI/KAI Joint symposium on Immunology, 2011 年 12 月 5 日-6 日、東京
- ⑧ 長谷 耕二、腸管粘膜表面の免疫監視における M 細胞の重要性の解明、第 15 回腸内細菌学会、2011 年 6 月 16 日-17 日、東京
- ⑨ Hase K., Intestinal microbiota shapes intestinal T cell balance via epigenetic modifications. 第 71 回日本癌学会学術総会 (招待講演)、2012 年 9

- 月 19 日-21 日、札幌
- ⑩ Hase K., Epithelial immune functions at the interface between self and non-self. IEIIS2012 Homeostatic Satellite Symposium – Infection , Inflammation and Immunity. (招待講演)、2012 年 10 月 22 日、東京
- ⑪ 長谷 耕二, 粘膜表面の感染と宿主応答に果たす M 細胞の役割、第一回川島腎カンファレンス (招待講演)、2012 年 11 月 10 日-11 日、各務原 (岐阜)
- ⑫ Hase K. , Roles of intestinal M cells in mucosal infection and immunity. 第 85 回日本生化学会 (招待講演)、2012 年 12 月 14 日-16 日、福岡
- ⑬ Hase K. , Epithelial Notch signaling secures lymphoid organogenesis and immune homeostasis in the gut. 2012 Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. 2012 年 12 月 5 日-7 日、神戸

[図書] (計 1 件)

- ① 清野宏 編集, シナジー出版、臨床粘膜免疫学, 2010

[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

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/dmb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 耕二 (HASE KOJI)
東京大学・医科学研究所・特任教授
研究者番号 : 20359714

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号 :