

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293114

研究課題名(和文) M細胞を起点とした病原体 - 宿主間相互作用の解明

研究課題名(英文) Host-microbe interaction mediated by intestinal M cells

研究代表者

長谷 耕二 (Hase, Koji)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：20359714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜免疫系の正常な機能には、免疫系細胞のみならず外部環境と接する上皮細胞による粘膜抗原の認識と選択的輸送が必要不可欠である。その中心的な役割を担うのは、パイエル板上皮層に存在するmicrofold(M)細胞である。本研究では粘膜面の宿主防御におけるM細胞の役割と微生物認識機構の解明を試みた。粘膜感染症に対するM細胞欠損の影響を調べた結果、M細胞欠損マウスでは粘膜感染に対する抵抗性が減弱することが判明した。自然免疫系には大きな異常は認められなかったが、適応免疫系の異常が観察された。これらの結果から、M細胞は粘膜面における抗原特異的な免疫応答の発動に貢献していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It remains unknown whether M-dependent antigen uptake also contributes to cellular immunity against mucosal pathogens. Here we investigated the contribution of M cells to Th17-dependent cellular immunity. Wild type (WT) and M-cell-null mice were orally infected with *Citrobacter rodentium*. After the infection, M-cell-null mice developed more severe infectious colitis compared to WT mice, as evidenced by exacerbation of body weight loss and fecal clinical scores. Importantly, colonic Th17 cells were decreased in M-cell-null mice compared to WT mice at the early phase of infection. In contrast, under the physiological conditions, there was no significant difference in the number of colonic Th17 cells between the two groups. Collectively, these results suggested that M-cell-dependent antigen uptake plays a key role in the protection against *C. rodentium* infection by facilitating antigen-specific Th17 induction.

研究分野：免疫学

キーワード：粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜は、食物に含まれる種々の微生物や常在細菌に曝されている。これらの外来抗原を絶えず監視し、免疫応答を適切に誘導することは重要な生命維持機構の一つである。そのため腸管には多数のリンパ球が集積しており、生体内で最大の免疫系を構築している。その正常な機能には、免疫系細胞のみならず外部環境と接する上皮細胞による粘膜抗原の認識と選択的輸送が必要不可欠である。その中心的な役割を担うのは、パイエル板上皮層に存在する microfold (M) 細胞である。

M細胞には、管腔側に存在する抗原を取り込み、リンパ濾胞に面した側基底面に輸送する抗原トランスサイトシスと呼ばれる機構が発達している。M細胞の存在が確認されたのは 1970 年代初頭であり、それ以来数多くの研究報告がなされてきた。しかしながら、そのほとんどは電子顕微鏡などを用いた形態学的解析に留まっており、抗原トランスサイトシスに関する分子メカニズムはほとんど分かっていなかった。

M細胞は表面マーカーが未同定なことから濃縮が難しく、細胞生物学的解析は不可能と考えられてきた。こうした状況のなか、申請者は、独自の上皮剥離法を開発し、パイエル板上皮のマイクロレイ解析を初めて実施し、上述の GP2 を始めとする複数の M細胞特異的マーカーを同定してきた。M細胞は様々な病原性細菌に侵入の門戸を与える一方、それら病原に対する免疫応答の発動にも重要とされており、結果的に感染成立と防御のどちらに寄与しているのかという根本的な疑問が残されている。

2. 研究の目的

腸管は、免疫系を賦活して宿主防御を行う場であるとともに、炎症を制御する場でもある。その絶妙な仕組みについては断片的にしか分かっていない。申請者の予備的検討から、M細胞は『防御』と『制御』の両方において重要な役目を果たす可能性が示唆される。本研究では、分子（抗原取り込み受容体）、個体（M細胞欠損マウス）、生物間（宿主・微生物）相互作用という三つの階層において機能解析を行い、腸管免疫系の恒常性維持における M細胞の貢献を明らかにする。

3. 研究の方法

A) 単離 M細胞のトランスクリプトーム解析と新規抗原取り込み関連分子の同定

FACS ソーティングにより純粋な M細胞を単離し、RNA-Seq 法によるトラン

スクリプトーム解析を実施することで、M細胞特異的な遺伝子群の網羅的スクリーニングを実施する。これらの分子群のなかから M細胞の管腔側に発現する細胞膜タンパク質を選択し、各種 M細胞感染菌との結合活性をスクリーニングする。

B) 感染と宿主応答における M細胞の生物学的重要性の検証

急性および慢性経口感染モデルにおいて、M細胞欠損マウスの表現型を解析する。M細胞欠損マウス及び野生型マウスに赤痢菌または *Citrobacter rodentium* を経口投与し、感染に対する感受性を体重変化、糞便 cfu、糞便クリニカルスコアの点から比較した。加えて、大腸 HE 染色、マクロファージの免疫染色および FACS 解析により、大腸炎の重篤度を評価した。また、骨髓系免疫細胞における転写因子欠損の影響を除くため、骨髓キメラマウスを作製して同様の評価を行った。さらに、qPCR 法を用いて感染マウスの脾臓における 16S 遺伝子を検出し、細菌の体内移行を観察した。

4. 研究成果

FACS ソーティングにより純粋な M細胞を単離し、M細胞の機能や分化を司る遺伝子群の網羅的スクリーニングを実施した。上皮細胞はリンパ球に比較して、生細胞として FACS ソーティングを行うことが技術的に難しい。上皮の大部分は細胞調製中やソーティング中に死滅してしまう。そのため申請者はこれまでに最適な細胞調製法とソーティング条件について十分に検討を重ね、上皮細胞に対するダメージを最小限にしてソーティングする技術を確立した。さらに Gp2 遺伝子の下流に Venus 遺伝子をノックインした M細胞レポーターマウスを作出した。本マウスから M細胞を単離し、トランスクリプトーム解析を実施した。これより M細胞特異的な遺伝子群を同定した。現在、CRISPR/Cas9 システムを用いて、これらの遺伝子を欠損するマウスを作出した。

感染と宿主応答における M細胞の生物学的重要性の検証するために、M細胞欠損マウスを用いて経粘膜感染実験を行った。

M細胞欠損マウスに、急性感染モデルとして赤痢菌を経口感染させたところ、やせ型と比べて感染菌の数に大きな変化はみられなかった。

一方、*C. rodentium* 感染では、M細胞欠損マウスにおいて野生型マウスと比べて、感染 16 日目において重篤な大腸炎症状が認められた。さらに骨髓キメラマウスを用いた結果から、成熟 M細胞の欠損が C.

rodentium 感染に対して冗長性の炎症を引き起こす原因となっていることを強く示唆している。加えて、M 細胞欠損マウスでは感染 7 日目において脾臓が腫脹し、細菌の体内移行が増加した。つまり、M 細胞の欠損は感染時における腸管のバリア機能の低下を引き起こした。以上より、M 細胞は腸管粘膜のバリア機能を高め、感染性炎症の冗長を防ぐ役割を担っていることが推測される。

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 12 件)

- 1 Hashimoto M, Bhuyan F, Hiyoshi M, Noyori O, Nasser H, Miyazaki M, Saito T, Kondoh Y, Osada H, Kimura S, Hase K, Ohno H, Suzu S. Potential Role of the Formation of Tunneling Nanotubes in HIV-1 Spread in Macrophages. **J Immunol.** 196: 1832-41, 2016. 査読あり
- 2 Nakato G, Hase K, Sato T, Kimura S, Sakakibara S, Sugiyama M, Obata Y, Hanazato M, Iwanaga T, Ohno H. Epithelium-Intrinsic MicroRNAs Contribute to Mucosal Immune Homeostasis by Promoting M-Cell Maturation. **PLoS One.** 11(3):e0150379, 2016. 査読あり
- 3 Li Y, Takahashi Y, Fujii S, Zhou Y, Hong R, Suzuki A, Tsubata T, Hase K, Wang JY. EAF2 mediates germinal centre B-cell apoptosis to suppress excessive immune responses and prevent autoimmunity. **Nat Commun.** 7:10836, 2016. 査読あり
- 4 Nakato G, Hase K, Ohno H. Distinct microRNA expression profiles in follicle-associated epithelium and villous epithelium. **Genom Data.** 5:388-90, 2015. 査読あり
- 5 Ohnmacht C, Park JH, Cording S, Wing JB, Atarashi K, Obata Y, Gaboriau-Routhiau V, Marques R, Dulauroy S, Fedoseeva M, Busslinger M, Cerf-Bensussan N, Boneca IG, Voehringer D, Hase K, Honda K, Sakaguchi S, Eberl G. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ ⁺ T cells. **Science** 349: 989-93, 2015. 査読あり
- 6 Matsumura T, Sugawara Y, Yutani M, Amatsu S, Yagita H, Kohda T, Fukuoka S-I, Nakamura Y, Hase K, *Ohno H and *Fujinaga Y. Botulinum toxin A complex exploits intestinal M cells to enter the host and exert neurotoxicity. **Nat. Commun.**, 6: 6255, 2015
- 7 Kimura S, Yamakami-Kimura M, Obata Y, Hase K, Kitamura H, Ohno H, *Iwanaga T. Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches. **Mucosal Immunol.** 8: 650-60, 2015. 査読あり
- 8 Obata Y, Kimura S, Nakato G, Iizuka K, Miyagawa Y, Nakamura Y, Furusawa Y, Sugiyama M, Suzuki K, Ebisawa M, Fujimura Y, Yoshida H, Iwanaga T, *Hase K, *Ohno H. Epithelial-stromal interaction via Notch signaling is essential for the full maturation of gut-associated lymphoid tissues. **EMBO Rep.** 15:1297-304, 2014. 査読あり
- 9 #Obata Y, #Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H and *Hase K. Epigenetic regulator Uhrf1 is critical for functional expansion of colonic regulatory T cells. **Nat. Immunol.** 15: 571-579, 2014. 査読あり
- 10 #Furusawa Y, #Obata Y, #*Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NR, Murakami M, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, #*Hase K & *Ohno H. Commensal microbe-derived butyrate induces colonic regulatory T cells. **Nature** 504: 446-450, 2013. 査読あり
- 11 Atarashi K, Tanoue T, Oshima K,

Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, *Hattori M, *Honda K. Treg induction by a rationally selected Clostridia cocktail from the human microbiota. **Nature** 500: 232-236, 2013. 査読あり

- 12 Hase K, Nakatsu F, Ohmae M, Sugihara K, Shioda N, Takahashi D, Obata Y, Furusawa Y, Fujimura Y, Yamashita T, Fukuda S, Okamoto H, Asano M, Yonemura S and *Ohno H. AP-1B-mediated protein sorting regulates polarity and proliferation of intestinal epithelial cells in mice. **Gastroenterology** 145: 625-635, 2013. 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

1. Hase K, Furusawa Y. and Obata Y. Commensal bacteria shape the intestinal immune system through epigenetic modifications. International Conference of KSMCB. Oct 23, 2014. Seoul, Korea.
2. Hase K, Furusawa Y. and Obata Y. Intestinal microbiota regulates the mucosal immune system through epigenetic modifications. MBSJ Symposium: At the Molecular Crossroad of metabolism & epigenetics. Nov 26, 2014, Yokohama
3. 長谷耕二. 腸内細菌によるエピジェネティクス制御を介した Treg 分化誘導機構の解明. 感染症研究 2014 グローバルネットワークフォーラム. 2104 年 11 月 15 日. 千葉
4. Hase K. Commensal bacteria shape gut immune system through epigenetic modifications. The Fourth International Conference on Regulatory T Cells and Th Subsets and Clinical Application in Human Diseases. Nov 1-4, 2014, Shanghai, China.
5. Hase K. Intestinal microbiota shapes epithelial barriers & gut immune system.

The 87th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Oct 15, 2014, Kyoto.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 耕二 (HASE, Koji)

慶應義塾大学・薬学部・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

三室仁美 (MIMURO Hitomi)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号 : 80396887

古澤之裕 (FURUSAWA Yukihiro)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号 : 80632306

木村俊介 (KIMURA Shunsuke)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 40444525