

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460584

研究課題名(和文) NF- κ B非古典的経路による腸管恒常性維持機構の解明研究課題名(英文) The role of NF- κ B signaling in intestinal homeostasis

研究代表者

金谷 高史 (Takashi, Kanaya)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：20553829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管上皮細胞において古典的NF- κ Bは重要な役割を果たすが、非古典的NF- κ Bの役割は明確ではない。申請者はM細胞において非古典的NF- κ Bの活性化が観察されたことを踏まえ、M細胞における非古典的NF- κ Bの役割を解析した。非古典的NF- κ B転写因子RelBを欠損する腸管上皮細胞ではM細胞を誘導されず、一方でRelB/p52の強制発現はM細胞分化転写因子Spi-Bの発現を誘導した。またRelBの発現の上流で機能するTRAF6を欠損するマウスではM細胞が消失していた。よってTRAF6を介した非古典的NF- κ BがM細胞分化に必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Canonical NF- κ B is involved in the function of intestinal epithelial cells (IECs), however; the role of noncanonical NF- κ B in IECs has not been well understood. We found that intestinal M cells exhibit prominent RelB nuclear translocation, which is a marker of noncanonical NF- κ B activation. Based on this we evaluated the significance of RelB in M cell development. Organoids established from RelB-deficient mouse could not give rise to M cell upon RANKL administration, suggesting the essential role of noncanonical NF- κ B in M cell development. In addition, we evaluated the role of TRAF6, which is essential regulator of RANKL-RANK-mediated NF- κ B activation. As we expected, TRAF6-deficient mice exhibited M cell loss in Peyer's patches. Consistent with this, IgA responses to pathogenic bacterial infection were significantly decreased in TRAF6-deficient mice compared to control mice. Our study demonstrates that TRAF6-mediated noncanonical NF- κ B is essential for M cell development.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：noncanonical NF- κ B RelB M cell Peyer's patch TRAF6 Salmonella typhimulium IgA

1. 研究開始当初の背景

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) ファミリー転写因子によって構成されるシグナル伝達経路は様々な生体内反応を調節している。この NF- κ B シグナル伝達経路には古典的経路と非古典的経路の2つの経路が存在する。古典的経路によって活性化される転写因子複合体 p50/RelA は炎症性サイトカイン産生をはじめとする速やかな生体反応に寄与する。一方で非古典的経路によって活性化される p52/RelB は持続的なシグナルを必要とするリンパ節形成や細胞分化を制御する。これまで腸管上皮細胞の機能や分化において古典的 NF- κ B は重要な役割を果たすことが知られるが、非古典的 NF- κ B の腸管上皮細胞における役割は明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者は研究準備段階において非古典的 NF- κ B 活性化の指標となる RelB の核内移行を腸管各部位の上皮細胞において調べ、パイエル板、孤立リンパ小節、盲腸の cecal patch や大腸の colonic patch の濾胞随伴上皮細胞 (follicle-associated epithelium: FAE) において RelB の核内移行が見られることを見出した。FAE にはパイエル板への抗原取り込みを行う M 細胞が存在しており、RelB の核内移行は M 細胞において顕著であった。本研究では M 細胞を含む FAE 形成における非古典的 NF- κ B の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) RelB 欠損マウスからのオルガノイドの作製: RelB の M 細胞分化における役割を明らかにするため、RelB 欠損マウスを用いた。しかしながら RelB 欠損マウスはパイエル板を完全に欠損するため、パイエル板 FAE や M 細胞の分化における RelB の役割を評価できない。そこで RelB 欠損マウスより小腸上皮幹細胞のオルガノイドを作製し、作製したオルガノイドを RANKL で刺激し M 細胞誘導を行った。

(2) オルガノイドへの NF- κ B 転写因子の導入: オルガノイドへ NF- κ B 転写因子、RelB/p52 を導入し、NF- κ B 非古典的経路が M 細胞を誘導するか評価した。また RelA/p50 のオルガノイドへの導入も行い、NF- κ B 古典的経路の役割を評価した。

(3) 各種 NF- κ B シグナル伝達分子欠損マウスにおける M 細胞形成の評価: 上述の通り、RelB 欠損マウスはパイエル板を欠損するため、パイエル板 M 細胞形成を評価することができない。RelB 以外の各種 NF- κ B シグナル伝達分子欠損マウスにおいても様々な異常が個体に現れる。そこで腸管上皮細胞特異的に NF- κ B シグナル伝達分子を研究に用いた。FAE を分離し、M 細胞関連遺伝子の定量解析、免疫染色による M 細胞マーカー

分子の発現解析、蛍光ビーズを経口投与による M 細胞機能の評価、M 細胞から取り込まれる病原性細菌のパイエル板への取り込みの定量およびそれらの病原性細菌に対する免疫応答の評価を行った。

4. 研究成果

(1) RelB は M 細胞分化に必須である: RelB 欠損マウスより作製したオルガノイドを RANKL で刺激することで M 細胞を誘導したところ、M 細胞マーカー遺伝子である Gp2 の発現が誘導されなかった。よって RelB は M 細胞形成に必須であるといえる。一方で Spib など M 細胞分化の早期から発現するマーカーの発現が若干誘導されたことから、RANKL 刺激のよって活性化される別の転写因子がこれらの発現に寄与している可能性が示唆される。

(2) p52/RelB の強制発現は Spib の発現を誘導する: 野生型マウスより作製したオルガノイドへレンチウイルスを用いて p52/RelB を導入し、M 細胞マーカーの発現を解析したところ、M 細胞分化に必須である転写因子 Spib の発現が有意に増加した。また、レポーターアッセイにより p52/RelB が Spib プロモーター領域に結合することが明らかとなった。よって p52/RelB は Spib の発現を直接的に誘導することが明らかとなった (図.1)。

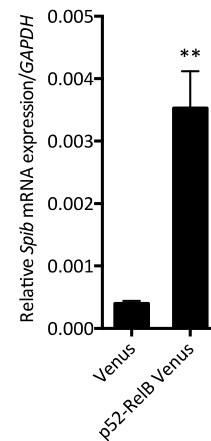


図.1 RelB/p52 は Spib を誘導する。

(3) TRAF ファミリー分子は M 細胞分化に重要である: RANKL-RANK が NF- κ B シグナルを活性化させるためには TRAF6 と呼ばれる分子が必要であること、また RelB の発現は TRAF6 を介した NF- κ B シグナルによって誘導されることが報告されている。そこで M 細胞分化における TRAF6 の役割を解析した。TRAF6 欠損マウスは骨形成やリンパ節形成に異常が見られるため、生後 2-3 週間ほどで死亡する。そこで腸管上皮細胞特異的に TRAF6 を欠損するマウス (TRAF6 IEC-KO) を研究に用いた。TRAF6 IEC-KO マウスの FAE では RelB の核内移行が消失し、M 細胞マーカーの発現も消失していた (図.2)。走査電子顕微鏡観察により、M 細胞様の形態を有する細胞

が認められたが、TRAF6IEC-KO マウスパイエル板ではサルモネラやエルシニアなどの病原性細菌の取り込みが著しく減少していたことから、これらの細胞は機能的な M 細胞では無いと考えられる。

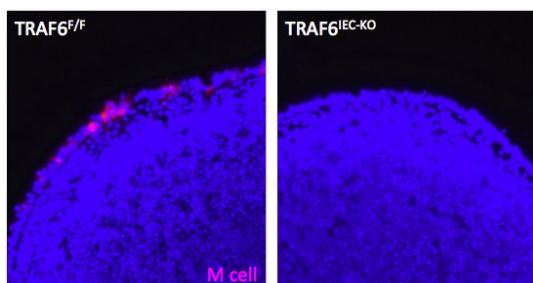


図.2 TRAF6IEC-KO マウスでは GP2+M 細胞が消失する。

一方で NF- κ B 非古典的経路の抑制分子である TRAF3 に着目した。TRAF3 を欠損すると B リンパ球の分化が亢進し、その数が増加することが報告されていることから、TRAF3 欠損かにおいて M 細胞が増加する可能性があると考え、TRAF3IEC-KO マウスにおける M 細胞分化における役割を解析した。しかしながら TRAF3IEC-KO マウスにおいて M 細胞数の増加は認められなかった。

(4) TRAF6IEC-KO マウスでは病原性細菌に対する IgA 抗体の産生が減弱する：上記の通り、TRAF6IEC-KO マウスは M 細胞を欠損する。そこで TRAF6IEC-KO マウスにサルモネラやエルシニアなどの病原性細菌を経口投与し、これらに対する特異的な IgA 抗体の産生を調べたところ、TRAF6IEC-KO マウスにおいて IgA 産生が有意に減少することが確認された。この結果 TRAF6IEC-KO マウスでは M 細胞欠損により、M 細胞を介してパイエル板に取り込まれる病原性細菌に対する免疫応答が減弱することが明らかとなった。

本研究の成果により、腸管上皮細胞における NF- κ B 非古典的経路がパイエル板 M 細胞の分化を制御することで病原性細菌に対する腸管免疫応答に寄与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 2 件)

Toshi Jinnohara*, Takashi Kanaya*, Koji Hase, Sayuri Sakakibara, Tamotsu Kato, Naoko Tachibana, Takaharu Sasaki, Yusuke Hashimoto, Toshiro Sato, Hiroshi Watarai, Jun Kunisawa, Naoko Shibata, Ifor R Williams, Hiroshi Kiyono, and Hiroshi Ohno

IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. *Journal of Experimental Medicine*, 2017, Epub ahead of print. *equal contribution. 査読有り

Chikako Shimokawa, Takashi Kanaya, Masami Hachisuka, Kenji Ishiwata, Hajime Hisaeda, Yosuke Kurashima, Hiroshi Kiyono, Tomohiro Yoshimoto, Tsuneyasu Kaisho, Hiroshi Ohno. Mast Cells Are Crucial for Induction of Group 2 Innate Lymphoid Cells and Clearance of Helminth Infections. *Immunity* 2017 46(5):863-874. 査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

金谷高史、榊原小百合、大野博司、腸管 M 細胞における NF- κ B の役割、第 68 回細胞生物学会 (ポスター発表) 2016 年 6 月 15-17 日、京都府京都市 京都テレサ

〔図書〕(計 2 件)

Kendle Maslowski、金谷高史、大野博司、科学評論社、臨床免疫・アレルギー科、2016、300 (294-300)。
金谷高史、大野博司、腸管上皮細胞と生体防御、羊土社、実験医学増刊 生体バリア 粘膜や皮膚を舞台とした健康と疾患のダイナミクス、2017、227 (14-18)。

〔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.riken.jp/research/labs/ims/i>

ntest_ecosys/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金谷 高史 (KANAYA TAKASHI)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医

科学研究センター・研究員

研究者番号：20553829