

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23842

研究課題名（和文）M細胞の抗原取り込みにおける新規同定輸送関連分子による制御機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of antigen transcytosis by M cells mediated by a novel identified M-cell specific molecule.

研究代表者

小林 伸英 (Nobuhide, Kobayashi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：30712799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：M細胞は粘膜リンパ組織を覆う上皮に存在し、管腔内抗原をトランスサイトーシスし、免疫応答を誘導する。一方、M細胞はボツリヌス毒素などの病原因子の侵入経路ともなっている。しかしながら、トランスサイトーシスの分子機構には不明な点が多い。本研究では、M細胞に高発現するPleckstrin homologyドメイン含有分子（以下M-Plek）に着目し、M-Plek欠損マウスを解析した。その結果、M-Plek欠損マウスは野生型に比べボツリヌス毒素に対し高い感受性を示した。また、トランスサイトーシスを定量的に評価するために、単層培養した腸オルガノイドにM細胞を誘導し、物質の透過性を測定する系を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

M細胞による抗原輸送の分子機構には不明な点が多く、その解明は粘膜ワクチンなどへの応用に直結する。本研究で開発した単層培養オルガノイドにM細胞を誘導しトランスサイトーシス機能を定量的に評価する実験系は、M細胞トランスサイトーシスの分子機構の解明に有用なツールであると考えられる。今後、本実験系を用いてM-Plekやその他の輸送関連分子の寄与を解析する。また、本研究の結果、M-Plekはボツリヌス毒素に対して防御的に機能することが示唆された。今後詳細なメカニズムを解明することでボツリヌス症発症機構の解明にも寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：M cells are specialized epithelial cells covered on the surface of mucosal lymphoid tissues, and transcytose intraluminal antigens to induce immune responses. On the other hand, M cells also serve as a route of entry for pathogenic agents such as botulinum toxin. However, the molecular mechanism of transcytosis by M cells remains unclear. In this study, we focused on a Pleckstrin homology domain-containing molecule (M-Plek), which is highly expressed in M cells. M-Plek-deficient mice were more sensitive to botulinum toxin than wild-type mice. In addition, we developed in vitro M-cell culture system using monolayer-cultured intestinal organoids to quantify transcytosis activity.

研究分野：免疫学

キーワード：M細胞 樹状細胞 ボツリヌス毒素

1. 研究開始当初の背景

消化管などを覆う粘膜面は共生細菌や食事由来の抗原の侵入を防ぐため、高度なバリア機能を有している。このため、通常はバリアを突破して体内に異物が侵入することは少ない。一方で、適切な免疫応答を誘導するために、積極的に管腔内抗原を取り込む機構が存在する。M 細胞は小腸パイエル板などのリンパ濾胞を覆う上皮に存在し、細菌などの抗原を取り込み直下の免疫細胞へと受け渡すこと(トランスサイトーシス)で、分泌型 IgA の産生といった免疫応答に重要な役割を果たしている¹。一方で、サルモネラ菌やボツリヌス毒素などの病原因子が侵入する際の門戸としても M 細胞は利用されている。すなわち、M 細胞は免疫応答の誘導による生体防御と、病原因子の侵入経路という二面性を有する諸刃の剣と言える。したがって、M 細胞による抗原取り込み機構を明らかにすることは、粘膜免疫および経粘膜感染症に理解において極めて重要な課題である。しかしながら、M 細胞によるトランスサイトーシスの分子機構については未だほとんど明らかにされていない。

申請者は、M 細胞のトランスクリプトーム情報の解析により、M 細胞に高発現する輸送関連候補遺伝子として M-Plek を同定した。M-Plek は膜輸送などに関与するホスホイノシチドに結合する PH ドメインを有しており、M 細胞特異的な発現が認められた。しかしながら、M-Plek の分子機能および生体での役割は全く不明であった。そこでまず、M-Plek 遺伝子をクローニングし、培養細胞に発現させて細胞内局在を解析した。その結果、M-Plek は細胞膜ならびにアクチン骨格との共局在が認められ、C 末端領域がアクチン骨格との相互作用の責任部位であった。さらに、M-Plek の PH ドメインのリコンビナントタンパク質を作製し、特異的に結合するホスホイノシチドの同定を試みたところ、PI(3,4)P2 および PI(3,4,5)P3 に結合することが明らかになった。PI(3,4,5)P3 は細胞膜への局在、PI(3,4)P2 はアクチン骨格制御を介し種々のエンドサイトーシス経路に寄与すると考えられている。そこで、M-Plek を強制発現させた培養細胞でデキストランの取り込み量を検討したところ、マクロピノサイトーシスによって取り込まれる 70 kDa デキストランの取り込みの顕著な促進が認められた。このことから、M-Plek が M 細胞トランスサイトーシスを制御する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、M 細胞特異的に発現する遺伝子から細胞内輸送に関連する分子を同定し、その生理的意義を解明することを目的とし、M-Plek 遺伝子欠損マウスを用い、M 細胞の輸送系における M-Plek の役割と、粘膜免疫と病原因子侵入における意義を解明する。

3. 研究の方法

申請者によるこれまでの研究により、M-Plek はアクチン骨格制御を介した膜変形により、可溶性分子のマクロピノサイトーシスに寄与することが示唆されている。マクロピノサイトーシスは、細胞膜が変形して大量の細胞外液ごと比較的大きな可溶性分子を取り込む機構であり、分子量 70 kDa 以上のデキストランの取り込みが指標となる。そこで本研究では、可溶性分子の取り込みの検出系としてボツリヌス毒素に着目した。ボツリヌス毒素は複合体として産生され、L 毒素(L-PTC、500 kDa)はボツリヌス神経毒素、無毒成分、Hemagglutinin (HA)から構成される。L-PTC は HA が M 細胞特異的に発現する受容体 GP2 に結合することで体内に取り込まれるが、HA を持たず細胞付着性がない M 毒素(M-PTC、300 kDa)は取り込み経路が不明である。そこで、本研究では L-PTC および M-PTC を M-Plek 欠損マウスに経口投与し、食餌性ボツリヌス症の感受性を比較検討する。ボツリヌス毒素は極めて致死性が高く、経口投与による死亡率という形で高感度に取り込みへの影響を検出することが可能である。

4. 研究成果

M-Plek 欠損マウスに A 型 L-PTC 及び B 型 M-PTC を経口投与し、ボツリヌス症の発症をコントロールマウスと比較した。その結果、L-PTC では有意差な差が見られなかったが、M-PTC の経口投与で M-Plek 欠損マウスにおいて生存率が有意に低下した。すなわち、予想に反し、M-Plek 欠損によって毒素吸収が亢進していると考えられた。この要因として、M-Plek 欠損によって(M 細胞の形態異常や粘膜免疫系の異常により)腸管バリア機能が低下している、または M-Plek 欠損によって M 細胞の抗原取り込みが促進されることが考えられた。そこで、経口投与した蛍光標識デキストランの血中移行を測定したところ、コントロールマウスと差は見られなかった。すなわち、M-Plek 欠損マウスの腸管バリア機能は維持されていた。また、ホールマウント染色においてパイエル板 M 細胞の形態に異常は認められず、蛍光標識デキストランの細胞内取り込みにも顕著な差は見られなかった。このことから、毒素が腸管から吸収された後のプロセスに、ボツリヌス症が増悪する要因があることが示唆された。

M 細胞から取り込まれたボツリヌス毒素は粘膜固有層に存在する樹状細胞との共局在が確認されている。M-Plek は成熟樹状細胞においても発現が認められ、今回用いたマウスが全身欠損であることから、M 細胞以外の樹状細胞等の細胞がボツリヌス症の悪化に寄与している可能性が

考えられた。そこで、M-Plek 欠損マウスから骨髄細胞を単離し、成熟樹状細胞を分化誘導したところ、野生型と比較してサイトカイン遺伝子の発現に異常が認められた。このことから、M-Plek 欠損マウスでは成熟樹状細胞の機能が破綻している可能性が示唆された。ボツリヌス毒素が上皮バリアを突破したのち、その毒性の標的となる神経細胞に至るまでにおける他の細胞の影響は未知である。今後、Plekhs1 依存的な樹状細胞の機能を明らかにすることで、ボツリヌス症発症に至るメカニズムの解明につながると考えられる。

M 細胞トランスサイトーシスにおける M-Plek の機能を明らかにするため、腸管オルガノイドを単層培養し、M 細胞を分化誘導することでトランスサイトーシスを定量的に評価する系の構築を試みた。上皮バリアの指標となる経上皮電気抵抗値 (TEER) は大腸オルガノイドで $400 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ 程度の報告が多い。これに対し、所属研究室が Caco-2 等の cell line の単層培養系で培った技術を応用することで、小腸オルガノイドの単層培養で最大 $700 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ 、大腸オルガノイドで最大 $2600 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ 程度の高い TEER 値を得る事ができた。さらに、単層培養したオルガノイドに M 細胞分化を誘導するサイトカインである RANKL を添加し、上層に添加した蛍光標識デキストランの下層へのトランスサイトーシスを測定する系を開発した。本実験系は、M 細胞のトランスサイトーシス機能を定量的に評価する際に有用なツールであると考えられる。

<引用文献>

1. Kobayashi, N., Takahashi, D., Takano, S., Kimura, S. & Hase, K. The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology* 10, 2345 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kobayashi Nobuhide, Takahashi Daisuke, Takano Shunsuke, Kimura Shunsuke, Hase Koji	4. 巻 10
2. 論文標題 The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.02345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Shunsuke, Nakamura Yutaka, Kobayashi Nobuhide, Shiroguchi Katsuyuki, Kawakami Eiryō, Mutoh Mami, Takahashi-Iwanaga Hiromi, Yamada Takahiro, Hisamoto Meri, Nakamura Midori, Udagawa Nobuyuki, Sato Shintaro, Kaisho Tsuneyasu, Iwanaga Toshihiko, Hase Koji	4. 巻 11
2. 論文標題 Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13883-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林伸英
2. 発表標題 M細胞による抗原取り込みと細菌毒素の腸管バリア突破機構
3. 学会等名 2019年度北陸腸内細菌研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------