

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460261

研究課題名(和文) 新しいホールマウント染色法による小腸パイエル板上皮と陰窩の発現分子解析

研究課題名(英文) Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches.

研究代表者

木村 俊介 (Kimura, Shunsuke)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40444525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜組織の各部位に存在するリンパ濾胞は管腔内の抗原に対するIgA抗体を産生し、粘膜免疫応答の主要となるリンパ性器官である。リンパ濾胞上皮に存在するM細胞は異物を取込むことで、粘膜免疫応答の開始に働く特殊な上皮細胞である。

我々は濾胞上皮のホールマウント染色法を開発し、成熟M細胞と未成熟M細胞の可視化に成功した。そして、転写因子RelBの活性がM細胞の分化に必須であったことから、RelB活性の制御がM細胞成熟に重要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The microfold (M) cell residing in the follicle-associated epithelium (FAE) is a specialized epithelial cell that initiates mucosal immune responses by sampling luminal antigens. The differentiation process of M cells remains unclear due to limitations of analytical methods. Here we found that M cells were classified into two functionally different subtypes based on the expression of Glycoprotein 2 (GP2) by newly developed image cytometric analysis. GP2-high M cells actively took up luminal microbeads whereas GP2-negative or low cells scarcely ingested them, suggesting that GP2-high M cells represent functionally mature M cells. Further, the GP2-high mature M cells were abundant in Peyer's patch but sparse in the cecal patch: this was most likely due to a decrease in the nuclear translocation of RelB, a downstream transcription factor for the receptor activator of NF- $\kappa$ B signaling.

研究分野：組織細胞学

キーワード：パイエル板 濾胞上皮

### 1. 研究開始当初の背景

消化器や呼吸器を覆う粘膜組織は口と鼻を通じて外界とつながっていることから、抗原物質となる異物が多量に存在している。そのため、生体は免疫システムを高度に発達させることで恒常性の維持に務めている。

体内で最も多い数の免疫細胞が常駐する腸管では、管腔内に多量の IgA を保有することで腸内環境のバランスを保っている。この粘膜免疫応答機構の中核を担うのが小腸の集合リンパ小節、パイエル板である。

パイエル板をおおう濾胞上皮(FAE)に存在する M 細胞は管腔内の抗原取込みを行い、粘膜免疫応答の開始に重要な役割を果たす細胞である。この細胞は特徴的な構造を持っており、他の腸管上皮と比較して管腔側の糖衣が薄く、異物(抗原)の取り込みに適した形状を持つ。このような M 細胞の特徴は逆に言えば、微生物の侵入を受けやすい構造であり、実際にサルモネラ菌などの食中毒菌は M 細胞から侵入しやすいことが指摘されている。そのため、粘膜組織における M 細胞の数は厳密に制御される必要がある。

腸管における M 細胞は他の腸上皮細胞と同様に陰窩の幹細胞から出現する。近年、幹細胞分子マーカーの発見によって絨毛上皮細胞の分化過程の解明が急速に進んでいる。しかしながら、M 細胞の分化と成熟機構、及びその制御機構にはまだまだ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

- ① M 細胞成熟過程における発現分子の同定と発現変動を解析する。これによって、分子マーカーによる M 細胞の成熟段階の可視化を目指す。
- ② 濾胞上皮陰窩で発現する分子を見出す。これによって M 細胞分化に働く分子を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) FAE ホールマウント法

本研究計画では従来の組織切片による解析方法に加えて、申請者が開発した FAE ホールマウント法を用いた。本方法では上皮層を EDTA 処理によって剥離しシート状にしてから免疫組織染色(IHC)もしくは蛍光 *in situ* hybridization(FISH)を行い、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行う(図 1)。この方法によって組織切片では困難な陰窩部とドーム全体の観察を同時に行うことを可能にしている。従来のパイエル板全体(リンパ小節や固有層を含んでいる)を染色するホールマウント法で問題となる抗体やプローブの試料への浸透性の低さと染色ムラが改善され、薄い試料とすることで組織からの自家蛍光が改善される。これにより、再現性の高い結果が得られる。さらに、顕微鏡観察時に試料をカバーガラスに密着できるため、高倍率対物レンズの性能を十分に発揮でき、解像度の高

い画像を得ることができる。

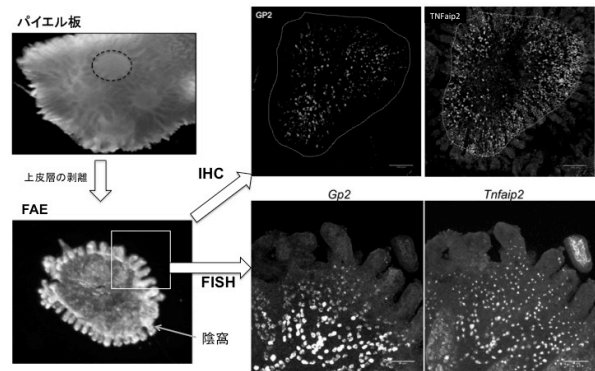


図 1 FAE ホールマウント法

#### (2) M 細胞発現分子

研究開始当初 M 細胞を含む試料の発現分子の DNA マイクロアレイデータとして、FAE(DNA Res. 2005 12:127)、RANKL 誘導 絨毛 M 細胞(Nat. Immunol. 2012 13:729)、RANKL 処理オルガノイド(Mol. Cell Biol. 2012 32:3639)が公表されていた。これらの 3 つの異なるアレイデータを解析し共通する分子を M 細胞発現分子として解析を行った。本研究では Glycoprotein 2(GP2), Tnfaip2, Spib, Anxa5, Pglyrp2, Ccl9 についての解析を行った。

#### (3) 免疫組織染色

##### ・抗体

Tnfaip2 に対する特異的抗体を作製した。全長の Tnfaip2 タンパク質とタグタンパク質としての GST の融合蛋白質 GST-Tnfaip2 の発現ベクターを構築し、大腸菌へとトランスフォーメーション後、GST と結合するグルタチオンを用いて精製した。GST-Tnfaip2 は Thrombin をプロテアーゼ処理によって GST を除去した後に、ウサギへと免疫を行った。隔週で 2 ヶ月間の免疫後に血清を採取し、Tnfaip2 抗血清を得た。抗血清から GST-Tnfaip2 へと結合する特異抗体のみを精製し本研究に用いた。

Glycoprotein 2(GP2) (MBL 社)、Spib(R&D 社)、CCL9 (R&D 社)、Relb(SantaCruz 社)に対する抗体は各自市販されている物を用いた。

##### ・免疫組織染色

BALB/c、C57BL/6 系統マウスを安楽死後、腸管を採取しパイエル板を切除、上記のホールマウント法によって FAE を分離した後に、4% パラホルムアルデヒドによって固定、免疫組織染色を行った。

(4) Fluorescent in situ hybridization QuantiGene ViewRNA Assays (Affymetrix 社)を用いて Gp2, Tnfaip2, Spib, Ccl9, Anxa5, Pglyrp2 の mRNA 発現部位を検討した。各分子に対するオリゴ DNA プローブは Affymetrix 社で合成したものをを用いた。

### 4. 研究成果

本研究によって得られた成果は以下のとおりである。

(1) GP2 陽性細胞は機能的な M 細胞である各 M 細胞発現分子の FAE 上の分布を解析したところ、GP2 が陰窩から離れた濾胞頂上付近で発現していることが明らかになった。対して SpiB、Tnfaip2、Anxa5、Pglyrp2、Ccl19 は陰窩の細胞増殖帯付近からの発現が認められた。これらの分子については in situ hybridization 法によって mRNA の発現部位が同一であることを確認している。

そこで、GP2 と Tnfaip2 による多重免疫染色を行い、GP2 陽性 M 細胞 (Tnfaip2 陽性、GP2 陽性) と GP2 陰性 (Tnfaip2 陽性、GP2 陰性) 細胞における、管腔内へと投与した蛍光ラテックスビーズの取り込み効率を測定した (図 2)。その結果 GP2 陽性細胞は陰性細胞に比べてラテックスビーズの取り込み効率が高いことが明らかになった。GP2 の発現が陰窩から離れた部位から生じることから考えて、GP2 陽性細胞はより成熟の進んだ機能的な M 細胞であると考えられた。

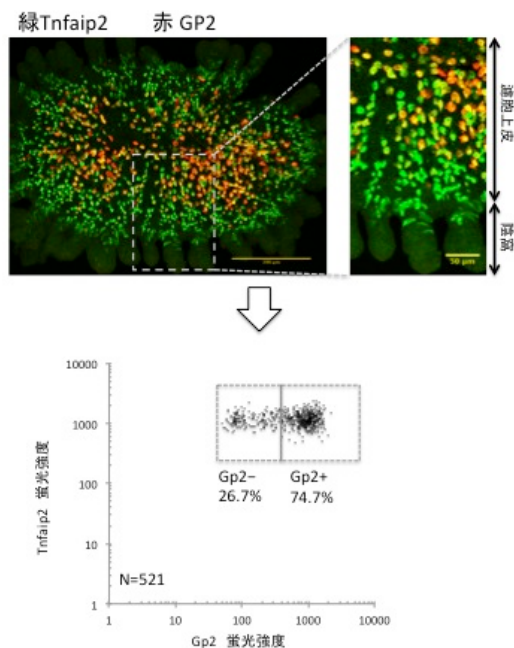


図 2 Tnfaip2 と GP2 による M 細胞の分類 (上図) FAE を GP2 (赤)、Tnfaip2 (緑) で染色した。(下図) 得られた画像から各細胞の蛍光強度を計測し、散布図を作製した。図中のドットの一つ一つが細胞一つを示す。GP2 の蛍光強度によって 2 つの細胞集団 (GP2+、GP2-) が存在する。

(2) M 細胞の成熟には転写因子 RelB の活性化必須である。

腸管は細かく分類されており、マウス腸管では十二指腸、回腸、盲腸、結腸に集合リンパ小節が認められる。パイエル板と呼ばれるのは主に回腸の集合リンパ小節である。各部位のリンパ濾胞から濾胞上皮を分離し、GP2、Tnfaip2 によって同様に免疫組織染色を行い GP2 陽性細胞の比率を解析した。

その結果、盲腸の集合リンパ小節では GP2

陽性細胞の割合が著しく低く、そして、管腔内へと投与した蛍光ビーズの取り込み効率もほとんど有していないことが明らかとなった。

次に FAE 陰窩で発現する分子として RelB に着目した。RelB は核内で機能する転写因子である。盲腸と回腸集合リンパ小節を用いて、M 細胞で発現する転写因子 SpiB と RelB の発現を図 2 と同様に解析した。その結果、回腸では SpiB を発現する M 細胞の全てが RelB を発現していたのに対して、盲腸ではその値はおよそ 50% 程度であった。両者とも陰窩では RelB の発現が認められたが、盲腸 FAE では RelB は発現しておらず、盲腸では成熟段階での RelB の活性が低下することで、GP2 陽性細胞の出現が起こらないと想定された。

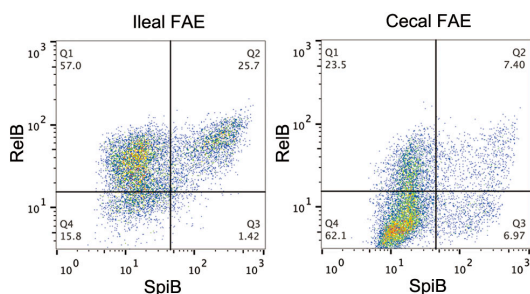


図 3 ホールマウント染色による SpiB 陽性 M 細胞における RelB 核移行の解析 SpiB、RelB 抗体を用いて各濾胞上皮を染色後ここでは細胞核を DAPI によって染色し、DAPI 陽性の核における SpiB、RelB の蛍光強度を測定した。

マウスでは盲腸は摂取した食物の発酵器官として働く。そのため常在菌が最も多く存在している。GP2 陽性細胞が少なく、管腔内物質の摂取を制限することで、過剰な免疫応答が起こらないように制御されているものと想定される。

本研究によって M 細胞の成熟機構を可視化することに成功した。これにより、消化器官の各部位で M 細胞の機能が調節されていることが明らかになった。粘膜免疫の調節としてはリンパ球が主に制御していると考えられていた。本研究成果によって抗原の入り口としての濾胞上皮において、M 細胞の活性制御が抗原取り込み量を調節することで粘膜免疫応答している可能性が示唆される。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Kaji I, Akiba Y, Konno K, Watanabe M, Kimura S, Iwanaga T, Kuri A, Iwamoto KI, Kuwahara A, and Kaunitz JD. Neural FFA3 activation inversely regulates anion secretion evoked by nicotinic ACh receptor activation in rat proximal colon. *J Physiol.* in press, 2016 査読あり doi: 10.1113/JP271441.

- ② Mutoh M, Kimura S, Takahashi-Iwanaga H, Hisamoto M, Iwanaga T and Iida J. RANKL regulates the differentiation of microfold cells in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT). 査読あり  
*Cell Tissue Res.* 364(1):175-84, 2016  
doi: 10.1007/s00441-015-2309-2
- ③ Yajima M, Kimura S, Karaki S, Nio-Kobayashi J, Tsuruta T, Kuwahara A, Yajima T and Iwanaga T. Non-neuronal, but atropine-sensitive ileal contractile responses to short-chain fatty acids: age-dependent desensitization and restoration under inflammatory conditions in mice. 査読あり  
*Physiol Rep.* 4(7). pii: e12759, 2016  
doi: 10.14814/phy2.12759.
- ④ Nakato G, Hase K, Sato T, Kimura S, Sakakibara S, Sugiyama M, Obata Y, Hanazato M, Iwanaga T, and Ohno H. Epithelium-Intrinsic MicroRNAs Contribute to Mucosal Immune Homeostasis by Promoting M-Cell Maturation. 査読あり  
*PLoS One.* 11: e0150379, 2016  
doi: 10.1371/journal.pone.0150379.
- ⑤ Hashimoto M, Bhuyan F, Hiyoshi M, Noyori O, Nasser H, Miyazaki M, Saito T, Kondoh Y, Osada H, Kimura S, Hase K, Ohno H, and Suzu S. Potential Role of the Formation of Tunneling Nanotubes in HIV-1 Spread in Macrophages. 査読あり  
*J Immunol.* 196:1832-41, 2016  
doi: 10.4049/jimmunol.1500845.
- ⑥ Kimura S, Kishimoto A, Muto M, Takahashi-Iwanaga H, and Iwanaga T. GP2-expressing cells in the conjunctiva and tear ducts of mice: identification of a novel type of cells in the squamous stratified epithelium. 査読あり  
*Biomed Res.* 36: 263-272, 2015  
doi: 10.2220/biomedres.36.263.
- ⑦ Nio-Kobayashi J, Kudo M, Sakuragi N, Kimura S, Iwanaga T, Duncan WC. Regulated C-C motif ligand 2 (CCL2) in luteal cells contributes to macrophage infiltration into the human corpus luteum during luteolysis. 査読あり  
*Mol Hum Reprod.* 21(8):645-54, 2015  
doi: 10.1093/molehr/gav028.
- ⑧ Kimura S, Yamakami-Kimura M, Obata Y, Hase K, Kitamura H, Ohno H and Iwanaga T. Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of

their maturation in cecal patches. 査読あり

*Mucosal Immunol.* 8: 650–660, 2015  
doi: 10.1038/mi.2014.99.

- ⑨ 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, and Ohno H. Epithelial-stromal interaction via Notch signaling is essential for the full maturation of gut-associated lymphoid tissues. 査読あり  
*EMBO Rep.* 15:1297-304, 2014  
doi: 10.15252/embr.201438942.
- ⑩ Kimura S, Muto M, Hisamoto M, Zheng M and Iwanaga T. A novel type of cell expressing GP2 in the respiratory epithelium of the paranasal sinuses in mice. 査読あり  
*Biomed Res.* 35:329-37, 2014
- ⑪ Zheng M, Kimura S, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H and Iwanaga T. Three types of macrophagic cells in the mesentery of mice with special reference to LYVE-1-immunoreactive cells. 査読あり  
*Biomed Res.* 35:37-45, 2014

[学会発表] (計 9 件)

- ① 木村 俊介, 武藤 麻未, 岩永 敏彦, Osteoprotegerin による腸管上皮 M 細胞の分化抑制機構とその意義, 第 121 回日本解剖学会総会・全国集会 2016 年 3 月 30 日 ビックパレットふくしま (福島県・郡山市)
- ② 木村 俊介, 武藤 麻未, 岩永 敏彦, RANKL-RANK シグナルによる腸特殊上皮 M 細胞分化制御機構の解明, 第 1 回日本免疫学会ウインターセミナー 2016 年 1 月 28 日-29 日 ホテルマロウド軽井沢 (長野県・軽井沢町)
- ③ 木村 俊介, 武藤 麻未, 岩永 敏彦, 粘膜組織のリンパ濾胞上皮 M 細胞の分化機構の解析, 第 61 回東北・北海道連合支部学術集会, 2015 年 8 月 29 日, 盛岡市観光文化交流センター (岩手県・盛岡市)
- ④ Kimura S, Yamakami-Kimura M, and Iwanaga T, Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015 年 3 月 22 日 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ⑤ Kimura S, Yamakami-Kimura M, and

Iwanaga T, Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

- ⑥ 木村 俊介、木村 恵、岩永 敏彦、腸管濾胞上皮における M 細胞分化と成熟の制御機構の解析、日本解剖学会第 60 回東北・北海道支部学術集会 2014 年 9 月 6 日 福島学院大学 福島駅前キャンパス (福島県・福島市)
- ⑦ 木村 俊介、木村 恵、テイ・ビョウ、岩永 敏彦、新規ホールマウント染色法を用いたパイエル板 M 細胞の分化・成熟過程の可視化、第 119 回日本解剖学会全国学術集会 2014 年 3 月 29 日 自治医科大学 (栃木県・下野市)
- ⑧ 木村 俊介、木村 恵、テイ・ビョウ、岩永 敏彦、発現分子によるパイエル板 M 細胞のサブタイプ解析。日本解剖学会第 59 回東北・北海道支部学術集会 2013 年 9 月 14 日 北海道大学大学院獣医学研究科講義棟講堂 (北海道・札幌市)
- ⑨ Kimura S, Yamakami-Kimura M, Zheng M and Iwanaga T., Multicolor fluorescence imaging of follicle-associated epithelium in wholemount preparations of Peyer's patch., XXIII ISMS 2013 International Symposium on Morphological Science. 2013 年 9 月 10 日-13 日 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター、(新潟県・新潟市)

[その他]

招待講演

- ① 木村 俊介、RANKL-RANK シグナルによる腸特殊上皮 M 細胞分化制御機構の解明、松本歯科大学大学院歯学独立研究科大学院セミナー、2015 年 11 月 12 日、松本歯科大学 (長野県・塩尻市)
- ② 木村 俊介、特殊な腸管上皮細胞 M 細胞にまつわる最近の知見、酪農学園大学大学院セミナー、2015 年 6 月 26 日、酪農学園大学 (北海道・江別市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 俊介 (KIMURA, Shunsuke)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40444525

### (2) 研究協力者

北海道大学・大学院歯学研究科・口腔医学専攻・大学院生

武藤 麻未 (Mutoh, Mami)