

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20113003

研究課題名（和文）上皮細胞極性物流システムによる粘膜免疫制御機構の研究

研究課題名（英文） Regulation of mucosal immunity by polarized trafficking in epithelial cells

研究代表者

大野 博司（OHNO HIROSHI）

独立行政法人理化学研究所・免疫系構築研究チーム・チームリーダー

研究者番号：50233226

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：細胞内ロジスティクス、上皮細胞極性輸送、M細胞、AP-1B、GP2、M-Sec、

1. 研究計画の概要

上皮細胞極性物流システムは、消化器系、呼吸器系などの組織において、体内外の境界を形成する上皮細胞特有の細胞内ロジスティクス機構である。上皮細胞は極性物流システムによって細胞内に“極性”を形成し、体内外という異なる環境の境界面として機能している。研究代表者は科学研究費補助金（特定領域研究〔計画〕、基盤研究〔B〕など）の補助を得て、細胞内輸送因子 AP 複合体の作用機序を世界で初めて報告し (*Science*, 1995)、さらに上皮細胞特異的極性物流システム制御因子 AP-1B を発見し (*FEBS Lett.*, 1999)、その機能を世界に先駆けて明らかにしてきた (*Cell*, 1999; *Mol. Biol. Cell*, 2002)。極性物流システムは細胞極性の形成・維持ばかりでなく、栄養素の吸収や IgA 抗体の分泌など、上皮バリアーを超えての物質輸送をも制御する。さらに研究代表者は、最近樹立した AP-1B 欠損マウスの観察から、極性物流システム不全による上皮細胞の異常増殖や炎症性腸疾患（腸管免疫系のバランス異常）を示唆する知見を得ている。したがって極性物流システムの破綻は、吸収障害や免疫系の破綻のみならず、発癌にもつながる可能性があるが、極性物流システムの個体レベルでの役割は明らかではない。本研究では、①AP-1B 遺伝子欠損マウスの解析、ならびに②研究代表者が最近同定した腸管上皮細胞特異的な物流制御因子 GP-2 および M-sec の構造機能解析や、これらと相互作用する化合物の探索（清水との共同研究）③極性物流のライブイメージ

ング（牧野内との共同研究）などを通じて、極性物流システムの生体高次機能における役割を解明することにより、細胞極性の破綻に起因すると考えられる炎症性腸疾患や癌などの疾患の病態の理解とそれに基づく治療法の開発を目指すとともに、細胞極性に関する専門知識・技術を提供することにより、本領域の推進に貢献する。

2. 研究の進捗状況

（1）AP-1B 欠損マウスの解析

極性を持つ上皮細胞特異的に発現し、測定面細胞膜への極性輸送を制御する輸送因子である AP-1B の個体レベルでの役割を検討するために、AP-1B 欠損マウスの樹立、解析を進めてきた。AP-1B 欠損マウスでは、腸管上皮細胞における膜タンパク質の局在異常とともに、腸管上皮細胞の増殖能の亢進が認められ、本来は増殖性を持つ腸管上皮幹細胞が存在するクリプト底部に留まるべき増殖細胞が広く絨毛上部にまで分布していた。腸管上皮細胞の分布に重要な EphB2 が頂端面細胞膜へと誤輸送されること、細胞増殖を促進する β -カテニンの核移行が有意に亢進していることから、細胞極性の形成・維持と上皮細胞の増殖は密接に関係していることが示唆された（論文投稿中）。

そこで、大腸がん組織における AP-1B 特異的サブユニット μ 1B の発現量を解析した結果、 β -カテニンの核移行が見られず比較的悪性度の低い大腸がんでは μ 1B の遺伝子発現量は非がん部と差は認められなかったのに対し、 β -カテニンの核移行が見られた悪性

度の高い大腸がんにおいては、 μ 1Bの発現量は非がん部と比較して有意に高いことから、 μ 1Bはがんの悪性を制御している可能性が示唆された。

(2) GP2およびM-Secの解析

M細胞特異的に発現するGP2が、大腸菌やサルモネラ菌などのI型線毛を有するグラム陰性腸桿菌の取り込み受容体として機能し、これらの細菌抗原に対する効率的な腸管免疫応答の誘導に必須であることを証明した(Hase, *Nature*, 2009)。

M-Secに関しては、この分子がM細胞以外に樹状細胞やマクロファージといった骨髄系細胞に特異的に発現し、これらの細胞間を繋ぐ細胞膜ナノチューブの形成因子であることを証明した(Hase, *Nat. Cell Biol.*, 2009)。また清水との共同研究で、GP2およびM-sec結合低分子化合物探索のためのGP2、M-secと蛍光タンパク質の融合タンパク質の作成を行い、得られた融合タンパク質を用いてスクリーニングした結果、M-Secに関しては2種類の結合低分子化合物候補が得られた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

上述のように、2つのサブテーマともほぼ順調に結果が得られており、論文発表に至っている。特に(2)については、*Nature*、*Nat. Cell Biol.*というhigh qualityの学術誌に採択されていることから、客観的評価も高いと考える。

4. 今後の研究の推進方策

これまで述べてきたように順調に進展しており、当初の計画通り下記のような計画に基づき推進する。

(1) AP-1B欠損マウス

当該マウスで自然発症する大腸炎の発症機序を解明するために、タイト・ジャンクションの形態や構成分子の発現量、浸潤する免疫担当細胞の種類と数、各種サイトカインや抗菌ペプチド産生量などにつき系統的に解析する。また、腸内細菌叢の組成や数の変化、菌の上皮組織内への移行の有無を調べる。また、家族性大腸ポリポーシスのモデルでえあるApcMinマウスでは μ 1B遺伝子発現の低下が認められるため、蛋白レベルでも発現低下が認められるかをウエスタンブロットにより確認する。低下が認められたら、AP-1B欠損マウスと交配することにより、ApcMinマウスにおけるポリープや大腸癌の出現頻度が上昇するか否か検討する。(神戸大学・吉田優博士との共同研究)。

(2) M細胞の解析

Intravital顕微鏡を用いたM細胞による抗

原取り込みのin vivoリアルタイム観測技術の確立を目指す。GP2に関しては、GP2結合アプタマーとM細胞上に発現するGP2との結合を確認できれば、モデル抗原であるニワトリ卵白アルブミン(OVA)に化学修飾によりGP2結合アプタマーを結合させ、OVA-アプタマーのM細胞への取り込みや、その後のOVA特異的腸管免疫応答誘導能を検討する。M-Secに関しては、結晶構造解析を進めるとともに(東京大学・深井周也博士との共同研究)、そこから得られた情報を元に、M-Secの機能部位の同定を行う。

5. 代表的な研究成果

(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4件)

①Mimura, M., Masuda, A., Nishiumi, S., Kawakami, K., Fujishima, Y., Yoshie, T., Mizuno, S., Miki, I., Ohno, H., Hase, K., Minamoto, T., Azuma, T., Yoshida, M. AP1B plays an important role in intestinal tumorigenesis with the truncating mutation of an APC gene. *Int. J. Cancer* (査読有) in press

②Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* (査読有) 469 (2011) 543-547

③Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S. I., Lowe, A. W., Waguri, S., Itoh, K., Kiyono, H., Ohno, H. Uptake through Glycoprotein 2 of FimH⁺ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* (査読有) 462 (2009) 226-230

④ Hase, K., Kimura, S., Takatsu, H., Ohmae, M., Kawano, S., Kitamura, H., Ito, M., Watarai, H., Hazelet, C. C., Yeaman, C., Ohno, H. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nature Cell Biol.* (査読有) 11 (2009) 1427-1432