

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08836

研究課題名(和文) 特殊上皮細胞、M細胞の抗原取り込み機能の包括的理解

研究課題名(英文) Comprehensive understanding of M cells, unique intestinal epithelial cells specialized for luminal particulate antigen uptake

研究代表者

佐藤 慎太郎 (Sato, Shintaro)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授(常勤)

研究者番号：80447333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新たに同定したM細胞特異的発現遺伝子群の1つであるAif1のM細胞における機能を詳細に解析した。Aif1の発現は腸管上皮細胞系列ではM細胞に特異的であり、かつSpi-Bに依存していることを確認した。Aif1欠損マウスを作出し、そのin vivoにおける機能を解析したところ、Aif1欠損マウスでは、人工粒子や腸内細菌の一種である乳酸菌群、さらに病原性細菌であるエルシニアの取り込みが顕著に減少していた。以上の結果は、M細胞による抗原取り込みにはM細胞中でAif1が発現し機能することが重要であることを示している。その他の候補分子に関しても継続して解析していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果として、M細胞の機能発現に直接関わる分子としてAif1を同定し、M細胞におけるその機能、分子メカニズムを世界に先駆けて報告した。Aif1はM細胞の外来抗原取り込み能に直接関与していることから、Aif1の機能を調節することが出来れば、食物抗原やアレルゲン、病原性微生物の侵入を一過性にコントロールすることが可能となる。したがって、Aif1をターゲットとした薬剤の開発は、効果的な経口粘膜免疫寛容の誘導や腸管感染症の予防につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We show that mouse allograft inflammatory factor 1 (Aif1) is expressed by M cells and contributes to M-cell transcytosis. FAE in Aif1^{-/-} mice has suppressed uptake of particles and commensal bacteria, compared with wild-type mice. Translocation of *Yersinia enterocolitica*, but not of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, leading to the generation of antigen-specific IgA antibodies, is also diminished in Aif1-deficient mice. Although α 1 integrin, which acts as a receptor for *Y. enterocolitica* via invasin protein, is expressed on the apical surface membranes of M cells, its active form is rarely found in Aif1^{-/-} mice. These findings show that Aif1 is important for bacterial and particle transcytosis in M cells.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：粘膜免疫 M細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外来抗原の取り込み・侵入門戸は、腸管におけるパイエル板や呼吸器における鼻咽頭関連リンパ組織などの粘膜系リンパ組織を覆う特殊上皮層（濾胞関連上皮細胞層：FAE）に存在する M 細胞が主に担っていると考えられている。近年、転写因子 Spi-B が M 細胞分化を制御しているという報告が、申請者らを含む 3 つのグループから相次いで報告された (Sato, S., et al. *Mucosal Immunol.* 6:838, 2013.; Kanaya, T., et al., *Nat. Immunol.* 13:729, 2012.; de Law, W., et al., *Mol. Cell. Biol.* 32:3639, 2012.)。Spi-B 欠損マウスの FAE 上では M 細胞の形態学的特徴や特異的表面マーカーの欠落が認められる。さらに、病原性微生物であるサルモネラ菌やエルシニア菌の経口感染において、それらの菌のパイエル板内への取り込みが野生型と比較して有意に減少していることから、Spi-B 欠損マウスでは機能的にも M 細胞を欠損していると言える。しかし、依然として M 細胞の分化・機能発現に直接関わる分子群のほとんどが明らかにされておらず、包括的な M 細胞の理解にはまだまだ多くの解決すべき問題が残されている。

2. 研究の目的

申請者がこれまでに同定した新規 M 細胞特異的発現分子の *in vivo* 機能解析を、それぞれの分子を欠損するマウスを用いて進める。また、申請者が樹立した Marcksl1-GFP マウスを用い、M 細胞を GFP 陽性細胞として、それ以外の細胞を GFP 陰性細胞としてセルソーティングにより調整する。これらの細胞集団における遺伝子発現プロファイルを比較・解析することで、M 細胞特異的遺伝子群の同定を継続する。

3. 研究の方法

申請者によって樹立された Marcksl1-GFP マウスからパイエル板上皮細胞を調整し、リンパ球マーカーである CD45 陰性の GFP 陽性細胞を、M 細胞への分化刺激を受けた上皮細胞としてセルソーターで分取する。約 10 万個の細胞を 1 ロットとして集め、そこから total RNA を調整し、DNA マイクロアレイのサンプルとする。得られたデータを比較し、変化の大きい候補遺伝子のうち、細胞膜表面上に発現する分子や、糖転移酵素、アクチン重合に関わる分子をコードしているものを中心に、定量的 PCR によって発現変動を確認する。

同定した分子のパイエル板での局在を確認するために、市販抗体を用いた免疫染色、もしくは *in situ* hybridization を行う。また、コンベンショナルな Spi-B 欠損マウスを用いて、当該分子の発現が Spi-B 依存的であることを確認する。

M 細胞における特異的発現が確認された分子に関しては、ノックアウトマウスを入手または腸管上皮細胞特異的欠損マウスの作製を行う。これらのマウスを用いて、蛍光標識微粒子や GFP 発現サルモネラ等の各種細菌を用い、FAE での抗原取り込み能力をコントロールマウスと比較することで *in vivo* における M 細胞の機能解析を行う。

4. 研究成果

新たに同定した M 細胞特異的発現遺伝子群の 1 つである、allograft inflammatory factor 1 (Aif1) の M 細胞における機能を詳細に解析した。

リアルタイム PCR、免疫染色の結果から、Aif1 の発現は腸管上皮細胞系列では M 細胞に特異的であり、かつ Spi-B に依存していることを確認した。そこで次に、Aif1 の生体内での機能を詳細に解析するために、Aif1 欠損マウスを作製した。抗原取り込み能を比較するために、蛍光標識されたビーズもしくは腸内細菌の一種である *Lactobacillus reuteri* を経口投与し、FAE 層やパイエル板内に取り込まれたビーズ、および菌を計測したところ、Aif1 欠損マウスではどちらの取り込みも有意に減少していた。次に、腸管病原性細菌としてサルモネラとエルシニアの取り込み実験を行ったところ、Aif1 欠損マウスに於いては、エルシニアの取り込みが顕著に減少していた。

Aif1 は、マクロファージや樹状細胞などの物質の貪食に関わる細胞で強く発現していることが報告されていることから、Aif1 欠損マウスで抗原の取り込みが減弱している理由として、これらの細胞群による貪食能が弱まった結果である可能性があった。そこで、Aif1 欠損マウスに野生型の骨髄を移植して（また、それとは逆のマウスを作製して）同様の解析を行った。その結果、野生型マウスは Aif1 欠損マウス由来の骨髄を移植されても、物質の取り込みが認められた。逆に Aif1 欠損マウスは野生型由来の骨髄を移植しても、物質の取り込みが改善するはなかった。これらの結果は、抗原の取り込みには M 細胞中で Aif1 が発現し機能することが重要であることを示している。

宿主側のエルシニアタンパク受容体として α 1 インテグリンが知られているが、免疫染色による実験から、Aif1 欠損マウスの M 細胞上では α 1 インテグリンの活性化が起こっていないことが明らかとなった。

以上の結果から、Aif1 は M 細胞に於いて、抗原取り込みの際のアクチン重合および α 1 インテグリンの活性化に重要であることが示唆された。

その他の候補分子に関しては遺伝子改変マウスの作出は完了しており、今後も継続して解析していく予定である。

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 9 件 : すべて査読有り)

- 1) Kimura S, Kobayashi N, Nakamura Y, Kanaya T, Takahashi D, Fujiki R, Mutoh M, Obata Y, Iwanaga T, Nakagawa T, Kato N, **Sato S**, Kaisho T, Ohno H, Hase K.
Sox8 is essential for M cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice.
J Exp Med. 2019 Mar 15. pii: jem.20181604. doi: 10.1084/jem.20181604. [Epub ahead of print]
- 2) **Sato S (Corresponding)**, Hisaie K, Kurokawa S, Suzuki A, Sakon N, Uchida Y, Yuki Y, Kiyono H.
Human norovirus propagation in human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial cells.
Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol. 2019;7(3):686-688.e5. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.11.001.
- 3) Murase M, Kawasaki T, Hakozaki R, Sueyoshi T, Putri DDP, Kitai Y, **Sato S**, Ikawa M, Kawai T.
Intravesicular Acidification Regulates Lipopolysaccharide Inflammation and Tolerance through TLR4 Trafficking.
J Immunol. 2018 Apr 15;200(8):2798-2808. doi: 10.4049/jimmunol.1701390.
- 4) Takemura N, Kurashima Y, Mori Y, Okada K, Ogino T, Osawa H, Matsuno H, Aayam L, Kaneto S, Park EJ, **Sato S**, Matsunaga K, Tamura Y, Ouchi Y, Kumagai Y, Kobayashi D, Suzuki Y, Yoshioka Y, Nishimura J, Mori M, Ishii KJ, Rothenberg ME, Kiyono H, Akira S, Uematsu S.
Eosinophil depletion suppresses radiation-induced small intestinal fibrosis.
Sci Transl Med. 2018 Feb 21;10(429). pii: eaan0333. doi: 10.1126/scitranslmed.aan0333.
- 5) Shibata N, Kunisawa J, Hosomi K, Fujimoto Y, Mizote K, Kitayama N, Shimoyama A, Mimuro H, **Sato S**, Kishishita N, Ishii KJ, Fukase K, Kiyono H.
Lymphoid tissue-resident Alcaligenes LPS induces IgA production without excessive inflammatory responses via weak TLR4 agonist activity.
Mucosal Immunol. 2018 May;11(3):693-702. doi: 10.1038/mi.2017.103.
- 6) Niimi K, Usami K, Fujita Y, Abe M, Furukawa M, Suyama Y, Sakai Y, Kamioka M, Shibata N, Park EJ, **Sato S**, Kiyono H, Yoneyama H, Kitazawa H, Watanabe K, Nochi T, Aso H.
Development of immune and microbial environments is independently regulated in the mammary gland.
Mucosal Immunol. 2018 May;11(3):643-653. doi: 10.1038/mi.2017.90.
- 7) Takahashi Y, **Sato S (Corresponding)**, Kurashima Y, Yamamoto T, Kurokawa S, Yuki Y, Takemura N, Uematsu S, Lai CY, Otsu M, Matsuno H, Osawa H, Mizushima T, Nishimura J, Hayashi M, Yamaguchi T, Kiyono H.
A Refined Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Organoids. **Stem Cell Reports.** 2018 Jan 9;10(1):314-328. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.11.004.
- 8) Takahashi Y, **Sato S (Corresponding)**, Kurashima Y, Lai CY, Otsu M, Hayashi M, Yamaguchi T, Kiyono H.
Reciprocal Inflammatory Signaling Between Intestinal Epithelial Cells and

Adipocytes in the Absence of Immune Cells.

EBioMedicine. 2017 Sep;23:34-45. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.07.027.

- 9) *Kishikawa S, ***Sato S (Corresponding)**, Kaneto S, Uchino S, Kohsaka S, Nakamura S, Kiyono H.
(*equally contributed)
Allograft inflammatory factor 1 is a regulator of transcytosis in M cells.
Nat Commun. 2017 Feb 22;8:14509. doi: 10.1038/ncomms14509.

〔学会発表〕(計4件)

- 1) **Shintaro Sato** and Hiroshi Kiyono. Identification and Elucidation of Novel M-cell specific Molecules for Its Function and Differentiation. 第22回腸内細菌学会(東京) 2018年6月
- 2) **Shintaro Sato**
Allograft inflammatory factor 1 (Aif1) is a regulator of transcytosis in M cells.
18th International Congress of Mucosal Immunology, Washington D.C., USA, Jul. 19-22, 2017.
- 3) **佐藤慎太郎**. 腸管免疫抗原取り込み機能分子 Aif1 の同定と解析.
第41回日本リンパ学会総会(鹿児島) 2017年6月
- 4) **佐藤慎太郎**, 岸川咲吏, 清野宏.
抗原取り込み特化細胞、M細胞における Allograft inflammatory factor1 (Aif1)の役割.
日本薬学会第137回年会(仙台) 2017年3月

〔図書〕(計0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/mucosal/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。