

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09368

研究課題名(和文) M細胞表皮型脂肪酸結合タンパク質発現による腸内抗原環境維持機構

研究課題名(英文) epidermal fatty acid binding protein(FABP) in Peyer's patch: a contribution to intestinal flora control

研究代表者

鈴木 良地 (SUZUKI, Ryoji)

秋田大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20396550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：パイエル板EFABP発現の機能的意義について以下を明らかにした。：S100タンパク質陽性の境界が上皮内、上皮下のEFABP陽性細胞に挟まれることで破綻し、EFABP発現細胞であるM細胞と樹状細胞が接触、腸管内抗原受け渡しが成立する。：胚中心マクロファージのEFABP発現に応じたAnnexinV分泌により、周囲のB細胞表面にPSを誘導される。これをGas6とEFABP発現に相関してマクロファージ表面に発現するAxlの複合体が認識し、B細胞の貪食が亢進する。胚中心に於けるマクロファージの貪食作用は腸管粘膜免疫の最終産物である抗原特異的IgA産生制御にB細胞選択を介して関わっていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢を構成する細菌選択機構の一端をパイエル板における表皮型脂肪酸結合タンパク質の担う仕組みで具体的に説明した。

表皮型脂肪酸結合タンパク質は長鎖脂肪酸と結合してシグナリング分子として機能することが分かっているので、今後腸内細菌叢を操作する方法として脂肪酸の経口投与の可能性を示せた。

研究成果の概要(英文)：epidermal fatty acid binding protein (EFABP) expression cells in Peyer's patch have S100 protein phagocytosis capability. M cells in epithelium and dendritic cells(DCs) express EFABP. DC could penetrate S100 positive border with 4cCorporation of EFABP positive M cell and DC, which would work as antigen presenting switch. EFABP positive germinal center macrophage secrete AnnexinV. AnnexinV expose phosphatidylserine to the surface of surrounding B220 positive cells. This process enhances macrophage phagocytosis of B220 positive cells. Which might work as antigen specific IgA production through B cell selection.

研究分野：解剖学

キーワード：脂肪酸結合タンパク質 パイエル板 M細胞 樹状細胞 腸内細菌叢

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パイエル板は腸管粘膜下に形成される集合リンパ小節で、腸管粘膜免疫を構成する主要な組織の一つである。免疫は自己と非自己を鑑別し非自己を排除する仕組みである。しかし、腸管粘膜免疫では、非自己である腸内細菌叢を構成する菌株や食餌由来抗原は排除されない。このことは、自己、非自己の認識機能の他に抗原種に依存した切り替え機構が無いと説明できない。現在のところこの切り替え機構は専ら粘膜下のリンパ球、樹状細胞の免疫担当細胞が担っているとされている。我々の研究テーマである脂肪酸結合タンパク質の生体内での機能を調べる過程でパイエル板内で表皮型脂肪酸結合タンパク (Epidermal fatty acid binding protein: EFABP) が M 細胞と粘膜下の樹状細胞、胚中心マクロファージに存在すること (Suzuki et al. 2009) を見出した。EFABP のパイエル板内の発現分布は EFABP と腸管内抗原の粘膜下への受け渡しとの関係を示唆するものである。

申請時までの実験過程で、以下のことを明らかに出来た。

①C57BL/6 生後 16 日から 19 日の腸内細菌叢の変化に伴い M 細胞の EFABP 陽性反応が増強する (第 116 回解剖学会総会 鈴木ら)。

②16S rRNA 遺伝子によるマイクロバイオーーム解析結果で、EFABP ノックアウト (K.O.) マウスの糞便中で *L. acidophilus* が増えていた。また、EFABP K.O. では、この菌株を認識する分子である DC-SIGN (27kD) に加えて短いスプライシングバリエント (24kD) が検出され、両者の共存による抗原取り込み能低下を培養系で確認した。即ち EFABP 依存性に排除される菌株の存在が証明された (第 119 回解剖学会総会 鈴木ら)。

EFABP のパイエル板内での発現局在と上記①,②より、特定の菌株において EFABP 発現の増減に依存した排除機構があると考えられた。

2. 研究の目的

C57BL/6 パイエル板内における EFABP 発現が腸管内抗原排除の on-off 決定の具体的な仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

生後 0,3,14,16,17,18,19,21 日後の C57BL/6 マウスを 4%paraformaldehyde で灌流固定しパイエル板を厚さ 20 μ m の凍結切片とした。使用するまで -80°C で保存し、免疫組織化学によりそれぞれのタンパク質の発現局在、強度を検討した。

Caco2、RAW264.7、BCL1-B20 細胞に GFP、あるいは、EFABP-GFP 融合タンパク質を強制発現、あるいは、EFABP siRNA による発現抑制を行った。細胞を 2%paraformaldehyde で固定し、蛍光免疫染色により、タンパク質の発現局在、強度を検討した。

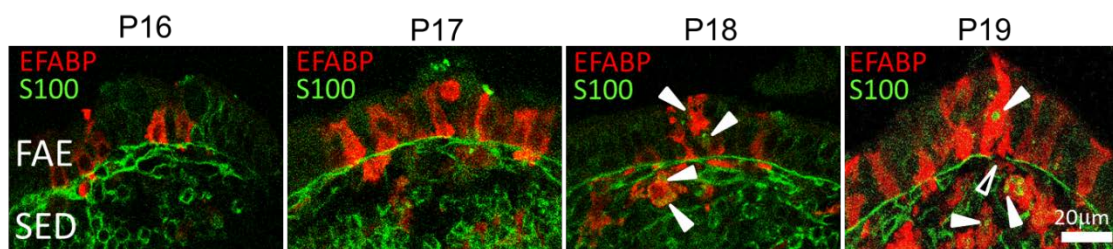
また、sonicator を用い、バッファー中で細胞を破碎し lysate を調整した。Western blot により lysate 中のタンパク質発現量を検討した。

OptiPrep™濃度勾配液を用いた超遠心分画調整法は先行文献 (Methods, 2018, Onodi Z. et al.) によった。

EFABP、S100 タンパク質、B220、phosphatidylserine(PS)、CD11c、ER-TR7、DC-SIGN、AnnexinV、Gas6、Axl をそれぞれの特異抗体で検出した。

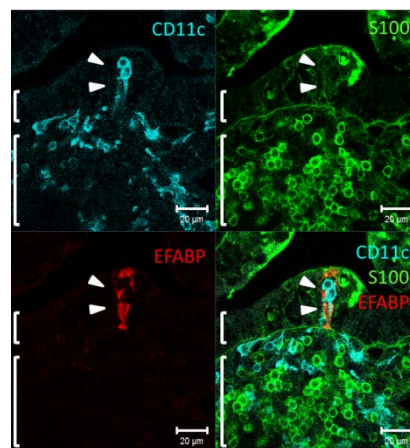
4. 研究成果

パイエル板上皮と上皮下は S100 タンパク質陽性構造で境されているが、生後 16 日 (P16) ~ 19 日 (P19) の間に EFABP 発現の上昇すると、EFABP 発現陽性細胞内に S100 タンパク質の貪



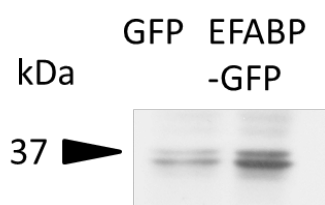
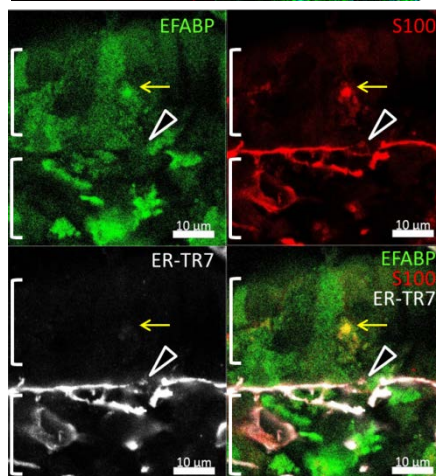
食像(白矢頭)と隣接する上皮-上皮下境界に間隙 (白抜き矢頭) が生じる。

これより早期の生後 3 日でも S100 陽性境界と上皮内の EFABP 陽性細胞が接していると上皮内に樹状細胞(CD11c 陽性細胞)の遊走が観察された。上記とあわせると上皮内の EFABP 発現により S100 陽性境界を越えて樹状細胞が上皮内に遊走できるようになることが示唆された。



生後 21 日のパイエル板でも、EFABP 陽性細胞に接した S100 タンパク質陽性境界に間隙が生じ、上皮内への EFABP 陽性細胞遊走が観察された。マーカータンパク質の発現 (ER-TR7) から S100 タンパク質は fibroblastic reticular cell であることが分かった。

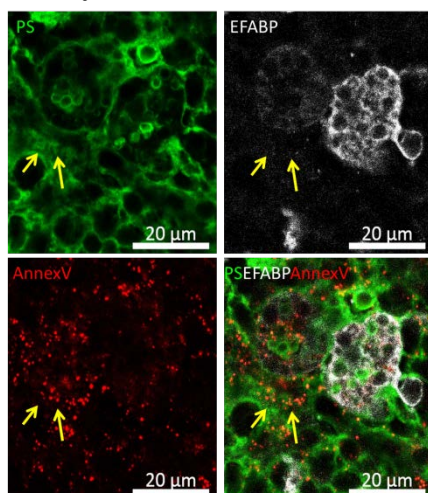
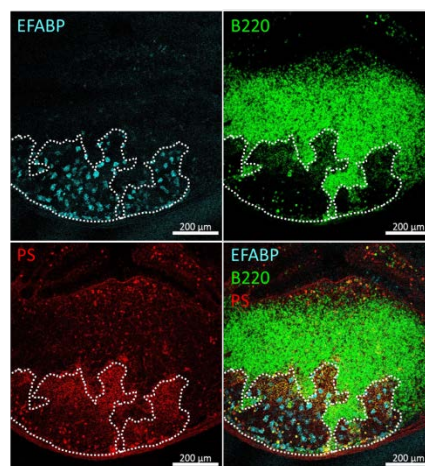
S 100 タンパク質陽性境界は生後の経過時間に伴い肥厚するので、EFABP 発現強度に応じた S100 タンパク質陽性境界の発現細胞による貪食が生じるとすると、上皮、上皮下の双方から挟み込まれた S100 タンパク質陽性境界にのみ間隙が生じることが予想される。上皮内の EFABP 陽性最簿は M 細胞、上皮下の EFABP 陽性細胞は樹状細胞であることが分かっているので、EFABP 発現に応じて、腸管内の抗原が樹状細胞に提示されることになる。



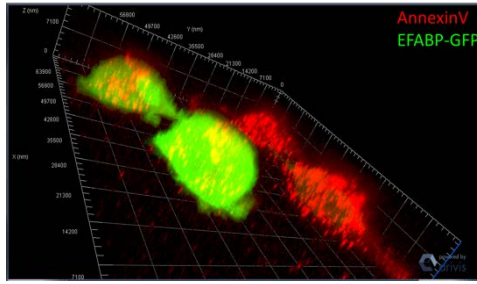
Caco2 細胞での EFABP 強制発現で、コントロール(GFP 発現誘導)と比して DC-SIGN 発現が増強することも確認できた。DC-SIGN は既に述べたように *L. acidophilus* 親和性分子であるので、合わせると EFABP 発現増強に伴い、M 細胞による抗原取り込みと上皮下への提示、樹状細胞による抗原の受け取りが連動して増強することが考えられた。

パイエル板での EFABP 発現は胚中心マクロファージで最も強く、マクロファージの機能への関与が考えられた。

胚中心 (右図点線内) の EFABP 陽性マクロファージ周辺では B 細胞(B220 陽性細胞)の B220 陽性反応が減少し、eat-me-signal である、phosphatidylserine(PS)陽性反応が観察された。液性の PS 誘導因子が EFABP 発現に応じて周囲に分泌されると考えると所見をうまく説明できる。

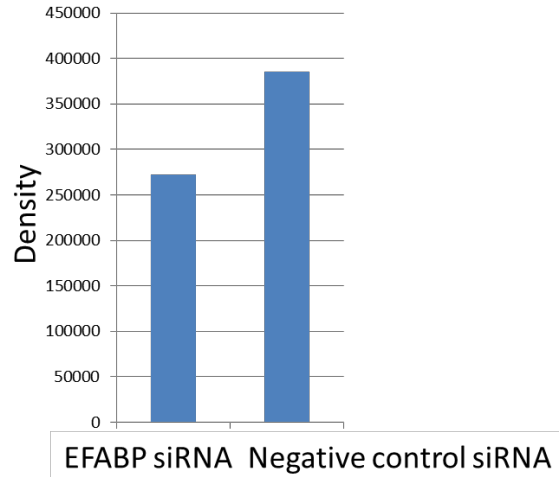


AnnexinV は本来細胞内に傾いている PS の分布を細胞表面に固定する液性因子である。EFABP,PS,AnnexinV の 3 重免疫染色を実施すると実際に EFABP 陽性細胞に PS 陽性細胞が貪食され、この周囲に AnnexinV 陽性顆粒が観察された。AnnexinV 陽性顆粒の多くは PS 陽性細胞表面に接着していた (黄色矢印)。

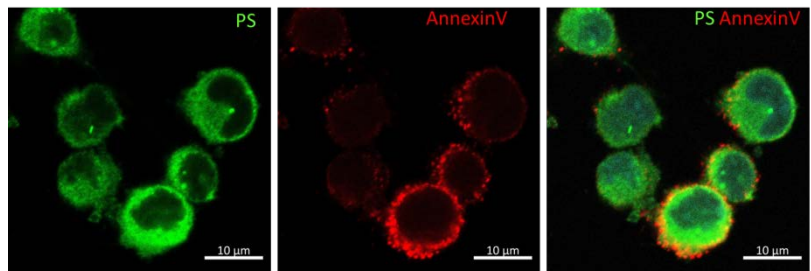


マクロファージ系の RAW264.7 細胞に EFABP を GFP との融合タンパク質として強制発現すると発現強度に応じて AnnexinV の分布が細胞表面に傾いた。

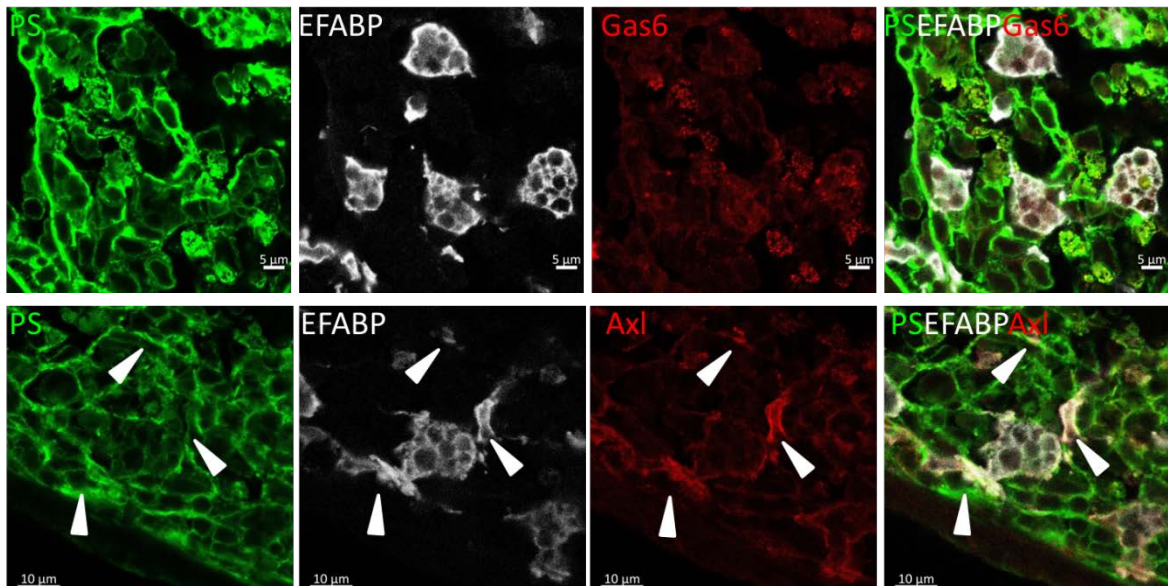
RAW264.7 細胞は内因性の EFABP を発現しているのですが、これを siRNA で抑制すると培地中に分泌される AnnexinV が減少することを Western blot で確認した。



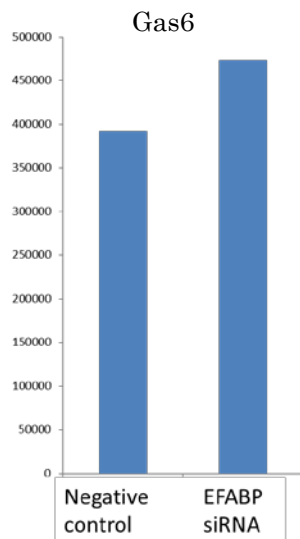
また、RAW264.7 で conditioning した培地を B 細胞系の BCL1-B20 に加えると細胞表面に接着した AnnexinV 顆粒が観察され、接着の程度に相関して PS 陽性シグナルが観察された。C57BL/6 パイエル板で観察された所見と一致した。



細胞表面に PS が露出した細胞の貪食は PS 特異的受容体を介して促進される。PS には液性因子である Gas6 とこれと結合する膜タンパクである Axl の複合体が結合することが知られている。パイエル板胚中心におけるこれらの発現をしらべると、EFABP 陽性マクロファージに貪食された細胞と周囲の PS 陽性反応に一致して Gas6 陽性反応が観察された。さらにマクロファージの EFABP 陽性強度に相関した Axl 陽性反応 (白矢頭) を確認した。



RAW264.7 lysate を超遠心 (120,000 x g, 24 時間、) Optiprep 濃度勾配による分画(F1~F10)に分け、Western blot にて Gas6, Axl, AnnexinV, EFABP のそれぞれの分画における発現を確認すると、Axl, AnnexinV, EFABP は主に F2~F5 に存在したが、Gas6 は F6~F10 で検出された。



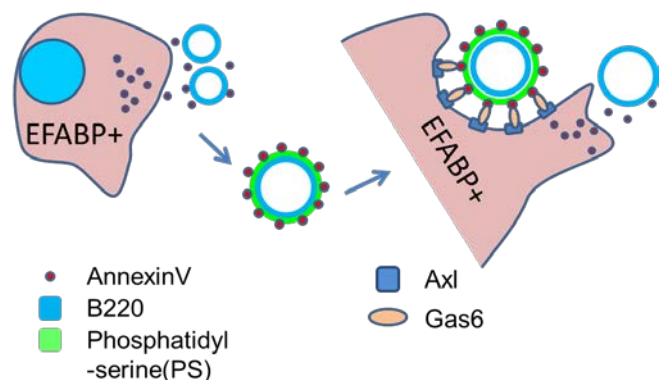
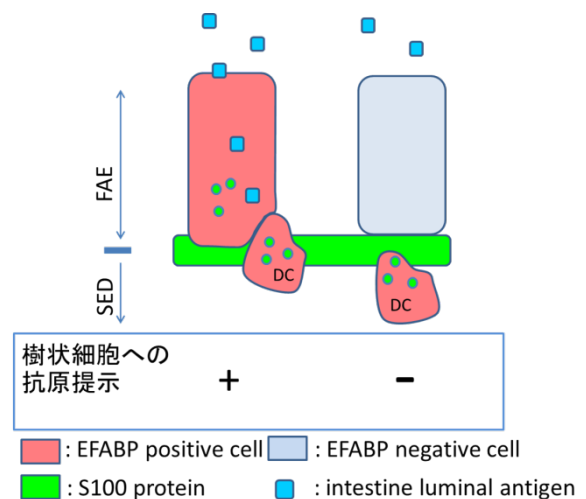
RAW264.7には内因性のEFABPが発現しているのをこれをsiRNAで抑制し、培地中のGas6をWestern blotにて検出するとGas6量はEFABP発現と逆相関した。これはEFABP発現と相関して発現したAxlにより、培地中のGas6が捉えられ、培地中のGas6が減少することが考えられた。



まとめると、EFABP発現は、①上皮と上皮下の連携による選択的抗原取り込みと、②胚中心マクロファージのB細胞貪食を介してパイエル板機能に関与することが分かった。それぞれの具体的な機構について以下に示す。

①：通常 S100 タンパク質陽性の境界が上皮内、上皮下の EFABP 陽性細胞に挟まれることで破綻し、EFABP 発現細胞である M 細胞と樹状細胞が接触し、腸管内抗原受け渡しが成立する。

②：胚中心マクロファージの EFABP 発現に相関した AnnexinV 分泌により、周囲の B 細胞表面に PS を誘導される。これを Gas6 と EFABP 発現に相関してマクロファージ表面に発現する Axl の複合体が認識し、B 細胞の貪食が充進する。胚中心に於けるマクロファージの貪食作用は腸管粘膜免疫の最終産物である抗原特異的 IgA 産生制御に B 細胞選択を介して関わっている。



パイエル板上皮と上皮下の異なる細胞に EFABP が発現し、それぞれの機能を正に制御している。EFABP さらに上位のシグナリング分子が存在すれば、EFABP は異なる細胞の連携を図る仕組みとして機能すると考えられる。FABP ファミリーは長鎖脂肪酸と結合してシグナリング分子として機能することが分かっているので、パイエル板内の EFABP の上位シグナルは腸管内の長鎖脂肪酸であることが予想される。

予備的に野生型マウスと EFABP ノックアウトマウスの糞便中の脂肪酸を質量分析を用いて網羅的に調べた結果、含有量が異なる脂肪酸の存在が確認できた。腸内細菌による脂肪酸プロファイルの変化→EFABP 発現および EFABP シグナリング変化→パイエル板への抗原提示、IgA 産生変化→腸内細菌叢の変化といったループにより恒常性が保たれていることが予想されるが、詳細は今後の研究 (基盤 C、20K08274) で明らかにしていくことを考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木良地、大和田祐二、板東良雄
2. 発表標題 パイエル板胚中心における表皮型脂肪酸結合タンパク質の機能
3. 学会等名 日本解剖学会 第64回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木良地、大和田祐二、板東良雄
2. 発表標題 鈴木良地、大和田祐二、板東良雄
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木良地
2. 発表標題 パイエル板表皮型脂肪酸結合タンパク質発現によるB細胞アポトーシス誘導
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018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
研究協力者	大和田 祐二 (OWADA Yuji) (20292211)	東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	志村 洋一郎 (SHIMURA Yoichiro) (60332920)	秋田県立大学・生物資源科学部・助教 (21401)	