

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07631

研究課題名(和文) パイエル板樹状細胞による腸管免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of Peyer's patch dendritic cells and macrophages in regulation of mucosal immune responses

研究代表者

金谷 高史 (KANAYA, TAKASHI)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：20553829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：パイエル板のSED領域には様々な種類の細胞が集積し、腸管免疫応答を制御するための微小環境が形成されている。本研究ではSED領域には樹状細胞が顕著に集積することに着目し、これらの機能不全モデルを確立することでSED領域の生体防御における重要性を解明することを目的とした。我々はRNA-sequenceとwPGSA法を組み合わせることで、SED-DCにおいてRelBおよびC/EBPaが選択的に発現することを見出し、これらの転写因子を樹状細胞特異的に欠損するマウスを作出した。これらのマウスの表現型を解析した結果、RelBおよびC/EBPaがSED-DCの機能を調節に必須であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パイエル板のSED領域には樹状細胞、リンパ球、自然リンパ球などの免疫細胞の他、ストロマ細胞や上皮細胞など非免疫細胞が集積し、複雑な微小環境形成している。この微小環境は腸管免疫を制御する上で重要な領域であると考えられているが、それぞれの細胞の機能不全モデルを確立することは困難であったことから、微小環境形成の分子メカニズムには不明な点が多い。本研究によってSED領域樹状細胞の機能制御機構の一端が明らかとなった。本研究成果はSED-DCを標的とした腸管免疫制御方法の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：PPs take up antigens through M cells distributed in follicle-associated epithelium (FAE) covering PP lymphoid follicles, from which the antigens are transferred to dendritic cells (DCs) located in subepithelial dome (SED) for subsequent T cell-priming. Accumulating evidence indicates that SED-DCs have unique functions other than priming T cells to facilitate mucosal immune responses. We have previously shown that SED-DCs express IL-22 binding protein (IL-22BP), allowing an efficient antigen-uptake into PPs. Here we identified that RelB and C/EBPa were preferentially expressed by SED-DCs in murine PPs. RelB-deficiency silenced the expression of IL-22BP by SED-DCs. On the other hand, C/EBPa-deficiency decreased the expression of Lysozyme by SED-DCs, causing the increased invasion of orally administered pathogenic bacteria into PPs and mesenteric lymph nodes. Our findings demonstrate that RelB and C/EBPa regulate the development of SED-DCs, and contribute to the mucosal host defense.

研究分野：腸管免疫

キーワード：樹状細胞 パイエル板 腸管免疫

1. 研究開始当初の背景

パイエル板 (Peyer's patch: PP) は腸管に分布する代表的な腸管関連組織であり、腸管内に侵入した抗原に対して特異的な免疫応答を誘導する役割を担っている。PP への抗原の取り込みは、PP の粘膜面を覆う濾胞随伴上皮細胞層 (follicle-associated epithelium: FAE) に分布する M 細胞によって行われ、取り込まれた抗原は FAE 直下の SED (sub-epithelial dome) 領域の樹状細胞に受け渡され、その結果抗原特異的な免疫応答が誘導される。SED 領域には樹状細胞以外にも、T 細胞、B 細胞、LTi (lymphoid tissue inducer) 細胞などの免疫細胞に加え、非免疫細胞であるストロマ細胞など様々な種類の細胞が集積し、また上皮細胞層である FAE とも近接している。これらの細胞間の相互作用が、それぞれの細胞の機能を調節することで SED 領域の微小環境が保たれていると考えられる。近年では SED の樹状細胞が TGF- β を介して直接的に B 細胞の IgA へのクラススイッチを誘導することが報告された(1)。我々は、SED 領域に分布する樹状細胞がインターロイキン 22 結合タンパク質 (IL-22BP) を発現し、FAE における IL-22 シグナルを恒常的に抑制していることを見出した(2)。他にも様々な細胞間相互作用が腸管免疫の制御に寄与すると考えられるが、それぞれの細胞種の機能不全モデルを確立することが困難であることから、その仕組みの多くは明らかにされていない。

2. 研究の目的

SED 領域には樹状細胞が顕著に集積することから、樹状細胞が SED 領域の微小環境形成における重要な要素の一つであることが示唆される。そこで申請者は PP から樹状細胞集団を調製し、SED に分布する樹状細胞 (CD11b+MHCII^{high}CD11c^{high}) を単離した (以下、SED-DC)。単離した SED-DC の RNA-sequence 解析を行ったところ、SED-DC は脾臓の類似樹状細胞サブセット (CD11b+MHCII^{high}CD11c^{high}) では発現の見られない遺伝子を多数発現していることが明らかとなった。SED-DC の SED 領域の微小環境形成における役割を評価するためには、SED-DC の機能欠損モデルが不可欠である。そこで SED-DC の機能や分化を制御する転写因子を予測するため、前述の RNA-sequence で得られたデータを wPGSA 法 (Weighted parametric gene set analysis) (3) で解析することにより、SED-DC で機能すると予測される転写因子群を選抜した。そして再度 RNA-sequence のデータから発現量が高いと考えられる転写因子を絞り込み、RelB および C/EBP α が SED-DC に選択的に発現することを見出した。本研究では、これらの転写因子を樹状細胞特異的に欠損するマウスを作出し、選抜した転写因子の SED-DC における役割を解析することにより、SED 領域における細胞間相互作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SED-DC マーカーの抽出

SED-DC は CD11b+MHCII^{high}CD11c^{high} 細胞として濃縮、単離することが可能であることから、SED-DC は大まかに conventional DC2 (cDC2) に分類されるといえる。そこで SED-DC に発現するマーカー遺伝子を抽出するため、PP の cDC1、脾臓の cDC1 および cDC2 と遺伝子発現を RNA-sequence 解析によって比較することで SED-DC のマーカー遺伝子群を抽出した。

(2) 各種転写因子の樹状細胞コンディショナルノックアウトマウス (cKO) の作製

Relb-flox および Cebpa-flox マウスと Itgax-Cre (Itgax は CD11c をコードする遺伝子) マウスを交配し、CD11c を高発現する樹状細胞集団において RelB および C/EBP α を欠損するマウスを作製した。

(3) cKO マウスの表現型解析

前述の転写因子の SED-DC における役割を明らかにするため、各種表現型解析を行った。これまでの研究によって、SED-DC は Lysozyme や IL-22BP を高発現することが明らかにされている(2, 4)。そこで Lysozyme および IL-22BP を SED-DC の機能的マーカーとし、それぞれの転写因子の SED-DC における役割を解析した。

4. 研究成果

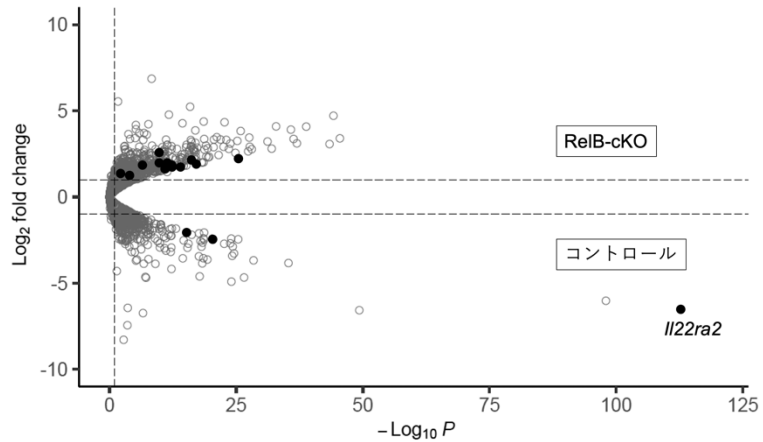
(1) SED-DC は特徴的な遺伝子発現パターンを呈する

SED-DC、PP-cDC1、脾臓 cDC1 および cDC2 の遺伝子発現を比較し、SED-DC において高発現

する遺伝子群を抽出した。この遺伝子群には既知のマーカである *Lyz2* (Lysozyme をコードする遺伝子) や *Il22ra2* (IL-22BP をコードする遺伝子) が含まれることが確認された他、補体系、食食、病原体に対する応答に関与する遺伝子群が SED-DC において高発現することが明らかとなった。以降の cKO マウスの表現型解析は、Lysozyme および IL-22BP の発現を SED-DC の機能的マーカーとして進めることとした。

(2) RelB は IL-22BP の発現に必須である

免疫染色を用いて Lysozyme および IL-22BP の発現を解析したところ、RelB-cKO マウスの SED-DC では Lysozyme の発現に大きな変化は見られなかった一方で、IL-22BP の発現が欠失することが観察された。さらに RelB-cKO マウスから SED-DC を単離して RNA-sequence 解析によって RelB-欠損下において発現が有意に変化する遺伝子群を網羅的に解析した。その結果、RelB-cKO マウスの SED-DC において *Il22ra2* の発現が著しく減少することが確認された。しかしながら、前項で抽出された SED-DC のマーカー遺伝子の多くは、RelB-cKO において上昇する傾向が確認された (図 1、黒丸は SED-DC マーカー遺伝子を示す)。



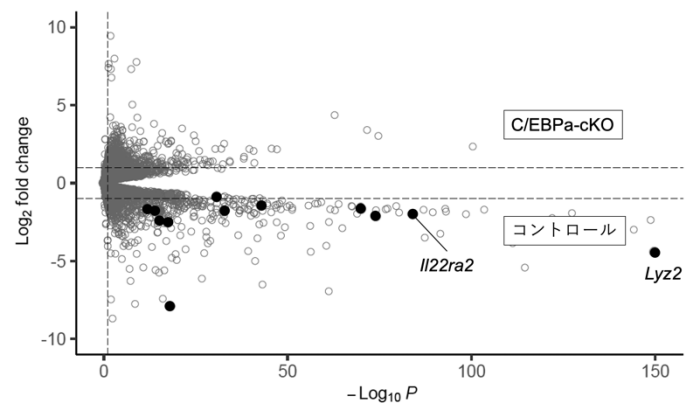
ウスの SED-DC において *Il22ra2* の発現が著しく減少することが確認された。しかしながら、前項で抽出された SED-DC のマーカー遺伝子の多くは、RelB-cKO において上昇する傾向が確認された (図 1、黒丸は SED-DC マーカー遺伝子を示す)。

(3) RelB-cKO マウスでは M 細胞の数が減少する

SED-DC は M 細胞を含む FAE と近接していることから、SED-DC の機能欠損が M 細胞の分化に何らかの影響を与える可能性があるかと推測した。RelB-cKO マウスから FAE を単離し、M 細胞マーカー遺伝子の発現を解析したところ、RelB-cKO マウスにおいて M 細胞の成熟マーカーである *Gp2* の発現が有意に減少することが明らかとなった。近年、*S100a4* という分子が PP の SED-DC および自然リンパ球において発現すること、および *S100a4* が M 細胞の成熟に必要であることが報告された (5)。前項の RNA-sequence 解析のデータを確認したところ、RelB-cKO マウスの SED-DC において *S100a4* の発現が減少することが明らかとなったことから、RelB-cKO マウスにおける M 細胞の減少は SED-DC において *S100a4* の発現が減少したことによってもたらされたと推測される。

(4) C/EBPα は Lysozyme の発現に必須である

一方で C/EBPα-cKO マウスの SED-DC では、IL-22BP の発現も大きく減少することに加えて Lysozyme の発現が殆ど欠失することが確認された。C/EBPα-cKO マウスから SED-DC を単離して RNA-sequence 解析を行った。その結果、C/EBPα-欠損下において *Lyz2* や *Il22ra2* を含む SED-DC マーカー遺伝子群の発現が軒並み低下することが観察された (図 2、黒丸は SED-DC マーカー遺伝子を示す)。C/EBPα は骨髄系細胞の分化において、granulocyte/monocyte progenitor (GMP) の分化に必須であり、また common dendritic progenitor (CDP) の分化に必要とされることが報告されている (6)。本研究では C/EBPα が Lysozyme をはじめとする SED-DC の機能マーカーの発現のマスターレギュレーターの一つであることを明らかとなった。



(5) C/EBPα-cKO マウスでは病原性細菌の侵入が増加する

Lysozyme は代表的な抗菌タンパク質のひとつであることから SED-DC において発現する Lysozyme には M 細胞が取り込んだ細菌抗原が樹状細胞に伝達された際、これらの細菌抗原を殺

菌することで感染を防ぐ役割があると推測された。そこでパイエル板を介して感染する代表的な病原性細菌である *Salmonella Typhimurium* および *Listeria monocytogenes* の感染実験を行い、SED-DC における Lysozyme の欠失がこれらの病原性細菌感染に及ぼす影響を評価した。その結果、C/EBP α -cKO マウスではコントロールマウスと比較し、経口感染させた *S. Typhimurium* および *L. monocytogenes* のパイエル板および腸間膜リンパ節への伝播が増加することが明らかとなった。

<参考文献>

1. A. Reboldi, *et al.*, IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer's patches. *Science (New York, N.Y.)* 352, aaf4822–aaf4822 (2016).
2. T. Jinnohara, *et al.*, IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. *The Journal of experimental medicine* 61, jem.20160770 (2017).
3. E. Kawakami, S. Nakaoka, T. Ohta, H. Kitano, Weighted enrichment method for prediction of transcription regulators from transcriptome and global chromatin immunoprecipitation data. *Nucleic acids research* 44, 5010–5021 (2016).
4. H. Lelouard, *et al.*, Pathogenic bacteria and dead cells are internalized by a unique subset of Peyer's patch dendritic cells that express lysozyme. *Gastroenterology* 138, 173-84.e1–3 (2010).
5. K. Kunitura, *et al.*, S100A4 Protein Is Essential for the Development of Mature Microfold Cells in Peyer's Patches. *Cell Reports* 29, 2823-2834.e7 (2019).
6. R. S. Welner, *et al.*, C/EBP α is required for development of dendritic cell progenitors. *Blood* 121, 4073–4081 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanaya T, Williams IR, Ohno H.	4. 巻 21
2. 論文標題 Intestinal M cells: Tireless samplers of enteric microbiota.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Traffic	6. 最初と最後の頁 34-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tra.12707.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Stanifer ML, Mukenhirm M, Muenchau S, Pervolaraki K, Kanaya T, Albrecht D, Odendall C, Hielscher T, Haucke V, Kagan JC, Bartfeld S, Ohno H, Boulant S	4. 巻 5
2. 論文標題 Asymmetric distribution of TLR3 leads to a polarized immune response in human intestinal epithelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature microbiology	6. 最初と最後の頁 181-191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41564-019-0594-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeuchi Tadashi, Miyauchi Eiji, Kanaya Takashi, Kato Tamotsu, Nakanishi Yumiko, Watanabe Takashi, Kitami Toshimori, Taida Takashi, Sasaki Takaharu, Negishi Hiroki, Shimamoto Shu, Matsuyama Akinobu, Kimura Ikuo, Williams Ifor R., Ohara Osamu, Ohno Hiroshi	4. 巻 595
2. 論文標題 Acetate differentially regulates IgA reactivity to commensal bacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 560 ~ 564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-021-03727-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------