

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06033・19K21170

研究課題名（和文）アレルギー性気管支炎においてM細胞が果たす役割の解明

研究課題名（英文）The role of M cells in allergic airway inflammation

研究代表者

中村 有孝（Nakamura, Yutaka）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・特任助教

研究者番号：60824456

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、気道炎症におけるM細胞の意義について検証した。遺伝子欠損マウスを用いた解析により、M細胞はNALTおよびiBALTの形成には関与しないことが明らかとなった。一方、免疫誘導機能には軽微な減弱が認められた。またこの遺伝子欠損マウスは、野生型マウスに比べ、HDM誘導性の気管支炎に対して感受性がやや増加した。この結果は、気道M細胞は気道炎症に対して防御的に働くことを推測させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで気道M細胞による抗原取り込みと気道炎症との関連は明確ではなかった。しかし、本研究により、気道炎症に対する宿主防御応答にM細胞による抗原取り込みが寄与していることが推測された。さらなる研究により、宿主防御応答の詳細を明らかにすることで、アレルギー病態形成におけるM細胞の役割、免疫誘導機構について解明することが可能である。

研究成果の概要（英文）：Our results from M cell-null Spi-B or Sox8-deficient mice indicate that the development of airway mucosa-associated lymphoid tissues, like NALT and iBALT, is independent of M cells. On the other hand, the defect of Spi-B slightly reduced germinal center B cells, indicating the reduced induction of immune responses.

The Spi-B depletion exacerbated the house dust mite (HDM)-induced asthma, as represented by the increased number of macrophages infiltrating the bronchoalveolar lumen. This result suggests that M cells play an important role in the defense against airway damage.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：M細胞 気道炎症 気管支炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、わが国の人口の約半数がなんらかのアレルギー疾患(気管支喘息、花粉症、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎など)に罹患している[1]。また世界的にも、学童年代人口の 40-50 % が少なくとも 1 つのアレルゲンに対して感受性を有するとされている[2]。

アレルギー疾患の原因は、粘膜や皮膚への抗原(アレルゲン)の曝露に対して、本来起きない異常な獲得免疫応答が引き起こされることにある。しかしながら、アレルギー疾患における異常な獲得免疫がどのように誘導されるかは明らかでない。

粘膜の獲得免疫は、粘膜独自の二次リンパ組織である MALT において誘導される。粘膜以外の二次リンパ組織が、血管やリンパ管の抗原を捕捉するのに対し、MALT は上皮層の M 細胞を介して外来抗原を取り込み、特異的な免疫細胞を粘膜面に誘導する[3]。気道においても MALT の存在が確認されており、鼻咽頭関連リンパ組織(Nasopharynx-associated lymphoid tissue: NALT) および炎症時に一過性に誘導される誘導性気管支関連リンパ組織(inducible Bronchus-associated lymphoid tissue: iBALT)が知られている。近年、呼吸器 MALT が結核菌やインフルエンザなどの気道感染症や気管支喘息などの気道アレルギーにおいて獲得免疫を誘導する場となると報告された[4,5,6]。しかし、呼吸器 MALT における M 細胞の抗原取り込みが呼吸器粘膜における個体レベルでの免疫応答に関与するかは不明であった。

### 2. 研究の目的

上述のようにアレルギー疾患の主体である異常な獲得免疫応答がどのように誘導されるのかは明らかでない。また M 細胞の抗原取り込みが免疫応答に果たす役割を個体レベルで示した知見はほとんど無い。しかし、申請者はこれまでの研究で、M 細胞の抗原取り込みが腸管の感染症に対する個体レベルでの免疫応答に重要な貢献をしていることを明らかにしてきた[7,8]。そこで本研究では、M 細胞による外来抗原の取り込みが気道アレルギー疾患においても免疫応答の開始点である可能性をアレルゲンに対する個体レベルの免疫応答から検討する。本研究により、アレルギー疾患における異常な免疫応答の形成機序を解明するとともに、粘膜免疫応答における M 細胞の生物学的重要性を新たな切り口から明らかにする。

具体的には、下記の項目について解析を行う。

- (1) 呼吸器 MALT の形成・発達に M 細胞が関与するのか
- (2) 気管支炎症モデルに対する M 細胞の貢献についての検証
- (3) 気管支炎症モデルの抗原特異的免疫応答に対する M 細胞の貢献についての検証

### 3. 研究の方法

- (1) 呼吸器 MALT の形成・発達に M 細胞が関与するのか

M 細胞を欠損する Spi-B 欠損マウス[9]および Sox8 欠損マウス[10]を用いて、NALT の観察を行った。マウスを安楽殺後、断頭し、下顎を切除した。4%PFA にて一晚固定し、OSTEOMOLL (Merck) にて脱灰を行なった。カミソリを用いて NALT に該当する鼻腔部位を切り出し、OCT および液体窒素を用いて凍結切片とした。クライオスタットで 5 $\mu$ m の切片を作成し、HE 染色にて NALT の構造を観察した。さらに、NALT における杯中心 B 細胞を検出するため、ピンセットを用いて口蓋から NALT を剥がしとり、フローサイトメーター (FCM: Flow-cytometer) で GL-7 陽性 CD95 陽性 B 細胞(=杯中心 B 細胞)を検出した。

また iBALT 誘導モデルにて、iBALT の誘導に M 細胞が関与するか検討した。iBALT の誘導は、Spi-B 欠損マウスを用いて、ハウスダスト(HDM)誘導モデルで行なった。イソフルランを用いてマウスを麻酔し、HDM 抗原を経鼻投与した。0, 1 日目は、感作として 50 $\mu$ g、7, 8, 9, 14, 15, 16 日目には 10 $\mu$ g を投与した。その後、40 日目にマウスを解剖し、肺を摘出した。摘出した肺は、Tissue-Clearing Reagent CUBIC-L および R+ (東京化成工業株式会社)のプロトコルに従い、透明化および染色した。その後、Light-sheet 顕微鏡にて iBALT の確認を行った。さらに、本モデルにおいて iBALT 上に M 細胞が誘導されているか確認するため、HDM 誘導あるいは非誘導(PBS 曝露群)の野生型マウスにおいて、肺を採取し、4% PFA で固定後、OCT 切片とした。クライオスタットを用いて 5 $\mu$ m 切片を作成し、anti-CD45R(B220)抗体および anti-Spi-B 抗体を用いて免疫染色を行った。その後、核染色試薬である DAPI を含んだ封入剤を用いて封入した。

(2) 気管支炎症モデルに対する M 細胞の貢献についての検証

上述の HDM 誘導性気管支炎モデルを Spi-B 欠損マウスに適応し、炎症がピークに達する 17 日目に肺胞洗浄液(BALF: bronchoalveolar lavage fluid)を回収し、炎症性細胞の浸潤をフローサイトメトリー(FCM: Flow-cytometry)で確認した。また、肺の切片を作成し、HE 染色による病理診断を実施した。

(3) 気管支炎症モデルの抗原特異的免疫応答に対する M 細胞の貢献についての検証

(2)の気管支炎モデルにおいて、Spi-B 欠損マウスにおける気管支炎が予想に反して悪化しており、またその悪化が非常に軽微な差であったことから、当初の予定を変更し、経鼻免疫寛容により、M 細胞の有無による気道 MALT の寛容誘導について検証を行った。過去の報告[11]を参考に OVA を経鼻投与後 7 日目に、OVA/CFA 皮下投与した。さらに 1 週間後、耳介に OVA(曝露群)もしくは PBS(対照群)を皮内投与し、翌日、耳介の腫脹を測定し、遅延型過敏反応(DTH: delayed type hypersensitivity)を評価した。

4. 研究成果

(1) 呼吸器 MALT の形成・発達に M 細胞が関与するのか

Spi-B 欠損マウスおよび Sox8 欠損マウスの両方において NALT の形成が認められた。またその構造には変化が認められなかったことより、NALT の発達に M 細胞の有無は関与しない事が示唆された。一方で、NALT の大きさを切片上で正確に測定・比較することは難しく、その大きさの変化については単純に比較することができなかった。FCM により Spi-B 欠損マウスにおける NALT の杯中心 B 細胞を検出すると、野生型マウスに比べ、減少傾向にあった。杯中心 B 細胞は、活発な免疫誘導の指標として用いられることより、Spi-B 欠損マウスにおける杯中心 B 細胞の減少は、M 細胞の欠失による抗原取り込み能の低下が、免疫誘導能の低下を引き起こしていることを示唆している。この結果は、小腸パイエル板の結果と一致する。

Spi-B 欠損マウスにおいては、HDM による炎症誘導により、野生型マウスと同じく iBALT が形成された。また本モデルにおいて、野生型マウスの iBALT では、Spi-B 陽性の M 細胞が確認された。従って、M 細胞の有無は iBALT 形成・発達には関与しないことが推測された。一方で、iBALT において M 細胞を欠失することによる免疫誘導能の変化についてはさらなる検討が必要である。

(2) 気管支炎症モデルに対する M 細胞の貢献についての検証

M 細胞を欠損するマウスでは、抗原の取り込みが制限されるため、炎症が緩和されると予想していた。しかしながら、Spi-B 欠損マウスでは、炎症ピーク時において BALF 中の CD45 陽性血球細胞が増加し、特にマクロファージの増加が有意に認められた。これまでの研究より、腸管の M 細胞は常在する抗原に対して免疫誘導を行い、これらが炎症時において宿主防御的に働くことが分かっている[8]。今回の結果より、気道粘膜においても M 細胞は同様の役割を果たしており、組織損傷に対して宿主防御的な機能を有していることが推測された。一方で、組織切片を用いた病理診断では明確な差が得られなかった。このことより、気道 M 細胞が有する宿主防御的な機能は、本モデルにおいて非常に限定的なものであると考えられる。

(3) 気管支炎症モデルの抗原特異的免疫応答に対する M 細胞の貢献についての検証

気道 M 細胞が免疫寛容に影響するか検証するため、経鼻免疫寛容を誘導した。しかし、野生型マウスと Spi-B 欠損マウスの間では、DTH に差は認められなかった。一方で、今回実施した経鼻免疫寛容の実験条件では、野生型マウスにおける免疫寛容の誘導も非常に軽微であった。また今回の結果は、健常時に M 細胞が存在する呼吸器 MALT である NALT 上の M 細胞の役割についてのみ検討しており、炎症に伴って誘導される iBALT 上の M 細胞については検証を行っていない。経鼻免疫寛容に M 細胞が関与するかについては、さらなる検証が必要であると考えられる。

#### 【引用文献】

- [1] 平成 23 年度 厚生労働省リウマチ・アレルギー対策委員会報告書, 2011
- [2] White book on allergy. World Allergy Organization (WAO)
- [3] Kanaya T. et al., *Nat Immunol.*, 2012.
- [4] Nair R.V., et al., *Cell Rep.*, 2017.
- [5] Moyron-Quiroz E.J., et al., *Nat Med.*, 2004.
- [6] Kim D-Y., et al., *Allergy*, 2012.
- [7] Kimura S. et al., *Nat Commun.*, 2020.
- [8] Nakamura Y. et al., *Mucosal Immunol.*, 2020.
- [9] Kanaya T. et al., *Nat Immunol.*, 2012.
- [10] Kimura S. et al., *J Exp Med.*, 2019.
- [11] Samsom N.J. et al., *J. Immunol.*, 2005.

## 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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shunsuke Kimura, Yutaka Nakamura, Nobuhide Kobayashi, Katsuyuki Shiroguchi, Eiryō Kawakami, Mami Mutoh, Hiromi Takahashi-Iwanaga, Takahiro Yamada, Meri Hisamoto, Midori Nakamura, Nobuyuki Udagawa, Shintaro Sato, Tsuneyasu Kaisho, Toshihiko Iwanaga, Koji Hase	4. 巻 11
2. 論文標題 Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13883-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yutaka Nakamura, Shunsuke Kimura, Koji Hase	4. 巻 38
2. 論文標題 M cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-018-0072-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Yutaka, Mimuro Hitomi, Kunisawa Jun, Furusawa Yukihiro, Takahashi Daisuke, Fujimura Yumiko, Kaisho Tsuneyasu, Kiyono Hiroshi, Hase Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 Microfold cell-dependent antigen transport alleviates infectious colitis by inducing antigen-specific cellular immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 679 ~ 690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41385-020-0263-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yutaka Nakamura, Shunsuke Kimura, Nobuhide Kobayashi, Katsuyuki Shiroguchi, Eiryō Kawakami, Mami Mutoh, Hiromi Takahashi-Iwanaga, Takahiro Yamada, Meri Hisamoto, Midori Nakamura, Nobuyuki Udagawa, Shintaro Sato, Tsuneyasu Kaisho, Toshihiko Iwanaga, Koji Hase
2. 発表標題 Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances the gut immunity and infection
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka Nakamura
2. 発表標題 Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity.
3. 学会等名 The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yutaka Nakamura
2. 発表標題 M-cell-dependent antigen uptake mitigates infectious colitis by shaping mucosal barrier function
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学薬学部生化学講座 <a href="http://square.umin.ac.jp/keio-dbc/">http://square.umin.ac.jp/keio-dbc/</a>
---

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
---------	---------