

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790383
研究課題名(和文) パイエル板上皮ーリンパ球間クロストークによるM細胞分化誘導機構の解明
研究課題名(英文) M cell differentiation based on lympho-epithelial interaction

研究代表者
長谷 耕二 (Hase Koji)
独立行政法人理化学研究所・免疫系構築研究チーム・研究員
研究者番号：20359714

研究成果の概要(和文)：

M細胞はリンパ濾胞内の免疫系細胞と相互作用することにより分化すると考えられるが、どのような細胞種がM細胞インデューサーとして機能するかは分かっていない。そこで本研究ではM細胞インデューサーの同定とその性状解析を行った。M細胞が減少しているCCR6欠損マウスと野生型マウスのパイエル板リンパ球のFACS解析の結果から、パイエル板にはCD11c陽性の特殊なB細胞(CCR6^{hi}CD11c⁺B細胞)が存在し、本細胞集団がM細胞のインデューサーとして機能することを明らかにしてきた。

研究成果の概要(英文)：

M cells are developed in a course of cell-cell interaction between FAE and certain unidentified immune cells. We found that a unique B-cell subset characterized by CCR6^{hi}CD11c⁺ resided in mouse PP. Adoptive transfer of CCR6^{hi}CD11c⁺ B cells from wild-type mice restored the M-cell decrement in CCR6-deficient mice. Collectively, the spatial regulation of CCR6^{hi}CD11c⁺ B cells via the CCL20-CCR6 system may play a vital role in M-cell differentiation in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 ・免疫学

キーワード： M細胞、パイエル板、上皮細胞、B細胞、粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

腸管の粘膜は常に外来抗原に曝されており、生体防御のための免疫応答が正常に行われるには、パイエル板などの粘膜関連リンパ組織にこれらの抗原が効率的に採取される必要がある。パイエル板を覆う上皮層（濾胞上皮層）に存在するM細胞は、トランスサイトシスと呼ばれる高分子取り込み機能が非常に発達しており、粘膜上の抗原を積極的に取り込み抗原提示細胞に受け渡す役割を担っている。一方で、こうした性質を逆手に取り、サルモネラ菌など多くの病原微生物は、M細胞を経由して生体内に侵入する。したがってM細胞の機能や分化の解明は、粘膜免疫応答や感染症を理解し制御する上で最も重要な課題の一つである。しかしながら、安定した *in vitro* 誘導系やM細胞特異的表面マーカーの欠如により、これまでの研究は電子顕微鏡などの手法を用いた形態学的解析に留まっており、M細胞特異的な機能発現や細胞分化のメカニズムはほとんど解明されていない。

1) リンパ上皮間相互によるM細胞の誘導

これまでの報告から、M細胞は、リンパ濾胞内の免疫系細胞と相互作用することにより分化すると考えられる。パイエル板上皮細胞はCCL9、CCL20及びCXCL16を恒常的に発現しており、パイエル板微小構造の維持に重要な役割を果たしている。申請者は、これらのケモカインを介した特定の免疫細胞と上皮層の相互作用がM細胞の分化誘導に重要と考え、CCL9、CXCL16又はCCR6（CCL20受容体）欠損マウスのパイエル板を観察した。その結果、CCR6欠損マウスにおいてのみ、顕著なM細胞の著しい減少が認められた。そこでCCR6欠損および野生型マウスのパイエル板リンパ球を比較解析した結果、CD11cを発現する特殊なB細胞（以下、CD11c⁺B細胞）がパイエル板に存在し、

この細胞群がCCR6欠損マウスにおいて顕著に減少していることを明らかにした。

2) M細胞分化におけるNotchシグナルの影響

Notchシグナルは、多くの組織において分化過程の運命決定を担う非常に重要なシグナル系である。腸管絨毛部の上皮層では、成熟分化した腸管内分泌細胞や杯細胞はNotchリガンドを発現し、隣接した未分化上皮細胞のNotchシグナルを活性化して腸管内分泌細胞や杯細胞への分化を抑制することにより、これらの細胞の数を自己調節することが知られている。M細胞はパイエル板上皮層の約10-20%を占めるが、ホールマウント染色して全体を俯瞰するとM細胞は決して隣接して存在しない。この知見から、一旦分化したM細胞はNotchリガンドを発現し、過度のM細胞の分化を抑制しているとの仮説が成り立つ。実際にM細胞がNotchリガンドdelta-1を発現するとの報告もある。

2. 研究の目的

以上の知見を元に、本研究では上皮-リンパ間クロストークに立脚したM細胞分化誘導メカニズムの解明を試みた。具体的には、1)パイエル板においてM細胞インデューサーとして作用する細胞の同定を試みると共に、2)上皮特異的Notchシグナル欠損マウスを作成し、パイエル板M細胞分化への影響を調べた。

3. 研究の方法

研究課題1 上皮-リンパ球間クロストークによるM細胞分化誘導メカニズムの解析

1-1) CCR6を高発現するCD11c⁺B細胞がCCL20依存的な遊走活性を示すかどうかを検討する。また、ラベルしたCD11c⁺B細胞を野生型マウスに投与し、FAE直下へのホーミング活性を示すかどうかを検討する。

1-2) CD11c⁺B 細胞が M 細胞インデューサーとして働くかどうかを調べるために、野生型マウスパイエル板から単離した CD11c⁺B 細胞を CCR6 欠損マウスへ細胞移入を行う。

1-3) CD11c⁺B 細胞以外のポピュレーションについても、M 細胞インデューサーとしての可能性を検討する。

研究課題2. M細胞分化における Notch シグナルの影響

2-1) M 細胞インデューサーの作用により分化した M 細胞が、Notch シグナルの活性化を介して周辺細胞の M 細胞への分化を抑制するとの仮説を検証するため以下の実験を行う。Notch1-4 がリガンド結合により活性化すると、細胞内ドメインが切断され遊離し、これが転写調節因子である RBP-J (recombination signal binding protein-J) に作用して細胞分化に関与する遺伝子群の転写を制御する。Notch や F RBP-J の遺伝子欠損マウスは胎生致死であるため、本研究では腸管上皮特異的に RBP-J を欠損するマウスを作成する。すなわち、floxed RBP-J マウス (京都大・本庶佑博士よりご供与頂いた) と、腸管上皮特異的 Cre 発現マウス (villin-Cre Tg) を掛け合わせる。本マウスにおけるパイエル板 M 細胞の数を、GP2 染色を指標として共焦点顕微鏡により観察する。

4. 研究成果

M 細胞が減少している CCR6 欠損マウスと野生型マウスのパイエル板より免疫系細胞を調整し、FACS 解析を行ったところ、CCR6 欠損マウスのパイエル板では CD11c⁺CD19⁺細胞が著しく減少していた。この CD11c⁺CD19⁺細胞が B 細胞系列に属するかどうかを調べるために、FACS ソーティング

を行った後に mRNA を抽出し、RT-PCR によって BCR 遺伝子の再編成の有無を確認した。その結果、対象として測定した CD11c⁺B 細胞と同様に、CD11c⁺CD19⁺細胞においても BCR 遺伝子の再編成が確認できたことから、本細胞は B 細胞系列に属することが分かった。CD11c⁺B 細胞は CCR6 を高発現しており、パイエル板上皮によって産生される CCL20 によって上皮直下へ遊走する。野生型マウスより CD11c⁺B 細胞を単離して、CCR6 欠損マウスへ移入すると M 細胞の数が有意に増加したことから、本細胞は M 細胞の誘導において重要な役割を果たすことを明らかとした。

CCR6^{hi}CD11c⁺B 細胞を完全に欠損する J_HD マウスや Rag1 欠損マウスのパイエル板において M 細胞を観察したところ、野生型マウスのパイエル板と比較して少ないながらも M 細胞が検出された。これより、パイエル板には B および T リンパ球系以外の M 細胞インデューサーが存在すると考えられた。パイエル板上皮層の直下には樹状細胞 (DC) が多数存在することから、CD11c プロモーター領域下にジフテリア毒素受容体 (DTR) cDNA を挿入したトランスジェニックマウスを用いて、M 細胞の分化誘導における DC の関与を調べた。本マウスにジフテリア毒素 (DTA) を投与するとパイエル板上皮直下に存在する CD11c^{hi} のコンベンショナル DC のほとんどが除去された。DTA 投与後のパイエル板上皮層を共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、M 細胞の顕著な減少が認められた。以上の結果から、パイエル板では CCR6^{hi}CD11c⁺B 細胞と CD11c^{hi} DC の両方が M 細胞インデューサーとして働くことが明らかとなった。

腸管上皮特異的 RBP-J マウスのパイエル板を観察した結果、対照マウスとほぼ同程度の M 細胞が存在していた。この結果から、Notch シグナリングは M 細胞の分化や細胞数の調節には関与していないことが明らかとなった。

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 7 件)

1. Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S, Yabashi A, Waguri S, Nakato G, Kimura S, Murakami T, Iimura M, Hamura K, Fukuoka S, Lowe AW, Itoh K, Kiyono H, Ohno H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. **Nature**. 462: 226-30 (2009). (査読あり)
2. Hase K, Kimura S, Takatsu H, Ohmae M, Kawano S, Kitamura H, Ito M, Watarai H, Hazelett CC, Yeaman C, Ohno H. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. **Nat. Cell Biol.** 11: 1427-32 (2009). (査読あり)
3. Nakato G, Fukuda S, Hase K, Goitsuka R, Cooper MD, Ohno H. New approach for M-cell-specific molecules screening by comprehensive transcriptome analysis. **DNA Res.** 16: 227-235 (2009). (査読あり)
4. Hase K, Takahashi D, Ebisawa M, Kawano S, Itoh K, Ohno H. Activation-induced cytidine deaminase deficiency causes organ-specific autoimmune disease. **PLoS ONE** 3, e3033 (2008). (査読あり)
5. Terashima A, Watarai H, Inoue S, Sekine E, Nakagawa R, Hase K, Iwamura C, Nakajima H, Nakayama T and Taniguchi M, A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. **J. Exp. Med.** 205: 2727-33 (2008). (査読あり)
6. Dann SM, Spehlmann ME, Hammond DC, Iimura M, Hase K, Choi LJ, Hanson E, Eckmann L. IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. **J. Immunol.** 180: 6816-26 (2008). (査読あり)
7. Terahara K, Yoshida M, Igarashi O, Nochi T, Pontes GS, Hase K, Ohno H, Kurokawa S, Mejima M, Takayama N, Yuki Y, Lowe AW, Kiyono H., Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. **J. Immunol.** 180: 7840-6 (2008). (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

1. Hase K, GP2-dependent antigen transcytosis by M cells initiates mucosal immune response. The 4th Stage Surface Barrier Immunology Study Group (SBARIS). 2nd Meeting. January 29-30, 2010, Tokyo, Japan.
2. Hase K, GP2-dependent antigen transcytosis by M cells initiates mucosal immune response. 第 39 回 日本免疫学会・国際シンポジウム 2009 年 12 月 2-4 日, 大阪
3. Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Lowe AW, Kiyono H and Ohno H. Uptake via Glycoprotein 2 of FimH⁺ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. 14th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI2009). July 5-9, 2009, Boston, USA.
4. 長谷耕二, 粘膜免疫系の最前線におけるM細胞依存的抗原取り込み機構の解明. 日本食品免疫学会シンポジウム.2009年5月27日, 東京
5. 長谷耕二, 腸管特殊上皮M細胞による抗原トランスサイトシスの分子機構. 第13回日本食物繊維学会学術集会 2008年11月21-22日, 東京
6. Hase K, Function and differentiation of intestinal follicular M cells. The 3rd JSI-RCAI Immunology Workshop. March 14, 2008, Yokohama, Japan.

[その他]

ホームページ等

<http://leib.rcai.riken.jp/riken/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 耕二 (Hase Koji)

独立行政法人理化学研究所・免疫系構築研究チーム・研究員

研究者番号: 20359714