

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790487

研究課題名(和文) パイエル板におけるM細胞を介した抗原取り込みと受け渡し機構の可視化と解析

研究課題名(英文) Visualization and molecular analysis of antigen-uptake and -delivery at M cell.

研究代表者

木村 俊介 (KIMURA SHUNSUKE)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40444525

研究成果の概要(和文)：小腸パイエル板を覆う上皮細胞には管腔内の抗原を取り込み免疫細胞へと受け渡すM細胞が存在している。その相互作用機構は明らかになっていない。本研究ではM細胞がケモカインCCL9を高発現し、CCL9受容体のCCR1発現細胞がM細胞と密に相互作用している様子を新たに開発した観察法を用いて明らかにした。さらに、もう一つの因子としてM-Secを見だし、この分子が近年新たに発見された細胞間相互作用に関わる膜ナノチューブの形成に重要な役割を果たすことを示した。

研究成果の概要(英文)：Peyer's patch (PP) in the small intestine is a primary site for the intestinal immune system. The luminal side of PPs is covered by the follicle-associated epithelium (FAE), which contains M cells. M-cells uptake antigens or macromolecules and deliver them to dendritic cells inhabiting subepithelial dome region under FAE. We found high expression level of a chemokine gene, *Ccl9*, in the M cells by using the mouse chemokine array and *in situ* hybridization analysis. The cells expressing CCR1 protein, a receptor of CCL9, were found underneath M cells and close contact with. Moreover, M cells expressed a gene of M-Sec which product is a key molecule of the formation of membrane nanotubes, a new structure for cell-cell communication. Taken together, our data suggest that M cells interact and communicate with immune cells by two ways, CCL9-CCR1 and membrane nanotubes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：パイエル板、M細胞

1. 研究開始当初の背景

腸管は外界とつながっており、食物とともに多くの抗原や微生物が入ってくる。これらの抗原や微生物に対して生体は、免疫システムを使うことで恒常性を維持している。そのため、腸管には生体防御を担うリンパ球が多く常駐し、この場所における免疫応答は厳密な調節を受けている。パイエル板上皮層に存在する M 細胞は管腔内の抗原の取り込みの窓口となる細胞で、粘膜免疫応答の開始や制御に重要であると考えられている。そのため、M 細胞は腸管における粘膜免疫システムを理解するための鍵となる細胞である。特に、この細胞は一番始めに抗原と接する細胞であることから、経口ワクチンの標的として、粘膜免疫を人工的に効率良く誘導するアイデアは魅力的であり、M 細胞の発見直後から研究対象となっている。

研究の重要性から M 細胞で機能する分子の解析が望まれていたが、M 細胞は数が少なく研究対象としては困難な細胞であり、M 細胞の分子生物学的解析が始まったのはごく最近のことである。

M 細胞は管腔側の自由面から抗原を取り込み、基底膜側で免疫系細胞と物理的に接触、相互作用することで抗原を受け渡し、その機能を果たすと考えられている。研究開始当初はちょうど M 細胞の分子マーカー、抗原取り込みに働く分子が明らかになった時期であり、これらの新しい情報を用いて、取り込み機構と抗原を受け渡し過程の解析への取り組みが可能になっていた。一方で、免疫細胞との相互作用機構には、不明な点が多く残っており解明への着手が望まれていた。

2. 研究の目的

M 細胞における抗原取り込み機構、受け渡し機構の可視化と分子機構の解明を目指し、以下の点を目的として研究をおこなった。

- (1) M 細胞可視化方法の開発と改良
- (2) M 細胞-免疫細胞間相互作用に関わる分子の発見

3. 研究の方法

- (1) フラットマウント染色法のパイエル板上皮細胞への応用を試み、M 細胞内の細胞内小器官の免疫蛍光染色、M 細胞マーカーと免疫細胞マーカーとの多重染色を行った。
- (2) パイエル板上皮細胞のマイクロアレイデータから M 細胞に高く発現している遺伝子を選び出し、機能解析を行った。

4. 研究成果

- (1) M 細胞可視化法の開発
従来 M 細胞研究の形態学的解析には組織切片を用いた通常の組織化学的解析法、パイエル

板を切りとり、そのまま免疫抗体染色を行うホルマウント染色法が使われてきた。M 細胞はパイエル板上皮細胞に点在して存在しているため、組織の一部しか見ることができない前者の組織切片法では M 細胞の全体像を見ることはできず、作成した切片によっては M 細胞を見つけることすら困難な場合もある。対して後者のホルマウント染色法は、上皮細胞の全体を一度に観察することが可能であり、数の少ない M 細胞には適した方法である。

しかしながら、パイエル板は周囲に絨毛があり、上皮層の上に覆ってしまい観察時の邪魔になる。さらに、そのドーム状の形態は顕微鏡観察過程における封入時に問題を生じ、高倍率での観察を妨げてきていた。

そこで、本研究ではホルマウント法の改良を行い、新たな M 細胞観察方法の開発を行った。

マウス腸管からパイエル板摘出し、EDTA を含むリン酸緩衝液に氷上で処理することで、酵素処理をすることなく上皮層をシート状に剥離することができる。剥離後パラホルムアルデヒドにて固定をし、パラフィン包埋切片を作成後ヘマトキシリン・エオシン染色によってこの上皮層を観察したところ、目立った構造の異常は見られなかった。同様に凍結切片を作成し、アドヘレンスジャンクション、タイトジャンクションのマーカー分子である E-カドヘリン、ZO-1 の免疫蛍光染色を行ったところ、こちらも異常は確認されなかった(図 1)。走査電子顕微鏡による観察も同様であった。剥離による細胞構造への影響は小さく、M 細胞観察には有効であると考えられる。

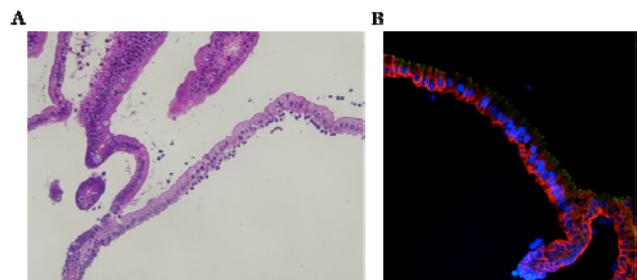


図 1 剥離したパイエル板上皮層のヘマトキシリン・エオシン染色 (A)、免疫蛍光染色 (B) 青は細胞核、赤は E-カドヘリン、緑は ZO-1 に対する抗体のシグナルを表す。

続いて、この剥離した上皮組織シートのフラットマウント染色を行った。具体的には上皮組織シートを上述のように固定後、直に M 細胞マーカーである GP2 抗体を用いて、免疫蛍光抗体法を行い、シート状のまま封入処理をしたサンプルを作製した。共焦点顕微鏡に

より Z 軸方向に数十枚の画像を取得し 3D 画像をコンピューター上で再構築したところ、高解像度の蛍光染色像を得ることができた (図 2)。

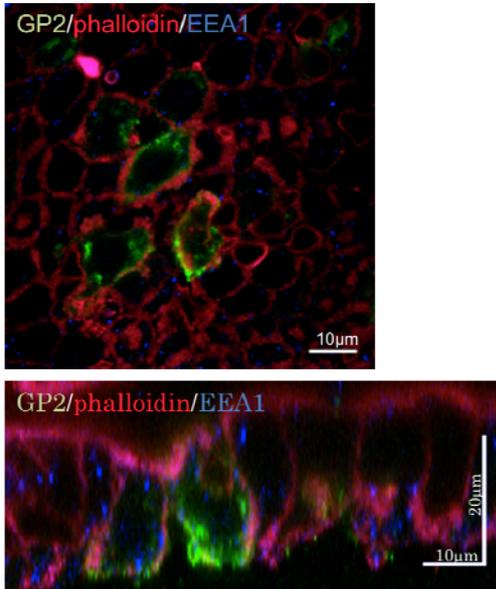


図 2 パリエル板上皮層のフラットマウント染色。

(上図) 共焦点顕微鏡画像 (下図) Z 軸を動かしながら取得した画像を再構築した、縦切りの切片画像。GP2 は M 細胞に多く発現する GPI アンカータンパク質、Phalloidin はアクチン骨格、EEA1 はエンドソームをそれぞれ標識する。

本方法で得られた画像は従来のホールマウント染色と比べて、解像度の大きな改善が見られた。これはフラットマウントにすることによって上皮細胞層とカバーガラスとの間の隙間を少なくすることができたためである。高倍率の対物レンズに使われる油浸レンズの場合、カバーガラスと観察対象物の間に屈折率の異なる物質があると、球面収差を生じて解像度の低下を引き起こす。従来のホールマウント法では、パリエル板のドーム状の形状からカバーガラスとの接する面は、せいぜいドームの頭頂部の一部であるため、非常に狭くなる。他の大部分に至っては対物レンズの性能を十分に生かすことができず、低解像度の画像しかえることができない。フラットマウント法ではパリエル板上皮層の広い範囲を高解像度で観察することが可能であるため、M 細胞頭頂部での抗原取り込み過程、底部での免疫細胞との相互作用の観察に非常に有用である。

(2) M 細胞-免疫細胞間相互作用に関わる分子の発見

① CCL9

CCL9 は細胞遊走に関わるケモカインの一つ

である。CCL9 はパリエル板上皮層で強く発現していることが以前から報告されているが、我々の研究から M 細胞に特化して発現が強いことが明らかになっている。このケモカインが面英細胞との相互作用に関わっているかを調べるために、その受容体である CCR1 の解析を行った。

CCR1 はこれまでマクロファージ、樹状細胞、好中球での mRNA の発現が確認されている。実験対象としているマウスでは良い抗体が無くタンパク質レベルでの解析は進んでいない。そこで、本研究ではマウス CCR1 抗体の作成を行った。

CCR1 の N 末端 11 アミノ酸を合成し作成したペプチドをウサギに免疫し、免疫血清を作成した後、抗原にもちいたペプチドを使用してアフィニティー精製によって抗 CCR1 ポリクローナル抗体を作成した。作成した抗体は CCR1 を強制発現させた HeLa 細胞に反応し、配列のよく似た CCR12 を発現させた細胞には反応せず CCR1 特異的に反応する抗体を得ることができた。

作成した抗体を用いて、マウス小腸の免疫組織化学染色を行ったところ CCR1 陽性細胞はパリエル板上皮細胞層の直下と腸管の粘膜固有層に多く存在することがわかった。フラットマウント法を用いて M 細胞との位置関係を解析したところ、この CCR1 陽性細胞は M 細胞と密に接している様子が多く観察された。この結果は M 細胞と免疫細胞との相互作用に CCL9-CCR1 が関わっていることを示唆する。

現在この CCR1 陽性細胞がそのような種類の免疫細胞であるかを確認するためにフローサイトメトリー解析を行っている。今後、その細胞が明らかになれば M 細胞が腸管免疫応答に果たす役割に関してより深い理解が得られると期待できる。

② M-Sec

M-Sec は TNF α の刺激によって発現が亢進する分子として TNFaip2 として報告された分子である。その機能は未知であった。我々の解析によって M 細胞がこの分子を高く発現していることがわかっていった。

その機能解析を行ったところ、M-Sec を強制発現させた細胞ではチューブ状の膜構造の形成が誘導されることが明らかになった。この膜構造は近年報告されている、トンネルナノチューブ (Tunneling nanotubes, TNTs) 構造に非常に良く似ている。さらに、M-Sec がこの膜構造に多く局在していた。

そこで、TNT 構造をもともと持つ Raw264.7 細胞を用いて RNAi によるノックダウン実験を行ったところ TNT 構造の減少が見られた。TNT 構造は数十マイクロメートルの長いチューブ構造を形成し、遠く離れた細胞間を物理

的につなぐことで、カルシウムシグナルの伝達などの細胞間相互作用に働く構造である。M-SecはこのTNT構造の形成に働くことから、M細胞がTNT構造を使って、免疫細胞と相互作用している可能性が考えられる。

今後、M-Secのノックアウトマウスを作成しM細胞におけるTNT構造の機能を解析する。

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5件)

1. Takahashi D, Hase K, Kimura S, Nakatsu F, Ohmae M, Mandai Y, Sato T, Date Y, Ebisawa M, Kato T, Obata Y, Fukuda S, Kawamura Y, Dohi D, Katsuno T, Yokosuka O, Waguri S, and Ohno H: The epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B secures gut immune homeostasis in mice. *Gastroenterology in press*, 2011 (査読あり)

2. Ohno H, Hase K, Kimura S: M-Sec: Emerging secrets of tunneling nanotube formation. *Commun Integr Biol.* 3(3):231-3, 2010 (査読あり)

3. 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 (12), 1427-32, 2009 (査読あり)

4. 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 (7270), 226-30, 2009 (査読あり)

5. Kimura S, Fujita N, Noda T, Yoshimori T: Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. *Methods Enzymol* 452, 1-12, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計4件)

1. Koji Hase, Shunsuke Kimura, Hiroshi Ohno: M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the

exocyst complex, 第14回国際免疫学会議, 2010年8月26日, 兵庫県神戸市

2. Ryo Yamazaki, Shunsuke Kimura, Masashi Ebisawa, Yasuhiro Date, Satoshi Tsuneda, Haruhiko Suzuki, Koji Hase and Hiroshi Ohno: Functional analysis of CCL9 in small intestine, 日本免疫学会, 2009年12月2日, 大阪府大阪市

3. Shunsuke Kimura, Ayako Sakamoto, Ryo Yamazaki, Kazuya Kawano, Koji Hase, Hiroshi Ohno: 日本細胞生物学会, 2009年6月2日, 愛知県名古屋市

4. Ryo Yamazaki, Shunsuke Kimura, Koji Hase, Masashi Ebisawa, Yasuhiro Date and Hiroshi Ohno: Functional analysis of CCL9 in small intestine, 日本細胞生物学会, 2009年6月2日, 愛知県名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 俊介 (KIMURA SHUNSUKE)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 40444525