

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 5日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790343

研究課題名（和文）M細胞の細胞内粒子透過能をもたらす遺伝子の発現クローニング

研究課題名（英文）Expression cloning of the gene that transform Caco-2 cells to M cells

研究代表者

小林 基弘 (KOBAYASHI MOTOHIRO)

信州大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00362137

研究成果の概要(和文): ヒトM細胞のモデルであるCaco-2細胞/Raji細胞共培養系を用いて, Caco-2細胞をM細胞に分化させ, M細胞の細胞内粒子透過能をもたらす遺伝子を発現クローニングによって単離同定することを目標とした. この系によるM細胞への分化誘導の至適条件を検討してきたが, 再現性のある分化誘導は実現できなかった. また, lipofection法によるCaco-2細胞への遺伝子導入効率極めて低く, この方法によって発現クローニングを行うことは極めて困難であると判断された.

研究成果の概要(英文): Our research goal was to clone the gene that transforms Caco-2 cells into M cells, which transcytose antigenic molecules in the intestinal lumen to subepithelial immune cells, by employing the Caco-2/Raji cells co-culture system. While we tried to find optimal condition for the induction of M cell phenotype, reproducible condition was not identified. Moreover, the transfection efficiency of Caco-2 cells by a lipofection method was too low to perform expression cloning.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：M細胞, 発現クローニング

1. 研究開始当初の背景

消化管, 殊に腸管粘膜は, 体内にあるにも拘わらず外界に接しており, 常に異種抗原に暴露されている. 腸管粘膜固有層には粘膜免疫を司るリンパ球が浸潤し, パイエル板を始めとする粘膜関連リンパ組織 (mucosa-associated lymphoid tissue: MALT) を形成している. このMALTには, 末

梢リンパ節, 扁桃と同様, 高内皮細静脈 (high endothelial venule: HEV) が存在し, ここから末梢血中のリンパ球が血管外遊走している. 一般に, HEV内腔面には硫酸化シアリルルイスX糖鎖に加えて, 接着分子mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) が特異的に発現している. MAdCAM-1のレセプターである $\alpha 4\beta 7$ インテグリンは, 主にメモリーTリンパ球上に発現し

しており、これらの分子間結合によって、腸管特異的なリンパ球ホーミングがもたらされている。

これまでに種々の慢性炎症性疾患において、硫酸化シアリルルイス X 糖鎖を発現した HEV 様血管の誘導が報告されており (Aloisi *et al. Nat Rev Immunol* 6: 205-217, 2006), われわれも、ヘリコバクター関連慢性胃炎 (Kobayashi *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17807-17812, 2004) および潰瘍性大腸炎 (Suzawa *et al. Am J Gastroenterol* 102: 1499-1509, 2007) において粘膜固有層に HEV 様血管が誘導され、慢性炎症の程度に応じて、その出現頻度が増加していることを明らかにした。さらに最近、MAdCAM-1 は、そのムチン様ドメインに硫酸化シアリルルイス X 糖鎖付加を受けることにより、L-セレクチンリガンドとしても機能し、活動期潰瘍性大腸炎のリンパ球浸潤に寄与していることを明らかにした (Kobayashi *et al. Inflamm Bowel Dis* 15: 697-706, 2009)。

こうして形成された MALT は濾胞関連上皮 (follicle-associated epithelium: FAE) で被覆されているが、FAE の大部分を占める吸収上皮細胞に混じて、微絨毛の発達が悪く、基底側に種々の免疫担当細胞を抱え込んだポケット状の窪みを形成している M 細胞 (membranous or microfold cell) が散在している。M 細胞は陰窩から分化する上皮細胞であるが (Kerneis *et al. Science* 227: 949-952, 1997), マクロファージと同様に抗原を積極的に取り込む機能も有し、MHC class II 抗原を表出している。また、病原微生物上のレクチン (様タンパク) が認識する糖鎖構造を表出しており、病原微生物や食餌性高分子などの異種抗原を効果的に取り込み、ポケット内や直下の粘膜固有層に控えている抗原提示細胞に受け渡していると考えられている。

これまでの M 細胞に関する研究はマウスに関するものが多く、ヒト M 細胞の分子生物学的特性については不明な点が多い。マウスでは *Ulex europaeus agglutinin 1* (UEA-1) レクチンの認識する $\alpha 1, 2$ 結合フコース含有糖鎖が M 細胞のマーカーとして用いられており、最近では、清野らが $\alpha 1, 2$ 結合フコース含有糖鎖を認識する NK16-2-4 抗体を作製し、マウス M 細胞の新たなマーカーとして用いている (Nochi *et al. J Exp Med* 204: 2789-2796, 2007)。しかしながら、ヒト M 細胞の特異的なマーカーが同定されていないことに加え、M 細胞の消化管粘膜上皮に占める割合が低いことから、解析に十分な数の M 細胞を採取することが困難であることがヒト M 細胞の研究を困難にしている。

現在 M 細胞の研究に用いられている *in vitro* の系としては、ヒト大腸癌由来 Caco-2

細胞と、ヒトパーキットリンパ腫由来 Raji 細胞を Transwell フィルターで仕切って共培養し、Raji 細胞の産生する液性因子によって、Caco-2 細胞を M 細胞に分化させる系がある (Gulberg *et al. Biochem Biophys Res Commun* 279: 808-813, 2000)。この系で Caco-2 細胞から分化した M 細胞は、生体の M 細胞と同様、細胞内粒子透過能、即ち、ラテックスビーズなどの粒子を管腔側に加えると、細胞内透過によって基底膜側に透過させる性質を獲得している。

2. 研究の目的

ヒト M 細胞の *in vitro* モデルである上記 Caco-2 細胞/Raji 細胞共培養系を用いて、Caco-2 細胞を M 細胞に分化させ、M 細胞の最も重要な機能である細胞内粒子透過能をもたらす遺伝子を発現クローニングによって単離同定することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) Caco-2 細胞-Raji 細胞共培養系の確立と M 細胞への分化の確認

直径 6.5 mm、孔径 3 μm の Transwell フィルターの裏面に 3×10^5 個の Caco-2 細胞を撒き (図 1. A), 一晩後に Transwell insert を上下反転させて 24 穴プレートに装着する (図 1. B)。そのまま 14 日間培養し、Caco-2 細胞を刷子縁を持った単層の吸収上皮に分化させる (図 1. C)。Caco-2 細胞の基底側になる Transwell の upper chamber に 1×10^6 個の Raji 細胞を加えて共培養を開始し (図 1. D), 2 日後に Raji 細胞が Transwell フィルターを通過して一部の Caco-2 細胞の細胞内ポケットに集積していること (図 1. E), さらに、刷子縁における villin および sucrase-isomaltase の発現低下など、これまで報告されているヒト M 細胞の特徴と矛盾がないことをレーザー共焦点顕微鏡で確認する。

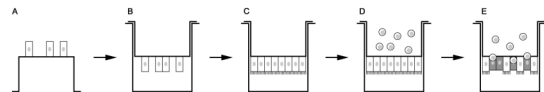


図 1. Caco-2 細胞-Raji 細胞共培養系による M 細胞への分化

(2) 細胞内粒子透過能の評価

FITC 標識された直径 0.1 μm のラテックスビーズを 1×10^8 個含んだ培地を Transwell の upper chamber に加える (次頁図 2. D)。Transwell フィルターおよび Caco-2 細胞層を通過し、Transwell の lower chamber に透

過したビーズ（次頁図 2.E）の数をフローサイトメーターでカウントする。Raji 細胞と共培養していない Caco-2 細胞は細胞内粒子透過能を欠くので、これを陰性コントロールとする。

(3) cDNA ライブラリーの作製

M 細胞に分化した Caco-2 細胞から mRNA を抽出し、哺乳細胞用発現ベクター (pcDNA1) にサブクローニングされた cDNA ライブラリーを作製する。発現クローニングにおいては、高品質の cDNA ライブラリーを作製する必要があるため、cDNA ライブラリー作製は Invitrogen 社に委託する。

(4) 発現クローニング

12 個の Transwell inserts の裏面に Caco-2 細胞を撒き、上記(1)と同様の方法で Caco-2 細胞を単層の吸収上皮に分化させる（前頁図 1.A-C）。上記(3)で作製した cDNA ライブラリーの aliquot を、各 Transwell insert の Caco-2 細胞に遺伝子導入する（図 2.A）。3 時間後に Transwell insert を上下反転させ、24 穴プレートに装着し（図 2.B）、2 日間培養して cDNA ライブラリーの遺伝子を発現させ、M 細胞に分化させる（図 2.C）。12 個の Transwell inserts の細胞内粒子透過能を上記 2. と同様の方法で評価し（図 2.D, E）、最も透過能の高いものから Hirt 法を用いてプラスミドを回収する。コンピテント細胞 MC1061/P3 を形質転換させ、得られた cDNA ライブラリーを 12 等分し、次ラウンドの遺伝子導入に用いる。この作業を繰り返す (sib selection)。最終的に Caco-2 細胞に細胞内粒子透過能をもたらす MC1061/P3 のシングルコロニーを得る。得られたプラスミドに組み込まれた cDNA の塩基配列を決定する。

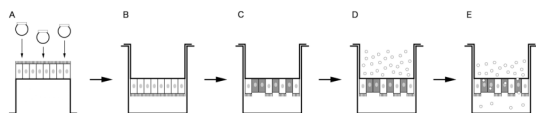


図 2. 細胞内粒子透過能に着目した発現クローニングの戦略

4. 研究成果

これまでに発表された論文 (Gullberg *et al. Biochem Biophys Res Commun* 279: 808-813, 2000 (ほか)) に述べられている条件に加え、考えられ得るパラメータの至適条件の検討を行ってきたが、再現性のある M 細胞への分化誘導は実現できなかった (図 3)。さらに、平成 22 年度に作製した cDNA ライブラリーの Caco-2 細胞への遺伝子導入実験を行うための予備実験として、GFP 発現ベクター

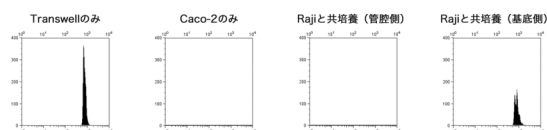


図 3. Caco-2/Raji 細胞共培養系による M 細胞の FITC 標識ビーズ透過能 (未発表データ)

を通常の lipofection 法で行ったところ、遺伝子導入効率は数%程度と極めて低く、この方法によって発現クローニングを行うことは極めて困難であると判断された。そこで、ウイルスベクターにサブクローニングされた cDNA ライブラリーを作製することにより、高い遺伝子導入効率が期待できるウイルス感染による遺伝子導入を行う方向で準備を進めてきた。しかしながら、前述の通り、再現性のある、安定した M 細胞への分化誘導の至適条件がこれまでに得られていないことから、現在のところスクリーニングを行うことが困難である。

本研究課題は、国内外を見ても独創性に富んだものであり、引き続き研究を行って行きたい。M 細胞への分化誘導に関しては、実際に Caco-2/Raji 細胞共培養系による M 細胞の分化誘導に成功している研究者を訪ね、実際の彼らの手技を見学させてもらうことを検討している。ウイルスベクターにサブクローニングされた cDNA ライブラリーの作製に関しては、この方面の経験、実績とも豊富な研究者の協力が得られている。

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 7 件)

- ① Shimojo H, Kobayashi M (corresponding author), Kamigaito T, Shimojo Y, Fukuda M, Nakayama J. Reduced glycosylation of α -dystroglycans on carcinoma cells contributes to formation of highly infiltrative histological patterns in prostate cancer. *Prostate* 71: 1151-1157, 2011. DOI: 10.1002/pros.21330. 査読有
- ② Kobayashi M (corresponding author), Mitoma J, Hoshino H, Yu SY, Shimojo Y, Suzawa K, Khoo KH, Fukuda M, Nakayama J. Prominent expression of sialyl Lewis X-capped core 2-branched O-glycans on high endothelial venule-like vessels in gastric MALT lymphoma. *J Pathol* 224: 67-77, 2011. DOI: 10.1002/path.2851. 査読有
- ③ Hoshino H, Kobayashi M (corresponding

- author), Mitoma J, Sato Y, Fukuda M, Nakayama J. An integrin $\alpha 4\beta 7$ -IgG heterodimeric chimera binds to MAdCAM-1 on high endothelial venules in gut-associated lymphoid tissue. *J Histochem Cytochem* 59: 572-583, 2011. DOI: 10.1369/0022155411404416. 査読有
- ④ Hoshino H, Tsuchida A, Kametani K, Mori M, Nishizawa T, Suzuki T, Nakamura H, Lee H, Ito Y, Kobayashi M, Masumoto J, Fujita M, Fukuda M, Nakayama J. Membrane-associated activation of cholesterol α -D-glucosyltransferase, an enzyme responsible for biosynthesis of cholesteryl- α -D-glucopyranoside in *Helicobacter pylori* critical for its survival. *J Histochem Cytochem* 59: 89-105, 2011. DOI: 10.1369/jhc.2010.957092. 査読有
- ⑤ Suzuki A, Kobayashi M, Matsuda K, Matsumoto T, Kawakubo M, Kumazawa S, Koide N, Miyagawa S, Ota H. Induction of high endothelial venule-like vessels expressing GlcNAc6ST-1-mediated L-selectin ligand carbohydrate and mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) in a mouse model of “*Candidatus Helicobacter heilmannii*”-induced gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Helicobacter* 15: 538-548, 2010. DOI: 10.1111/j.1523-5378.2010.00801.x. 査読有
- ⑥ Hirakawa J, Tsuboi K, Sato K, Kobayashi M, Watanabe S, Takakura A, Imai Y, Ito Y, Fukuda M, Kawashima H. Novel anti-carbohydrate antibodies reveal the cooperative function of sulfated N- and O-glycans in lymphocyte homing. *J Biol Chem* 285: 40864-40878, 2010. DOI: 10.1074/jbc.M110.167296. 査読有
- ⑦ Kobayashi M (corresponding author), Nakayama J. Immunohistochemical analysis of carbohydrate antigens in chronic inflammatory gastrointestinal diseases. *Methods Enzymol* 479: 271-289, 2010. DOI: 10.1016/S0076-6879(10)79016-9. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Fujiwara M, Kobayashi M, Hoshino H, Uchimura K, Sakai Y, Nakada T, Fukuda M, Nakayama J. Production of an

antibody against long-form N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase 1 that is expressed in human high endothelial venules. Annual Conference of the Society for Glycobiology, 2011.11.11, Seattle, WA, USA.

- ② 小林基弘, 中山淳. Prominent expression of sLeX-capped core 2 O-glycans on HEV-like vessels in gastric MALT lymphoma. 第100回日本病理学会総会, 2011.4.29, 横浜.
- ③ Ito Y, Vela JL, Matumura F, Hoshino H, Tyznik A, Lee H, Kobayashi M, Seeberger P, Nakayama J, Kronenberg M, Fukuda M. Cholesteryl α -glucosides of *Helicobacter pylori* play critical roles in bacterial growth and innate immunity by invariant natural killer T cells. Annual Conference of the Society for Glycobiology, 2010.11.10, St. Petersburg, FL, USA.
- ④ Kobayashi M, Mitoma J, Hoshino H, Yu SY, Shimojo Y, Suzawa K, Khoo KH, Fukuda M, Nakayama J. O-glycans carrying non-sulfated sialyl Lewis X appearing on HEV-like vessels in gastric MALT lymphoma function as L-selectin ligands. Annual Conference of the Society for Glycobiology, 2010.11.9, St. Petersburg, FL, USA.
- ⑤ Shimojo H, Kobayashi M, Fukuda M, Nakayama J. Reduced glycosylation of α -dystroglycans on carcinoma cells contributes to formation of highly infiltrative histological patterns in prostate cancer. Annual Conference of the Society for Glycobiology, 2010.11.9, St. Petersburg, FL, USA.
- ⑥ Bao X, Nakayama J, Miler M, Pham A, Kobayashi M, Kawashima H, Broide D, Fukuda M. Deficiency of L-selectin ligand biosynthesis by knocking out of GlcNAc6ST-1 and -2 suppresses asthmatic response in murine model of asthma. Annual Conference of the Society for Glycobiology, 2010.11.9, St. Petersburg, FL, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 基弘 (KOBAYASHI MOTOHIRO)
信州大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 00362137

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：