

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659199
 研究課題名（和文） M細胞の機能解析を目的としたパイエル板M細胞特異的欠損マウスの作製
 研究課題名（英文） Establishment of Peyer's patch M-cell-deficient mice to analyze M-cell function
 研究代表者
 佐藤 慎太郎 (SATO SHINTARO)
 東京大学・医科学研究所・助教
 研究者番号：80447333

研究成果の概要（和文）：

外来抗原の取り込みに特化していると考えられている M 細胞の重要性を明らかにする目的で、M 細胞欠損マウスの作製に挑んだ。研究を進めていく過程で、血球系細胞で機能していることが知られている転写因子 Spi-B が、腸管上皮細胞において M 細胞特異的に発現していることを発見した。Spi-B 欠損マウスを解析したところ、GP2 陽性のいわゆる成熟 M 細胞が完全に欠失していた。このマウスを用いて当初予定していた解析を進めた結果、成熟 M 細胞は病原性細菌が効率よくパイエル板内に取り込まれるために必要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Although many of the biological features of microfold cells (M cells) have been known for many years, the molecular mechanisms of M-cell development and antigen recognition have remained unclear. Here, we report that transcription factor Spi-B was specifically expressed in M cells among non-hematopoietic lineages. Spi-B-deficient mice showed reduced expression of most, but not all, other M cell-specific genes and M-cell surface markers. Whereas uptake of *Salmonella* Typhimurium via M cells was obviously reduced in Spi-B-deficient mice, the abundance of intra-tissue cohabiting bacteria was comparable between wild-type and Spi-B-deficient mice. These data indicate that there is a small M-cell population with developmental regulation that is Spi-B independent; however, Spi-B is probably a candidate master regulator of M-cell functional maturation and development by another pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：発生病理・M細胞

1. 研究開始当初の背景

食物抗原やアレルゲン、病原性微生物などの外来抗原は、消化管や呼吸器をはじめとする広大な粘膜組織表面を介して絶えず我々の体内に侵入してくるが、これら外来抗原を認識・処理する機構が粘膜免疫機構である。この粘膜免疫機構のユニークな点は、粘膜系

および全身系の免疫応答を誘導・制御（寛容）できることであり、このような粘膜免疫機構の特性を医学的に応用したものが経口・経鼻ワクチンである。したがって、外来抗原の取り込み機構の理解は、より効率的な経口・経鼻ワクチンの開発に重要である。外来抗原の取り込み・侵入門戸は、腸管にお

けるパイエル板や呼吸器における鼻咽頭関連リンパ組織などの粘膜系リンパ組織を覆う特殊上皮層に存在するM細胞であるとされている。しかしながら腸管においては、樹状細胞による直接的な抗原取り込み機構の存在が最近明らかにされており (Vazquez-Torres, A., et al., Nature 401:804, 1999.; Rescigno, M., et al., Nat. Immunol. 2:361, 2001.; Niess, J.H., et al., Science 307:254, 2005.)、また、「M細胞様」細胞の存在が小腸上皮細胞や鼻腔粘膜上皮層に認められており (Terahara, K., et al., J. Immunol. 180:7840, 2008.; Kim, D.Y., et al., under submitted)、抗原取り込みあるいは病原性微生物の侵入門戸として、「M細胞がどの程度寄与しているのか」、「実際に必須なのか」、という疑問が生じてきている。

2. 研究の目的

申請者が所属する研究室ではこれまでに、パイエル板M細胞を機能的、分化・発生学的に理解しようとする目的で、パイエル板M細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体 (NKM-16-4-2) の樹立 (Nochi, T., et al., J. Exp. Med. 204:2789, 2007.) や、その抗体のアドバンテージを利用したパイエル板M細胞特異的発現分子の探索に取り組んできた。その結果、微生物の FimH タンパク質を認識し、その微生物が効率的にM細胞を介して取り込まれるのに必須である Glycoprotein 2 (GP2) を含む数種のM細胞特異的分子の同定に成功している (Terahara, K., et al., J. Immunol. 180:7840, 2008.; Hase, K., et al., Nature 462:226, 2009.)。

本研究では、以上のような背景と申請者らのこれまでの知見を基に、M細胞特異的欠損マウスの作製に挑み、そのマウスの表現型を解析することで、M細胞が実際にどの程度抗原取り込みに寄与し、粘膜免疫システムの惹起および恒常性の維持に関与しているかを直接的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究で実際に作出するマウス (floxed-EGFP-STOP/DT-A マウス) は、loxP 配列で挟まれた EGFP 遺伝子と強力な転写停止配列 (bpA および STOP [Buch, T. et al., Nat. Methods 2:419, 2005.]) の下流に、DT-A をコードする cDNA 配列を繋いだ遺伝子カセットを、内在性の GP2 プロモーター下で転写されるようにしたものである。Cre 非存在下では転写は EGFP までで止まり、また PGK プロモーターで制御されるネオマイシン耐性遺伝子の転写も bpA および STOP 配列によりその先まで進むことはない。Cre 存在下では、loxP で挟まれた EGFP 遺伝子と転写停止配列が除かれるため、DT-A 遺伝子が転写を受け、

続いて翻訳されることになる。GP2 の開始コドンに続けて loxP 配列、EGFP 遺伝子を in-flame になるように組み込み、転写制御および翻訳開始点は GP2 のものを利用する。ターゲティングベクターを構築し、定法に従って GP2 ゲノムを目的の遺伝子配列に置き換えた floxed-EGFP-STOP/DT-A マウスを作製する。ヘテロ型 floxed-EGFP-STOP/DT-A マウスが得られ次第、それと Villin1-Cre マウスまたは Villin1-Cre-ERT2 マウス (Marjou, F.E., et al., Genesis 39:186, 2004.) との掛け合わせを開始する。

マウスの作製完了後、得られた個体からパイエル板を採取し、走査型電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡、また NKM 16-2-4 抗体を用いた共焦点レーザー顕微鏡解析等を駆使することで、形態学および組織学的にM細胞が欠損されていることを証明する。

機能的な解析として、蛍光標識した卵白アルブミン (可溶性抗原) や GFP 発現サルモネラ等の各種細菌を用い、粘膜上皮層での抗原取り込み能力をコントロールマウス (同腹仔の Cre マウス) と比較する。

さらに、腸内環境の恒常性維持にパイエル板M細胞が寄与しているかについて検証するために、腸内細菌叢のプロファイリングを行い、比較検討を行う。加えて、最近申請者らは、マウスおよびヒト小腸パイエル板内において腸内共生細菌の一種である *Alcaligenes* が優勢的に存在している事を見出している (Obata, T., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 107:7419, 2010) ことから、*Alcaligenes* の組織内共生が、パイエル板M細胞が欠失している状態でも維持されているかについても観察する。これには申請者らが開発した *Alcaligenes* を可視化する FISH 法や、ELISA 法による *Alcaligenes* 特異的 IgA の定量をもつて行う。

4. 研究成果

初年度に並行して進めていた、新規M細胞特異的発現分子の探索により同定した、転写因子 Spi-B のM細胞における局在の確認と機能解析を行ったところ、実際に Spi-B は腸管上皮細胞において、M細胞特異的に発現しており、さらに Spi-B 欠損マウスではM細胞表面マーカー分子 GP2 の発現が完全に消失していた。また、Spi-B 欠損マウスでは病原細菌 (サルモネラ菌、エルシニア菌) のパイエル板内への取り込みが有意に減少していた。その一方で興味深いことに、これまでにM細胞特異的発現分子として報告されているものの中には、Spi-B 欠損マウスにおいてもその発現が認められるものがあった。このことは、Spi-B がM細胞の分化段階の後期で機能していることを示唆するものである。さらに、レクチン反応性や微細構造の形態学的特徴か

ら M 細胞に定義される細胞は、極少数ながらも Spi-B 欠損マウスにおいても認められたことから、M 細胞には Spi-B 非依存性に分化するものがあることも明らかになった。

研究代表者の属する研究室ではこれまでに、パイエル板内に共生するユニークな腸内細菌として *Alcaligenes* 属を報告しているが、今回の研究により、*Alcaligenes* が Spi-B 依存性・非依存性を問わず、M 細胞を介して管腔内から取り込まれることが新たにわかった。実際、Spi-B 欠損マウスにおいても *Alcaligenes* はパイエル板内に野生型マウスと同程度検出された。以上の結果は、Spi-B 自身および Spi-B が発現調節する分子は、腸内共生細菌の取り込みに関しては大きく影響しないことを示唆するものであった。

本研究は当初、ジフテリア毒素を利用した M 細胞欠損マウスの作製に挑むものだったが、今回得られた結果から、Spi-B は M 細胞分化において中心的な役割を担っており、Spi-B 欠損マウスを M 細胞欠損マウスとして利用しようものと考えている。

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 6 件)

- 1) **Sato S**, Kaneto S, Shibata N, Takahashi Y, Okura H, Yuki Y, Kunisawa J, Kiyono H. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.* 2012 Dec 5. doi: 10.1038/mi.2012.122.
- 2) Kong IG, Sato A, Yuki Y, Nochi T, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kurokawa S, Okada K, **Sato S**, Briles DE, Kunisawa J, Inoue Y, Yamamoto M, Akiyoshi K, Kiyono H. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 81:1625-1634, 2013. doi: 10.1128/IAI.00240-13.
- 3) Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, **Sato S**, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. *Cell*

Host Microbe. 12:705-716, 2012. doi: 10.1016/j.chom.2012.10.010.

- 4) Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, **Sato S**, Nakajima S, Iijima H, Kubo M, Kunisawa J, Kiyono H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun.* 3:1034, 2012. doi: 10.1038/ncomms2023.
- 5) **Sato S**, Kiyono H. The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr Opin Virol.* 2:225-232, 2012. doi: 10.1016/j.coviro.2012.03.009.
- 6) Kim DY, Sato A, Fukuyama S, Sagara H, Nagatake T, Kong IG, Goda K, Nochi T, Kunisawa J, **Sato S**, Yokota Y, Lee CH, Kiyono H. The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J Immunol.* 186:4253-4262, 2011.

[学会発表] (計 1 件)

- 1) **Shintaro Sato**, Satoshi Kaneto, Naoko Shibata, Hideaki Okura, and Hiroshi Kiyono. Discovery of novel cell surface markers and two non-redundant pathways for the development of Peyer's patch M cells. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 (神戸) 2012 年 12 月

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 慎太郎 (SATO SHINTARO)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号: 80447333

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: