

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5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790550
 研究課題名（和文） M細胞欠損マウスを用いたM細胞の生体内における存在意義の解明

研究課題名（英文） Evaluation of the effect of M-cell deficiency by using M-cell-deficient mouse model.

研究代表者

金谷 高史 (KANAYA TAKASHI)

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：20553829

研究成果の概要（和文）：腸管内の抗原を取り込み、パイエル板の免疫担当細胞へ伝達する特殊な腸管上皮細胞、M細胞の生体内での重要性は明確には実証されていない。本研究では Spi-B 欠損マウスを M 細胞欠損モデルマウスとして用い、腸管免疫応答における M 細胞の重要性を解析した。M 細胞欠損はネズミチフス菌感染におけるパイエル板における抗原特異的 T 細胞の活性化を阻害し、さらに腸管腔への IgA 抗体の産生を低下させることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：M cells have high capacity for phagocytosis and transcytosis, which enables the rapid transport of liminal antigen to underlying immune cells of Peyer's patches. However, the importance of M cells in mucosal immune response has not been demonstrated. We have evaluated the effect of M-cell deficiency in mucosal immune response by using Spi-B-deficient mice (*Spib* KO), which completely lack functional M cells in Peyer's patches. As a result of this, we confirmed that impaired immune response to *Salmonella* Typhimurium infection in *Spib* KO mice.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

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、腸管免疫

1. 研究開始当初の背景

体外環境との境界をなす腸管粘膜上皮は、大量の食物抗原や、食物と共に摂取される外来性の細菌やウイルスに曝されている。腸管にはパイエル板をはじめとする腸管関連リンパ組織が発達しており、上皮細胞を介して腸内の微生物などの抗原を腸管腔から取り込んで監視することにより、腸管免疫恒常性の維持に重要な役割を果たしている。FAE (follicle-associated epithelium) と呼ばれるパイエル板を覆う上皮層には、M細胞と呼ばれる特殊な腸管上皮細胞が点在している。M細胞は腸管内抗原を取り込み、トラン

スサイトーシスと呼ばれる細胞内輸送系により FAE 下の抗原提示細胞に受け渡すことで腸管免疫監視における主要な役割を担うと考えられている。しかしながら、M細胞はその絶対数が少なく、特異的マーカー分子も存在しなかったことから、これまで M細胞の機能や分化のメカニズムはほとんど解明されていなかった。その結果、M細胞を欠損する表現型を有するマウスは存在せず、M細胞の生体内における重要性を実証することは困難であった。

2. 研究の目的

申請者はM細胞分化機構の解明に取り組んだ結果、ets family 転写因子の Spi-B が M 細胞に高発現することおよび Spi-B 欠損マウスは機能的に成熟した M 細胞を欠損することを明らかにした。この結果、今まで腸管免疫に関する研究において切望されていた M 細胞欠損マウスを用いることが可能となった。本研究では Spi-B 欠損マウスを用い、腸管免疫における M 細胞の重要性を実証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) パイエル板への病原性細菌の取り込みの測定

Spi-B 欠損マウスでは成熟した M 細胞が完全に欠損する（以後 Spi-B 欠損マウスを M 細胞欠損マウスとする）。まず M 細胞欠損がパイエル板への病原性細菌の取り込みに与える影響を解析する。本研究ではネズミチフス菌とエルシニアを病原性細菌の感染モデルとして使用する。M 細胞欠損および野生型マウスへネズミチフス菌とエルシニアを経口的に投与し、パイエル板にとりこまれた細菌数を比較する。

(2) ネズミチフス菌特異的 T 細胞活性化の測定

ネズミチフス菌感染における腸管免疫応答を評価するため、M 細胞欠損が抗原特異的な CD4+T 細胞の活性化に及ぼす影響を調べるため、ネズミチフス菌を認識して活性化させる SM1-T 細胞を使用する。SM1-T 細胞を M 細胞欠損および野生型マウスへ移入し、ネズミチフス菌感染後のパイエル板における SM1-T 細胞の活性化および増殖を測定する。

(3) 糞中に分泌されたネズミチフス菌特異的 IgA 抗体の測定

ネズミチフス菌を経口感染させた後、糞を採取し、ネズミチフス菌特異的 IgA 抗体の産生量を ELISA で測定する。なお野生型のネズミチフス菌を投与するとマウスに投与すると 1-2 週間で死亡するため、IgA 抗体産生を測定する際は弱毒のネズミチフス菌を用いる。

(4) M 細胞欠損がネズミチフス菌感染時の生存率に与える影響の評価

項目 (3) の研究項目において弱毒性のネズミチフス菌をマウスへ感染させた。この結果、野生型マウスの糞中の IgA 抗体産生量は上昇することから、ネズミチフス菌に対するワクチン効果が得られていると考えられる。そこで弱毒性のネズミチフス菌を投与後、IgA 抗体価が上昇した時点で致死性の野生型ネズミチフス菌を経口感染させ、生存率を調べる。

4. 研究成果

(1) M 細胞欠損マウスのパイエル板では病原性細菌の取り込みが減少する

M 細胞欠損マウスおよび野生型マウスにネズミチフス菌およびエルシニアを経口的に投与した後、マウスからパイエル板を採取した。採取したパイエル板をすり潰し、それぞれの細菌の選択培地に播種し、コロニー数をカウントした。その結果、M 細胞欠損マウスパイエル板においてネズミチフス菌およびエルシニアの取り込みが著しく減少していた。

(2) M 細胞欠損マウスでは抗原特異的 CD4+T 細胞の活性化が阻害される

SM1-T 細胞を移入した M 細胞欠損マウスおよび野生型マウスへネズミチフス菌を経口的に感染させ、パイエル板の SM1-T 細胞の活性化を調べた。その結果、M 細胞欠損マウスでは野生型マウスと比較して SM1-T 細胞の活性化マーカーの発現が著しく低下することが認められた。また、活性化に伴う SM1-T 細胞の増殖も減少することが観察された。このことから、M 細胞欠損が抗原特異的な T 細胞活性化を傷害することが示された。

(3) M 細胞欠損は抗原特異的 IgA 抗体産生を減少させる

次に M 細胞欠損によって引き起こされた抗原特異的 T 細胞の活性化が腸管内への抗原特異的 IgA 抗体産生へ与える影響を検証した。Spi-B は B 細胞や形質様樹状細胞にも発現することから、これらの細胞における Spi-B 欠損が抗原特異的 IgA 抗体産生に影響を与える可能性が懸念される。そこで M 細胞欠損および野生型マウスに野生型マウスの骨髄細胞を移植したキメラマウスを作成した（以後この骨髄キメラマウスを M 細胞欠損マウスと表記する）。これらの骨髄キメラマウスに弱毒性（致死性でない）のネズミチフス菌を投与し、1~3 週間後の糞中のネズミチフス菌特異的 IgA 産生を ELISA で測定した。野生型マウスでは感染後 1-2 週間で IgA 抗体価の上昇が観察された。一方 M 細胞欠損マウスでは IgA 抗体価の上昇が野生型マウスと比較して遅く、感染後 3 週間程で IgA 抗体価の上昇が確認された。この結果、M 細胞欠損は腸管内における抗原特異的 IgA 産生を減少させることが示された。

(4) M 細胞欠損による抗原特異的 IgA 産生の低下は感染時の生存率に影響する

項目 (3) の結果、M 細胞欠損マウスにおいてネズミチフス菌特異的 IgA 抗体産生が減少することが示された。この IgA 産生の減少が個体の生存に影響を与えるか検証した。弱毒性のネズミチフス菌を M 細胞欠損および野生型マウスへ経口的に投与し、免疫応答を誘導する。その後、野生型マウスにおいて糞中への IgA 抗体産生が観察された段階で、強毒のネズミチフス菌を経口感

染させた。その後、両マウスの生存率を比較したところ、M細胞欠損マウスは野生型マウスと比較して早く死亡することが明らかとなった。このことから、M細胞が誘導するIgA抗体産生をはじめとする腸管免疫応答は、病原性細菌感染時の生体防御機構として重要であることが示された。

(5) 今後の課題

本研究の成果により、M細胞が腸管免疫応答において重要な役割を果たすことが実証された。今後、様々な病原体感染においてM細胞の重要性を解明していくことが必要であると考えられる。本研究ではM細胞欠損マウスモデルとして、最終的に野生型マウス由来の骨髄細胞により免疫細胞を再構築した骨髄キメラマウスを使用した。しかしながら、一部の免疫細胞は骨髄移植前の放射線照射に対して強い抵抗性をもつため、免疫細胞が完全にはドナー（野生型マウス）由来の細胞に置き換わっていないことが予測される。また、骨髄キメラマウスを作成するためには時間がかかるために若齢個体における免疫応答を評価することがコン案である。これらことから正確に免疫応答への影響を評価するためには、正常な免疫細胞を有するコンディショナルノックアウトマウスをM細胞欠損モデルとして研究に用いることが望ましい。M細胞はネズミチフス菌を積極的に取り込むことから、これに対する免疫応答を誘導する上で重要であるが、ネズミチフス菌がM細胞を介して感染を成立させるという見方もある。実際にM細胞が減少するマウスがある種の病原体感染への抵抗性を示すことが報告されている。このことから、M細胞の生体内における存在意義を明確にするためには、「免疫応答」と「感染」の両面からM細胞の重要性を評価する必要があると考える。

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 Kobayashi A, Donaldson DS, Erridge C, Kanaya T, Williams IR, Ohno H, Mahajan A, Mabbott NA. The functional maturation of M cells is dramatically reduced in the Peyer's patches of aged mice. *Mucosal Immunol.* 2013. doi: 10.1038/mi.2012.141. [Epub ahead of print], 査読あり

- ② Ohno H, Kanaya T, Williams IR. M cell differentiation: distinct lineage or phenotypic transition? *Salmonella provides answers.* *Cell Host Microbe.* 2012;12(5):607-9. doi: 10.1016/j.chom.2012.11.003., 査読あり
- ③ Kobayashi A, Donaldson DS, Kanaya T, Fukuda S, Baillie JK, Freeman TC, Ohno H, Williams IR, Mabbott NA. Identification of novel genes selectively expressed in the follicle-associated epithelium from the meta-analysis of transcriptomics data from multiple mouse cell and tissue populations. *DNA Res.* 2012;19(5):407-22. doi: 10.1093/dnares/dss022., 査読あり
- ④ Kanaya T, Hase K, Takahashi D, Fukuda S, Hoshino K, Sasaki I, Hemmi H, Knoop KA, Kumar N, Sato M, Katsuno T, Yokosuka O, Toyooka K, Nakai K, Sakamoto A, Kitahara Y, Jinnohara T, McSorley SJ, Kaisho T, Williams IR, Ohno H. The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat Immunol.* 2012;13(8):729-36. doi: 10.1038/ni.2352., 査読あり
- ⑤ Obata Y, Takahashi D, Ebisawa M, Kakiguchi K, Yonemura S, Jinnohara T, Kanaya T, Fujimura Y, Ohmae M, Hase K, Ohno H. Epithelial cell-intrinsic Notch signaling plays an essential role in the maintenance of gut immune homeostasis. *J Immunol.* 2012;188(5):2427-36. doi: 10.4049/jimmunol.1101128., 査読あり

- ⑥ Takakura I, Miyazawa K, Kanaya T, Itani W, Watanabe K, Ohwada S, Watanabe H, Hondo T, Rose MT, Mori T, Sakaguchi S, Nishida N, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H. Orally administered prion protein is incorporated by m cells and spreads into lymphoid tissues with macrophages in prion protein knockout mice. *Am J Pathol.* 2011;179(3):1301-9. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.058. , 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kanaya Takashi 他, The Ets transcription factor Spi-B is essential for M-cell differentiation. 第41回日本免疫学会学術集会, 2012年12月05日～2012年12月07日, 神戸国際会議場、神戸国際展示場 (神戸市)
- ② Kanaya Takashi 他, The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal M cells, 第34回内藤コンファレンス, 2012年10月16日～2012年10月19日, シャトラーゼ ガトーキングダム サッポロ (札幌市)

[図書] (計 2 件)

- ① 金谷高史 他, 羊土社, 実験医学増刊 感染・共生・生体防御システム, 2012 年, 3303-3309
- ② Kanaya T, Hondo T, Miyazawa K, Rose M. T, Aso H. The expression of cytokeratins in bovine intestinal microfold (M) cells. *In: "Cytokeratins - Tools in Oncology"* (Ed.: Hamilton G.), 2012. Chapter 1., InTech. Rijeka, Croatia. p. 3-14.

[その他]

ホームページ

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

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/keitai/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金谷 高史 (KANAYA TAKASHI)

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：20553829