

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249029

研究課題名(和文) 抗原取り込みに特化した特殊腸管上皮M細胞の統合的理解

研究課題名(英文) Comprehensive understanding of a unique intestinal epithelial M cells specialized for luminal particulate antigen uptake

研究代表者

大野 博司(OHNO, Hiroshi)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：50233226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,800,000円

研究成果の概要(和文)：Spi-B欠損マウスの解析から、シグナル分子RANKLによる未分化腸管上皮細胞の刺激が転写因子Spi-Bの発言を誘導すること、及びSpi-Bの発現がM細胞のぶんかに必須であることを明らかにした。また、RANKLの下流で働くNF- κ B経路は、古典的経路、非古典的経路ともにM細胞分化に必要なことを明らかにした。さらに、最終分化したM細胞は小腸パイエル板のリンパ濾胞と比較して盲腸のリンパ濾胞には少なく、この違いは、非古典的経路のシグナル分子のひとつであるRelBの発現が、パイエル板では多く、それと比較して盲腸リンパ濾胞では少ないことに起因することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Analysis of Spi-B KO mice have revealed that RANKL-signaling in immature intestinal epithelial cells induces the expression of Spi-B transcription factor, which is prerequisite for subsequent M-cell differentiation. We have further elucidated that both canonical and non-canonical NF- κ B pathways downstream of RANKL-RANKL signaling is required for M-cell differentiation. We have also shown that terminally differentiated M cells are fewer in cecal patches compared to Peyer's patches, and that this is due to the lower expression of RelB, a molecule of the non-canonical NF- κ B pathway, in cecal patches than in Peyer's patches.

研究分野：医学

キーワード：粘膜免疫学 細胞・組織 発生・分化 上皮細胞 M細胞 シグナル伝達 腸内細菌 細菌感染

1. 研究開始当初の背景

体外環境との境界をなす消化管粘膜上皮は、100兆個にも及ぶ腸内常在細菌叢や食餌性抗原、さらには経口的に侵入する細菌やウイルスなどの大量の異物抗原に常に曝されている。消化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、腸内の微生物や食餌性高分子などの抗原に対する適切な免疫応答により、腸管免疫恒常性の維持に重要な役割を果たしている。パイエル板を覆う follicle-associated epithelium (FAE) と呼ばれる上皮領域には M 細胞という特殊な上皮細胞が点在している。

M 細胞はトランスサイトーシスという細胞内輸送系を発達させて微生物などを含む腸内抗原を積極的に取り込み、FAE 直下に存在する樹状細胞に受け渡すことにより、腸管免疫応答の始動に主要な役割を担う。我々はマイクロアレイ解析により、M 細胞特異的に発現する遺伝子群の単離とその機能解析を行い(文献1)、細菌とり込み受容体として GP2 (文献2) を報告してきた。

また、M 細胞の分化に関しては、上皮細胞への RANKL による刺激が重要であることが報告されたが(文献3) その詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、遺伝子欠損マウスや、マウス腸管上皮幹細胞の存在するクリプトの *in vitro* 培養系(エンテロイド)を用いて、M 細胞の分化ならびに機能の分子レベルでの解析、特に個体レベルでの役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

マウスに RANKL を全身投与することにより、小腸絨毛上皮から異所性に M 細胞が分化誘導されること、この際に、転写因子 Spi-B が強く誘導されることがわかった。そこで M 細胞の分化における Spi-B の役割を検討するために、Spi-B 欠損マウスにおける M 細胞の有無、ならびに M 細胞の機能解析を行った。

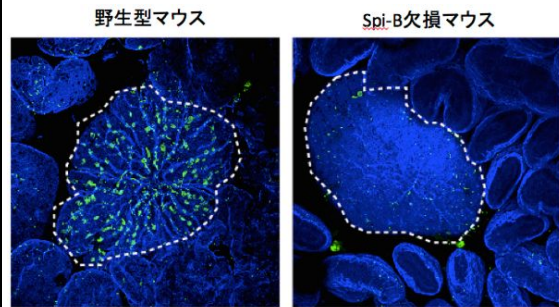
RANK の下流で NF κ B 経路が働いていることが知られている。NF κ B には古典的経路と非古典的経路が存在する。そこで、RANKL 刺激による M 細胞の分化においてこれらの NF κ B 経路が重要であるか否かを検証するために、古典的経路の TRAF6 遺伝子欠損マウスにおける M 細胞の分化を調べた。

一方、非古典的経路の NIK および RelB の欠損マウスではパイエル板が形成されないため必然的に M 細胞も存在せず、マウス個体レベルでは M 細胞の分化への影響を調べることはできない。そこで、これらのマウス腸管から、腸管上皮幹細胞を含むクリプトを回収してマトリゲル中で培養してエンテロイドを形成させ、そこに RANKL を投与することにより *in vitro* で M 細胞分化を誘導する系

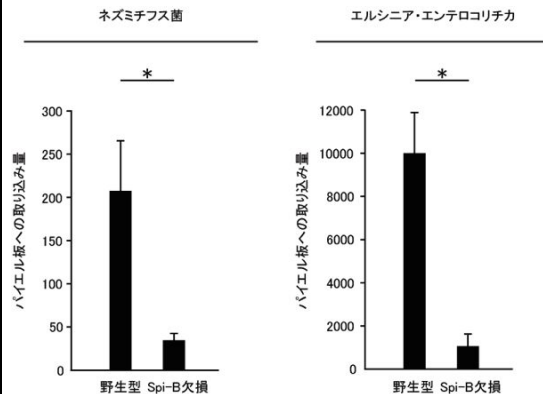
を用いて検討した。

4. 研究成果

Spi-B 欠損マウスのパイエル板上皮を免疫組織化学法にて観察した結果、Spi-B 欠損マウスでは GP2 陽性の M 細胞が欠失していることが示唆された(図1)。これに一致して、電子顕微鏡による観察でも M 細胞に特徴的な微絨毛を持たず M 細胞ポケットを形成して樹状細胞などの免疫細胞を抱え込む像を呈する細胞は見いだせなかった。このように Spi-B 欠損マウスは M 細胞を持たないことが示唆された。



そこで次に、Spi-B 欠損マウスおよび野生型マウスに M 細胞から取り込まれるサルモネラあるいはエルシニアを経口投与し、菌のパイエル板への移行を調べたところ、両菌種とも Spi-B 欠損マウスではパイエル板への取り込みが著しく低下していた(図2)。



さらに、サルモネラ経口投与後のサルモネラ特異的 T 細胞応答を調べた結果、Spi-B 欠損マウスでは、それらが著しく低下されていた。したがって、Spi-B 欠損マウスでは正常な M 細胞の分化が傷害される結果として M 細胞が欠落しており、そのために本来 M 細胞によって取り込まれるサルモネラなどの細菌に対する粘膜免疫応答が障害されることがわかった。

また、われわれが見出した M 細胞特異的に発現する細菌受容体 GP2 を標的とするワクチン送達法に関しては、モデル抗原である OVA と抗 GP2 抗体との融合分子を用いた免疫反応において、より少量の OVA でマウスに免疫寛容を誘導できることから、抗 GP2 抗体との融合タンパク質は、より効率的な経口免疫や経口ワクチンのデザインに有効で

あることが示唆された。

腸管上皮特異的に GPI アンカータンパク質を欠失する腸管上皮特異的 Pig-a 欠損マウスでは、C. rodentium 感染や DSS 腸炎に対する感受性が高かったが、感染や炎症誘導前の小腸・大腸上皮の遺伝子発現パターンは野生型と大きな違いはなかった。

RANKL の下流で働く NF κ B 経路の Spi-B の発現ならびに M 細胞分化における役割を検討するために、まず古典的経路の TRAF6 遺伝子欠損マウスにおける M 細胞の分化を調べたところ、SPI-B の発現もなく、また M 細胞は存在しなかった。また、IKK β 阻害剤 sc-514 によっても M 細胞の分化は抑制されていた。そこで、M 細胞の欠損が腸管免疫系に与える影響を調べるために、腸管上皮特異的 TRAF6 欠損マウスにおいて、腸内細菌叢の組成を次世代シーケンサーを用いたメタ 16S パイロシーケンス解析法により検討したところ、当該欠損マウスでは野生型マウスとは腸内細菌叢が異なることが明らかとなった（未発表データ）。

次に、非古典的経路の NIK および RelB の欠損マウス腸管から、腸管上皮幹細胞を含むクリプトを回収してマトリゲル中で培養してエンテロイドを形成させ、そこに RANKL を投与することにより *in vitro* で M 細胞分化を誘導する系を用いて検討した結果、野生型のマウスから作成したエンテロイドでは RANKL により M 細胞が効率よく誘導されるのに対し、NIK あるいは RelB の欠損マウスのエンテロイドでは RANKL を投与しても M 細胞の分化は認められなかった。これらの結果は、RANKL の下流で NF κ B の古典的経路ならびに非古典的経路の両方が作用することで M 細胞分化が誘導されることを示唆している。

また、M 細胞の最終分化マーカーである GP2 陽性の M 細胞は小腸パイエル板のリンパ濾胞に多く、それと比較して盲腸のリンパ濾胞には少ない。この違いは、非古典的経路のシグナル分子のひとつである RelB の発現が、パイエル板では多く、それと比較して盲腸リンパ濾胞では少ないことに起因することを明らかにした。

さらに、致死率の非常に高い食中毒を起こすことで知られるボツリヌス菌のボツリヌス神経毒素複合体が、M 細胞上の GP2 と結合することにより、M 細胞を介して効率的に体内に取り込まれることが、ボツリヌス毒素による食中毒の分子メカニズムの一端を担っていることを明らかにした。

<引用文献>

1. Hase, K., Ohshima, S., Kawano, K., Hashimoto, N., Matsumoto, K., Saito, H., Ohno, H.: Distinct gene expression profiles characterize cellular phenotypes of follicle-associated epithelium and M

- cells. **DNA Res.** 12 (2): 127-137, 2005
2. Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S. I., Lowe, A. W., Waguri, S., Itoh, K., Kiyono, H., Ohno, H. Uptake through Glycoprotein 2 of FimH⁺ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. **Nature** 462: 226-230, 2009
3. Knoop, K.A., Kumar, N., Butler, B.R., Sakthivel, S.K., Taylor, R.T., Nochi, T., Akiba, H., Yagita, H., Kiyono, H., Williams, I.R.: RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. **J. Immunol.** 183(9): 5738-5747, 2009

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 13 件)

1. Matsumura, T., Sugawara, Y., Yutani, M., Amatsu, S., Yagita, H., Kohda, T., Fukuoka, S.-I., Nakamura, Y., Fukuda, S., Hase, K., Ohno, H., Fujinaga, Y. Botulinum toxin A complex exploits intestinal M cells to enter the host and exert neurotoxicity. **Nat. Commun.** 6: 6255, 2015
2. Kimura, S., Yamakami-Kimura, M., Obata, Y., Hase, K., Kitamura, H., Ohno, H., Iwanaga, T. Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches. **Mucosal Immunol.** 8(3):650-660, 2015
3. Obata, Y., Kimura, S., Nakato, G., Iizuka, K., Miyagawa, Y., Nakamura, Y., Furusawa, Y., Sugiyama, S., Suzuki, K., Ebisawa, M., Fujimura, Y., Yoshida, H., Iwanaga, T., Hase, K., Ohno, H. Epithelial-stromal interaction via Notch signaling is essential for the full maturation of gut-associated lymphoid tissues in mice. **EMBO R.** 15(12):1297-1304, 2014
4. Shima, H., Watanabe, T., Fukuda, S., Fukuoka, S. I., Ohara, O., Ohno, H. A novel mucosal vaccine targeting Peyer's patch M cells induces protective antigen-specific IgA responses. **Int. Immunol.** 26(11): 619-625, 2014
5. Hanazato, M., Nakato, G., Nishikawa,

- F., Hase, K., Nishikawa, S., Ohno, H. Selection of an Aptamer against Mouse GP2 by SELEX. **Cell Struct. Funct.** 39(1): 23-29, 2014
6. Obata, Y., Furusawa, Y., Endo, T. A., Sharif, J., Takahashi, D., Atarashi, K., Nakayama, M., Onawa, S., Fujimura, Y., Takahashi, M., Ikawa, T., Otsubo, T., Kawamura, Y. I., Dohi, T., Tajima, S., Masumoto, H., Ohara, O., Honda, K., Hori, S., Ohno, H., Koseki H, Hase K. The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. **Nat. Immunol.** 15: 571-579, 2014
 7. Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K., Ohno, H. Commensal microbe-derived butyrate induces colonic regulatory T cells. **Nature** 504(7480): 446-450, 2013
 8. Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S., Fritz, J. V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Olle, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., Morita, H., Hattori, M., Honda, K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. **Nature** 500(7461):232-236, 2013
 9. Mandai, Y., Takahashi, D., Hase, K., Obata, Y., Furusawa, Y., Ebisawa, M., Nakagawa, T., Sato, T., Katsuno, T., Saito, Y., Shimaoka, T., Yokosuka, O., Yokote, K., Ohno H. Distinct Roles for CXCR6+ and CXCR6- CD4+ T Cells in the Pathogenesis of Chronic Colitis. **PLoS ONE** 8(6): e65488, 2013
 10. Hase, K., Nakatsu, F., Ohmae, M., Sugihara, K., Shioda, N., Takahashi, D., Obata, Y., Furusawa, Y., Fujimura, Y., Yamashita, T., Fukuda, S., Okamoto, H., Asano, M., Yonemura, S., Ohno, H. AP-1B-mediated protein sorting regulates polarity and proliferation of intestinal epithelial cells in mice. **Gastroenterol.** 145(3): 625-635, 2013
 11. Nakato, G., Hase, K., Suzuki, M., Kimura, M., Ato, M., Hanazato, M., Tobiume, M., Horiuchi |, M., Atarashi, R., Nishida, N., Watarai, M., Imaoka, K., Ohno, H. *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. **J. Immunol.**, 189 (4): 1540-1544, 2012
 12. Kanaya, T., Hase, K., Takahashi, D., Fukuda, S., Hoshino, K., Sasaki, I., Hemmi, H., Knoop, K. A., Kumar, N., Sato, M., Katsuno, T., Yokosuka, O., Toyooka, K., Nakai, K., Sakamoto, A., Kitahara, Y., Jinnohara, T., McSorley, S. J., Kaisho, T., Williams, I. R., Ohno, H. The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal M cells. **Nat. Immunol.**, 13 (8): 729-736, 2012
 13. 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.** 188(5): 2427-2436, 2012
- 〔学会発表〕(計 15 件)
1. Ohno, H. Host-Gut Microbial Communication in Host Defense and Immunity. The Microbiome Forum: Asia (招待講演) 2015 年 3 月 19 日, Kuala Lumpur, Malaysia
 2. 大野博司、腸エコシステムと疾患・生体防御・第 3 5 回日本肥満学会 (教育講演) (招待講演) 2014 年 10 月 24 日、宮崎県宮崎市・シーガイアコンベンションセンター
 3. 大野博司、腸内フローラと生体防御・免疫系 : 統合オミクス手法によるアプローチ、第 4 6 回日本小児感染症学会学術集会 (特別講演) (招待講演) 2014 年 10 月 18 日、東京都新宿区・京王プラザホテル
 4. 大野博司、食品・腸内細菌と生体防御・腸管免疫系 .日本食品免疫学会設立 1 0 周年記念学術大会 (招待講演) 2014 年 10 月 17 日、東京都文京区・東京大学伊藤謝恩ホール
 5. 大野博司、宿主-腸内フローラ相互作用、第 3 5 回日本食品微生物学会学術集会 (教育講演) (招待講演) 2014 年 9 月 19 日、大阪府堺市・大阪府立大学中百舌鳥キャンパス
 6. Ohno, H. Gut microbe-derived butyrate can induce colonic Treg differentiation . Cold Spring Harbor Conferences Asia 2014: Frontiers of Immunology in Health & Diseases(招待講演) 2014 年 9 月 5 日、 Suzhou, China

7. 大野博司、統合オミクス手法による宿主腸内フローラ相互作用の解析、第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会(招待講演)2014年7月10日、東京都新宿区・京王プラザホテル
8. Ohno, H. Integrative multi-omics approach for analyzing gut ecosystem. 第18回腸内細菌学会 (International Symposium) (招待講演)2014年6月12日、東京都文京区・東京大学伊藤国際学術研究センター
9. Shimokawa, C., Kanaya, T., Kaisho, T., Ohno, H. The role of M cells in intestinal helminthic infection. 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年12月13日、千葉県千葉市・幕張メッセ
10. Ohno, H. Differentiation and function of M cells, a unique subset of intestinal epithelial cells specialized for mucosal antigen-uptake. 16th International Congress of Mucosal Immunology (招待講演)2013年7月19日、Vancouver, Canada
11. Ohno, H. Differentiation and function of M cells, a unique subset of intestinal epithelial cells specialized for mucosal antigen-uptake. The American Association of Immunologists Annual Meeting (招待講演)2013年5月6日、Honolulu, Hawaii, USA
12. 大野博司、腸内細菌と疾患、第86回日本内分泌学会学術総会(招待講演)、2013年4月26日、宮城県仙台市・仙台国際センター
13. Ohno, H. Function and differentiation of M cells, a unique subset of intestinal epithelial cells specialized for mucosal antigen-uptake. The 12th International Symposium on Dendritic Cells (招待講演)2012年10月11日、Daegu, Korea
14. Ohno, H. M cells, a unique subset of intestinal epithelial cells specialized for mucosal antigen-uptake. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity (招待講演). 2012年9月14日、兵庫県淡路島市・兵庫県立淡路夢舞台国際会議場
15. Ohno, H. Antigen delivery to the gut immune system through epithelium: M cells vs FAE? Gordon Research Conference, Lysosomes & Endocytosis (招待講演)2012年6月20日、Andover, NH, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

理化学研究所統合生命医科学研究センター
粘膜システム研究グループ

http://www.riken.jp/research/labs/ims/intest_ecosys/

理化学研究所統合生命医科学研究センター
粘膜システム研究グループ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 博司 (OHNO, Hiroshi)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：50233226

(2) 研究分担者

金谷 高史 (KANATA, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・研究員

研究者番号：20553829

中藤 学 (NAKATO, Gaku)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・特別研究員

研究者番号：20584535