

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590410

研究課題名(和文) ヒト大腸癌Caco-2細胞をM細胞に分化させる遺伝子の発現クローニング

研究課題名(英文) Expression cloning of the gene functioning in transformation of Caco-2 cells to M cells

研究代表者

小林 基弘 (Kobayashi, Motohiro)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：00362137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

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もたらず遺伝子を発現クローニングによって単離同定し，その遺伝子産物に対する単クローン抗体を作製し，免疫組織染色により炎症性腸疾患におけるM細胞の数と局在の変化を病理組織学的に解析することを目標とした．しかしM細胞への分化誘導が困難であったことから，マウスM細胞マーカーであるGP2およびSpi-Bのヒトホモログに対する抗体を作製することにした．現在，ハイブリドーマのスクリーニングを行うための準備を進めている段階で，研究期間内に抗体は作製できていない．

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. Furthermore, we aimed to establish monoclonal antibodies recognizing the gene products to clarify changes in the number and distribution of M cells in inflammatory bowel diseases. However, due to the difficulty to obtain the optimal condition for the induction of M cell phenotype, we changed the strategy. We tried to establish monoclonal antibodies against GP2 and Spi-B, both of which are found to be markers for mouse M cells. We have not yet obtained the hybridoma, and currently, we are preparing obtaining optimal condition for hybridoma screening.

研究分野：糖鎖病理学

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はリンパ組織実質に移動している。HEV 内腔面には硫酸化 sialyl Lewis X (sLeX) 糖鎖が発現しており、そのレセプターであるリンパ球上の L-セレクトインとの結合によって、リンパ球ホーミングの第一段階であるローリング (リンパ球が血管内腔面をコロコロと転がる運動) が惹起される。さらに、MALT の HEV には硫酸化 sLeX 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ており、これらの分子間結合によって、MALT 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 sLeX 糖鎖を発現した HEV 様血管の誘導が報告されており (引用文献①)、申請者らも慢性胃炎 (引用文献②、③) および潰瘍性大腸炎 (引用文献④、⑤) において、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報告した。

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有する 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 (引用文献⑥)、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に認識され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。また、炎症性腸疾患における M 細胞の関与も明らかにされていない。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、清野らは $\alpha 1, 2$ 結合フコース含有糖鎖を認識する NKM-16-2-4 抗体を作製し、マウス M 細胞のマーカーとして用いている (引用文献⑦)。最近では、大野らが glycoprotein 2 (GP2) がマウス M 細胞管腔面に特異的に発現しており、特定の細菌成分に対する細胞内輸送レセプターとして機能していることを明らかにした (引用文献⑧)。この GP2 はヒトにおいても M 細胞管腔面に発現していることから、ヒト M 細胞のマーカーとして期待されるが、GP2 のヒト M 細胞における機能は明らかにされていない。

マウスに比べて、ヒト M 細胞の研究が遅れている理由の 1 つとして、腸管粘膜上皮に占める M 細胞の割合が極めて低く、解析に十分な数の M 細胞をヒトから採取することが困難であることが挙げられる。現在ヒト 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、ヒトバ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 (引用文献⑨)。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、細胞内粒子透過能を獲得しており、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側に透過させる。

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。その遺伝子産物に対する抗体を作製し、炎症性腸疾患の組織切片を免疫染色し、炎症性腸疾患における M 細胞の数と局在の変化を病理組織学的に解析することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) Caco-2 細胞の M 細胞への分化誘導: 1.5×10^5 個の Caco-2 細胞を孔径 $3 \mu\text{m}$ の Transwell upper chamber に撒き、そのまま 14 日間培養し、単層の吸収上皮に分化させる。Caco-2 細胞の基底側になる lower chamber に 1.5×10^6 個の Raji 細胞を加えて 5 日間共培養し、Caco-2 細胞を M 細胞に分化させる。M 細胞の細胞内粒子透過能は FITC 標識 $\phi 0.5 \mu\text{m}$ ラテックスビーズを 2.5×10^8 個含んだ培地を Caco-2 細胞の管腔側になる upper chamber に加え、lower chamber に透過したビーズの数をフローサイトメーターでカウントする。

(2) 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、レンチ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。

(3) 発現クローニング：φ10 cm の Transwell upper chamber に Caco-2 細胞を撒き、上記 1 と同様に Caco-2 細胞を単層の吸収上皮に分化させる。上記(1)の Raji 細胞との共培養のステップに代わって、上記(2)で作製した cDNA ライブラリーを Caco-2 細胞に遺伝子導入し、48 時間培養して cDNA ライブラリーを発現させ、M細胞に分化させる。Upper chamber に FITC 標識ラテックスビーズを加え、CO₂ インキュベーター内で 2 時間ビーズを透過させた後、4℃に急冷し、細胞内粒子透過能を停止させる。細胞内にとどまった FITC 標識ビーズをフローサイトメーターで検出することにより M 細胞に分化した Caco-2 細胞を選別する。細胞内 FITC 標識ビーズの検出が困難な場合には、12-well Transwell chamber を用いて本過程を実施し、最もビーズの透過した well から細胞を回収する。この細胞から DNA を抽出し、これを鋳型にレンチウイルスベクターの LTR 配列をプライマーとする PCR を行い、遺伝子導入した cDNA の全てを増幅する。この PCR 産物をレンチウイルスベクターにサブクローニングする。このベクターを用いて次ラウンドの遺伝子導入を行う。この作業を繰り返し、最終的には Caco-2 細胞に細胞内粒子透過能をもたらすプラスミド DNA を単離同定し、その塩基配列を決定する。

(4) 抗体作製および炎症性腸疾患の病理組織学的解析：上記(3)でクローニングされた cDNA の一部を GST ベクターにサブクローニングし、これを大腸菌に発現させて抗原タンパクを得る。このタンパクをグルタチオンビーズで精製し、アジュバントとともに BALB/c および C3H マウスに免疫し、ポリクローナル抗体を得る。抗体の特異性を確認した後、この抗体を用いて、炎症性腸疾患（正常回腸をコントロールとする）の組織切片を免疫染色し、炎症性腸疾患における M 細胞の数および局在の変化を病理組織学的に解析する。

4. 研究成果

平成 25 年度まで、Caco-2 細胞/Raji 細胞共培養系を用いて、Caco-2 細胞から M 細胞様細胞への分化を誘導する至適条件を探り続けてきたが、再現性のある至適条件が得られなかった。そこで、Caco-2 細胞/Raji 細胞共培養系を用いた Caco-2 細胞の M 細胞様細胞への分化誘導は中止し、マウス M 細胞マーカーとして報告された糖タンパク質 GP2 および転写因子 Spi-B のヒトホモログに対する抗体を作製するという戦略に変更した。平成

25 年の段階で既にこの抗原タンパク質の精製を終えている。この抗原タンパク質をマウスに免疫し、単クローン抗体の作製を行う。ハイブリドーマのスクリーニングは抗原タンパク質を恒常発現した細胞を用いて FACS で行うことを計画し、安定発現細胞株の樹立を目指したが、両抗原タンパク質とも発現が非常に弱く、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入によっても安定発現株を樹立することができなかった。そのため、抗原タンパク質を恒常発現した細胞を用いた FACS によるハイブリドーマのスクリーニングは困難と判断し、ELISA によるスクリーニングを計画した。現在その条件を検討している段階である。当初の計画通りに研究が進まないまま最終年度を終えることになったが、なんとかこのハイブリドーマの樹立までは持っていきたい。

<引用文献>

- ① Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 6: 205-217, 2006.
- ② Kobayashi 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.
- ③ Kobayashi, Mitoma J, Nakamura N, Katsuyama T, Nakayama J, Fukuda M. Induction of peripheral lymph node addressin in human gastric mucosa infected by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17807-17812, 2004.
- ④ Suzawa K, Kobayashi M, Sakai Y, Hoshino H, Watanabe M, Harada O, Ohtani H, Fukuda M, Nakayama J. Preferential induction of peripheral lymph node addressin on high endothelial venule-like vessels in the active phase of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 102: 1499-1509, 2007.
- ⑤ Kobayashi M, Hoshino H, Masumoto J, Fukushima M, Suzawa K, Kageyama S, Suzuki M, Ohtani H, Fukuda M, Nakayama J. GlcNAc6ST-1-mediated decoration of MAdCAM-1 protein with L-selectin ligand carbohydrates directs disease activity of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 15: 697-706, 2009.
- ⑥ Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 227: 949-952, 1997.

- ⑦ Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim DY, Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, Kohda T, Kozaki S, Igarashi O, Kiyono H. A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *J Exp Med* 204: 2789-2796, 2007.
- ⑧ 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: 226-230, 2009.
- ⑨ Gullberg E, Leonard M, Karlsson J, Hopkins AM, Brayden D, Baird AW, Artursson P. Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 808-813, 2000.

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 9 件)

- ① Okamura T, Sakai Y, Hoshino H, Iwaya Y, Tanaka E, Kobayashi M (corresponding author). Superficially located enlarged lymphoid follicles characterise nodular gastritis. *Pathology* 47: 38-44, 2015. doi: 10.1097/PAT.000000000000195. 査読有
- ② Kojima K, Amano Y, Yoshino K, Tanaka N, Sugamura K, Takeshita T. ESCRT-0 protein hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Hrs) is targeted to endosomes independently of signal-transducing adaptor molecule (STAM) and the complex formation with STAM promotes its endosomal dissociation. *J Biol Chem* 289: 33296-33310, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.578245. 査読有
- ③ Sakai Y, Hoshino H, Kitazawa R, Kobayashi M (corresponding author). High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in testicular seminoma. *Andrology* 2: 282-289, 2014. doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00192.x. 査読有
- ④ Ito Y, Vela JL, Matsumura F, Hoshino H, Tyznik A, Lee H, Girardi E, Zajonc DM, Liddington R, Kobayashi M, Bao X, Bugaytsova J, Boren T, Jin R, Zong Y, Seeberger PH, Nakayama J, Kronenberg M, Fukuda M. Helicobacter pylori cholesteryl α -glucosides contribute to its pathogenicity and immune response by natural killer T cells. *PLoS One* 8: e78191, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0078191. 査読有
- ⑤ Amano Y, Yoshino K, Kojima K, Takeshita T. A hydrophobic amino acid cluster inserted into the C-terminus of a recycling cell surface receptor functions as an endosomal sorting signal. *Biochem Biophys Res Commun* 441: 164-168, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.019. 査読有
- ⑥ Iwaya Y, Kobayashi M (corresponding author), Momose M, Hiraoka N, Sakai Y, Akamatsu T, Tanaka E, Ohtani H, Fukuda M, Nakayama J. High levels of FOXP3+ regulatory T cells in gastric MALT lymphoma predicts responsiveness to Helicobacter pylori eradication. *Helicobacter* 18: 356-362, 2013. doi: 10.1111/hel.12051. 査読有
- ⑦ Ohya A, Kobayashi M (corresponding author), Kawashima H, Kageyama S, Nakayama J. Lymphocyte recruitment via high endothelial venules in lymphoid stroma of Warthin's tumor. *Pathology* 45: 150-154, 2013. doi: 10.1097/PAT.0b013e32835c766d. 査読有
- ⑧ Maruyama M, Kobayashi M (corresponding author), Sakai Y, Hiraoka N, Ohya A, Kageyama S, Tanaka E, Nakayama J, Morohoshi T. Periductal induction of high endothelial venule-like vessels in type 1 autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 42: 53-59, 2013. doi: 10.1097/MPA.0b013e318258ce4c. 査読有
- ⑨ Kobayashi M, Hoshino H, Suzawa K, Sakai Y, Nakayama J, Fukuda M. Two distinct lymphocyte homing systems involved in the pathogenesis of chronic inflammatory gastrointestinal diseases. *Semin Immunopathol* 34: 401-413, 2012. doi: 10.1007/s00281-012-0302-3. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 酒井康弘ほか, セミノーマにおける TNF- α ・LT- α / β を介した高内皮細静脈様血管の誘導とリンパ球浸潤機序の解明. 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24~26 日, 広島国際会議場 (広島県広島市).

- ② 大谷明夫ほか, CXCL13 は血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (AITL) の濾胞樹状細胞 (FDC) 主体に陽性となり疑似濾胞を形成している. 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24~26 日, 広島国際会議場 (広島県広島市).
- ③ Okamura T et al. Superficially located enlarged lymphoid follicles characterize nodular gastritis. Annual Conference of the Society for Glycobiology, November 16-19, 2014, Honolulu (USA).
- ④ 小林基弘, リンパ球ホーミングから捉えた慢性炎症性疾患. 第 59 回日本病理学会秋期特別総会 (日本病理学会学術研究賞受賞講演), 2013 年 11 月 21~22 日, 富士屋ホテル (山梨県甲府市).
- ⑤ 酒井康弘ほか, セミノーマの高内皮細静脈様血管を介したリンパ球浸潤機序. 第 10 回日本病理学会カンファレンス, 2013 年 8 月 2~3 日, 六甲山ホテル (兵庫県神戸市).
- ⑥ 酒井康弘ほか, セミノーマで認められる腫瘍浸潤リンパ球のホーミング機序の解明. 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 6~8 日, ロイトン札幌 (北海道札幌市).
- ⑦ Sakai Y, et al. Periductal induction of vascular addressin on high endothelial venule-like vessels in autoimmune pancreatitis. Annual Conference of the Society for Glycobiology, November 10-14, 2012, San Diego (USA).
- ⑧ 酒井康弘ほか, 心膜原発悪性中皮腫の一部検例. 第 101 回日本病理学会総会, 2012 年 4 月 26~28 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区).
- ⑨ 大彌歩ほか, Warthin 腫瘍のリンパ間質における高内皮細静脈上の糖鎖発現形式. 第 101 回日本病理学会総会, 2012 年 4 月 26~28 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区).
- ⑩ 小林基弘ほか, Periductal induction of high endothelial venule-like vessels in autoimmune pancreatitis. 第 101 回日本病理学会総会, 2012 年 4 月 26~28 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 基弘 (KOBAYASHI, Motohiro)
 福井大学・医学部・教授
 研究者番号：00362137

(2) 研究分担者

小嶋克彦 (KOJIMA, Katsuhiko)
 信州大学・医学部・助教
 研究者番号：80345743