

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790186

研究課題名(和文)新規細胞間相互作用機構である膜ナノチューブ構造によるM細胞分化誘導機構の解明

研究課題名(英文)The possibility of M-cell differentiation regulated by novel intercellular communication system

研究代表者

木村 恵 (Yamakami-Kimura, Megumi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：90613787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：腸管リンパ濾胞上皮に存在するM細胞は管腔内の抗原を取り込む細胞である。この細胞の分化には上皮基底膜下のストローマ細胞が重要である。しかし、基底膜を隔てたM細胞とストローマ細胞の相互作用機構は不明である。本研究ではM細胞に発現するM-Secが細胞間相互作用を仲介する膜ナノチューブ構造の形成分子であることに着目した。その結果M細胞には基底膜側に突出した膜突起が存在し、基底膜を越えてストローマ細胞と接していた。一方でM-Sec欠損マウスでもこの突起形成、そしてM細胞分化に大きな変化は認められなかった。従って細胞膜突起形成にはM-Secの他に複数の分子が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：M-Sec is a cytoplasmic protein expressed by macrophages and intestinal microfold cells (M cells). We have previously reported that M-Sec in macrophage induces plasma membrane deformation resulting in membrane nanotube; however function of M-Sec in M cells as well as the existence of membrane nanotubes has been largely unknown. M cells are specialized epithelial cells reside in follicle-associated epithelium of Peyer's patches, and have uptake capacity of luminal macromolecules. Differentiation of M cells is thought to be regulated by the interaction with stromal cells underneath epithelial basement membrane. In the present study, we found that M cell had membrane protrusions on the basolateral membrane. The protrusions were elongated across basement membrane and reached to stromal cells. On the other hand, M-Sec KO mice did not show clear phenotype in the protrusion formation and M-cell differentiation, suggesting the probability that other molecules compensate the function of M-Sec.

研究分野：組織学

キーワード：細胞間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

外界に接している腸管には食物とともに摂取した抗原物質や微生物が多量に存在している。これらの抗原や微生物に対して宿主は、免疫システムを高度に発達させ生体の恒常性を維持している。腸管には体内で最も多い数の免疫細胞が常駐し、管腔内には IgA が多量に存在することで腸内環境のバランスを保っている。小腸の集合リンパ小節であるパイエル板は濾胞被蓋上皮層を通じて外来抗原を取り込み、常に管腔内の抗原情報をモニターすることで IgA 抗体産生の調節を行っている。

パイエル板の管腔側は濾胞被蓋上皮細胞層がドームを形成し、円柱上皮に混じって M 細胞がモザイク状に存在する。M 細胞の基底面は免疫系細胞が入り込むポケットと呼ばれる構造を持ち、細胞表面は微絨毛が疎であり、糖衣が薄く抗原や微生物と接触しやすい構造をもつ。この細胞は粘膜免疫応答時に真っ先に抗原と接触し、管腔内の抗原を取り込み抗原提示細胞へと伝える役割を持つことから、粘膜免疫ワクチンを効率よく誘導するための標的細胞として、微生物の生体への侵入機構のモデル細胞としてなど様々な分野で研究対象とされている。

近年 M 細胞発現分子の解析が進み、これまで、形態学的解析に頼ってきた M 細胞研究に分子生物学的解析が可能になった。それに伴い、徐々に M 細胞の分化機構が明らかになりつつある。

M 細胞分化には上皮下のストローマ細胞と上皮の相互作用が重要であると考えられているが、基底膜に仕切られた上皮-ストローマ間での制御機構がどのように行われているかは不明な点が多い。濾胞上皮はリンパ濾胞の形成に働くことが報告されるなど、上皮の役割は従来考えられているよりも多彩であると認識されつつある。そのため、この部位における細胞間相互作用機構の解明は重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では M 細胞で高く発現する M-Sec (Tnfrsf25) に着目した。この分子は、細胞間相互作用に係る細胞膜突起の形成に必要な分子として報告されている。M 細胞における M-Sec の機能解析を行うことで、M 細胞分化と成熟過程における上皮-ストローマ細胞の相互作用の関与とその実態を分子レベルで明らかにすることも目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) M 細胞における M-Sec の局在解析

#### M-Sec 特異的抗体作成

初めにマウス M-Sec に対する抗血清をウサギに大腸菌によって作成した全長 M-Sec タンパク質を免疫することによって作成した。作成した M-Sec 抗血清は抗原によってアフィニティー精製を行うことで、抗 M-Sec ポリ

クローナル抗体を得た。この M-Sec 抗体の特異性は、M-Sec ノックアウトマウスの組織における、免疫組織染色、ウェスタンブロット法によって確認し、特異性が高い抗体であることを確認している。

#### マウス組織における発現部位局在解析

マウス組織を摘出し、免疫組織染色ならびにウェスタンブロット解析によって M 細胞発現組織の解析を行った。

#### マウス M 細胞における細胞内局在解析

マウスからパイエル板作成した M-Sec 抗体を用いて、M 細胞の免疫組織染色を行い、細胞内局在の解析を行った。

#### マクロファージにおける細胞内局在解析

M-Sec は M 細胞に加えてマクロファージに高く発現する。M 細胞における細胞膜突起の存在は確認されていないのに対して、マクロファージは細胞膜突起形成を有する細胞である。細胞膜突起と M-Sec の関係を明らかにするために、マクロファージにおける M-Sec の解析を行うのが適している。

具体的にはマウスの腹腔内マクロファージを単離し、マクロファージにおける M-Sec の細胞内局在を解析した。

### (2) M-Sec KO マウスの解析

#### M-Sec KO マウスの作成

常法に従い、M-Sec の全身欠損マウスを作成した。M-Sec KO マウスは通常の繁殖、発生段階での異常は認められなかった。

#### KO マウスにおける M 細胞分化

M-Sec KO マウスにおける M 細胞の分化機構の解析を行った。主要な M 細胞発現分子の発現と管腔内へと投与した蛍光ビーズの取り込みを調べることで、M-Sec 欠損による M 細胞機能への影響を検証した。

#### KO マウスにおけるマクロファージの形態変化

KO マウスから単離した腹腔内マクロファージの形態変化、並びに膜突起形成を解析した。

### (3) M-Sec の膜変形機構の解析

M-Sec の培養細胞への強制発現は細胞膜の変形を促し、膜突起様構造の形成を促進する。このとき、膜突起に M-Sec の濃縮が認められることから、M-Sec は細胞膜と相互作用するタンパク質であると考えられる。しかしながら、M-Sec のアミノ酸配列からはこのタンパク質は細胞質に発現すると予測され、細胞膜貫通領域、並びに既知の膜との結合ドメインは認められない。そこで、M-Sec の N 末端、C 末端欠損変異体を数種類作成し、細胞へと強制発現させることで、膜への局在と膜突起形成に必要な部位の探索を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) M-Sec は未成熟 M 細胞で発現する。

各組織における M-Sec の発現分布を解析したところ、M-Sec はリンパ性器官と精巣で発現が高いことが明らかになった。

発現の高いパイエル板上皮において M-Sec 抗体を用いた免疫組織染色による解析を行った。M 細胞マーカーとして Glycoprotein 2 (GP2) との二重染色を行ったところ、GP2 を発現する M 細胞において M-Sec の発現が認められた。一方で、濾胞上皮には GP2 陰性、M-Sec 陽性の細胞群が認められた。この細胞は形態的に M 細胞の特長を有していることから、M 細胞に類するものであると考えられた。

M 細胞を含める腸管上皮細胞は陰窩の基底部に存在する幹細胞から分化し、押し出されるようにして絨毛もしくは濾胞上皮のドームの頂部へと移動していく。M-Sec 陽性細胞が陰窩付近で認められるのに対して、GP2, M-Sec 両陽性細胞は頂部に現れること、M-Sec 陽性 GP2 陰性細胞は GP2 陽性細胞に比べて管腔内の異物の取り込み能が低いことから、M-Sec 陽性 GP2 陰性細胞は未熟な M 細胞であると結論づけた。つまり、GP2 は成熟 M 細胞で発現するが、M-Sec は未熟な M 細胞から成熟した M 細胞まで連続して発現していると考えられる。

##### (2) M-Sec の細胞内局在は細胞膜と関連する。

M 細胞における細胞内局在と機能

M 細胞における M-Sec の細胞内局在は、主に細胞質である。それに加えて一部膜構造と関連が認められ、それは M 細胞の成熟と関係しているようである。

多くの GP2 陽性成熟 M 細胞においては頭頂部付近で共焦点顕微鏡観察では顆粒状の強い局在が認められる。免疫電子顕微鏡による解析ではこの顆粒は多胞体(Multivesicular body)であり、M-Sec は多胞体の膜に局在していた。M 細胞が蛍光ビーズを取り込んだ時には、ビーズのシグナルは M-Sec と重なることから、多胞体はエンドソーム由来のものであることが示唆される。

これらの結果から、M-Sec は M 細胞において管腔内物質のエンドサイトーシスに関係すると予測された。しかしながら、M-Sec KO マウスにおいては蛍光ビーズの取り込み能に大きな差異は現在まで認められていない。今後のさらなる解析が必要である。

未成熟 M 細胞では M 細胞はしばしば細胞膜へと局在していることが観察された。一部は基底膜側の突起として観察された。免疫電子顕微鏡と共焦点顕微鏡による観察では、M 細胞の突起は基底膜を越えて、基底膜下のストローマ細胞と接していた。この突起は RANK 陽性であった。

未成熟 M 細胞では M-Sec 陽性の突起には RANK が存在し、基底膜下の RANKL 陽性ストローマ細胞と接していた。このことから M

細胞分化に M-Sec が関与している可能性が示唆された。

そこで、M-Sec KO マウスにおける、M 細胞数の測定、GP2 陽性成熟 M 細胞の計測、蛍光ビーズの取り込みを解析した。その結果、KO マウスにおいてこれらの値に顕著な差は認められなかった。

以上の結果から、M-Sec は M 細胞において、エンドサイトーシス、細胞の形態形成に関係すると推定されるが、おそらく、代替する分子が存在するために KO マウスでの表現系が明瞭ではないと考えられた。

##### マクロファージにおける細胞内局在と機能

マクロファージにおける M-Sec の局在は細胞、浸潤突起に強く認められた。さらに、蛍光ビーズを取り込ませた時には、phagocytic cup への局在が一部認められた。

これらの結果を基に KO マウスでのマクロファージの貪食能を解析したが、大きな変化は認められていない。一方で浸潤突起の形成に若干影響が出ているようであり、現在解析を続けている。

##### (3) M-Sec の機能部位の探索

N 末端欠損ならびに C 末端欠損 M-Sec タンパク質の解析から M-Sec の N 末端は細胞膜との結合に必要であること、C 末端側が膜突起の伸長に働くことが明らかになった。

N 末端部のアミノ酸配列を詳細に解析すると、アミノ酸リジンに富んだ領域が存在していた。この領域は種間で良く保存されていた。この部位を欠失させた変異 M-Sec は細胞膜への結合が認められず、膜突起形成も認められなかった。

続いて M-Sec と細胞膜構成成分であるホスファチジルイノシトールとの結合を調べた。M-Sec はホスファチジルイノシトールと N 末端のリジンリッチ領域により直接結合していることを明らかにした。

この成果は現在論文投稿中である。

#### 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1件)

1. Kimura S, Yamakami-Kimura M, Obata Y, Hase K, Kitamura H, Ohno H, and Iwanaga T.

Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches. *Mucosal Immunol.* 2015 May;8(3):650-60. doi: 10.1038/mi.2014.99. 査読あり

[学会発表](計2件)

1. Kimura S, Yamakami-Kimura M, and Iwanaga T.

Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches.

第120回日本解剖学会・全国学術集会

2015年3月22日

神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

2. Kimura S, Yamakami-Kimura M, and Iwanaga T.

Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches.

第37回日本分子生物学会年会

2014年11月25日

パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 恵 (KIMURA, Megumi)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：90613787

### (3) 連携研究者

木村 俊介 (KIMURA, Shunsuke)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40444525