

論文内容の要旨

論文題目 : **Molecular and Cellular Characterization of Peyer's Patch M Cells: From Development of Isolation to Identification of Specific Surface Marker**

パイエル板 M 細胞の分子細胞生物学的特徴の解析：単離精製法の確立および特異的表面マーカーの同定

氏名 吉田 理人

【序論】

消化管や呼吸器を覆う広大な粘膜面は、病原性微生物などの外来抗原に絶えず曝露していることから、我々の生体には粘膜免疫系という、外来抗原に対する特異的な防御免疫応答を誘導するシステムが備わっている。消化管では、小腸に存在するパイエル板などが粘膜免疫誘導組織として機能するが、外来抗原に特異的な粘膜免疫応答が誘導されるには、抗原がこれらの誘導組織に送達される必要がある。

粘膜免疫誘導組織を覆う濾胞関連上皮層(follicle-associated epithelium : FAE)の中には、M 細胞という特殊な上皮細胞が存在する。M 細胞は管腔に存在する様々な微生物をはじめとする多種多様な抗原などを積極的に取り込み、抗原を直下に存在する樹状細胞に直接受け渡す。また我々の研究グループは、パイエル板などの誘導組織から離れた小腸絨毛の上皮層にも、M 細胞(絨毛 M 細胞)が存在することを明らかにしてきた(Jang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004)。このように、M 細胞は抗原特異的な粘膜免疫応答の言わば開始点に位置する重要な細胞であるといえる。

しかし、パイエル板 M 細胞の存在頻度は非常に低いことから、その単離精製法はこれまで確立されておらず、パイエル板 M 細胞の培養系も存在しない。このような理由から、パイエル板 M 細胞の遺伝子発現などの分子生物学的な特徴については未だに不明な点が多く、パイエル板 M 細胞に関する研究は、これまで電子顕微鏡による形態学的な解析や、マウスでは杯細胞という別種の上皮細胞にも反応してしまうレクチン UEA-1 を用いた組織学的解析に限られていた。そこで私は、マウスからパイエル板 M 細胞を効率的に単離精製する方法を確立し、DNA マイクロアレイを用いて M 細胞での遺伝子発現を網羅的に解析することで、パイエル板 M 細胞特異的遺伝子、特に遺伝子レベルでの特異的表面マーカーの同定を試みた。

【方法および結果】

1. マウスパイエル板 FAE の単離法の検討

まず初めに、パイエル板 M 細胞を生きた状態で少しでも効率的に取得する方法の確立を試みた。そこで、腸管上皮細胞の調製に関するこれまでの報告を参考にして(Weiser et al., J. Biol. Chem. 1973, Evans et al., J. Cell. Sci. 1992, Lundqvist et al., J. Immunol. Method. 1992), 外科的に単離したパイエル板を、EDTA, DTT, コラゲナーゼといった各々の試薬を溶かした PBS 中で攪拌して細胞画分を調製した。その結果、0.5 mM, 10 mM EDTA, 1 mM DTT 溶液を用いた場合で、パイエル板 FAE の剥離が認められた(図 1)。これらの条件から得られた細胞画分について FACS 解析を行い、forward scatter (FSC), side scatter (SSC) で展開したところ、2つの細胞分画 R1, R2 が認められた(図 2A)。上皮細胞マーカーの 1 つである *Villin1* mRNA の発現が R1 分画のみに認められたので(図 2B)、上皮細胞画分の取得率(R1 分画の頻度)、生存率(7-AAD⁻細胞, R3 分画の頻度)、純度(CD45⁻細胞, R4 分画の頻度)を総合的に比較した結果、0.5 mM EDTA 溶液を用いた場合に、生きたパイエル板 FAE 細胞を最も効率よく選択的に取得出来ることを明らかにした(図 2C)。

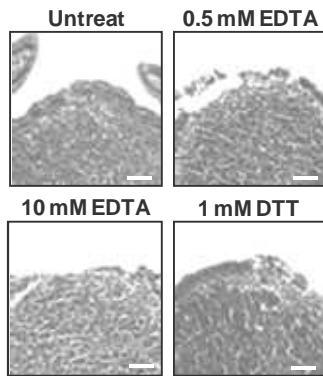


図 1. パイエル板 FAE の剥離

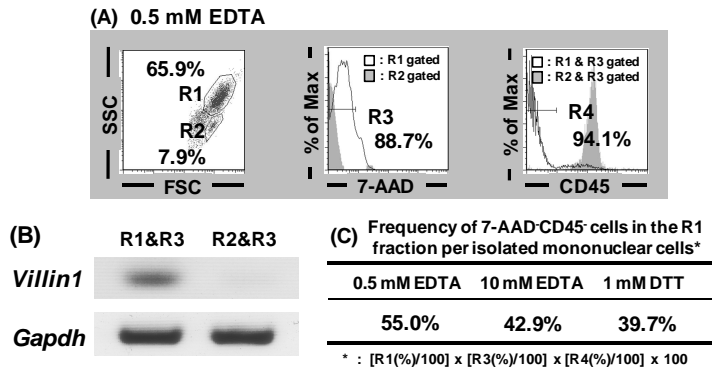
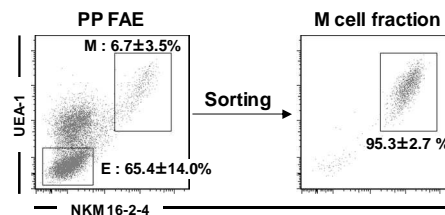


図 2. 上皮細胞画分の同定および回収率の検討

2. マウスパイエル板 M 細胞の単離精製法の確立

$\alpha(1,2)$ フコース構造を認識するレクチン UEA-1 は、マウスパイエル板 M 細胞のマーカーとして広く用いられてきたが(Clark et al., J. Histochem. Cytochem. 1993), UEA-1 は杯細胞にも反応してしまう(Jang et al. 2004)。しかし、我々の研究グループは、マウスパイエル板 M 細胞、絨毛 M 細胞に反応する一方、杯細胞には反応しないモノクローナル抗体 NKM 16-2-4 を確立した(Nochi et al., J. Exp. Med. 2007)。そこで次に、NKM 16-2-4 と UEA-1 を用いた FACS ソーティングによる、パイエル板 M 細胞の単離精製法の確立を試みた。FACS 解析の結果、前述の方法で調製したパイエル板 FAE 画分中の NKM 16-2-4⁺UEA-1⁺M 細胞の頻度は約 7%であったが、FACS ソーティングを行うことで、90%以上の純度で M 細胞画分を調製することが可能となった(図 3)。

図 3. パイエル板 FAE(PPFAE)画分における M 細胞(M), 吸収上皮細胞(E)の頻度



3. DNA マイクロアレイを用いたマウスパイエル板 M 細胞の網羅的遺伝子発現解析

このようにして確立した方法を用いて単離精製したパイエル板 M 細胞、小腸絨毛の吸収上皮細胞

(NKM16-2-4⁻UEA-1⁻)から mRNA を調製し、45,101 個のプローブを搭載した DNA マイクロアレイを用いて、各細胞での遺伝子発現プロファイルを作製した。そして、(表 1)に示した統計学的な発現の有無の評価(flag 値)、絶対的発現レベル、相対的発現レベルの条件を全て満たした 1,392 個のプローブに対応した遺伝子群が、パイエル板 M 細胞で有意に発現しているという結果を得た。

表 1. パイエル板 M 細胞に有意に発現する遺伝子の評価基準

| | flag | absolute expression level | relative expression level |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| PP M cell (PPM) | 'Presence' or 'Marginal' | > 100 | PPM / Vi-EC > 2 |
| Villous enterocyte (Vi-EC) | - | < 100 | |

4. マウスパイエル板 M 細胞特異的の表面マーカーをコードする遺伝子の探索

次に、前述した遺伝子群の中から、パイエル板 M 細胞に特異的な表面マーカーをコードする遺伝子の探索を試みた。候補遺伝子の数をさらに絞るために、Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>)によって細胞外領域に存在するタンパク質をコードする遺伝子として分類され、かつ近年報告されたマウスパイエル板 M 細胞特異的の遺伝子 *Sgnel* (Hase et al., DNA Res. 2005) の場合と比べて、パイエル板 M 細胞での相対的発現レベルが高い(吸収上皮細胞の約 16 倍以上である)遺伝子を探索した結果、9 個の候補遺伝子を同定した。これらの候補遺伝子の発現を定量的リアルタイム PCR 法で解析した結果、GPI アンカータンパク質をコードする *Glycoprotein2(Gp2)* 遺伝子の発現が、NKM 16-2-4⁺UEA-1⁺パイエル板 M 細胞を含む細胞画分のみ認められ、また *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、*Gp2* mRNA はパイエル板 FAE の UEA-1⁺細胞に強く検出された(図 4)。

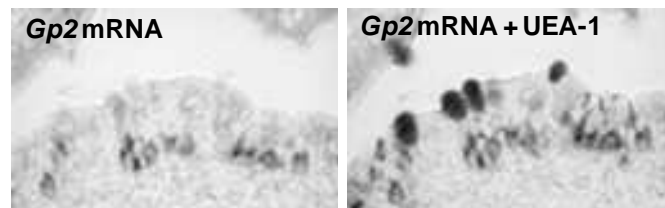


図 4. *Gp2* mRNA の発現局在

5. マウス *Gp2* 特異的モノクローナル抗体の作製

次に、パイエル板での *Gp2* タンパク質の発現局在を明らかにするために、抗マウス *Gp2* モノクローナル抗体の作製を試みた。マウスの *Gp2* と EGFP を同時に発現させるベクター p*Gp2*-IRES2-EGFP を作製し、ラット小腸上皮細胞株 IEC-6 に導入後、FACS ソーティングをして得られた EGFP⁺細胞を SD ラットに複数回免疫した。そしてハイブリドーマを作製後、p*Gp2*-IRES2-EGFP を導入した CHO 細胞を用いてスクリーニングを行った結果、抗マウス *Gp2* モノクローナル抗体 10F5-9-2(rat IgG2a)を産生するハイブリドーマクローンを樹立した。

6. M 細胞における *Gp2* タンパク質の発現局在解析

10F5-9-2 を用いた組織染色の結果、*Gp2* は UEA-1⁺WGA⁻M 細胞の管腔膜に局在が認められた(図 5A, 矢印)。しかし、UEA-1⁺WGA⁺杯細胞(図 5A, 矢頭)、UEA-1⁺WGA⁻絨毛 M 細胞には発現が認められなかった(図 5B)。一方、マウス回腸末端部のパイエル板 FAE には UEA-1⁺細胞が多数存在するが、*Gp2* を発現する細胞の頻度は十二指腸のパイエル板 FAE とほぼ同じであり、*Gp2* の強発現は UEA-1 に対してあまり反応しない細胞に認められた(図 5C, 矢印)。ここで、 $\alpha(1,3)$ ガラクトース構造を認識するレクチ

ン EEL は、マウスのパイエル板 M 細胞に加えて、大腸での主要な粘膜免疫誘導組織である colonic patch の M 細胞にも反応することから(Giannasca et al., Am. J. Physiol. 1994), 10F5-9-2, EEL, UEA-1 を用いて組織染色を行った。その結果, Gp2 の強発現は EEL^{high}UEA-1^{low/-}細胞に認められ(図 5C, 矢印), EEL^{low/-}UEA-1^{high}細胞にはほとんど認められなかった(図 5C, 矢頭)。また colonic patch FAE では, Gp2 は EEL⁺UEA-1^M細胞に局在が認められ(図 5D, 矢印), EEL^{UEA-1}⁺細胞には認められなかった(図 5D, 矢頭)。さらに, マウスの UEA-1⁺腸管上皮細胞は, 無菌環境下から通常状態(conventional)の環境下に移して飼育した際に出現することが知られているが(Bry et al., Science. 1996), パイエル板 FAE において Gp2 を発現した細胞の頻度および分布は, 無菌マウスと SPF の環境下で飼育されたマウスではほぼ同様であった。

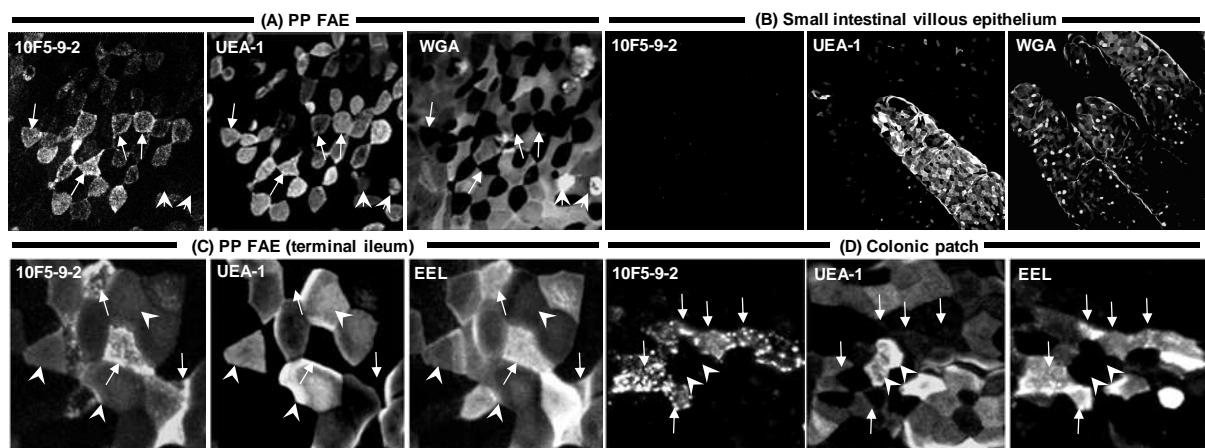


図 5. マウスの各種腸管上皮層における Gp2 タンパク質の発現局在

【結論】

本研究では, マウスのパイエル板から生きた状態で高純度の M 細胞を効率的に調製する方法を確立し, DNA マイクロアレイを用いて, パイエル板 M 細胞での包括的な遺伝子発現プロファイルを作製することに成功した。そして, 遺伝子発現プロファイルの結果の解析, およびモノクローナル抗体の作製を通して, パイエル板 M 細胞特異的表面マーカーの一例として Gp2 の同定に成功した。さらに, Gp2 はマウスの絨毛 M 細胞には発現していない一方, colonic patch M 細胞, さらに本研究に引き続いてヒトを含めた霊長類のパイエル板 M 細胞にも発現が報告された(Misumi et al., J. Immunol. 2009, Hase et al., Nature. 2009)。以上のことから, Gp2 は解剖学的部位や腸内環境, 生物種を越えて, 消化管関連リンパ組織(gut-associated lymphoid tissue : GALT)の FAE 中に存在する M 細胞の特異的マーカーとなりうる可能性が考えられ, 効果的な粘膜ワクチン抗原デリバリーシステムを構築する上での有用な標的となりうると思われる(表 2)。また本研究で構築されたパイエル板 M 細胞の包括的遺伝子発現プロファイルは, 新規の M 細胞特異的遺伝子の同定の他, 抗原取り込みを含めた M 細胞の特徴的な機能や, M 細胞の分化誘導の仕組みなどを分子レベルで明らかにする際に重要な手掛かりになると期待される。

表 2. M 細胞の各種モノクローナル抗体, レクチンに対する反応性. +: 陽性, -: 陰性

| Antibody/ lectin | ligand | GALT M cell | | | | | |
|---------------------|--|---------------|-------|---------------|----------------|-------------|------------|
| | | Peyer's patch | | Colonic patch | Villous M cell | Goblet cell | Enterocyte |
| | | Duodenum | Ileum | | | | |
| 10F5-9-2 | Gp2 | + | + | + | - | - | - |
| NKM 16-2-4 | $\alpha(1,2)$ fucose-containing carbohydrate | + | +/- | - | + | - | - |
| UEA-1 | $\alpha(1,2)$ fucose | + | +/- | - | + | + | - |
| EEL | $\alpha(1,3)$ galactose | + | + | + | + | - | - |