

## 122. NF- $\kappa$ B 非古典的経路の腸管恒常性維持における役割の解明

金谷 高史

Key words : NF- $\kappa$ B 非古典的経路, RelB, M 細胞,  
Spi-B

理化学研究所  
統合生命医科学研究センター

### 緒 言

Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) ファミリー転写因子によって構成されるシグナル伝達経路は様々な生体内の反応を制御している。このシグナル伝達経路は古典的経路と非古典的経路の2種類に分類される。古典的経路はTLRやTNFRによって活性化され、p50/RelAの転写因子複合体が核内へ移行することで標的遺伝子の発現を調節し、炎症性サイトカイン産生をはじめとする速やかな生体反応に寄与する。非古典的経路はLT $\beta$ RやCD40によって活性化され、p52/RelBの転写因子複合体が標的遺伝子の発現を誘導し、持続的なシグナルを必要とするリンパ節形成や細胞分化を誘導する。古典的経路は多くの細胞において観察されることから、これまでNF- $\kappa$ Bの生理的な役割は古典的経路を中心に研究が進められてきた。腸管上皮細胞の機能においてもNF- $\kappa$ B古典的経路が重要な役割を果たすことが知られている。例えば腸管上皮細胞のNEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator) を欠損させることにより古典的経路をブロックすると、腸管上皮細胞からの抗菌ペプチドの産生が減弱することで腸管上皮細胞層のバリア機能が低下し、その結果自発性の腸炎を発症することが報告されている。一方でNF- $\kappa$ B非古典的経路の腸管上皮細胞における重要性はほとんど明らかにされていない。本研究では腸管上皮細胞層におけるNF- $\kappa$ B非古典的経路の活性化を調べ、その役割を解析した。

### 方法および結果

#### 1. NF- $\kappa$ B非古典的経路はFAEにおいて活性化している

はじめに転写因子RelBの核内移行を指標にして腸管上皮細胞における非古典的経路の活性化を調べた。その結果、パイエル板や孤立リンパ小節などの腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissues: GALT) の粘膜面を覆っている上皮細胞層 (follicle-associated epithelium; FAE) において非古典的経路の活性化が認められた (図1A)。FAEには腸管内の抗原を取り込んでGALTへ伝達する特殊な腸管上皮細胞であるM細胞が分布している。そこでFAEにおけるRelBの発現を詳細に解析したところ、M細胞の核において特に強いRelBのシグナルが認められた (図1B)。このようにNF- $\kappa$ B非古典的経路は腸管上皮細胞層においてはFAEに限局して活性化していることが明らかとなった。よって本研究ではM細胞の分化におけるNF- $\kappa$ B非古典的経路の役割に着目して研究を進めていくことにした。

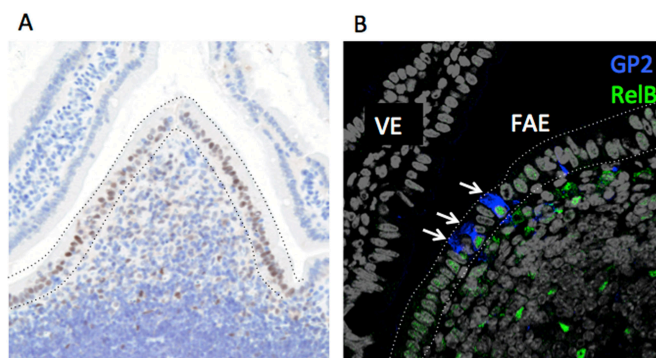


図1. 小腸腸管上皮細胞における NF- $\kappa$ B 非古典的経路の活性化.

A) パイエル板を覆う上皮細胞層 (FAE) において RelB の核内移行が認められた. B) M 細胞マーカーである GP2 と RelB の蛍光二重染色写真. 矢印は RelB の核内移行が顕著であり, なおかつ GP2 陽性の細胞を示している. 破線は A, B ともに FAE を示す.

## 2. RANKL-RANK によって活性化された NF- $\kappa$ B 非古典的経路が M 細胞を誘導する

FAE における M 細胞の発生は, FAE 直下の間質細胞から分泌されるサイトカインである RANKL によって促進される. またマウスへ RANKL を投与することで, 小腸上皮細胞層へ M 細胞を誘導することが可能である. この RANKL 誘導性 M 細胞分化において NF- $\kappa$ B 非古典的経路の活性化をこの経路において転写因子としてはたらく p52 および RelB の核内移行を指標として評価した. その結果, RANKL 投与後これらの転写因子の核内移行が明瞭に観察されたことから, RANKL-RANK のシグナルによって活性化された NF- $\kappa$ B 非古典的経路が M 細胞分化に必須である可能性が示唆された (図2).

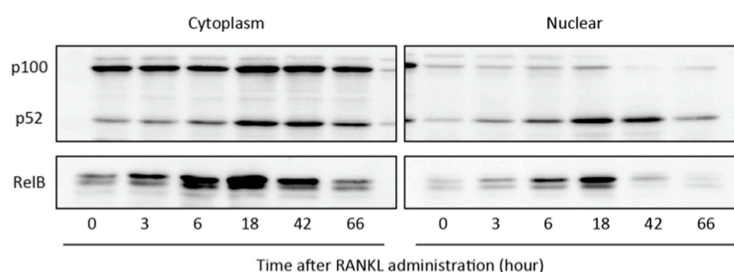


図2. RANKL の投与は小腸腸管上皮細胞において NF- $\kappa$ B 非古典的経路を活性化させる.

BALB/c マウスへ GST-RANKL 融合タンパク質を腹腔内投与し, 3~66 時間後に解剖し, 小腸上皮細胞を採取した. NF- $\kappa$ B2 (p100-p52) および RelB の核内移行をウエスタンブロットで解析した.

## 3. RelB 欠損マウスでは M 細胞分化が欠失する

次に NF- $\kappa$ B 非古典的経路の M 細胞分化における重要性を評価するため, RelB 欠損マウスを用いた解析を行った. しかしながら, RelB 欠損マウスではパイエル板が完全に欠損するため FAE における M 細胞分化を評価することができない. そこで小腸上皮幹細胞の初代培養系 (オルガノイド) を用いた. 野生型マウスより作製したオルガノイドへリコンビナント RANKL を加えるとオルガノイドへ M 細胞を誘導することが可能である (図3A). RelB 欠損マウスよりオルガノイドを作製し, RANKL で刺激を加えたところ, M 細胞マーカーの発現は誘導されなかった. このことから M 細胞の分化には NF- $\kappa$ B 非古典的経路によって活性化された転写因子 RelB が必須であることが明らかとなった.

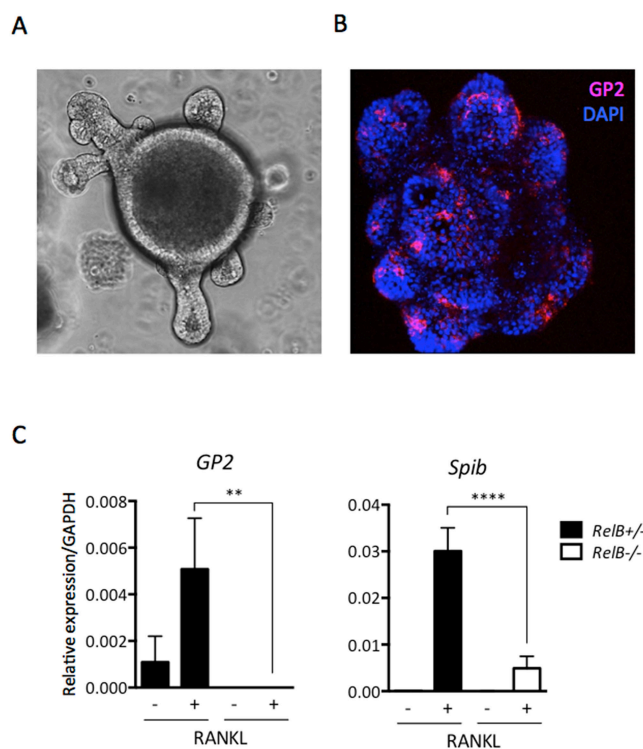


図3. 小腸上皮幹細胞初代培養系（オルガノイド）を用いたM細胞分化の解析.

A) 小腸粘膜よりクリプト（幹細胞が存在する領域）を分離し、マトリジェルに埋め込み、小腸上皮幹細胞培養培地において培養することにより得られたオルガノイド. B) オルガノイドにGAT-RANKLを加えて3日間培養し、M細胞マーカーであるGP2による蛍光免疫染色を行った. オルガノイドにGP2陽性M細胞が誘導されることが観察された. C) RelB欠損マウスよりオルガノイドを作製し、RANKLを加えた後、M細胞マーカーであるGP2およびSpi-Bの発現をリアルタイムPCRで解析した. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

#### 4. NF- $\kappa$ B非古典的経路はM細胞分化のマスター転写因子Spi-Bの発現を誘導する

最後にNF- $\kappa$ B非古典的経路の活性化がM細胞の分化に十分な因子であるか否か検証した. レンチウイルスベクターにRelBおよびp52をクローニングし、オルガノイドにレンチウイルス感染によってRelBおよびp52を強制発現させ、M細胞マーカー遺伝子の発現を解析した. その結果、p52とRelBを同時にオルガノイドへ強制発現させるとM細胞分化のマスター転写因子であるSpi-Bの発現が誘導された. しかしながら、GP2をはじめとするM細胞マーカー遺伝子の発現はほとんど上昇しなかったことから、M細胞の完全な分化にはNF- $\kappa$ B非古典的経路の活性化の他に何らかのシグナルが必要とされることが示唆された. レポーターアッセイを行ったところ、p52/RelBによって形成されるヘテロダイマーがSpi-Bのプロモーター部位へ結合する可能性が示された. これらのことから、NF- $\kappa$ B非古典的経路は腸管上皮細胞においてSpi-Bの発現を直接的に活性化させることでM細胞分化に関与することが明らかとなった.

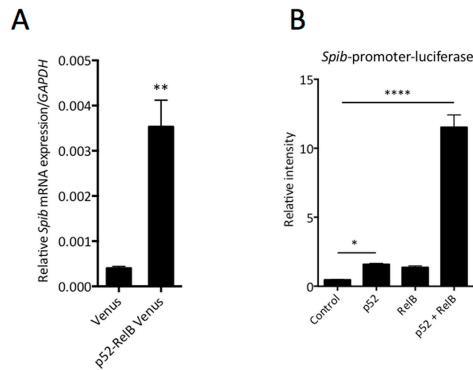


図4. NF- $\kappa$ B 非古典的経路は Spi-B の発現を直接的に誘導する.

A) レンチウイルスを用いて RelB および p52 をオルガノイドへ強制発現させ, Spi-B の発現をリアルタイム PCR で解析した. \*\* $p < 0.01$ . B) Spi-B のプロモーター部位がサブクローニングされたルシフェラーゼベクターと RelB および p52 の発現ベクターを用いてレポーターアッセイを行った. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

#### 5. RelB は NF- $\kappa$ B 古典的経路によって制御される

RANKL-RANK のシグナルは, NF- $\kappa$ B 非古典的経路のみならず NF- $\kappa$ B 古典的経路を活性化させることが知られる. 特に NF- $\kappa$ B 古典的経路は RelB の転写を直接的に制御することが報告されている. そこで RANKL 誘導性の M 細胞分化における NF- $\kappa$ B 古典的経路の重要性を評価した. オルガノイドへ RANKL による刺激を加え, M 細胞への分化誘導を行う際に IKK $\beta$  の阻害剤である sc-514 を添加したところ, RelB の発現が大幅に減少し (図 5A), また M 細胞マーカーの発現誘導も抑制された (図 5B). これは M 細胞分化に必須である NF- $\kappa$ B 非古典的経路の活性化には, NF- $\kappa$ B 古典的経路の活性が必要とされることを示唆する. なお RANKL-RANK 誘導性の NF- $\kappa$ B 古典的経路の活性化には TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) が必要であることが知られる. そこで現在は腸管上皮細胞特異的に TRAF6 を欠損するマウスを用い, このマウスにおける M 細胞の形成を解析している.

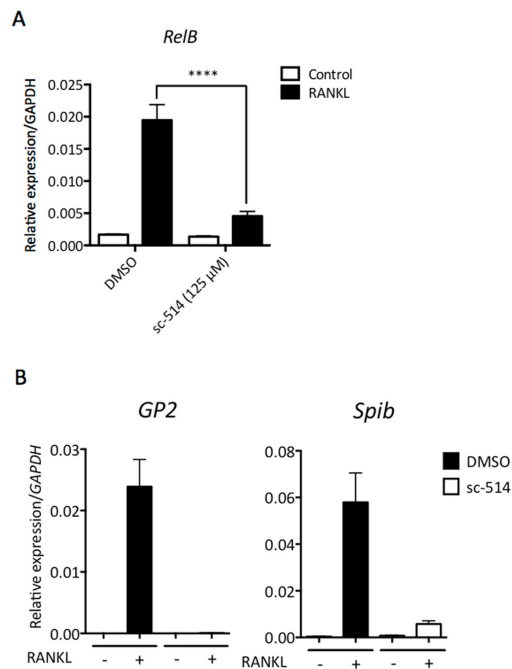


図5. NF- $\kappa$ B 古典的経路を阻害すると RelB の発現が抑制される。

A) オルガノイドへ RANKL を加えて刺激する際、IKK  $\beta$  の阻害剤である sc-514 を加えると、RelB の発現が著しく減少した。 B) sc-514 存在下では RelB の発現抑制に伴い、オルガノイドにおける M 細胞マーカーの発現がブロックされた。 \*\*\*\*p < 0.0001.

## 考 察

本研究の結果、M 細胞の分化に NF- $\kappa$ B 非古典的経路の活性化が必須であることが明らかとなった。NF- $\kappa$ B 非古典的経路の活性化は M 細胞を含む FAE 全体で観察されるが、FAE 全体が M 細胞へと分化するわけではない。このことは M 細胞を含む FAE 全体の細胞の分化制御に NF- $\kappa$ B 非古典的経路以外にも何らかのシグナルが関与していることを示唆する。今後これらのシグナル伝達系の役割を総合的に評価することを検討している。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、慶應大学消化器内科の佐藤敏朗である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Kanaya, T. & Ohno, H. : The Mechanisms of M-cell differentiation. *Biosci. Microbiota Food Health*, **33** : 91-97, 2014