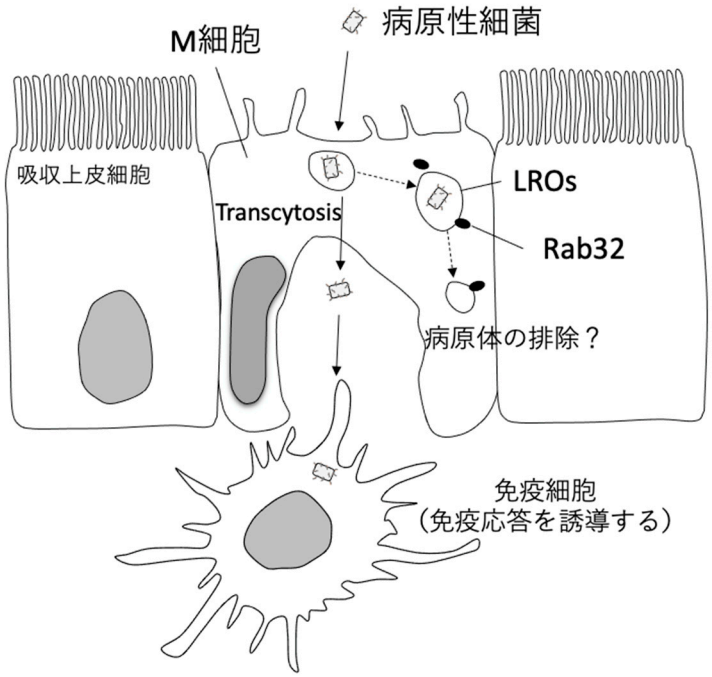
23　腸内細菌に対する免疫応答に重要なM細胞の総合的理解	大野　博司

【目的】M 細胞は腸管における免疫応答の誘導の開始点としての役割を担っている。これまでに筆者は M 細胞に GP2 などの分子が発現することを見出し、これらが特定の細菌の取り込み受容体として機能することを明らかにした。他にも様々な分子が M 細胞に発現することが見出されているが、その殆どが M 細胞の機能と結びつけられておらず、特にトランスサイトーシスに関わる分子は全く同定されていない。本研究では M 細胞のトランスサイトーシスの仕組みを明らかにするため、細胞内の小胞輸送を制御する低分子量 G タンパク質である Rab ファミリーに着目した。

【方法】M 細胞に発現する Rab ファミリー遺伝子を同定するため RNA-sequence 解析を行った。Rab32 のタンパク質レベルでの発現を解析するため抗 Rab32 抗体を用いた免疫染色を行った。

【結果】RNA-sequence の結果、Rab32 が FAE において高発現することが見出された。免疫染色の結果、M 細胞は Rab32 を発現することが明らかとなった。Rab32 の細胞内局在を観察したところ、リソソームおよびリソソーム関連オルガネラ（lysosome-related organelles : LROs）のマーカーである Lamp-1 と共局在することが観察された。よって Rab32 は M 細胞のリソソームもしくは LROs に局在することが明らかとなった。

M 細胞は Rab32 を発現する



23. 腸内細菌に対する免疫応答に重要なM細胞の総合的理解

大野　博司

理化学研究所 生命医科学研究センター 粘膜システム研究チーム

Key words：M細胞，パイエル板，Rab32，リソソーム関連オルガネラ，オルガノイド

緒　言

腸内には非常に多くの腸内共生細菌が常在している。一方で、食物の摂取に伴い腸管には病原性細菌やウイルスなど身体にとって有害な病原体が侵入してくる可能性もある。このように腸管粘膜は多くの抗原に曝されていることから腸管にはこれらの抗原を監視し、適切な免疫応答を発動させて腸管から排除しなければならない。そのため腸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、腸管における免疫応答の誘導において中心的な役割を担っている。パイエル板の粘膜面を覆う濾胞随伴上皮細胞層（follicle-associated epithelium：FAE）には抗原の取り込みと輸送に特化した上皮細胞であるM細胞が分布している。M細胞は腸管内の抗原を捕捉して取り込み、トランスサイトーシスと呼ばれる細胞内輸送系によって抗原をパイエル板の樹状細胞に受け渡す。この結果抗原に対する免疫応答が誘導されることから、M細胞は腸管免疫応答の開始点であるといえる。

これまでに筆者はM細胞にGP2をはじめとする分子が発現することを見出し、これらが特定の細菌の取り込み受容体として機能することを明らかにした［1］。他にも様々な分子がM細胞に発現することが見出されているが、その殆どがM細胞の機能と結びつけられておらず、特にトランスサイトーシスに関わる分子は全く同定されていない。そこで筆者はM細胞のトランスサイトーシスの仕組みを明らかにするため、細胞内の小胞輸送を制御する低分子量Gタンパク質であるRabファミリーに着目した。M細胞が分布するFAEとM細胞が分布しない絨毛上皮との遺伝子発現を比較解析したデータセットにおいて、Rabファミリー低分子量Gタンパク質をコードする遺伝子の発現量を調べたところ、Rab32がFAEにおいて高発現することが見出された。本研究ではRab32のM細胞におけるRab32の発現解析を行った。

方　法

1. M細胞のRNA-sequence解析

小腸遠位部に分布するパイエル板を採取し、30 mM EDTAで15分処理した後、26Gの注射針を用いてFAEを単離した［2］。FAEからRNA抽出後、illumina社のTruSeq RNA library Prep Kit v2でライブラリーを調製し、HiSeq1500（50-bp single-end）でシークエンス解析を行った。得られたシークエンスデータをSTARによってゲノムへマッピングを行い、featureCountsでカウント値を算出した。カウント値をDESeq2パッケージで正規化した後、FAEに高発現する遺伝子を抽出した。

2. Rab32の発現解析

単離したFAEをlysis bufferに懸濁し15分間氷上で静置したのち遠心し、上清を回収することで細胞質タンパク質画分（cell lysate）を精製した。このcell lysateをサンプルとして抗Rab32抗体を用いたwestern blottingを行った。また、M細胞におけるRab32の発現様式を解析するため抗Rab32抗体を用いてパイエル板組織のホールマウント免疫染色およびパイエル板組織切片の免疫染色を行った。

3. 小腸オルガノイドの作製とオルガノイドにおけるM細胞分化誘導

小腸の近位部および遠位部を採取してPBSで洗浄後、粘膜面の絨毛をスライドグラスで除去する。再度PBSで洗浄後、4℃に保った状態で2 mM EDTA/PBS中で30分間ゆっくり転倒混和する。50 mL tubeへ移し、激しくシェイクすることで小腸陰窩（クリプト）を単離し、マトリジェルに埋め込み既報に従い培養してオルガノイドを作製した[3]。作製したオルガノイドにRANKLを添加し、M細胞を誘導した。

結　果

1.　Rab32はFAEにおいて高発現する

FAEと絨毛上皮（villous epithelium：VE）の遺伝子発現をRNA-sequenceによって比較解析した。FAEサンプルにおいて既知のM細胞マーカー遺伝子の発現が高いことが確認された（図1）。このデータセットにおいてRabファミリーの遺伝子発現を解析したところ、*Rab31*、*Rab32*および*Rab42*がFAEにおいて高発現することが明らかとなった。Rab32は他の研究グループの報告においてもM細胞で高発現する可能性が示されている［4］。これらのことを踏まえて本研究ではRab32に着目した。M細胞におけるRab32のタンパク質レベルでの発現を評価するため、パイエル板から単離したFAEをサンプルとしてwestern blottingを行ったところ、25 kDa付近に明瞭なバンドが確認されたことから、M細胞を含むFAEにおいてRab32がタンパク質レベルで発現することが示唆された（図2A）。

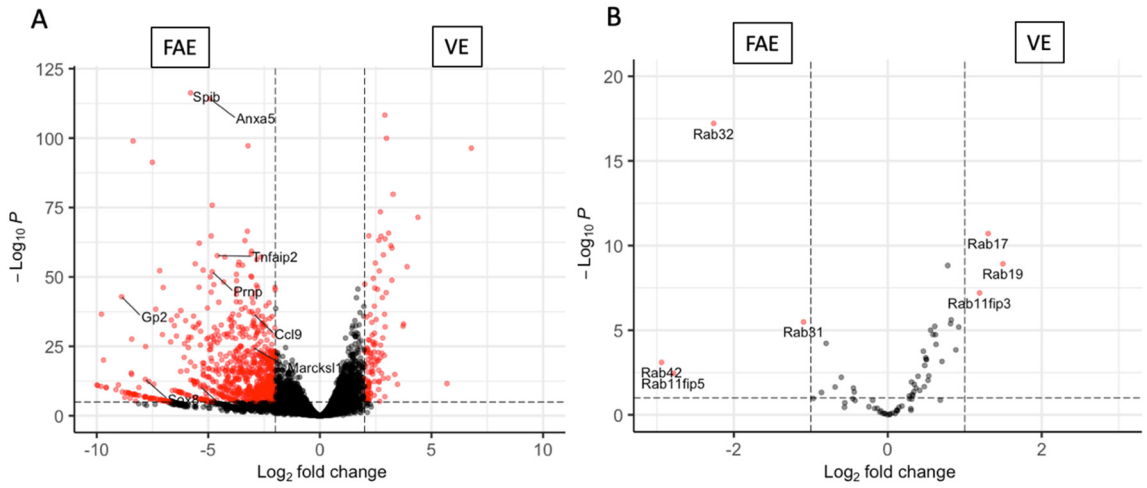


図1.　FAEのRNA-sequence解析

A）　パイエル板から採取したFAEとVEの遺伝子発現を解析し、Volcano plotに表した。縦軸はDESeq2による二群間比較のp-valueを表し、横軸は発現量の違いのfold change（FC）を表している。赤いプロットは$p<10^{-6}$、FC>2を示す。また、既知のM細胞マーカー遺伝子をラベルした。

B）　AのVolcano plotからRabファミリーおよびそのパートナー遺伝子を抽出した。赤いプロットは$p<10^{-2}$、FC>1を示す。

2.　M細胞はRab32を発現する

FAEにおけるRab32タンパク質の発現様式をパイエル板のホールマウント免疫染色によって観察したところ、GP2を発現する成熟M細胞においてRab32が発現することが確認された（図2B）。Rab32の発現はGP2を発現していない細胞においても発現することが確認されたことから、Rab32は成熟前のM細胞においても発現することが示唆された。M細胞分化に必須である転写因子Spi-B欠損マウスのFAEにおいても*Rab32*-mRNAの発現は観察されたことから、Rab32はSpi-Bの標的遺伝子では無いことが明らかとなった（図2C）。

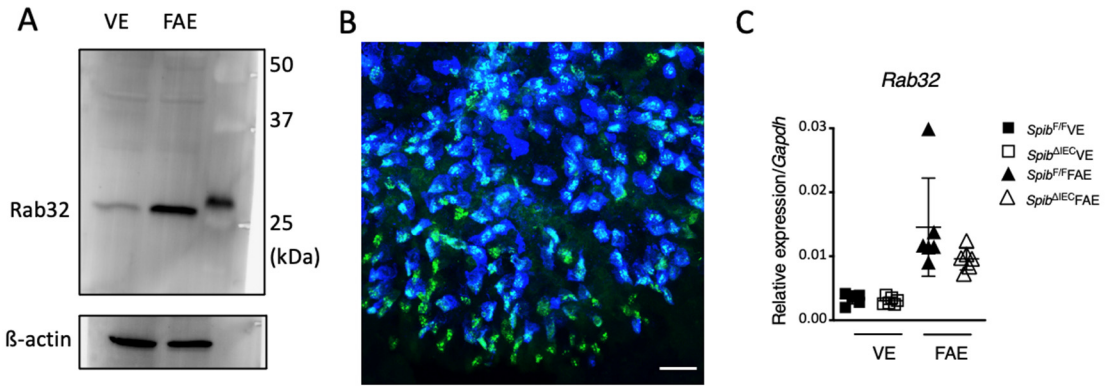


図2. FAEおよびM細胞におけるRab32の発現解析

A) パイエル板から採取した FAE と VE から cell lysate を調製し、抗 Rab32 抗体による western blotting を行った。内部標準として beta-actin の blotting を行った。

B) パイエル板を採取し、抗 GP2 抗体（青）および抗 Rab32 抗体（緑）によるホールマウント免疫染色を行った。（スケールバー：20 μ m）

C) Spi-B 欠損マウス（*Spib* 遺伝子を腸管上皮細胞特定機に欠損するマウス: $Spib^{\Delta IEC}$）およびコントロールマウス（$Spib^{F/F}$）から FAE と VE を採取し、Rab32 の mRNA を定量した。

3. Rab32 は M 細胞のリソソーム関連オルガネラに局在する

Rab32 の M 細胞内における局在を調べるため、パイエル板組織切片の免疫染色を行った。Rab32 はメラノサイト、マクロファージや樹状細胞においてリソソーム関連オルガネラ（lysosome-related organelle：LROs）に局在することが報告されている［5, 6］。そこで Rab32 とリソソームおよび LROs のマーカーである Lamp1 の細胞内局在を観察したところ、Rab32 は細胞の頂端側の小胞状のオルガネラに分布し、Lamp-1 が共局在することが明らかとなった（図 3A）。リソソームが発達する樹状細胞においても Rab32 のシグナルが検出されるが、M 細胞のような小胞状のオルガネラへの局在は観察されなかった。M 細胞にはリソソームが発達しないと考えられているため［7］、M 細胞において Rab32 は LROs に局在することが推測示唆された。なお小腸より作製したオルガノイドから誘導した M 細胞も Rab32 を発現することが確認された（図 3B）。今後は *in vivo* および *in vitro* の試験系を組み合わせ、Rab32 の細胞内局在を詳細に明らかにする。

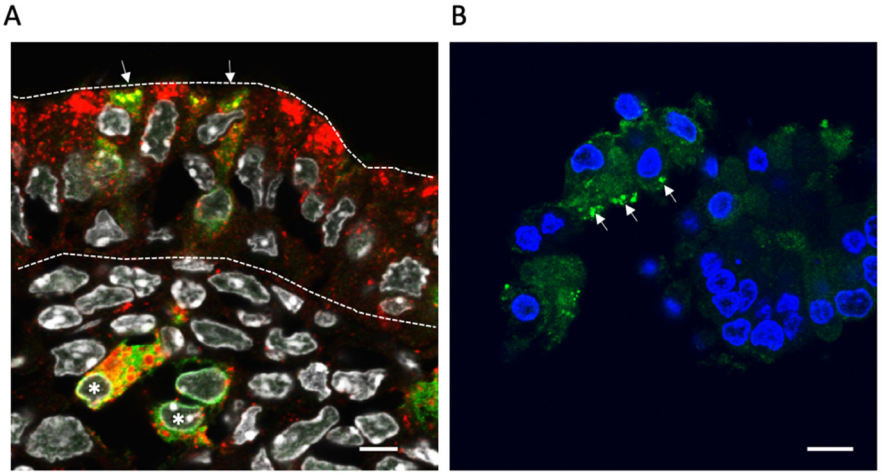


図3. M細胞におけるRab32の細胞内局在

A) パイエル板の組織切片を抗 Rab32 抗体（緑）および抗 Lamp-1 抗体（赤）による免疫染色を行った（スケールバー：5μm）。核の対比染色は DAPI で行った（白）。破線は FAE を示し、矢印は M 細胞において Rab32 と Lamp-1 が共局在する部分を示す。

B) オルガノイドを 3 日間 RANKL で刺激して M 細胞を誘導し、抗 Rab32 抗体によるホールマウント免疫染色を行った（スケールバー：10μm）。核の対比染色は DAPI で行った（青）。矢印は Rab32 タンパク質が多く見られる部分を示し、*はリソソームを多く形成する樹状細胞を示す。

考　察

Rab32 はマクロファージや樹状細胞の LMO に局在し、*Salmonella* 属菌の感染に対する感受性の違いを規定する因子であることが報告されている［8］。マウスにとって *Salmonella* Typhimurium の感染は致死的であるが、ヒトにおいて腸チフスを引き起こす *Salmonella* Typhi の感染に対しては耐性を有する。Rab32 は細胞内に感染した *S.* Typhi を取り囲むように局在し、抗菌活性を有する LROs へ *S.* Typhi を輸送すると考えられている。一方で *S.* Typhimurium は Rab32 に取り囲まれることは無く、これは *S.* Typhimurium が Rab32 を不活性型にするタンパク質 SopD2 および分解する GtgE を発現するからであることが報告された［6, 8］。本研究では Rab32 が M 細胞において LROs を形成することを示唆された。これまで M 細胞は取り込んだ細菌抗原をそのまま樹状細胞に受け渡すと考えられてきたが、M 細胞の細胞内において病原性細菌を排除する仕組みが備わっていることが推測された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東北大学大学院生命科学研究科膜輸送機構解析分野の福田光則教授である。

文　献

1) Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. Nature. 2009;462: 226–230. doi:10.1038/nature08529

2) Hase K, Ohshima S, Kawano K, Hashimoto N, Matsumoto K, Saito H, et al. Distinct gene expression

profiles characterize cellular phenotypes of follicle-associated epithelium and M cells. DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes. 2005;12: 127–137. doi:10.1093/dnares/12.2.127

3) Sato T, Vries RG, Snippert HJ, Wetering M van de, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt–villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature. 2009;459: 262–265. doi:10.1038/nature07935

4) Haber AL, Biton M, Rogel N, Herbst RH, Shekhar K, Smillie C, et al. A single-cell survey of the small intestinal epithelium. Nature. 2017;551: 333–339. doi:10.1038/nature24489

5) Marks MS, Heijnen HFG, Raposo G. Lysosome-related organelles: unusual compartments become mainstream. Current opinion in cell biology. 2013;25: 495–505. doi:10.1016/j.ceb.2013.04.008

6) Spanò S, Galán JE. A Rab32-dependent pathway contributes to Salmonella typhi host restriction. Science (New York, NY). 2012;338: 960–963. doi:10.1126/science.1229224

7) Kraehenbuhl J-P, Neutra MR. EPITHELIAL M CELLS: Differentiation and Function. Annu Rev Cell Dev Biol. 2003. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.301

8) Spanò S, Gao X, Galán JE, Hannemann S. A Bacterial Pathogen Targets a Host Rab-Family GTPase Defense Pathway with a GAP. Cell Host & Microbe. 2016;19: 216–226. doi:10.1016/j.chom.2016.01.004