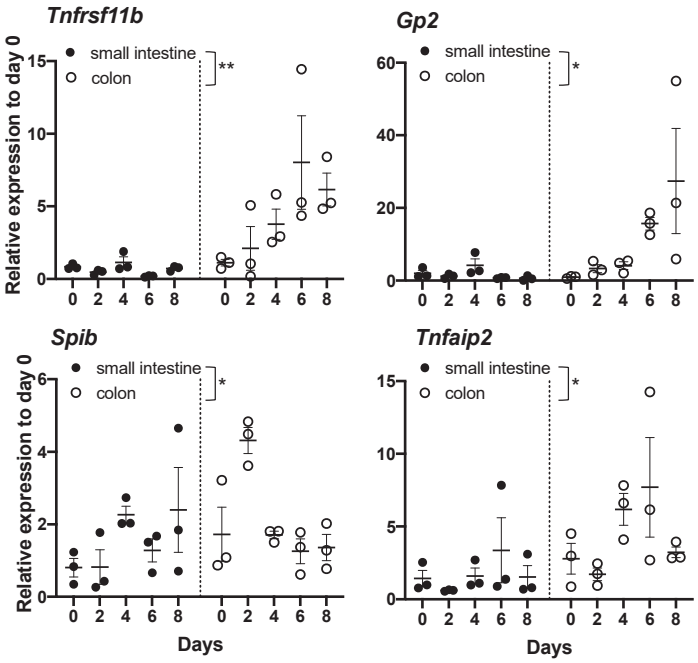
| 27　潰瘍性大腸炎における誘導性M細胞の機能解明 | 木村　俊介 |
|---|---|

**【目的】**内なる外である消化器には多くの外来抗原や常在微生物が存在している。これらの異物に対する個体防御のため、消化管は高度な免疫システムを備え、生体恒常性の維持に貢献する。免疫システムの誘導装置として機能するパイエル板などのリンパ組織は、絶えず外来抗原をモニターし、分泌型 IgA の産生を行う。こうした免疫監視が正常に機能するためには粘膜上の抗原が上皮下のリンパ球に認識される必要がある。そのため、パイエル板を覆う濾胞上皮には M 細胞と呼ばれる特殊な上皮細胞が存在し、粘膜面に存在する抗原を取り込み、粘膜免疫応答を活性化する役割を持つ。M 細胞は抗原取り込みに特化するための様々な特徴を備える。管腔側の微絨毛は通常の吸収上皮に比べて疎であり、そこに存在する糖衣も薄く、外来抗原が細胞に接触しやすい構造となっている。さらに M 細胞表面には Glycoprotein 2（GP2）を始めとする病原性微生物に対する受容体が発現しており、M 細胞からの抗原取込みを促進する。一方で、バリアが虚弱な M 細胞の構造は異物が侵入しやすいという側面も持ち合わせている。実際にある種の病原微生物や毒素は選択的に M 細胞を標的として生体内に侵入する。このような理由から M 細胞の分化は自己抑制機構を含む厳密な制御下におかれ、その数が制限されている。このような制御機構のもとで、定常状態ではパイエル板の濾胞上皮に限局し、小腸絨毛、大腸上皮にはほとんど存在しない。ところが、炎症性腸疾患、感染症においては M 細胞の異所性の出現が認められる。しかしながら、これらの炎症性 M 細胞の病態における役割は不明である。そこで、本研究では、炎症誘導 M 細胞の性状解析を行い、その分化メカニズム、炎症性腸疾患における役割を明らかにすることを目的とした。

**【方法】**デキストラン硫酸ナトリウム塩（DSS）による大腸炎モデルマウスを作製し、その腸管上皮を分離し、定量的 PCR 法、免疫組織染色法により M 細胞関連分子の発現を解析した。

【結果】DSS 処理後 2 日で M 細胞関連因子の発現上昇並びに M 細胞の出現が大腸上皮において認められた。

DSS 大腸炎モデルの大腸上皮におけるM細胞関連分子の発現上昇



# 27. 潰瘍性大腸炎における誘導性 M 細胞の機能解明

木村　俊介

慶應義塾大学 薬学部 生化学講座

Key words：M 細胞，パイエル板，炎症性腸疾患

## 緒　言

内なる外である消化器には多くの外来抗原や常在微生物が存在している。これらの異物に対する個体防御のため、消化管は高度な免疫システムを備え、生体恒常性の維持に貢献する。免疫システムの誘導装置として機能するパイエル板などのリンパ組織は、絶えず外来抗原をモニターし、分泌型 IgA の産生を行う。こうした免疫監視が正常に機能するためには粘膜上の抗原が上皮層を越えて、リンパ濾胞に取り込まれる必要がある。そのため、パイエル板を覆う濾胞上皮には M 細胞と呼ばれる特殊な上皮細胞が存在し、粘膜面に存在する抗原を取り込み、トランスサイトーシス経路を通して上皮下の樹状細胞に受け渡すことで粘膜免疫応答を活性化する役割を持つ（図 1）。

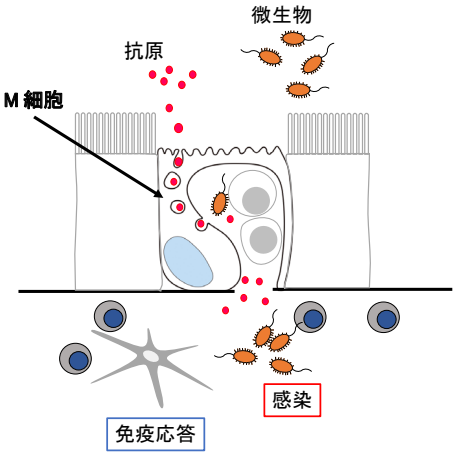



図 1. M 細胞は粘膜面の物質取り込みを行う細胞である
M 細胞は上皮バリアを越えて物質を取り込むことで免疫応答を活性化する一方で、微生物の体内への侵入口となる二面性を持つ。

M 細胞は抗原取り込みに特化するための様々な特徴が備わっている。例えば M 細胞の管腔側の微絨毛は通常の吸収上皮に比べて疎であり、そこに存在する糖衣も薄く、外来抗原が細胞に接触しやすい構造となっている。さらに M 細胞表面には Glycoprotein 2（GP2）を始めとする病原性微生物に対する受容体が発現しており［1］、M 細胞からの抗原取込みを促進する。

一方で、バリアが虚弱な M 細胞の構造は異物が侵入しやすいという側面も持ち合わせている。実際にある種の病原微生物や毒素は選択的に M 細胞を標的として生体内に侵入する。このような理由から M 細胞の分化は自己抑制機構を含む厳密な制御下におかれ、その数が制限されている［2］。このような制御機構のもとで、定常状態ではパイエル板の濾胞上皮に限局し、小腸絨毛、大腸上皮にはほとんど存在しない。

ところが、炎症性腸疾患、感染症においては M 細胞の異所性の出現が認められる［3，4］。さらに、近年のヒト大腸粘膜のシングルセル RNAseq 解析による細胞間相互作用を解析した研究では、M 細胞が潰瘍性大腸炎患者において増

加し、疾患発症の中心となる細胞であることが示されている［5］。しかしながら、これらの炎症性 M 細胞の病態における役割は不明である。我々によるデータの再解析からは、この報告における炎症誘導性M細胞は、定常時の M 細胞とは発現分子プロファイルが異なることが示唆された。したがって、その分化機構、機能も定常状態で存在する M 細胞とは異なる可能性が考えられる。

本研究では、炎症誘導 M 細胞の性状解析を行い、その分化メカニズム、炎症性腸疾患における役割を明らかにすることを目的とした。

## 方　法

### 1. 大腸炎モデルの構築

本研究ではデキストラン硫酸ナトリウム塩（DSS）のマウスへの投与による大腸炎モデルを作製した。Special Pathogen Free（SPF）環境下で飼育した C57BL6/N 系統 オス 7 週齢から 12 週齢のマウスへと、DSS の飲水投与を行った。あらかじめ投与量を 2.0%、2.5%、3.0%で試し、投与後 7 日で体重が 80%程度へと低下する DSS 濃度を検討した。その結果、2.5%DSS により予定の体重減少を確認した。解剖時には糞便スコア、大腸組織像、大腸の長さの測定を行い、大腸炎の発症を確認した。

### 2. 定量的 PCR 法による M 細胞関連分子の発現確認

上述したようにマウスへと 2.5%DSS を飲水投与し、2 日ごとに M 細胞関連分子の発現量を測定した。マウスは安楽死後に、回腸と大腸を採取し、あらかじめ氷冷した Hank's balanced salt solution（HBSS）で洗浄し内容物を除去したのちに、30 mM EDTA を含む HBSS で、氷上で 15 分処理後、実体顕微鏡下で注射針を用いて単層上皮の剥離を行った。剥離したシート状の上皮は一部を 4%パラホルムアルデヒドで 30 分固定後、免疫組織染色へと用いた。残りは RNA 抽出のため、セパゾール RNA 抽出試薬に懸濁した。製品プロトコルに従い RNA を抽出した後、塩化リチウム沈殿法により DSS の除去を行った。その後、逆転写反応により cDNA を合成しリアルタイム PCR 法により、目的の mRNA 量の定量を行った。

### 3. 免疫染色

PFA で固定した上皮シートは PBS で洗浄後、10%正常ロバ血清により 30 分ブロッキング処理を行ったのちに、一次抗体により室温で一晩処理した。PBS での洗浄後、二次抗体で室温 2 時間処理を行ったのちに、再び PBS で洗浄を行って封入した。一次抗体として、Rabbit anti-Tnfaip2 antibody（200 倍希釈）［6］、Guinea Pig anti-Sox8 antibody（2,000 倍希釈）［7］、Rat anti-GP2 antibody（200 倍希釈）［1］を用い、二次抗体として、anti-Rabbit IgG antibody Alexa488、anti-Guinea Pig IgG antibody Cy3、anti-Rat IgG antibody Alexa647（いずれも Jackson Immunoresearch 1,000 倍希釈）を用いた。

## 結果および考察

DSS 処理後 2 日の大腸上皮において Spib の発現上昇が定量的 PCR 法により確認できた。Spib は M 細胞分化に必須の転写因子である。その後、*Tnfaip2*、*Tnfrsf11b*、*Gp2* の発現が上昇していた（図 2）。一方で、回腸上皮ではこれらの遺伝子の発現上昇は確認できなかった。また、免疫組織染色の結果では、M 細胞で発現するもう一つの転写因子である、Sox8 を発現する上皮細胞の増加が大腸上皮において認められた。以上の結果は DSS 大腸炎により大腸で M 細胞が誘導されている可能性を示している。これは潰瘍性大腸炎の患者で M 細胞様細胞が増加するとの先行研究と一致しており DSS 大腸炎モデルを用いることで、炎症性 M 細胞の解析が可能であることを示している。

一方で、炎症誘導性 M 細胞の分化機構を明らかにすることはできなかった。定常状態におけるパイエル板 M 細胞は Tnf スーパーファミリーの RANKL とその受容体 RANK により誘導される。現在腸管上皮で RANK を欠損する Villin-

Cre RANK$^{\Delta/\Delta}$ マウスを導入済みである。今後、DSS 大腸炎モデルと本遺伝子改変マウスを用いることで、炎症誘導性 M 細胞が同様に RANKL-RANK シグナルを必要とするのかを明らかにしていく。

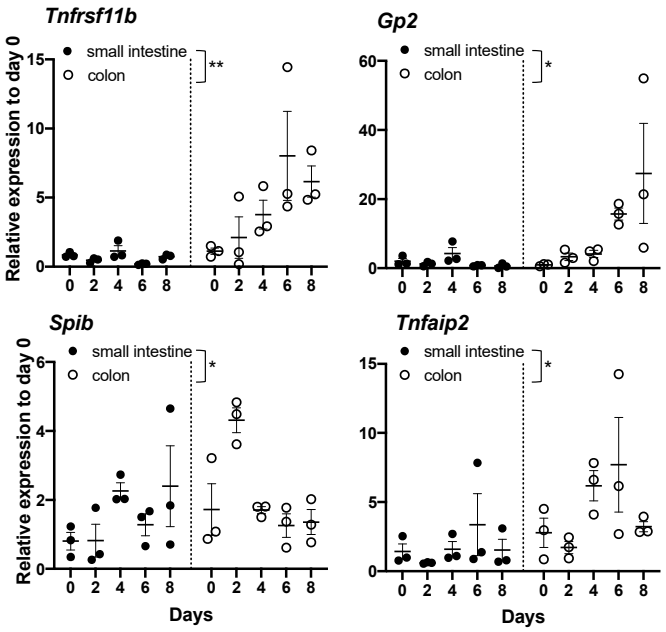



図 2. DSS 大腸炎モデルの大腸上皮における M 細胞関連分子の発現上昇
経時的に小腸上皮（●）および大腸上皮（○）を回収し定量的 PCR 法によって M 細胞関連遺伝子の発現を解析した。**P＜0.01、*P＜0.5（2-way ANOVA）。

## 共同研究者・謝辞

本研究の実施にあたり北海道大学大学院医学研究院組織解剖学教室の岩永敏彦先生の協力を得た。

## 文　献

1） 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. 2009 Nov 12;462(7270):226-30. doi: 10.1038/nature08529. PMID: 19907495

2） Kimura S, Nakamura Y, Kobayashi N, Shiroguchi K, Kawakami E, Mutoh M, Takahashi-Iwanaga H, Yamada T, Hisamoto M, Nakamura M, Udagawa N, Sato S, Kaisho T, Iwanaga T, Hase K. Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity. Nat Commun. 2020 Jan 13;11(1):234. doi: 10.1038/s41467-019-13883-y.PMID: 31932605

3） Fujimura Y, Kamoi R, Iida M. Pathogenesis of aphthoid ulcers in Crohn's disease: correlative findings by magnifying colonoscopy, electron microscopy, and immunohistochemistry. Gut. 1996 May;38(5):724-32. doi: 10.1136/gut.38.5.724. PMID: 8707119

4） O'Shea M, Roe AJ, Shaw DJ, Gally DL, Lengeling A, Mabbott NA, Haas J, Mahajan A. Salmonella transforms follicle-associated epithelial cells into M cells to promote intestinal invasion. Cell Host Microbe. 2012 Nov 15;12(5):645-56. doi: 10.1016/j.chom.2012.10.009. PMID: 23159054

5) Smillie CS, Biton M, Ordovas-Montanes J, Sullivan KM, Burgin G, Graham DB, Herbst RH, Rogel N, Slyper M, Waldman J, Sud M, Andrews E, Velonias G, Haber AL, Jagadeesh K, Vickovic S, Yao J, Stevens C, Dionne D, Nguyen LT, Villani AC, Hofree M, Creasey EA, Huang H, Rozenblatt-Rosen O, Garber JJ, Khalili H, Desch AN, Daly MJ, Ananthakrishnan AN, Shalek AK, Xavier RJ, Regev A. Intra- and Inter-cellular Rewiring of the Human Colon during Ulcerative Colitis. Cell. 2019 Jul 25;178(3):714-730.e22. doi: 10.1016/j.cell.2019.06.029. PMID: 31348891

6) Kimura S, Yamakami-Kimura M, Obata Y, Hase K, Kitamura H, Ohno H, 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. Epub 2014 Oct 22. PMID: 25336168

7) Kimura S, Kobayashi N, Nakamura Y, Kanaya T, Takahashi D, Fujiki R, Mutoh M, Obata Y, Iwanaga T, Nakagawa T, Kato N, Sato S, Kaisho T, Ohno H, Hase K. Sox8 is essential for M cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice. J Exp Med. 2019 Apr 1;216(4):831-846. doi: 10.1084/jem.20181604. Epub 2019 Mar 15. PMID: 30877171