

博士論文（要約）

論文題目 IgA 産生と腸内細菌叢の多様性を制御する間葉系細胞の同定

氏 名 永島 一樹

哺乳類の腸管には数多くの腸内細菌が生着しており、宿主が腸内細菌に対して繁殖の場と栄養素を与える一方で、腸内細菌は消化の補助、有害代謝物の解毒、病原菌生着の阻害を行うという共生関係にある。宿主の腸管免疫系は、感染防御だけでなく腸内細菌叢の維持にも関与する。宿主の遺伝的な素因や環境要因が複合的に作用し、腸管免疫系による腸内細菌叢の制御機構が破綻すれば炎症性腸疾患に繋がることが提唱されている。

近年の研究によって免疫グロブリン A (IgA) が腸管の感染防御と腸内細菌叢制御において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。B 細胞から分泌された IgA は炎症性腸疾患に関わるような有害な腸内細菌に優先的に結合し、有害な腸内細菌が腸管上皮に侵入することを阻害し糞便中への排せを促進する。しかし、腸内細菌に対する IgA 誘導機構は不明な点が多い。従来の研究は血球系細胞の役割に焦点を当てたものが多く、上皮系細胞や間葉系細胞の IgA 産生における役割はほとんど分かっていない。

パイエル板と孤立リンパ濾胞を含む腸管リンパ組織は、腸管において IgA が誘導される主要な場である。腸管リンパ組織の濾胞関連上皮は microfold (M) 細胞と呼ばれる特殊な上皮細胞を含んでおり、M 細胞は管腔の細菌抗原を取り込んで腸管リンパ組織内の免疫系細胞に渡す機能を持つ。また濾胞関連上皮の上皮細胞は多様なケモカインを産生することで免疫系細胞を誘引する働きも持っている。TNF ファミリーサイトカインの RANKL (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand) は腸管リンパ組織の M 細胞分化に必須の役割を果たすが、RANKL 欠損マウスが腸内細菌への IgA 産生の大幅な低下を示すのに対して、M 細胞を欠損する転写因子 SpiB 欠損マウスでは特定細菌に対する IgA 応答が減少するのみである。よって、腸管リンパ組織において RANKL は M 細胞分化誘導以外の役割を持つ可能性がある。

濾胞関連上皮の発現する RANK への RANKL 刺激が誘導する分子群を明らかにすることを目的として、腸管上皮特異的に RANK を欠損するマウスの濾胞関連上皮を単離して RNA-seq 解析を行なった。減少している遺伝子群の中で有意差が最も大きい遺伝子は濾胞関連上皮に特異的に発現するケモカイン *Ccl20* であった。パイエル板・孤立リンパ濾胞の濾胞関連上皮のホールマウント染色を行い、上皮細胞から産生される CCL20 がタンパク質レベルでも検出されないことを確認した。よって、濾胞関連上皮の RANK に対する RANKL 刺激は M 細胞分化に加えて、上皮細胞による CCL20 発現を制御することが分かった。

次に、濾胞関連上皮の RANK に RANKL を供給する細胞を明らかにすることを目的とする実験を行なった。RANKL には可溶型と膜結合型があり、上皮に接している細胞が膜結合型 RANKL を供給しているのか、上皮から離れた細胞が可溶型 RANKL を供給しているか不明であった。そこで、可溶型 RANKL を特異的に欠損するマウスを解析したところ M 細胞分化の障害や CCL20 発現の低下が認められなかったの

で、膜結合型 RANKL が重要であることが示唆された。

濾胞関連上皮に接することで膜結合型 RANKL を供給する細胞を同定する為に、上皮ドーム領域を免疫染色法によって観察したところ、間葉系細胞のマーカーである Podoplanin 陽性の細胞が RANKL を強発現していた。既報では、上皮ドーム領域において RANKL を発現する間葉系の辺縁細網細胞が報告されていたので、上皮と接する RANKL 陽性細胞が辺縁細網細胞と同一の細胞群なのかを検証した。上皮と接する RANKL 陽性細胞は、辺縁細網細胞とは異なる遺伝子発現プロファイルを持ち、MAdCAM-1 や CXCL13 を発現しない一方で RANKL を辺縁細網細胞よりも強く発現することが分かった。これらの結果から、この未知の RANKL 陽性細胞が上皮に直接接することで M 細胞分化と CCL20 発現を制御することが示唆された。

間葉系細胞の重要性を証明する為に、間葉系細胞特異的に RANKL を欠損するマウスを作成した。間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは CCL20 発現及び M 細胞分化が障害されたが、血球系細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは M 細胞分化・CCL20 発現が正常であった。よって、RANKL 陽性間葉系細胞が M 細胞誘導細胞 (M cell-inducer cells, MCi cells) として機能することが分かった。

M 細胞誘導細胞が腸管リンパ組織の免疫応答に与える影響を検証した。間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウスのパイエル板上皮下ドーム領域では M 細胞による抗原取り込みが減少しており、抗体の IgA へのクラススイッチに必要である B 細胞と樹状細胞間の相互作用も減少していた。また、孤立リンパ濾胞の成熟にも異常が認められた。次に腸内細菌に対する IgA 産生について検討した。間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウスのパイエル板では B 細胞の AID 発現が減少しており IgA へのクラススイッチが障害されていた。間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウスの小腸粘膜固有層では IgA 陽性形質細胞が著減しており、糞便中の IgA 濃度も大きく減少していた。腸内細菌を糞便から単離して、IgA の結合している細菌の割合をフローサイトメトリー法で計測したところ、間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは IgA 結合細菌の割合が低かった。IgA 産生の減少は腸管上皮特異的 RANKL 欠損マウスでも同様に確認された。これらの結果から M 細胞誘導細胞の発現する RANKL は腸内細菌特異的な IgA 産生を制御していることが分かった。

最後に M 細胞誘導細胞が IgA 産生を介して腸内細菌叢に与える影響を評価した。間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウスの糞便から DNA を抽出して 16s rRNA 遺伝子を網羅的に解析した。細菌集団の中で、*Bacteroidales* の相対頻度は減少していたが *Clostridiales* は増加しており、*Clostridiales* の中でも免疫系を強く賦活化する性質を持つ *Segmented filamentous bacteria* (SFB) が高い割合で検出された。主座標分析により、腸内細菌叢を調べたところ、間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウスの腸内細菌叢が変化していて、特に腸内

細菌叢の多様性の低下が顕著であることが明らかになった。同様の腸内細菌叢変化は腸管上皮特異的 RANK 欠損マウスにおいても認められた。これらの結果より、間葉系細胞の発現する RANKL によって、腸内細菌叢の多様性が維持されていることが明らかになった。

本研究により、腸管リンパ組織に局在する新規間葉系細胞である M 細胞誘導細胞が宿主と腸内細菌の共生関係を維持する為に重要な役割を果たす細胞であることが明らかになった。M 細胞はその発見から 30 年以上にわたって分子基盤が不明であったが、近年の研究により転写因子 SpiB、表面マーカーである GP2、Marcksl1 などが発見された。しかし、腸管リンパ組織では間葉系細胞やリンパ球など複数の細胞種が RANKL を発現することから、濾胞関連上皮に RANKL を供給する主たる細胞は未同定であったが、本研究において、RANKL を供給する間葉系の M 細胞誘導細胞が同定された。

腸管免疫系の研究はリンパ球をはじめとした血球系細胞とその産物を対象として進められてきたが、腸管の免疫応答は主に腸管リンパ組織で起こることを考慮すれば、腸管リンパ組織において血球系細胞を支持する細胞の研究も同様に重要である。腸管リンパ組織の上皮下ドーム領域は、M 細胞によって細菌抗原が取り込まれることで免疫応答が開始される場であるが、上皮下ドーム領域を制御する間葉系細胞群は不明であった。上皮下ドーム領域には辺縁細網細胞が局在し RANKL を発現していることが知られていたが、本研究により、辺縁細網細胞よりも RANKL を強く発現する M 細胞誘導細胞が膜結合型 RANKL を供給することで上皮下ドーム領域の免疫応答を制御することが明らかになった。

腸内細菌叢の多様性の低下が栄養失調や易感染性、代謝性疾患、IBD と関連していると考えられている。本研究では、M 細胞誘導細胞が腸内細菌叢への IgA 産生を誘導することで腸内細菌叢の多様性を維持していることが報告された。よって、M 細胞誘導細胞の同定は、IBD の病態解明・新規治療法開発やワクチン開発に繋がる可能性がある。