

博士論文

M細胞特異的分子 **MLP** の遺伝子改変マウスを用いた
パイエル板 **M**細胞の分子生物学的解析

金戸 聡

要旨

本研究では抗原取り込みに特化した上皮細胞である M 細胞に特異的に発現する Marcks-like protein (MLP) の機能解析を行った。作製した腸管上皮細胞特異的 MLP 欠損マウスでは、パイエル板内へのエルシニア菌の取り込みがコントロールマウスに比べ有意に減少した。エルシニア菌外膜タンパクの受容体としては $\alpha 5\beta 1$ インテグリンが知られているが、MLP を強制発現した腸管上皮細胞株では $\alpha 5\beta 1$ インテグリンのリガンドに対する応答能が亢進した。本研究結果から MLP が M 細胞において $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの活性化を制御することで、エルシニア菌の効率的な取り込みに寄与していることが示唆された。

序文

腸管は生体内で最も広大な粘膜面を有する器官であり、食物抗原や常在微生物などの多種多様な異種抗原に常時暴露されている (文献 1, 2). 加えて腸管は、赤痢菌やサルモネラ菌などの病原性微生物の主要な侵入経路でもある (文献 3). このため腸管は、粘膜上皮層やムチン、抗菌ペプチドといった物理的・化学的防御壁だけでなく、抗原特異的な分泌型 IgA 抗体を粘膜面に分泌するといった粘膜免疫応答により、病原性微生物が宿主内に侵入・定着することを防いでいる (文献 4-6). このような腸管粘膜免疫機構が正常に働かなくなると、クローン病などの炎症性腸疾患や食物アレルギーをひきおこすと考えられている (文献 7-9). 腸管粘膜免疫機構が正常に機能するためには、二次リンパ組織であるパイエル板などの粘膜免疫誘導組織に集積する T 細胞や B 細胞といったエフェクター細胞に、樹状細胞からの抗原情報が伝達され、抗原特異的な免疫応答が惹起される必要がある (文献 10). この抗原特異的な免疫応答の惹起に重要な役割を担っていると考えられている細胞種のひとつに M 細胞がある (文献 11). M 細胞はパイエル板を含む二次リンパ組織の濾胞関連上皮細胞層 (follicle-associated epithelium; FAE) に存在しており、腸管の管腔側から抗原を効率よく取り込むこ

とのできる特殊な上皮細胞と考えられている (文献 12-14). M 細胞は周辺の上皮細胞に比べ短く疎な微絨毛を持ち, 基底膜側に樹状細胞やリンパ球を内包することのできるポケット構造を有している (文献 15; 図 1). M 細胞が有するこれらの形態学的特徴は, 管腔側の抗原が M 細胞に侵入しやすい状況を作り, また直下で待機している樹状細胞やリンパ球に M 細胞がとりこんだ抗原をすばやく受け渡すことに寄与していると考えられている (文献 16, 17). M 細胞を介した抗原取り込みを起点として, 分泌型 IgA 産生などの腸管粘膜免疫だけでなく, 血中の抗原特異的 IgG 産生を介した全身性免疫が誘導される (文献 18). これらのことから, M 細胞における抗原取り込み機構や M 細胞表面に特異的に発現する分子について明らかにすることで, M 細胞を介して侵入する病原性微生物に対する治療法や, 効果的な経口ワクチン抗原のドラッグデリバリー開発への応用が可能となると期待されている (文献 19, 20).

しかしながら, M 細胞の抗原取り込みメカニズムやその分化, 発生に関する研究は進んでいない. その理由として, マウス 1 匹あたり数千個程度という存在数の低さ, 特異的表面分子の未同定, *in vitro* 下での細胞培養系の未確立といったいくつかの研究上の障害が挙げられる (文献 21).

この状況を打開するべく所属研究室ではこれまでに, マウスパイエル板 M 細

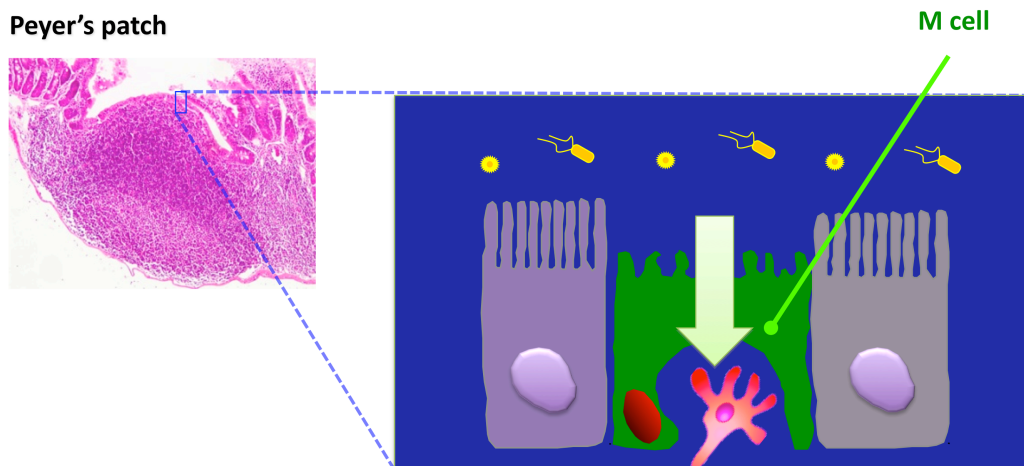


図 1. M 細胞の概念図

M 細胞（緑）は管腔側の抗原（黄）を取り込む上皮細胞であり、パイエル板を含む二次リンパ組織の上皮層に存在している。周辺の上皮細胞に比べて微絨毛の丈が短く、基底膜側に抗原提示細胞（桃）を内包するようなポケット構造を有する。

胞特異的抗体 (NKM16-2-4) を樹立した (文献 18). 次いで、この抗体を用いて単離・精製した高純度な M 細胞を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、組織学的解析と組み合わせることで、M 細胞特異的な分子として myristoylated alanine-rich C kinase substrate (Marcks)-like protein (MLP) と glycoprotein 2 (Gp2), および転写因子 Spi-B を同定した (文献 21, 22). Gp2 に関しては、その後の研究により、大腸菌やサルモネラ菌の表面に発現する鞭毛タンパク Fim H を認識することで、それらの細菌の M 細胞を介した取り込みに寄与していることが明らかになっている (文献 23). Spi-B に関しては、その遺伝子欠損マウスを用いた研究から、M 細胞の分化・成熟を制御する機能を有していることが明らかになって

いる (文献 22, 24). しかしながら, M 細胞を標的にして宿主に感染するエルシニア菌をはじめとした他の病原性細菌における感染・取り込み機構に関しては依然として明らかになっていない点が多い. M 細胞の抗原取り込み機構に関して知見を広げるためには, M 細胞特異的に発現する分子の M 細胞における機能についてさらなる探究が求められる.

目的

小腸パイエル板や孤立リンパ小節の上皮層に存在する M 細胞は、腸管における抗原特異的免疫応答を惹起する上で起点となる重要な細胞である (文献 13-17). M 細胞の遺伝子発現解析や組織学的解析から、M 細胞特異的に局在・発現する分子がこれまでにいくつか同定されている (文献 21-29). しかしながら、これらの M 細胞特異的分子が M 細胞を含む腸管粘膜免疫機構において実際に何らかの機能を有しているのかについては未だそのほとんどが明らかになっていない. 本研究で焦点を当てた MLP もその中のひとつである.

MLP は体組織において脳をはじめ、肺、腎臓と広い組織部位に発現している (文献 30). MLP は *Marcks11* にコードされた 200 アミノ酸 (42 kDa) からなる分子であり、主に、翻訳と並行して不可逆的に N-ミリスチル化されることで細胞膜への親和性を正に調節しているミリスチル化配列、機能未知な Marcks 相同配列、セリン残基を多く含んだリン酸化配列から構成される (文献 31; 図 2). これらの配列を用いることで MLP は Protein kinase C (PKC) の基質として機能する一方で、アクチンフィラメントに結合し細胞骨格の形成、細胞接着、移動に深く関与することが示唆されている (文献 32, 33; 図 2). ファミリー分子である

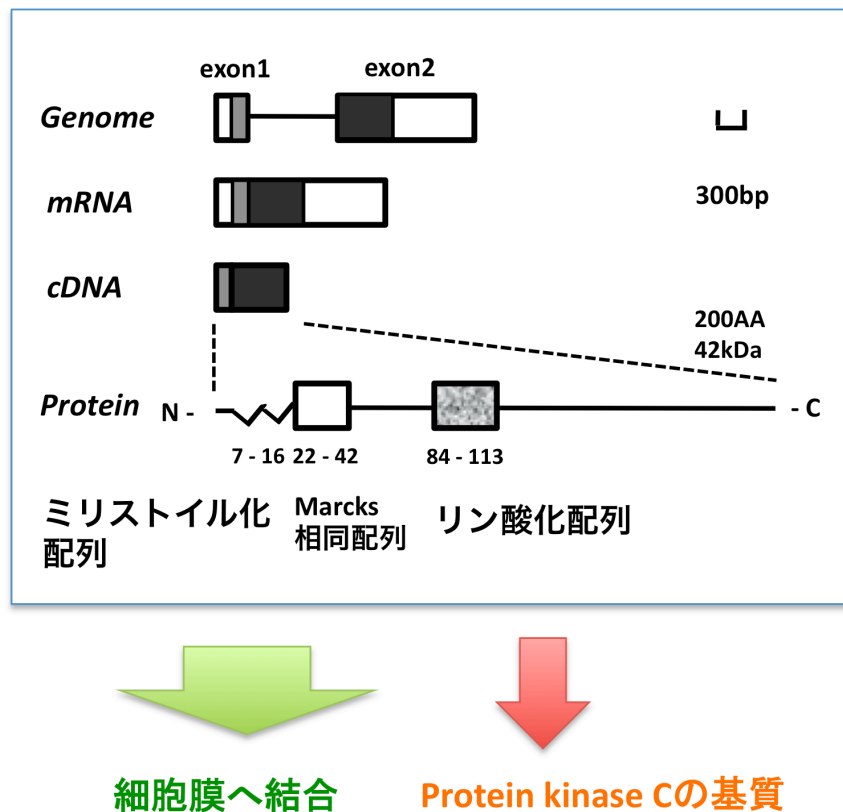


図 2. MLP 遺伝子の概念図

MLP 遺伝子は2つのエクソンから構成されている (コード領域; 灰, 黒). MLP のタンパク質はN末端に存在するミリストイル化配列 (カギ形, N末より7-16番目アミノ酸), Marcks 相同配列 (白箱, N末より22-42番目アミノ酸), リン酸化配列 (灰箱, N末より84-113番目アミノ酸) を有しており, アクチンフィラメントに結合することで細胞膜へ局在し, またプロテインキナーゼ C (PKC) の基質として機能する.

Marcks もまた, PKC の基質として知られ, 細胞骨格の制御に関与すると考えられている (文献 34). グリア細胞の1種であるオリゴデンドロサイト前駆細胞において RNA 干渉により *Marcks* 遺伝子をノックダウンすると樹状突起棘の伸長が阻害されたことから, *Marcks* がグリア細胞において細胞骨格系の制御に関与していることが示唆されている (文献 35). また, マクロファージにおいて,

Marcks は PKC 依存的にパーティクルに対する貪食能を制御していることが知られている (文献 36). 一方, MLP によるマクロファージの貪食能の制御については相反する報告がある. Zhu らは, J774 マクロファージ様細胞株に, リン酸化領域を欠損した MLP と野生型 MLP を強制発現させ, これらの細胞のパーティクルに対する貪食能を比較することで, MLP のリン酸化領域がマクロファージの貪食能に関与していることを報告した (文献 37). 一方で Underhill らは, MLP 欠損マウスの胎児肝臓由来細胞から分化させたマクロファージを用いて, MLP がパーティクルの取り込みに寄与しないことを示している (文献 38). M 細胞において MLP が外来抗原の取り込みに機能を有するかどうかはこれまでに報告がない. MLP 欠損マウスは胎生期において神経管が閉じず致死となるため (文献 39, 40), 成体において MLP の M 細胞における機能解析を行うためには, 腸管上皮細胞特異的に MLP が欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作製する必要がある.

本研究では MLP の腸管上皮細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製を行い, これらのマウスにおける M 細胞の形態学的・免疫学的解析を行った. また, 腸管上皮細胞株に *Mlp* 遺伝子を強制発現させ, 細胞応答能の変化について解析を行った.

方法

1. マウス

C57BL/6J 系統のマウスは日本クレアより購入した。B6-Tg(CAG-FLPe)³⁶ マウスは理化学研究所バイオリソースセンター (RIKEN BRC) から提供いただいた。B6N.Cg-Tg(Vil-cre)⁹⁹⁷Gum/J マウスは Jackson Laboratory から購入した。これらのマウスは実験に使用するまで、東京大学医科学研究所動物実験センターの SPF 施設にて適切に飼育した。すべての動物実験は東京大学医科学研究所動物実験倫理委員会の承認を受けている。

2. 腸管上皮細胞特異的 MLP 欠損マウスの作製

ターゲティングベクターは図 1A に示したように、マウス *Mlp* 遺伝子の第二エクソンの両端に *loxP* 配列を挿入し、*Frt-neo-Frt* 配列を *Mlp* と *Hdac1* の間にあ
るイントロン領域に挿入するよう設計した。*Mlp* の第一エクソンの上流 8205 塩基から 895 塩基までの領域 (Long arm 1) をクローニングするため、E14-1 ES 細胞を溶解し抽出した genome を鋳型に、TaKaRa LA Taq (Takara Bio) を用いて polymerase chain reaction (PCR) を行った。PCR は 98°C 30 秒の後、98°C 10 秒、

60°C 20 秒, 72°C 7 分の反応を 35 サイクル行い, 72°C で 7 分間処理するプログラムを組み, 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) を用いて行った.

Mlp の第一エクソンの上流 890 塩基から下流 580 塩基までの領域 (Long arm 2), *Mlp* の第二エクソン領域を含んだ *Mlp* の第一エクソンの下流 580 塩基から 2355 塩基までの領域 (Deletion), *Mlp* に隣接した遺伝子 *Hdac1* のコード領域を含む *Mlp* の第一エクソンの下流 2355 塩基から 3625 塩基までの領域 (Short arm) をそれぞれクローニングするため, E14-1 ES 細胞の genome を鋳型に Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) を用いて PCR を行った.

PCR は 98°C 30 秒の後, 98°C 10 秒, 60°C 20 秒, 72°C 90 秒の反応を 35 サイクル行い, 72°C で 7 分間処理するプログラムを組み, 2720 サーマルサイクラーを用いて行った. *Frt-neo-Frt* のフラグメントをクローニングするため, Phusion High-Fidelity DNA Polymerase を用いて PCR を行った. PCR は 98°C 30 秒の後, 98°C 10 秒, 60°C 20 秒, 72°C 90 秒の反応を 35 サイクル行い, 72°C で 7 分間処理するプログラムを組み, 2720 サーマルサイクラーを用いて行った. PCR 反応物はエチジウムブロマイドを含んだ 1% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, それぞれ目的のバンドを UV 照射下 (High Performance Transilluminators; UVP) で切り出した. Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて切り出

したゲルから DNA を抽出し, 30 μ l の TE 溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)) に溶出した. Long arm 1 フラグメントは, pT7-T-vector (Novagen) に DNA Ligation Kit Ver.2.1 (TaKaRa Bio) を用いて 16°C, 2 時間ライゲーション反応させることでサブクローニングした. 他の DNA フラグメントは Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing with pCR4 Blunt TOPO vector (Invitrogen) を用いて室温で 5 分反応させ, サブクローニングを行った. コロニーのカラーセレクションのため, LB 寒天培地は大腸菌播種前に, あらかじめ 20 mg/ml の 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside (X-gal) を 100 μ l 塗布した. 白色コロニーを 50 μ g/ml のアンピシリンを含んだ LB 液体培地中で 37°C 12 時間培養し, Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いてプラスミド精製を行った. 精製したプラスミドを用いて目的のフラグメントが正確にクローニングできているかどうか, フラグメントの塩基配列を確認した. 塩基配列の確認には, M13 Forward (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') および R-20 (5'-CAGCTATGACCATGATTACG-3') のプライマーを用いた.

制限酵素 Not I, Sal I で処理した Herpes simplex virus 由来の thymidine kinase (HSV-Tk) 配列を有する pBlueScript SK(+) (Tk pBSSK(+); Stratagene) ベクター,

Long arm 1 フラグメント, 制限酵素 Xho I, Sal I で処理した Long arm 2 および Ligation Kit Ver.2.1 を用いて 16°C 2 時間ライゲーション反応させた. 反応物の一部を用いてコンピテントセル (*E. coli* DH-5 α Competent Cells; TaKaRa Bio) の形質転換を行い, 50 μ g/ml のアンピシリンを含んだ LB 寒天培地上で 37°C 16 時間培養した. Tk pBSSK(+)-ベクターと Long arm 1 および 2 が正しく組み合わさったクローン (Tk pBSSK(+)-LA) を制限酵素 Sal I で直鎖化し, Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75, BAP; TaKaRa Bio) を用いて 37°C 30 分脱リン酸化反応を行った. 脱リン酸化処理することによりセルフライゲーションがおこりにくくなった Tk pBSSK(+)-LA と, 制限酵素 Xho I, Sal I 処理した Deletion フラグメントを Ligation Kit Ver.2.1 を用いて 16°C 2 時間ライゲーション反応させた後, 反応物の一部を用いてコンピテントセルの形質転換を行った. 制限酵素 Xho I, Bam HI, Xba I でそれぞれ処理し, Tk pBSSK(+)-LA と Deletion が正しく組合わさったクローン (Tk pBSSK(+)-LA-del) を選別した. 次に Tk pBSSK(+)-LA-del を制限酵素 Sal I で直鎖化し, Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) を用いて脱リン酸化反応を行い, 脱リン酸化処理した Tk pBSSK(+)-LA-del と, 制限酵素 Xho I, Sal I 処理した Frt-*neo*-Frt フラグメントを Ligation Kit Ver.2.1 を用いてライゲーション反応させた後, 反応物の一部を用いてコンピテントセルの形質転換を行った. 制限酵素

Bam HI で処理し, Tk pBSSK(+)-LA-del と Frt-*neo*-Frt が正しく組合わさったクローン (Tk pBSSK(+)-LA-del-*neo*) を選別した. 同様にして制限酵素 Sal I で Tk pBSSK(+)-LA-del-*neo* を直鎖化し, Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) を用いて脱リン酸化反応を行った後, 制限酵素 Xho I, Sal I 処理した Short arm フラグメントと Ligation Kit Ver.2.1 を用いてライゲーション反応させた後, 反応物の一部を用いてコンピテントセルの形質転換を行った. 制限酵素 Xba I で処理し, Tk pBSSK(+)-LA-del-*neo* と Short arm が正しく組み合わさったクローンを選別しターゲットベクターとして以下の実験に使用した. 最終的に完成したターゲットベクターは, 再度塩基配列の確認を行っている.

30 μ g のターゲットベクターを制限酵素 Sal I で処理し直鎖化した後, 10^7 個の E14-1 ES 細胞株にエレクトロポレーション法により導入し (500 μ F, 230V, 0.4cm Gene Pulser/Micropulser エレクトロポレーションキュベット, Gene Pulser Xcell エレクトロポレーションシステム; Bio-Rad Laboratories), 2×10^6 個ずつ細胞を 10 cm ペトリ皿に播種し, 7.0×10^{-4} % 2-メルカプトエタノール (nacalaitesque), 15% Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich), 10^3 U/ml の ESGRO Supplement (Millipore) を含んだ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) を用いて

培養した。エレクトロポレーション後 24 時間後に 400 $\mu\text{g/ml}$ G418 を培養液に添加し、エレクトロポレーション後 72 時間後からはさらに 2 μM ガンシクロビルを添加した。培養液は 1 日おきに交換を行った。Neomycin およびガンシクロビル耐性クローンを PCR 法とサザンブロット法により選択・選別した。PCR には TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa Bio), および Mutation genotype forward/reverse プライマーを用いて、96°C 30 秒の後、96°C 30 秒、67°C 30 秒、72°C 30 秒の反応を 35 サイクル行い、72°C で 7 分間処理する条件で行った。サザンブロットには、制限酵素 Nco I で処理した ES 細胞の DNA を 30 μg 用いて、エチジウムブロマイドを含んだ 1% アガロースゲル中で電気泳動を行い、Amercham Hybond-N+ メンブレン (GE Healthcare) へ転写した。E14-1 ES 細胞の genome を鋳型に TaKaRa Ex Taq Hot Start Version と Southern blot forward/reverse プライマーを用いて 96°C 30 秒の後、96°C 30 秒、67°C 30 秒、72°C 30 秒の反応を 30 サイクル行い、72°C で 7 分間処理する条件で PCR を行った。この PCR 反応物と Amercham Megaprime DNA Labeling System, dCTP (GE Healthcare), dCTP, [α - ^{32}P] (PerkinElmer) を用いて DNA プローブを合成し、ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare) を用いて RI 標識プローブを精製した。ハイブリダイゼーション緩衝溶液中で転写したメンブレンと作製した RI 標識プローブと

を 65°C 2 時間反応させた後、メンブレン上のシグナルをフィルムに感光させた。

正しく相同組み替えを起こした目的の ES クローンを C57BL/6J マウスから得た胚盤胞にマイクロインジェクションし、偽妊娠させた雌マウス胎内に着床させた (東京大学医科学研究所 吉田進昭先生との共同研究による)。生まれてきたキメラマウスを C57BL/6J マウスと交配させ、生殖系列移行した F1 マウスを得た。Neo 遺伝子を欠損させるため、この F1 マウスと B6-Tg(CAG-FLPe)36 マウスを交配させ、floxed-*Mlp* マウスを得た (文献 41)。さらに、この floxed-*Mlp* マウスと腸管上皮細胞でのみ Cre タンパクが発現している B6N.Cg-Tg(Vil-cre)997Gum/J マウスを交配させ (文献 42)、最終的に腸管上皮細胞特異的に MLP が欠損したコンディショナルノックアウトマウス (*Mlp*^{IECΔ/Δ}) を得た (文献 43, 44)。ターゲティングベクターの構築及び、個体選別のために使用したプライマーは以下の通りである (Hokkaido System Science)。

Long arm 1 forward,
5'-GCGGCCGCTCCAAACTCACAGATCCCAGTGACATCCC-3', Long arm 1
reverse, 5'-CTCGAGTCTGTGACCATACTGAGACTTC-3'; Long arm 2 forward,

5'-CTCAGTGTATGGTCACAGACTCGAGGGG-3', Long arm 2 reverse,
5'-GTCGACCCCTTGGTGCGGCCTAGCAGCGCCTTTGTTCCCGC-3'; Deletion
forward,
5'-CTCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGGCCGTG
GGGATGGTACTC-3', Deletion reverse,
5'-GTCGACCACTCAATGAAACATCACTAAAGGGACGAC-3'; Short arm forward,
5'-CTCGAGTGGGGTGTGGGTAAGAGGACTGCACCG-3', Short arm reverse,
5'-GTCGACCTTTCAGTGGCTCCTAGAGGTGGTGAG-3'; Neo forward,
5'-CTCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAG-3', Neo reverse,
5'-GTCGACCACATCCCCCTTTCGC-3'; Mutation genotype forward,
5'-ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG-3', Flox genotype forward,
5'-CTTGATAAGCAAGTGTTAGGCTTCAGGAGGG-3', Mutation/Flox genotype
reverse, 5'-CTCCAGGTCGGTGCAGTCCTCTTACCC-3'; Southern blot probe
forward, 5'-TGGAGATGCGTTTGTGTCAGGGTCCTCCTCATC-3', Southern blot probe
reverse, 5'-AGCTGCCCTACAACGACTACTTTGAATAC-3'.

3. パイエル板 M 細胞および腸管上皮細胞の単離

腸管上皮細胞の単離は先に記された方法を改変して行った (文献 21). パイエル板あるいはパイエル板を除いた十二指腸側の断片を, 頸椎脱臼により安楽死させたマウスより摘出し, PBS で洗浄した. 続いて腸組織を 0.5 mM EDTA を含んだ PBS 中で 37°C, 20 分間スターラーを用いて攪拌した. 回収した細胞は, 1/10 希釈した 7-amino actinomycin (7-AAD; BD Biosciences) で染色後, 5 µg/ml の fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した NKM 16-2-4 抗体 (文献 18), 5 µg/ml の rhodamine 標識した *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1; Vector Laboratories), 1 µg/ml allophycocyanin-cyanine 7 (APC-Cy7) 標識した抗マウス CD45 抗体 (BD Biosciences) で染色した. 染色した細胞は再度 PBS で洗浄し, FACS Aria III (BD Biosciences) を用いて解析し, CD45, 7-AAD 両陰性の細胞集団の中より UEA-1, NKM 16-2-4 両陽性の細胞集団を M 細胞として, 両陰性の細胞集団を腸管上皮細胞としてそれぞれ単離した.

4. 定量的 RT-PCR

RNA は High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics) を用いて精製した. 精製した全 RNA 中の mRNA を SuperScript III 逆転写酵素 (Invitrogen) と, オリゴ dT プライマー (Invitrogen) を用いて製造元のプロトコルに従い cDNA へ逆転写し

た. 逆転写物は定量的 RT-PCR 解析のための鋳型として用い, 特異的プライマーと, LightCycler 480 SYBER Green I Master (Roche Diagnostics) を用いて PCR 反応を行った. LightCycler 480 system II (Roche Diagnostics) を用いてリアルタイム PCR 反応を行った後, 標的分子の濃度を LightCycler 480 Software (Roche Diagnostics) により算出し, mRNA の発現量を *G3pdh* (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) の発現量でそれぞれ標準化した. 特異的プライマーのセットは, Universal ProbeLibrary のウェブサイトに従い以下の通りに設計した.

g3pdh forward, 5'-TGTCCGTCGTGGATCTGAC-3', *g3pdh* reverse,
 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'; *mlp* forward,
 5'-GGCAGCCAGAGCTCTAAGG-3', *mlp* reverse, 5'-TCACGTGGCCATTCTCCT-3';
villin1 forward, 5'-CTCGGCAAACCCACACT-3', *villin1* reverse,
 5'-TCATCCACCATTTTCTGCTG-3'; *marcks* forward,
 5'-GTCGCCTTCCAAAGCAAAT-3', *marcks* reverse,
 5'-CTTGCAGCTCCTCCTTGG-3'; *itga4* forward, 5'-GTTGGAGCTCCCATGCAG-3',
itga4 reverse, 5'-GACCCTTCCATTTC AACCA-3'; *itga5* forward,
 5'-CTACACCCCAACTCACAGG-3', *itga5* reverse,

5'-TTGTGTTTCCTGAGGCAGTAGAA-3';	itgb1	forward,
5'-CTGCTTCTAAAATTGAGATCAGGA-3',	itgb1	reverse,
5'-TCCATAAGGTAGTAGAGATCAATAGGG-3';	c5ar1	forward,
5'-TGCCTGCATCTCTTCTTGAG-3',	c5ar1	reverse,
5'-TGCTGTTATCTATGGGGTCCA-3'.		

5. 組織学的解析

組織学的解析は、マウスの十二指腸側より摘出した腸管組織を、4%パラホルムアルデヒドを含む PBS で固定した後、O.C.T. コンパウンド (Sakura Finetek) 中に包埋し、クリオスタット (Leica CM3050 S; Leica) を用いて7 μm の厚みの凍結切片にして行った (文献 21)。MLP の染色には、組織切片を 10 μg/ml 抗マウス MLP 抗体で4°C, 24 時間反応させた。次いで、切片は 3 μg/ml ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) で4°C, 24 時間反応させ、1.25 μg/ml の horseradish peroxidase (HRP) 標識したストレプトアビジン (Pierce) と 1 時間、室温で反応させた。シグナルは Tyramide Signal Amplification (Life Technologies) を用いて増幅し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した (TCD Sp2; Leica)。M 細胞の染色には、組織切片は 3 μg/ml 抗マウス Gp2 抗体 (Medical &

Biological Laboratories) 及び, 5 µg/ml NKM 16-2-4 抗体 (文献 18) で 4°C, 24 時間反応し, 3 µg/ml Alexa488 標識した抗ラット IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) と反応させた. 多重染色のために, 組織切片はさらに, 10 µg/ml の rhodamine 標識した UEA-1, 10 µg/ml の R-phycoerythrin (PE) 標識した抗マウス CD88 (C5aR) 抗体 (BioLegend), 3 µg/ml の Alexa633 標識したファロイジン (Invitrogen) あるいは 3 µg/ml Alexa633 標識した Wheat germ agglutinin (WGA; Invitrogen) で染色した. α 5 または β 1 インテグリンのホールマウント染色のためには, パイエル板を固定した後, 10 µg/ml 抗マウス CD49e 抗体 (BD Biosciences) および 10 µg/ml 抗マウス CD29 抗体 (BD Biosciences) とそれぞれ反応後, 3 µg/ml ビオチン化抗ラット IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を用いた. 1.25 µg/ml の HRP 標識したストレプトアビジンと 1 時間, 室温で反応させ, シグナルは Tyramide Signal Amplification を用いて増幅した.

6. 電子顕微鏡法

電子顕微鏡法は先に記載された方法に改良を加えて行った (文献 45). パイエル板を含んだ小腸組織は, マウスの十二指腸側より摘出後, 2.5%グルタルアルデヒドを含んだ 0.1 M リン酸溶液 (pH 7.5) にて 2 時間, 室温で固定し, 段階的に

エタノール濃度を上げた溶液に置換して脱水した。走査型電子顕微鏡法のために、脱水した組織は t ブチルアルコール溶液中で凍結乾燥した後、オスミウムで組織表面をコートし、走査型電子顕微鏡下で観察した (S-4200; Hitachi)。透過型顕微鏡法のために、腸管組織はエポン樹脂中に包埋し、70 nm の厚さの極薄切片をウルトラミクロトーム (Reichert Ultracut N; Leica) を用いて作製した。極薄切片は 2% アセチル化ウラン溶液で 5 分間、室温で反応させ、レイノルド溶液で 5 分間、室温で反応させた。切片は透過型顕微鏡下で観察した (H-7500; Hitachi)。

7. ナノパーティクルおよび微生物の経口投与

ナノパーティクルには直径 0.2 μm の蛍光標識されたポリスチレン粒子 (Fluoresbrite YG; Polysciences) を 2×10^{11} 個調整し、実験に用いた。経口投与 2 時間後、マウスの十二指腸側の腸管組織よりパイエル板を摘出し、O.C.T. コンパウンド中に包埋し液体窒素を用いて凍結した。凍結切片を 1 ブロックから 9 枚作製し、蛍光顕微鏡下で観察した (BZ-9000; Keyence)。パイエル板内のパーティクル数を計数し、合算した。微生物の取り込み実験には、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium 菌 (χ 3306 株; 北里大学 松井英則先生より提供いただいた) あるいは *Yersinia enterocolitica* 菌 (ATCC 27729 株) をそれぞれ 1.0×10^8

colony-forming unit (cfu), 1.5×10^9 cfu 経口投与した。24 時間後、マウスよりパイエル板を摘出し、PBS で洗浄後、100 $\mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシンで 30 分処理した。再び PBS で洗浄し、組織の重さを測定し破碎後、選択培地 (サルモネラ菌には 50 $\mu\text{g/ml}$ のナリジクス酸ナトリウム (Sigma) を含んだ LB 寒天培地, エルシニア菌にはエルシニア選択寒天基礎培地 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用) に段階希釈した懸濁液を播種した。1-2 日後に、形成したコロニー数を計数し、パイエル板の重さで標準化した。

8. マウス腸管上皮オルガノイド培養

先に記載された方法に基づき、腸管クリプト細胞をオルガノイド培養のために単離・調製した (文献 46)。まずパイエル板を除いた十二指腸側の断片を、頸椎脱臼により安楽死させたマウスより摘出し、PBS で洗浄した。続いて腸組織を 2 mM EDTA を含んだ PBS 中で 4°C 30 分間処理した後、ピペッティングにより細胞を遊離させ、70 μm ナイロンメッシュを通った細胞を回収した。得られた細胞懸濁液を Matrigel (BD Bioscience) 内に埋め込み、50 ng/ml EGF (Peprotech), 500 ng/ml R-spondin 1 (R&D Systems), and 100 ng/ml Noggin (Peprotech) を含む Advanced DMEM/F12 Media (Gibco) を用いて培養を行った。培養液は 1 日おき

に交換を行った。先に記載された方法に基づき M 様細胞を分化誘導するために (文献 47), 200 ng/ml リコンビナントマウス RANKL (BioLegend) をさらに添加し 2 日間培養した。

9. MLP 強制発現上皮細胞株の作製

マウス *Mlp* のコード領域配列を、前述の方法により C57BL/6J マウスからパイエル板 M 細胞を単離し、調製した cDNA を鋳型に PCR 法により合成した。PCR は 98°C 30 秒の後、98°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒の反応を 35 サイクル行い、72°C で 7 分間処理する条件下で、2720 サーマルサイクラーを用いて行った。また、リン酸化領域変異型 MLP 強制発現株作製のため p.S93A, p.S101G, p.S104A となるよう、KOD -Plus- Mutagenesis Kit (Toyobo) を用いて製造元のプロトコルに従い 3 カ所のセリン部位にアミノ酸変異を加えた。制限酵素 Not I, Sal I で処理したそれぞれの *Mlp* 遺伝子断片は制限酵素 Not I, Xho I で処理した pMXs-IresPuro ベクターと (東京大学医科学研究所 北村俊雄先生より提供いただいた), Ligation Kit Ver.2.1 を用いてライゲーション反応させた後、反応物の一部を用いてコンピテントセルの形質転換を行った。作製した pMXs-IresPuro ベクターを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてリポフェクションし、plat-E 細胞株内で

ウイルスをパッケージした (東京大学医科学研究所 北村俊雄先生より提供いただいた). リポフェクション2日後に Plat-E 細胞の培養上清を回収し, このウイルスを含んだ培養上清中でマウス腸管上皮 MODE-K 細胞を培養した. ウイルス感染 24 時間後から 3 $\mu\text{g/ml}$ ピューロマイシン, 10% Fetal Bovine Serum を含んだ DMEM (nacalai tesque) 中で MODE-K 細胞を培養し, ピューロマイシン耐性細胞を選別した (文献 48). PCR 法に用いたプライマーは以下の通りである.

mMlp	full	forward,
5'-GAATTCATGGGCAGCCAGAGCTCTAAGGCTCCCCGGGGCGAC-3',		mMlp
full		reverse,
5'-GTCGACCTACTCATTCTGCTCAGCACTGGCAGGTGTGGGGCCA-3';		mMlp
pkc	mutant	forward,
5'-GCTTTCAAGAAGCCTTTCAAATTGGGTGGCCTGGCCTTC-3',		mMlp pc
mutant reverse, 5'-GAATTTCTTCTTCTTCTTGGGGGTCTCC-3'.		

10. 細胞接着・伸展解析

5×10^5 個の MODE-K 細胞をラミニンおよびフィブロネクチンで表面コートさ

れたペトリ皿 (Wako) 上で Fetal Bovine Serum を含まない DMEM を用いて培養した。培養 20 分後に細胞を 4%パラホルムアルデヒドを含んだ PBS で固定し、細胞の形態を蛍光顕微鏡 (Keyence, BZ-9000) 下で観察を行った。必要に応じて 100 nM オカダ酸ナトリウム (Wako) を培養液に添加し、細胞内における分子の脱リン酸化を阻害した。細胞の縁が広がったものを伸展した細胞と定義・計数し、ペトリ皿に接着した総細胞数で標準化した。

11. Rap1 活性化の解析

ヒト *Mlp* のコード領域配列を、ヒト胎児腎由来 HEK 293 T 細胞から調整した cDNA を鋳型に PCR 法で合成した。PCR は 98°C 30 秒の後、98°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒の反応を 35 サイクル行い、72°C で 7 分間処理する条件下で、2720 サーマルサイクラーを用いて行った。制限酵素 Not I, Sal I で処理したそれぞれの *Mlp* 遺伝子断片は制限酵素 Not I, Xho I で処理した pIRES2 DsRed2 ベクターと Ligation Kit Ver.2.1 を用いてライゲーション反応させた後、反応物の一部を用いてコンピテントセルの形質転換を行った。HEK293T 細胞に pIRES2 DeRed2 の空ベクターおよびヒト *Mlp* 遺伝子挿入ベクターを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてリポフェクションした。2 日後細胞を回収し、ペトリ皿上で Fetal Bovine

Serum を含まない DMEM を用いて 20 分培養後, Rap1 activation assay kit (Abcam) に付属のプロトコルに従い, 細胞を溶解後, 抗 active-Rap1 マウスモノクローナル抗体を用いて免疫沈降し, NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Protein Gel (Invitrogen) 上で 200V 30 分泳動した. PDVF メンブレンへ転写後, 1:500 倍希釈した抗 Rap1 ウサギポリクローナル抗体および 1:20000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) でそれぞれ室温にて 2 時間処理した. Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて化学発光させたシグナルを ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare) にて検出し, ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) のソフトウェアを利用し, 蛍光強度を算出した. コントロールとして, 免疫沈降前のサンプルに対して 1:10000 倍希釈した抗アクチン抗体 (clone C4; Millipore) および 1:2000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) でそれぞれ室温にて 2 時間処理した. PCR 法に用いたプライマーは以下の通りである.

hMlp

forward,

5'-GCGGCCGCATGGGCAGCCAGAGCTCCAAGGCTCCCCGGGGCGAC-3', hMlp

reverse,

5'-GTCGACCTACTCATTCTGCTCAGCGCTGGCTGGTGTAGGGCCAC-3'.

12. 統計学的解析

データは平均値 (mean) ±標準誤差 (SEM) で表した。これらのデータは Student's *t*-test, Wilcoxon rank sum test, あるいは Dunnett's test を必要に応じて適用し有意差を検定した。統計学的有意差は p 値 < 0.05 を考慮した。

結果

1. 腸管上皮細胞特異的 MLP 欠損 ($Mlp^{IEC\Delta}$) マウスの作製

遺伝子改変マウスの作製にあたり本実験では、MLP が組織特異的に欠損するよう、Cre-loxP 相同組み替え法を取り入れた (文献 44). ターゲティングベクターは、マウス *Mlp* の第二エクソンを loxP 配列ではさみ、また、その 3'側に Frt 配列のついた neomycin 耐性遺伝子が挿入されるよう設計した. 非特異的挿入がおこったクローンを排除するために、ターゲティングベクターには Herpes simplex virus 由来の thymidine kinase (HSV-Tk) が組み込まれている (図 3A). 構築したターゲティングベクターは ES 細胞に遺伝子導入し、G418 およびガンシクロビル耐性株をサザンブロット法により選別し、正しく相同組み替えのおこった細胞株を得た. この ES 細胞株をマウスの胚盤胞にマイクロインジェクションし、偽妊娠させた雌マウス胎内に着床させることでキメラマウスを得た. さらに、生まれてきたキメラマウスを C57BL/6J マウスと交配させ、生殖系列移行した MLP の遺伝子改変マウスを得た.

腸管上皮細胞特異的に MLP を欠損させるため、上記にて作製した MLP の遺伝

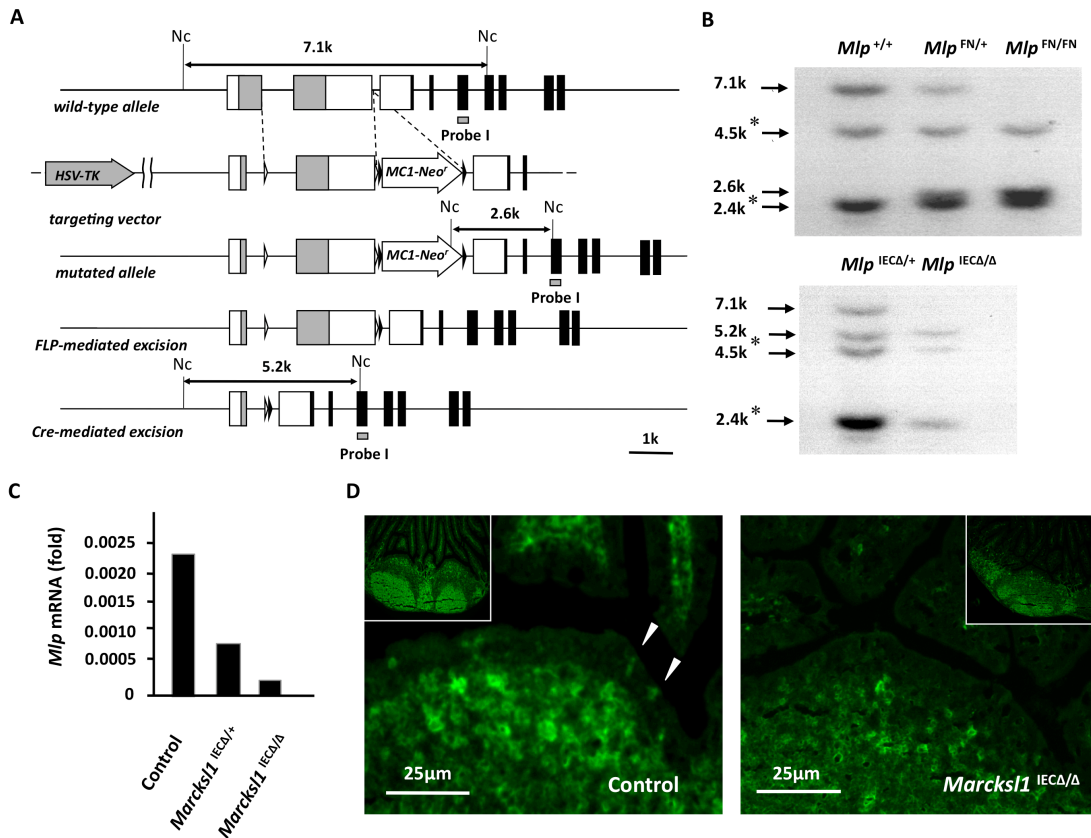


図 3. 腸管上皮細胞特異的 MLP 欠損マウスの作製

(A) Cre 誘導型 MLP 欠損マウス作製のためのターゲティングベクター構築図. *Mlp* (白箱, イントロン; 灰箱, エクソン) の第二エクソンを2つの *loxP* 配列により挟むことで, 隣接する遺伝子 *Hdac-1* (黒箱) に影響を与えず, Cre タンパクの発現依存的に MLP を欠損することができる. (B) 制限酵素 *Nco* I (Nc) で処理したマウスの DNA (上段; マウスの尻尾より調製, 下段; マウスの腸管上皮細胞より調製) と A で示したプローブを用いてサザンブロット解析を行った. 7.1kb のバンドは野生型あるいは FLP 作用により neomycin 耐性遺伝子を取り除かれたアレル, 2.6kb のバンドはターゲティングベクターが正しく組み込まれた変異型アレル, 5.2kb のバンドは Cre 作用により *Mlp* の第二エクソンが取り除かれたアレル, 4.5kb および 2.4kb のバンド(*) は非特異的反応によるものをそれぞれ示す. パイエル板上皮細胞における MLP の mRNA 量 (C), タンパク量 (D) をそれぞれ定量的 RT-PCR 法, 免疫組織化学染色法により解析した. MLP の mRNA 量は *G3pdh* の値で標準化した. 作製した *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスにおいて MLP の発現が減弱した. 矢印, パイエル板上皮細胞層での MLP の発現.

子改変マウスを Flp リコンビナーゼが全身で発現したマウス (B6-Tg(CAG-FLPe)36 マウス)と交配させ、さらに M 細胞を含む腸管上皮細胞でのみ Cre を発現するマウス (B6N.Cg-Tg(Vil-cre)997Gum/J マウス; Vil-Cre マウス)と交配させた (文献 41-44). 用いた Cre トランスジェニックマウスは *Villin1* のプロモーター下で Cre の発現が制御されているが, *Villin1* の mRNA の発現はリンパ球画分で低く, M 細胞を含む腸管上皮画分で高いことを定量的 RT-PCR 法により確認した (図 4A). MLP は腸管上皮細胞のうち M 細胞に特異的に発現するため (図 4B), これにより M 細胞でのみ MLP が欠損したマウスが生まれてくることになる (文献 21). 腸管上皮細胞特異的 MLP 欠損 ($Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$) マウスはメンデルの法則にしたがって生まれ, 通常の飼育下においては特に生育上の異常は認められなかった. まず, $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスの FAE において *Mlp* の発現が消失しているかどうかを確認した. コントロール群 (Control; $Mlp^{+/+}$, $Mlp^{Flox/+}$, $Mlp^{Flox/Flox}$, Vil-Cre), ヘテロ型 ($Mlp^{IEC\Delta/+}$), 欠損型である $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスそれぞれのパイエル板から FAE の細胞を調製し, 定量的 RT-PCR 法により MLP の mRNA 量を解析した (図 3C). $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスの FAE 画分における *Mlp* の発現量は Control マウスに比べて減少していた. 次に, MLP のタンパク質の発現をポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色法により確かめたところ (文献 21), $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$

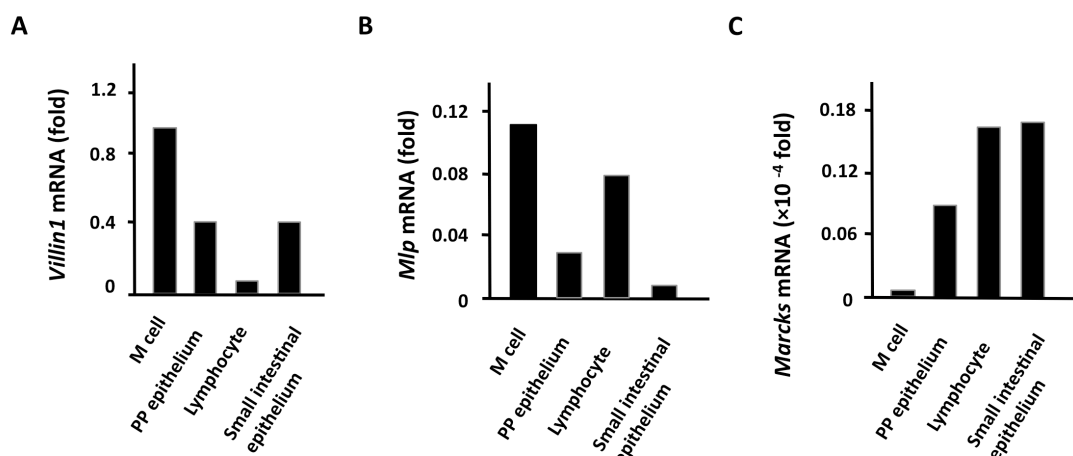


図 4. 腸管組織画分における遺伝子の発現

腸管組織より調製した cDNA を用いて *Villin1* (A), *Mlp* (B), *Marcks* (C) の発現を定量的 RT-PCR 法にて解析した. それぞれの遺伝子の mRNA 量は *G3pdh* の値で標準化した. M 細胞における *Villin1*, *Mlp* の発現強度は他の腸管上皮細胞画分と同程度以上であった. 一方, ファミリー分子である *Marcks* の発現強度は, 他の画分に比べ低い. PP; パイエル板.

マウスの FAE における MLP の発現強度は, Control マウスのものに比べて減少した (図 3D).

2. *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスにおける M 細胞の形態学的解析

MLP の腸管上皮細胞特異的な欠損が確認できたので, 次に, *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスにおいて M 細胞が存在しているかどうかを確かめた. Control および *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスからパイエル板を摘出し, 4%パラホルムアルデヒドで固定後に凍結切片を作製した. これらの切片を M 細胞特異的マーカーである抗マウス Gp2 抗体,

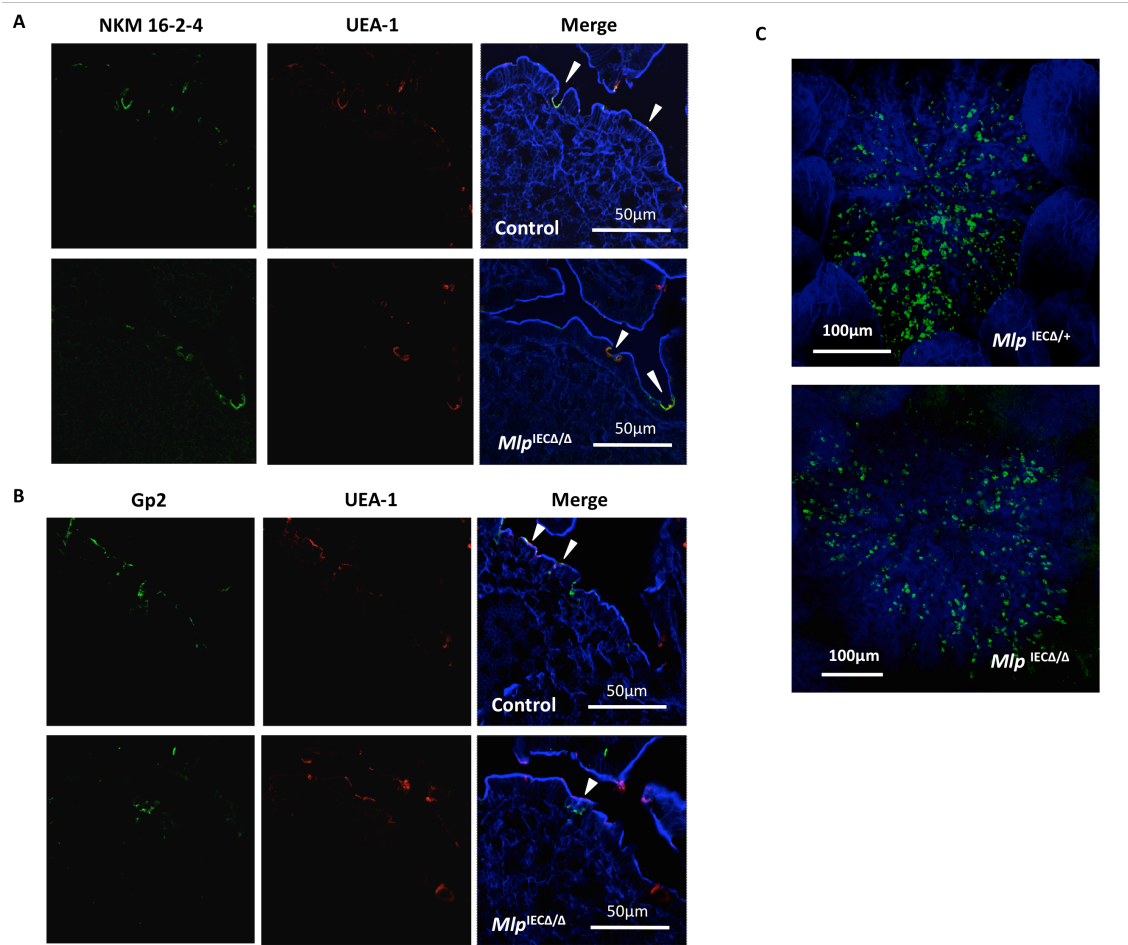


図 5. 免疫組織化学染色法により検出される M 細胞像

凍結切片上で確認されたパイエル板 M 細胞 (矢印; A, NKM 16-2-4, UEA-1 両陽性 M 細胞; B, Gp2, UEA-1 両陽性 M 細胞). (C) パイエル板のホールマウント染色により Gp2 陽性 M 細胞 ($Mlp^{IEC\Delta/+}$; 224 個, $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$; 212 個) が放射線状に分布する様子が認められた (緑, Gp2; 青, アクチン). 実験は 2 度独立試行している.

NKM 16-2-4 抗体, レクチン *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1) を用いて染色した (図 5A,B). NKM 16-2-4, UEA-1 両陽性 M 細胞および Gp2, UEA-1 両陽性 M 細胞は $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスにおいても Control マウスと同様に検出できた. また抗 Gp2 抗体を用いてパイエル板のホールマウント染色を行ったが, Gp2 陽性 M 細胞は

$Mlp^{IEC\Delta/+}$ マウスにおいても $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスにおいても検出できた (図 5C). MLP はアクチンフィラメントに結合し細胞骨格系の制御に関与することが示唆されていることから (文献 32, 33), 次に, MLP が M 細胞の形態学的特徴に影響を与えるかどうかについて電子顕微鏡法を用いて検討を行った (図 6A, B). 走査型電子顕微鏡法により, M 細胞特有の短く不揃いの微絨毛が $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスにおいても Control マウスと同様に存在することが明らかとなった (図 6A). さらに, 単位面積あたりに観察された短微絨毛細胞の数は Control マウスと $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスとの間で有意な差が認められなかった (図 6A). また, 透過型電子顕微鏡法から, $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスにおいても Control マウスと同様にリンパ球を内包するポケット構造を有する細胞が認められた (図 6B). これらの結果は, MLP が M 細胞の分化・成熟, および形態形成に必須ではないことを示唆している.

3. $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスにおける M 細胞の免疫学的解析

次に, M 細胞における MLP の欠損が抗原取り込み機能に影響を及ぼすかどうかについて解析を行った. M 細胞はマイクロパーティクルのような微粒子あるいは微生物のような大きな細胞を取り込むことが知られている (文献 12, 15). そこでまず, 蛍光標識した直径 200 nm のナノパーティクルをマウスに経口投与

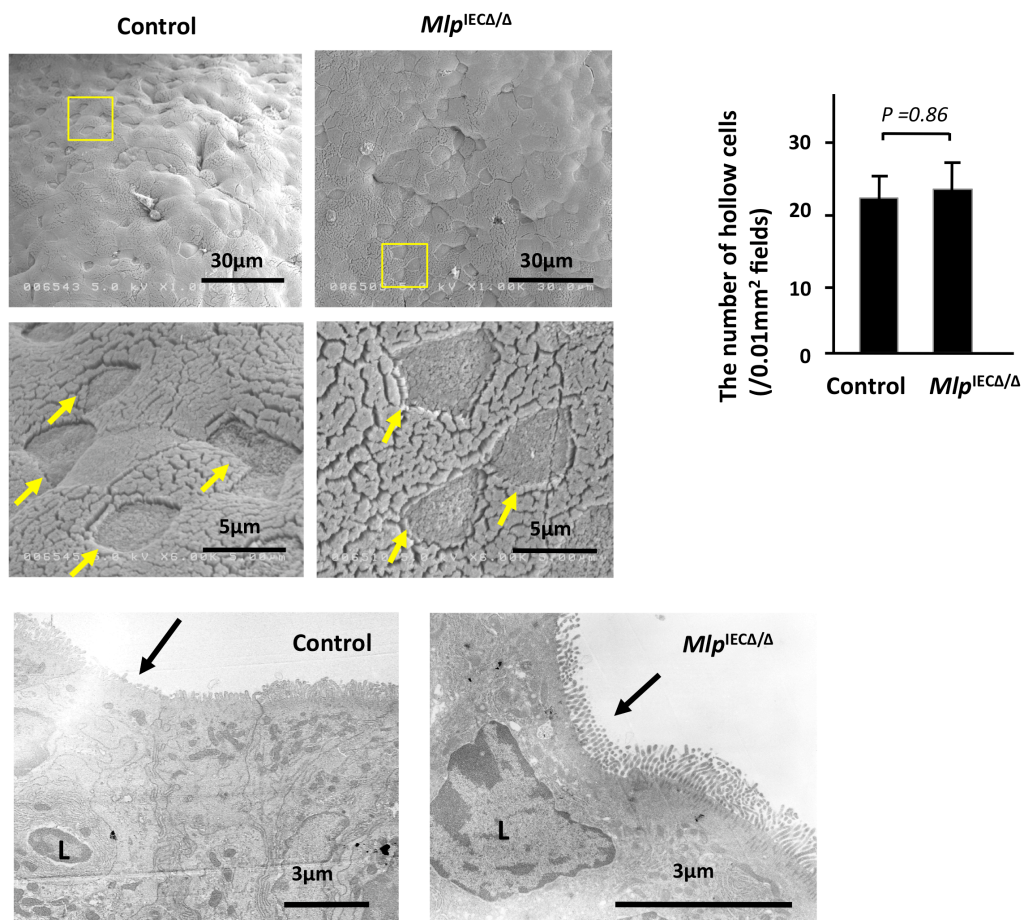


図 6. 電子顕微鏡法により検出される M 細胞像

(A) (左) 走査型電子顕微鏡法により検出された M 細胞の短微絨毛構造 (矢印). 下段図は上段図の□で囲った範囲を拡大している. (右) 単位面積あたりに観察された短微絨毛構造を持つ細胞の数は Control マウスと *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスとの間で同程度であった (n=4). それぞれの群で, パイエル板はマウス 2-3 匹より摘出し, 実験に用いた. (B) 透過型電子顕微鏡法により検出されたポケット構造を持つ細胞 (矢印). L; リンパ球.

した. 投与 2 時間後, パイエル板を摘出・固定し, 凍結切片を作製した. *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスと Control マウスとの間には微小粒子の取り込み量に有意な差がないことが蛍光顕微鏡下での観察により明らかになった (図 7A). この結果は, MLP の有無が M 細胞において, 特定の受容体などを介さない非特異的な物質取り込みに

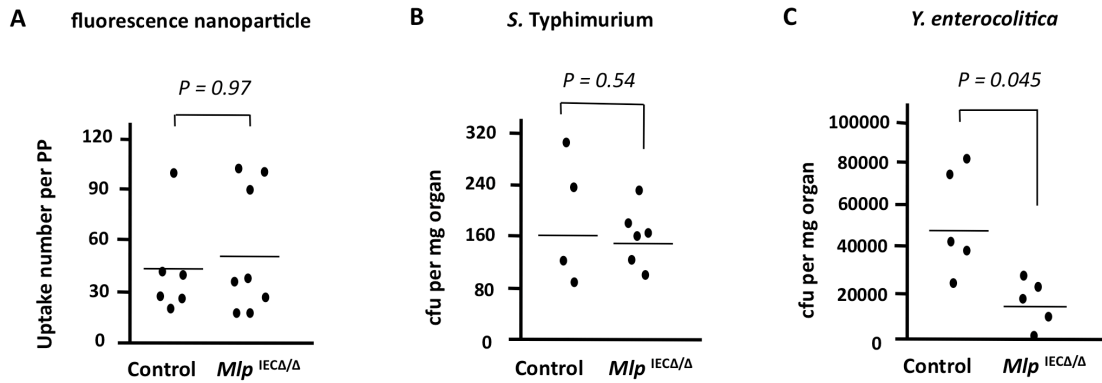


図 7. M 細胞における各種抗原とりこみ

(A) 直径 $0.2 \mu\text{m}$ のナノパーティクルをマウスに経口投与した. それぞれの群でマウス 2-3 匹から投与 2 時間後にパイエル板を十二指腸側の腸管組織より摘出した. 1 つのパイエル板から 9 枚の切片を作製し, パイエル板内に含まれるパーティクルの数を合算した. 1 つの点は 1 つのパイエル板の値を示す. (Control, $n=6$; *Mlp*^{IECΔ/Δ}, $n=8$). サルモネラ菌 (B) を 1.0×10^8 cfu, エルシニア菌 (C) を 1.5×10^9 cfu, それぞれマウスに経口投与し, 投与 24 時間後にパイエル板を摘出した. 摘出したパイエル板を破碎後, 懸濁液を選択培地に播種し, 培養 1-2 日後にコロニーの数を計数した. 計数したコロニー数をさらにパイエル板の重さで標準化した. (サルモネラ菌取り込み, Control, $n=4$; *Mlp*^{IECΔ/Δ}, $n=6$; エルシニア菌取り込み, Control, $n=5$; *Mlp*^{IECΔ/Δ}, $n=5$). 1 つの点は 1 匹のマウスから得られた値を示す. ナノパーティクル, サルモネラ菌の取り込みは Control マウスと同程度認められた一方で, エルシニア菌の取り込みは *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスにおいて大きく抑制された. 実験は 2 度独立試行している. PP; パイエル板, cfu; colony-forming unit.

影響を与えないことを示唆している. 次にサルモネラ菌とエルシニア菌をモデルとして, 微生物に対する取り込み実験を行った. サルモネラ菌の細胞表面に発現している鞭毛タンパク Fim H は, M 細胞表面に特異的に発現している Gp2 と結合し, この結合を介してサルモネラ菌は M 細胞内に効率的に取り込まれることが先行研究により明らかになっている (文献 23). 投与 24 時間後にサルモネ

ラ菌のパイエル板内への取り込み量を比較検討すると、*Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスと Control マウスとの間に有意な差は認められなかった (図 7B)。この結果は、サルモネラ菌の M 細胞を介した抗原取り込みに MLP の有無が影響を与えないことを示唆している。

次に、エルシニア菌をマウスに同様に経口投与した (図 7C)。投与 24 時間後にパイエル板を摘出し、組織を破砕した後、抽出した菌液を希釈し、選択培地上に播種した。*Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスでは、エルシニア菌のパイエル板内への侵入数は Control マウスに比べて有意に減少していたことから、MLP が M 細胞を介したエルシニア菌の取り込み機構の制御に寄与していることが示唆された。

4. *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスにおける β1 インテグリン分子の発現解析

エルシニア菌の外膜タンパクに対する結合標的分子のひとつとして、β1 インテグリンがこれまでに報告されている (文献 49)。そこでマウスより摘出したパイエル板を、4%パラホルムアルデヒドで固定後、作製した凍結切片を β1 インテグリン抗体と抗 Gp2 抗体を用いて染色したところ、*Mlp*^{IECΔ/Δ} マウス由来の Gp2 陽性細胞では管腔側における β1 インテグリンの発現が認められなかった (図 8)。また、*ex vivo* でも検討を行うために野生型および *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスの腸管上皮

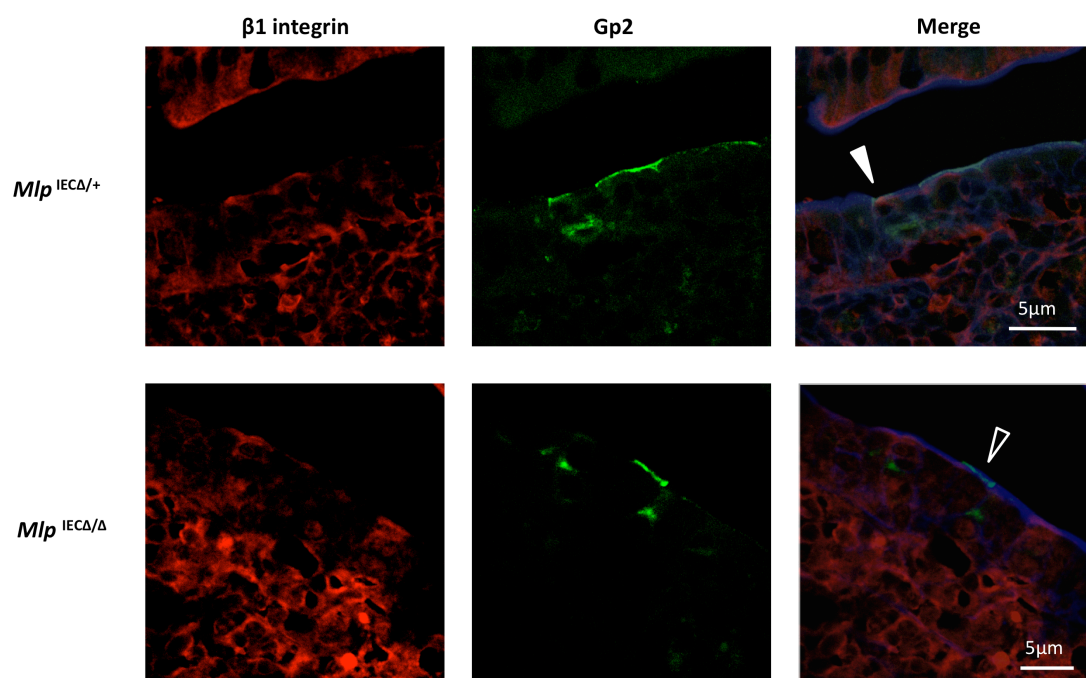


図 8. パイエル板切片における $\beta 1$ インテグリン分子の発現

パイエル板における $\beta 1$ インテグリン (赤), Gp2 (緑), アクチン (青) の発現を観察したところ, $Mlp^{IEC\Delta/+}$ マウスでは Gp2 陽性 M 細胞 (\blacktriangle) の管腔側においてインテグリン分子の発現が認められたが, $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスでは Gp2 陽性 M 細胞 (\triangle) において管腔側でのインテグリンの発現は認められなかった. 実験は 2 度独立試行している.

細胞からオルガノイドを培養し, RANKL 刺激を加えることで M 細胞への分化を誘導した (文献 46, 47). RANKL 刺激後の Control マウス由来オルガノイドを 4% パラホルムアルデヒドで固定後, 作製した凍結切片を $\beta 1$ インテグリン抗体と抗 Gp2 抗体を用いて同様に染色したところ, Gp2 陽性 M 様細胞は内腔側に $\beta 1$ インテグリンを発現していた. 一方で, RANKL 刺激後の $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウス由来オルガノイドでは, Gp2 陽性 M 様細胞の内腔側における $\beta 1$ インテグリンの発現は認め

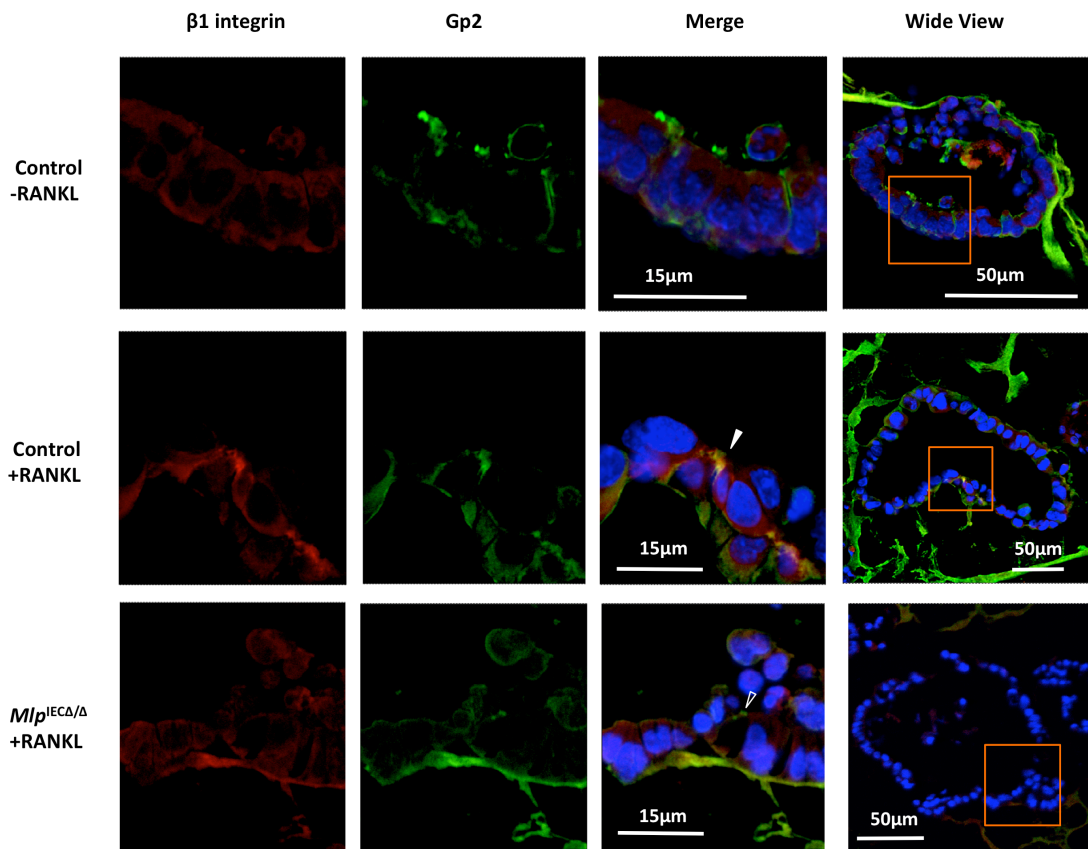


図 9. 腸管上皮オルガノイドにおける $\beta 1$ インテグリン分子の発現

腸管上皮オルガノイドにおける $\beta 1$ インテグリン (赤), Gp2 (緑), 核 (青) の発現を観察したところ, Control マウス由来オルガノイドでは RANKL 刺激後誘導される Gp2 陽性 M 様細胞 (\blacktriangle) の内腔側においてインテグリン分子の発現が認められたが, $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウス由来オルガノイドでは Gp2 陽性 M 様細胞 (\triangle) において内腔側でのインテグリンの発現は認められなかった. 右図の□で囲った範囲をそれぞれ拡大している. 実験は 2 度独立試行している.

られなかった(図 9).

5. MLP 強制発現株におけるインテグリン分子の活性化解析

次に, MLP が $\beta 1$ インテグリンの発現および活性化状態に与える影響について

in vitro で詳しく調べるために、レトロウイルスによる遺伝子導入法を実験に用いた (文献 48). マウス *Mlp* 遺伝子を pMXs-IresPuro ベクターに組み込み, plat-E 細胞株を用いてウイルス液を作製した (図 10A). MODE-K 細胞株を抽出したウイルス液下で培養し, ベクターが導入された MODE-K 細胞株を樹立した. 個々の過剰発現細胞株において, 定量的 RT-PCR 法により *Mlp* 断片が導入されていることを確認している (図 10B).

インテグリンは α サブユニットと β サブユニットのヘテロダイマーとして機能する分子であり, エルシニア菌の外膜タンパクに対しては $\beta 1$ インテグリンの相方として, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ インテグリンが結合することが知られている (文献 50). そこでこれらの α サブユニットのうち, MLP がその活性化を制御しているものがあるかどうかについて調べた. まず $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ インテグリンのリガンド応答性について, 作製した MODE-K 細胞株間で比較するために, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ インテグリンのリガンドとなるラミニンで表面コートされたペトリ皿上に細胞を撒き, 20 分後の細胞の接着, 形態変化について調べた. しかしながら, ラミニンコート上ではどの MODE-K 細胞も十分に定着することができなかった (data not shown). 次に $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ インテグリンのリガンド応答性について作製した MODE-K 細胞株間で比較するために, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ インテグリンのリガンドとなる

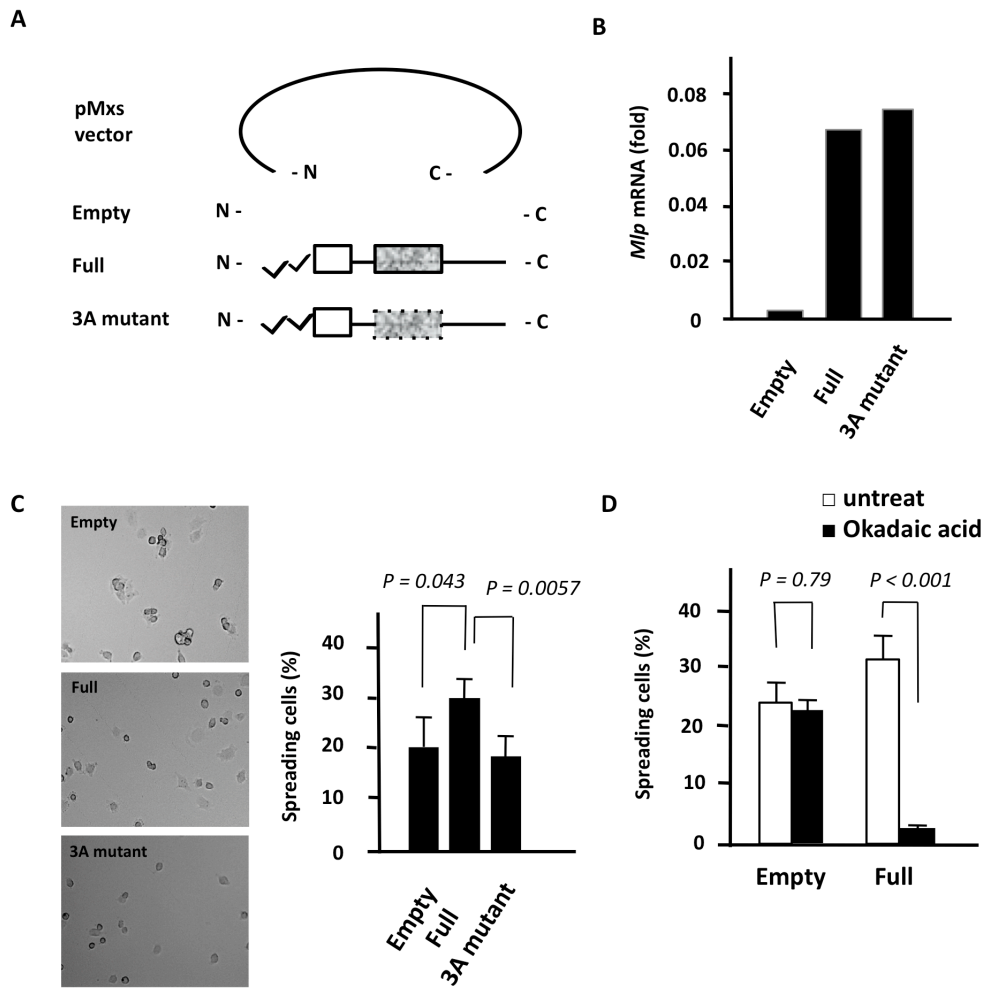


図 10. MODE-K 細胞におけるフィブロネクチンへのインテグリン応答能
MODE-K 細胞に各ベクター (A) を導入し, *Mlp* 遺伝子断片が挿入されたかについて定量的 RT-PCR 法を用いて確認した (B). *Mlp* の mRNA 量は *G3pdh* の値で標準化した. 白箱, Marcks 相同配列; 灰箱, リン酸化配列; カギ線, ミリスチル化配列. リン酸化配列変異型 MLP 強制発現株 (3A mutant) ではリン酸化配列内の 3 つのセリンにアミノ酸置換が生じている. (C) $\alpha 5\beta 1$ インテグリンのリガンドとなるフィブロネクチン上で細胞の接着・伸展を観察すると, *Mlp* 遺伝子のコード配列全長を導入した細胞株 (Full) において細胞伸展が亢進した. 縁の広がった細胞を伸展した細胞と定義した. 20 倍の対物レンズを用いた観察において, 異なる 5 点の視野内に観察された伸展した細胞, 全細胞ををれぞれ計数し伸展頻度を算出した. (D) ホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸で前処理し, フィブロネクチン上で細胞の接着・伸展を観察した (n=3). MLP の脱リン酸化を阻害すると, *Mlp* 遺伝子のコード配列全長を導入した細胞株において細胞伸展が抑制された. 実験は 2 度独立試行している.

フィブロネクチンで表面コートされたペトリ皿上に細胞を撒き、20 分後の細胞の接着、形態変化について調べた。MLP の全長を導入した細胞では、他の細胞株に比べフィブロネクチンに対するリガンド応答能が増強し、縁が広がった細胞が多く観察された (図 10C)。一方、リン酸化配列変異型 MLP 強制発現株 (3A mutant) ではリガンド応答能は増強されなかった。 $\alpha 4$ インテグリンの発現は造血系細胞で高く、腸管上皮細胞において低いことから (図 11)、MLP は M 細胞において $\alpha 4\beta 1$ インテグリンではなく $\alpha 5\beta 1$ インテグリンのリガンド応答性を正に制御していることが示唆された。

ファミリー分子である Marcks はリン酸化、脱リン酸化されることでそれぞれ細胞膜から細胞質および細胞質から細胞膜へと移動し、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリン分子の活性化およびアクチンの再構成に寄与することが知られている (文献 51; 図 12)。MLP のリン酸化状態に依存して、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンのリガンド応答能が制御されていることを確認するために、ホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸で前処理し、再度フィブロネクチン上での細胞形態を観察した (図 10D)。MLP の全長を導入した細胞において、ホスファターゼ阻害剤刺激により細胞の伸展は阻害された。これらの結果は、MLP のリン酸化・脱リン酸化のいずれも $\alpha 5\beta 1$ インテグリンのリガンド応答性の制御に重要であることを示している。

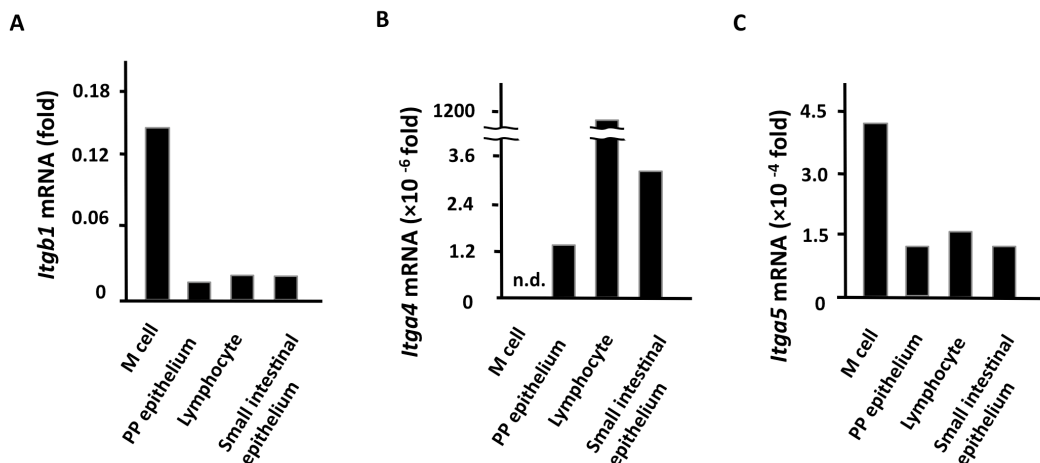


図 11. 腸管組織画分におけるインテグリン遺伝子の発現

腸管組織より調製した cDNA を用いて $\beta 1$ インテグリン (A), $\alpha 4$ インテグリン (B), $\alpha 5$ インテグリン (C) の発現量を定量的 RT-PCR 法にて解析した. それぞれの遺伝子の mRNA 量は *G3pdh* の値で標準化した. M 細胞における $\beta 1$, $\alpha 5$ インテグリンの発現強度は他の腸管上皮細胞画分と同程度以上であった. 一方, $\alpha 4$ インテグリンの発現強度は, リンパ球の画分に比べ腸管上皮細胞画分では一様に低い (M 細胞画分では検出できなかった (n.d.)).

インテグリンはリガンドとなる細胞外基質に応答できうる活性化状態と, 不応答となる不活性化状態といった 2 種類の形態をもつことが知られている (文献 52). インテグリンが活性化状態へと構造変化する際に, 低分子 G タンパクである Rap1 が重要な役割を担っていることが知られているため, 次にこの Rap1 に着目した. 他の Ras ファミリー分子と異なり, Rap1 とそのエフェクタータンパクである RAPL は, 活性化することによりインテグリンのコンフォメーションを不活性型から活性型へと変化させ, インテグリンのリガンドへの応答性を制

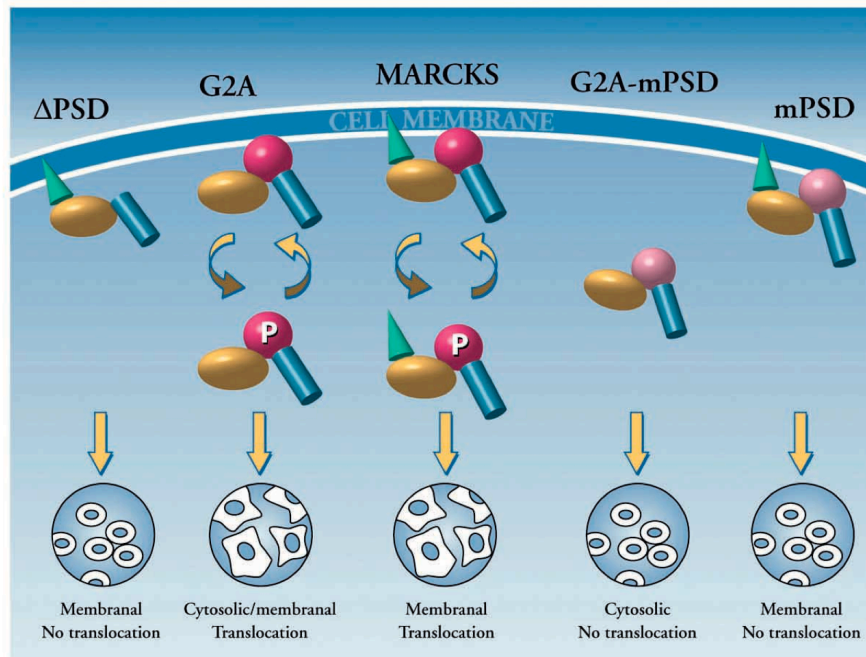


図 12. Marcks によるアクチン再構成の制御機構の概念図

野生型の Marcks とミリスチル化配列 (緑) を欠損した G2A 変異型 Marcks はリン酸化配列 (赤) のリン酸化状態依存的に細胞膜と細胞質を行き来し、アクチンの再構成を促進することができる。リン酸化配列の欠損型 (Δ PSD) あるいは変異型 (mPSD) ではリン酸化を受けることがないため、Marcks はミリスチン化配列により細胞膜に留まる。G2A-mPSD 変異型 Marcks はリン酸化配列の変異に加えミリスチン化配列がないため細胞質に留まり、また細胞膜に移動することもできないため、アクチンの再構成を促進することはできない。(文献 53 図 6A より転記)

御することが報告されている (文献 52)。そこで、ヒト *Mlp* 遺伝子のコード領域を pIRES2 DsRed2 ベクター内のヒトサイトメガロウイルス由来 (CMV) プロモーター下に挿入し、リポフェクション法を用いてヒト胎児腎細胞由来である HEK293T 細胞株に導入し、ウェスタンブロット解析により Rap1 の活性化が促進されるかどうか検討した (図 13)。HEK293T 細胞において、活性化状態の Rap1 は

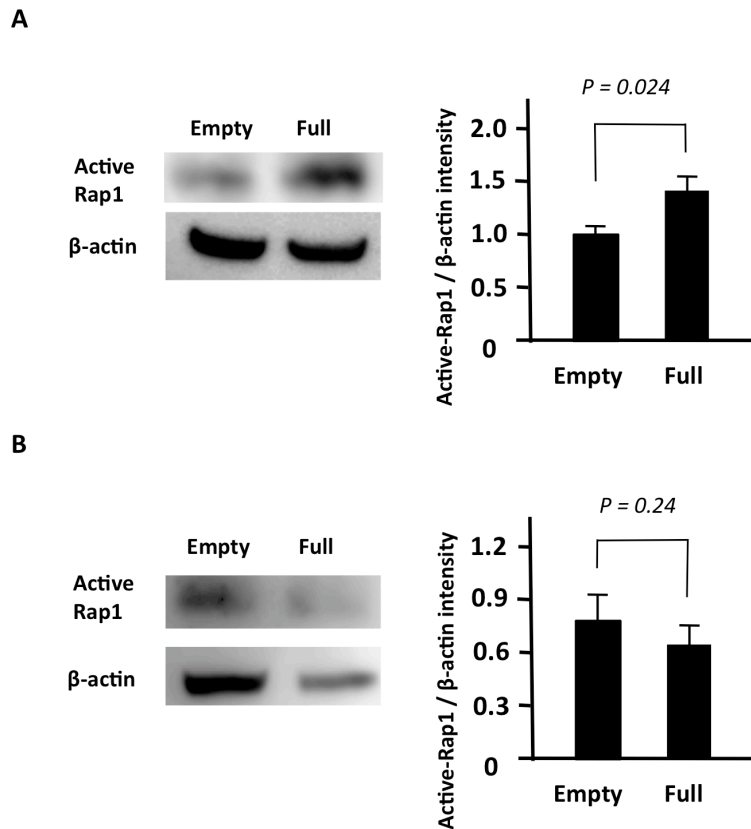


図 13. HEK293T 細胞における Rap1 の活性化状態の解析

HEK293T 細胞に pIRES2 DsRed2 の空ベクター (Empty) およびヒト *Mlp* 遺伝子をつないだベクター (Full) をそれぞれリポフェクタミン法により導入し、ウェスタンブロッティング法により Rap1 の活性化量を測定した。それぞれのシグナル強度を Image J ソフト上で算出し、 β アクチンの値により標準化した。(A) MLP は Rap1 の活性化を促進した。(B) ホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸により MLP の脱リン酸化を阻害すると、Rap1 の活性化促進は認められなかった。実験は 3 度独立試行し、得られた値を用いて平均値と標準誤差を算出した。

Mlp 遺伝子導入により増加し、また、オカダ酸処理による MLP の脱リン酸化阻害により Rap1 の活性化の亢進は認められなくなった。このことから、MLP がリン酸化・脱リン酸化されることで Rap1 を活性化し、M 細胞においては $\alpha 5\beta 1$ インテグリンが活性化されることが示唆された (図 14)。

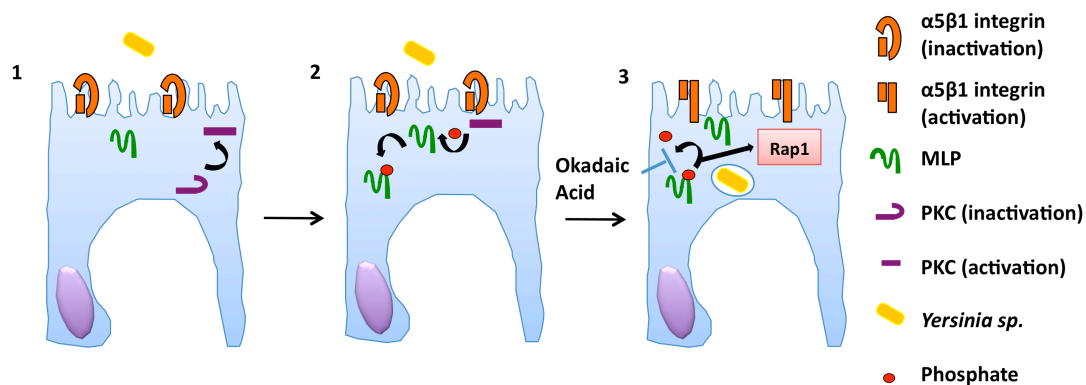


図 14. MLP による $\alpha 5\beta 1$ インテグリン分子の活性化機構の概念図

(1) PKC が活性化する. (2) PKC により MLP がリン酸化され, 細胞膜から細胞質へ移動する. (3) MLP が脱リン酸化されることで細胞膜へ戻り, この際に Rap1 が活性化する. 活性化した Rap1 により管腔側で $\alpha 5\beta 1$ インテグリンが活性化し, エルシニア菌の外膜タンパクを認識する. ホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸は MLP の脱リン酸化を阻害することで, MLP が細胞膜へ戻ることを妨げる.

6. *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスにおける $\alpha 5$ インテグリン分子の発現解析

$\alpha 5$ インテグリンが M 細胞の管腔側において発現しているかどうかを確認するために, マウスより摘出したパイエル板を 4%パラホルムアルデヒドで固定後, 作製した凍結切片を $\alpha 5$ インテグリン抗体と抗 Gp2 抗体を用いて染色した. 管腔側における $\alpha 5$ インテグリンの発現は管腔側における $\beta 1$ インテグリンと同様に, *Mlp*^{IECΔ/+} マウス由来の Gp2 陽性細胞で認められた. 一方で, *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウス由来の Gp2 陽性細胞では管腔側における $\alpha 5$ インテグリンの発現が減弱していた (図 15). さらに, Control および *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスの腸管上皮細胞からオルガノイドを

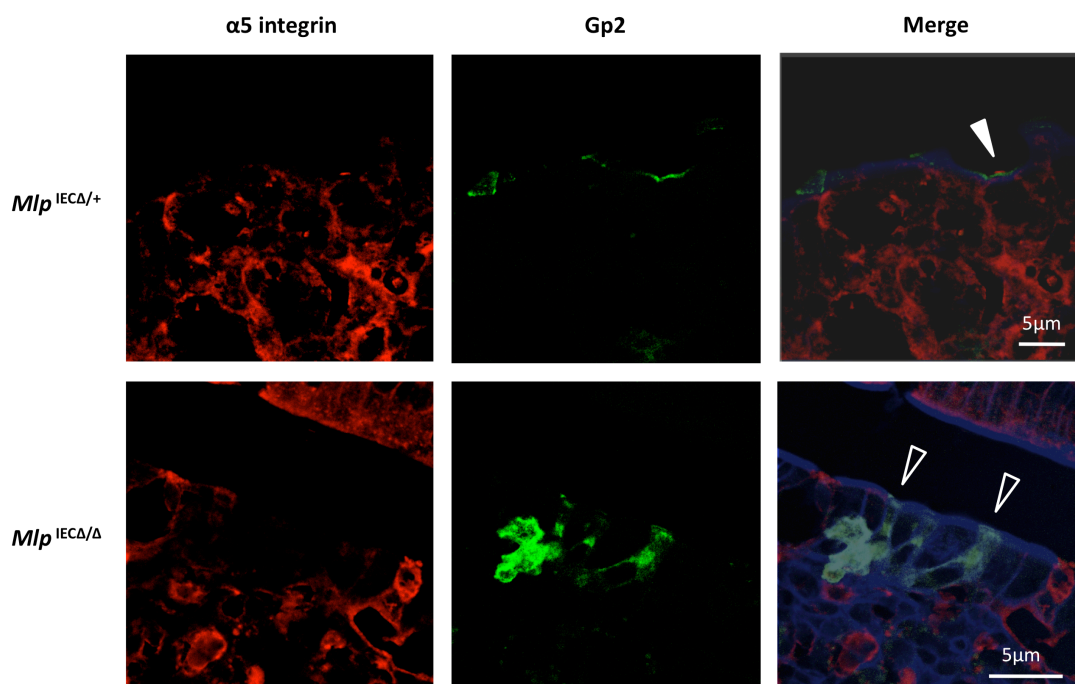


図 15. パイエル板切片における $\alpha 5$ インテグリン分子の発現

パイエル板における $\alpha 5$ インテグリン (赤), Gp2 (緑), アクチン (青) の発現を観察したところ, $Mlp^{IECA/+}$ マウスでは Gp2 陽性 M 細胞 (▲) の管腔側においてインテグリン分子の発現が認められたが, $Mlp^{IECA/\Delta}$ マウスでは Gp2 陽性 M 細胞 (△) において管腔側でのインテグリンの発現は認められなかった. 実験は 2 度独立試行している.

培養し, RANKL 刺激を加えることで M 細胞への分化を誘導した (文献 46, 47),

RANKL 刺激後の Control マウス由来オルガノイドを 4%パラホルムアルデヒド

で固定後, 作製した凍結切片を $\alpha 5$ インテグリン抗体と抗 Gp2 抗体を用いて同様

に染色したところ, Gp2 陽性 M 様細胞は内腔側に $\alpha 5$ インテグリンを発現してい

た. 一方で, RANKL 刺激後の $Mlp^{IECA/\Delta}$ マウス由来オルガノイドでは, Gp2 陽性

M 様細胞の内腔側における $\alpha 5$ インテグリンの発現は Control マウス由来オルガ

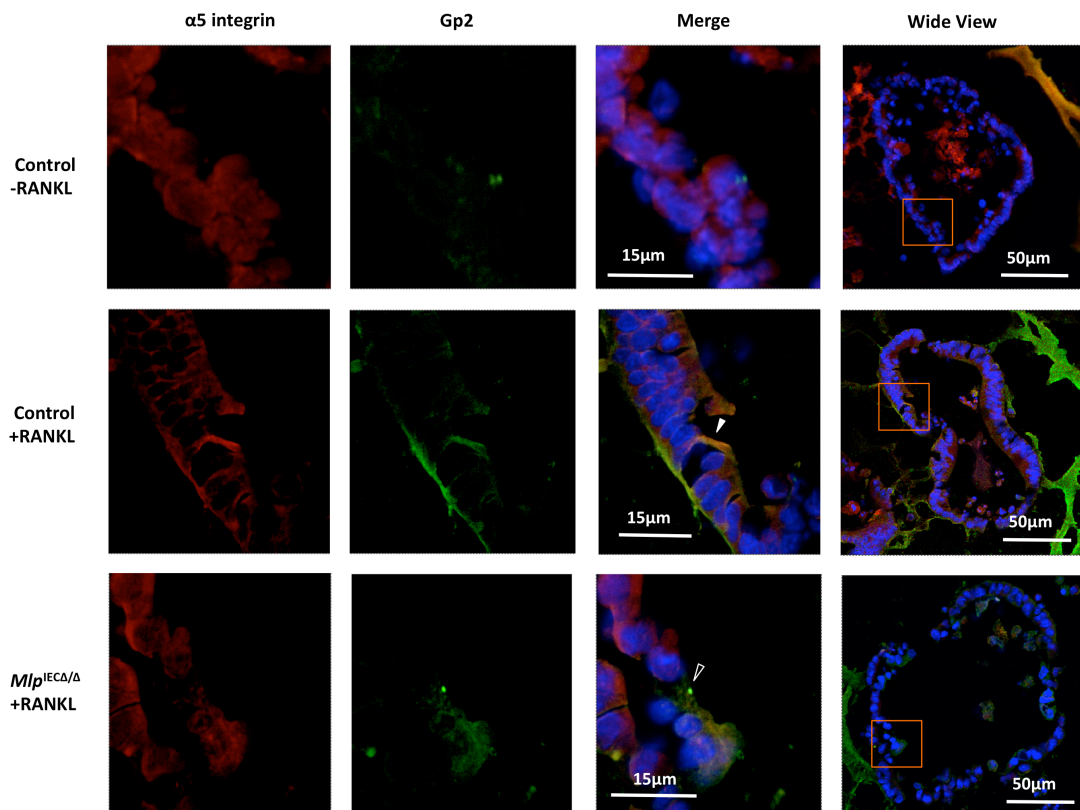


図 16. 腸管上皮オルガノイドにおける $\alpha 5$ インテグリン分子の発現

腸管上皮オルガノイドにおける $\alpha 5$ インテグリン (赤), Gp2 (緑), 核 (青) の発現を観察したところ, 野生型マウス由来オルガノイドでは RANKL 刺激後誘導される Gp2 陽性 M 様細胞 (▲) の内腔側においてインテグリン分子の発現が認められたが, $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウス由来オルガノイドでは Gp2 陽性 M 様細胞 (△) において内腔側でのインテグリンの発現は認められなかった. 右図の□で囲った範囲をそれぞれ拡大している. 実験は 2 度独立試行している.

ノイドの Gp2 陽性細胞内腔側における発現に比べ減弱していた (図 16).

7. パイエル板上皮細胞における C5aR の発現解析

エルシニア菌の外膜タンパクに対する他の結合標的分子として, C5aR が知られている (文献 53). そこで C5aR が M 細胞の管腔側において発現しているかど

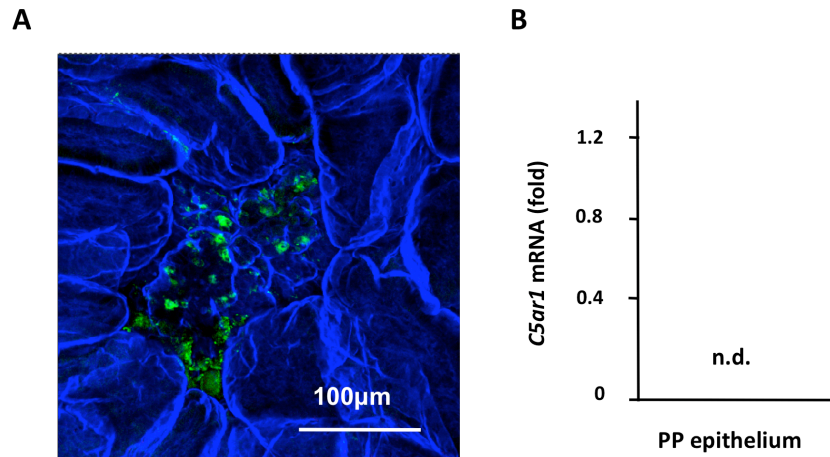


図 17. パイエル板上皮細胞における C5aR 分子の発現

(A) 免疫化学組織染色法により野生型マウスのパイエル板における C5aR (赤), Gp2 (緑), アクチン (青) の発現を観察したところ, パイエル板上皮細胞において C5aR の発現は認められなかった. (B) 野生型マウスの腸管組織より cDNA を調製し, 定量的 RT-PCR 法により解析を行ったが, パイエル板上皮細胞画分における *C5ar1* の発現は認められなかった. *C5ar1* の mRNA 量は *G3pdh* の値で標準化した.

うかを確認するために, パイエル板を野生型マウスの空腸より摘出し抗マウス CD88 (C5aR) 抗体と抗 Gp2 抗体を用いてホルマウント染色を行ったが, FAE 上に C5aR の発現を確認することはできなかった (図 17A). また, パイエル板から FAE の細胞を調整し, 定量的 RT-PCR 法により *C5ar1* の mRNA 量を解析したが, FAE 画分における *C5ar1* の発現量は検出できなかった (図 17B).

考察

M 細胞を起点とする腸管粘膜免疫機構の惹起が局所免疫だけでなく、全身性免疫にも影響を及ぼすことから、M 細胞は効果的な経口ワクチン・ドラッグデリバリーの標的として、これまで重用視されてきた (文献 19, 20, 54). M 細胞に局在する特異的分子についてはこれまでにいくつか報告されているが、それら M 細胞特異的分子の細胞性機能については依然として明らかになっていないものが多い. 先行研究では、MLP がマウスパイエル板 M 細胞に高発現していることが明らかになっているが (文献 21), M 細胞における MLP の機能に関しても未だ解明されてはいない. 本研究を通して、MLP がインテグリン分子を活性化することで、M 細胞における病原性細菌の侵入過程において重要な働きを担っていることを初めて明らかにした.

本研究ではまず、M 細胞における MLP の細胞性機能を解析するために、腸管上皮細胞特異的 MLP 欠損 ($Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$) マウスを作製した. パイエル板上皮細胞を $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスより調製し遺伝子発現量を解析したところ、 Mlp 遺伝子の mRNA 量は Control マウスに比べ 8 分の 1 程度に減少した. ヘテロマウスにおける Mlp 遺伝子の mRNA 発現量は Control マウスと $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスの中間値を示

したことから、*Mlp* の転写量はアレルの数に比例すると考えられる。免疫組織化学染色法による観察では、FAE における MLP のタンパク発現量も *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスにおいて減少しており、このことから *Villin1* 遺伝子のプロモーター下で発現制御された Cre タンパクにより *Mlp* 遺伝子領域の相同組み替えが正しくおきていると考えられる。また、サザンブロット解析により、*Mlp*^{IECΔ/+} マウスで検出された 7.1kbp のバンドが *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスでは検出されなかった (図 3B)。このことから、Cre による相同組み替えの効率はほぼ 100%であることが示唆された。免疫組織化学染色法および電子顕微鏡法による観察から、作製した *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスにおいても Gp2 陽性細胞は存在し、また特徴的な短く不揃いな微絨毛構造やポケット構造といった M 細胞の形態にも変化を認めなかったことから、MLP は M 細胞の分化・成熟、および形態形成に関与していないものと思われる。MLP が M 細胞における抗原取り込み能の制御に寄与しているかどうかについて検討したところ、パーティクルやサルモネラ菌を用いた取り込み実験において有意な差は認められなかった一方で、*Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスではエルシニア菌の取り込みが Control マウスに比べて有意に減少した。Gp2 欠損マウスにおいてエルシニア菌の取り込み能は野生型マウスと同程度であることから (文献 23)、これらの結果は既知の Fim H/Gp2 を介した抗原取り込みとは異なる方法により、MLP が M

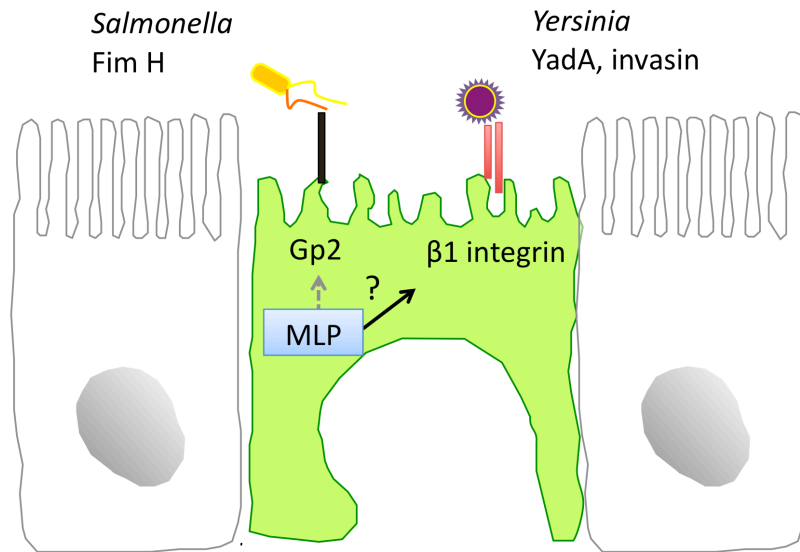


図 18. MLP が寄与する M 細胞における抗原取り込みの概念図

M 細胞表面に発現する Gp2 (黒) はサルモネラ菌 (黄) の鞭毛タンパク Fim H (橙) を認識する. 一方, $\beta 1$ インテグリン (赤) はエルシニア菌 (紫) の外膜タンパクである YadA や *invasin* を認識する. MLP の有無は Fim H/Gp2 経路ではなく (灰矢印), $\beta 1$ インテグリンを介したエルシニア菌の取り込み (黒矢印) に影響を与えることが示唆された.

細胞を介したエルシニア菌の取り込みを制御していることを示す (図 18). ファミリー分子である Marcks は MLP とリン酸化配列を含む塩基配列が酷似しており, また神経細胞やマクロファージといった細胞でどちらも発現していることから, それらの細胞において Marcks と MLP はお互いの機能を補い合っている可能性が考えられる. しかしながら Marcks の遺伝子発現は M 細胞画分において検出できなかったことから (図 4C), M 細胞におけるエルシニア菌の取り込みには Marcks は関与していないことが示唆される. 本研究から, 本研究では, エルシニア菌に対する抗原特異的免疫応答について解析することはできなかった. 臨床

応用へと本研究結果を発展させるためにも、エルシニア菌の長期感染時における抗原特異的免疫応答を ELISA 法などにより *Mlp*^{IECΔ/Δ} マウスと Control マウスとの間で比較検討することが今後必要である。

先行研究から、*in vitro* において、エルシニア菌は外膜タンパクである *YadA*、あるいは *invasin* が宿主の $\beta 1$ インテグリンを認識、結合できることが報告されている (文献 50)。そこで MLP と、 $\beta 1$ インテグリンの間に相関関係があるかどうかを MODE-K 細胞株を用いて *in vitro* での検討を行った。これまでに、MLP はインテグリンファミリーの中でも $\beta 2$ および $\beta 3$ インテグリンの発現・機能に影響を与えることが報告されているが (文献 55-58)、 $\beta 1$ インテグリンとの関連性については報告がない。特筆すべきは、MODE-K 細胞において MLP が $\alpha 5\beta 1$ インテグリンのリガンドであるフィブロネクチンに対する応答性を増強させたことである。また興味深いことに、リン酸化配列変異型 MLP 強制発現細胞株 (3A mutant) では、*Mlp* 遺伝子のコード領域全長を導入した細胞に比べてフィブロネクチンへのリガンド応答能が抑制されており、このことは *Rac1* や *Cdc42* といった低分子量 G タンパクファミリー分子が細胞膜へと移動しアクチンの再構成に働く際に、MLP が自身のリン酸化配列をもって細胞の応答性を制御している可能性を示唆するものである。ファミリー分子である *Marcks* がリン酸化状態依存的に細胞膜

と細胞質を行き来することによりインテグリンシグナル経路 (特に $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン) を制御することと合わせて考えると (文献 51), MLP も Marcks と同様に PKC によるリン酸化状態に応じて細胞膜と細胞質とを行き来し, これにより MLP がインテグリンのリガンド応答性を制御することが示唆される. 本研究では MLP が自身のリン酸化状態により細胞膜と細胞質を行き来していることを直接示すことはできなかった. PKC 刺激後の時間経過に応じた MLP の局在変化について, ウェスタンブロット法などにより今後確認する必要がある. ホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸を用いて MODE-K 細胞株を前処理し, MLP の脱リン酸化を阻害すると, インテグリンシグナル応答の減弱が観察されたことから, インテグリンのリガンド応答性の制御には, MLP がリン酸化されるだけでなく, 脱リン酸化をされることも重要であることが示唆された. オカダ酸で前処理した MLP の強制発現細胞株の細胞伸展率が空ベクターを導入した細胞株の細胞伸展率を大きく下回ったことから, MLP がリン酸化され細胞質に留まり続けることで細胞に毒性をもたらし, MLP の強制発現細胞株がアポトーシスをおこした可能性が考えられる. 今後, この可能性について検討を行う必要がある.

インテグリンの活性化状態を MLP がどのように制御しているか調べるために, インテグリンのコンフォメーション変化の制御に寄与するとして知られる低分

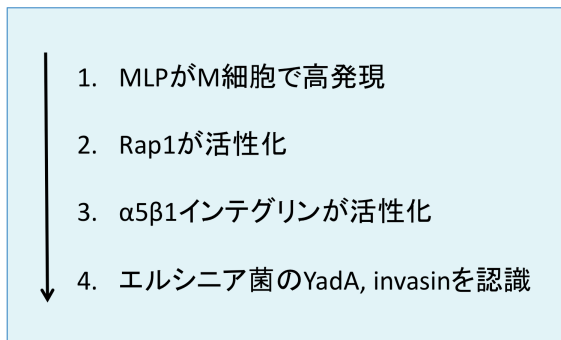
分子量Gタンパク Rap1 の活性化状態に着目し解析を行ったところ (文献 52), MLP の遺伝子導入株において Rap1 の活性化が亢進されたことから, MLP は Rap1 の活性化を介して細胞膜上のインテグリンを不活性型から活性型へと構造変化させていることが示唆された. この Rap1 が活性化状態となりインテグリンのコンフォメーション変化に働くためには, 他の Ras ファミリー分子と同様にグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) により GTP と結合することが必要と考えられる. 細胞膜上へ MLP が GEF を運搬しているかどうかについては本研究で明らかにすることはできなかった. 今後, 蛍光標識した GEF を MLP 発現ベクターと共に細胞へ導入し, 細胞内における GEF の動きをモニターすることで, MLP との関わりを明らかにする必要がある. 膜輸送機構に関しては, ファミリー分子である Marcks がリン酸化部位を介して熱ショックタンパク質 70 (HSP70), システインストリングタンパク (CSP) と複合体を形成し, 気道においてムチンの産生に関与していることが報告されている (文献 59, 60). MLP のリン酸化部位の配列は, Marcks のリン酸化部位の配列と相同性が高く, このことから Marcks と同様に HSP70, CSP と複合体を形成することで MLP が細胞膜へ GEF などの運搬に関与している可能性が考えられる. 上記の得られた結果を統合することにより, M 細胞において MLP が Rap1 の活性化を介して $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの腸管管腔側

における活性化状態を正に制御していることが示唆される。

免疫組織化学染色法により $Mlp^{IEC\Delta/+}$ マウスの FAE における $\alpha 5$ インテグリン, $\beta 1$ インテグリンそれぞれの発現を調べると Gp2 陽性 M 細胞の管腔側で発現が認められたが, $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウスにおいては Gp2 陽性 M 細胞の管腔側で発現が認められなかった。また, RANKL 刺激後の $Mlp^{IEC\Delta/\Delta}$ マウス由来オルガノイドにおいても, Gp2 陽性 M 様細胞の内腔側における $\alpha 5$ インテグリン, $\beta 1$ インテグリンそれぞれの発現は Control マウス由来オルガノイドの Gp2 陽性細胞内腔側における発現に比べ減少していた。

エルシニア菌の他の外膜タンパクと結合する分子は, 他に C5aR が報告されている (文献 53)。M 細胞における C5aR の発現を定量的 RT-PCR 法および免疫組織化学染色法により検討したが, 野生型マウスのパイエル板上皮細胞において発現を確認することはできなかった。C5aR はマクロファージにおいて $\alpha 5\beta 1$ インテグリンと同様に黄色ブドウ球菌を認識する受容体としての機能が報告されている(文献 61,62)。マクロファージや M 細胞で MLP が $\alpha 5\beta 1$ インテグリンに加え C5aR の機能を制御しているかについては, 本研究にて使用したものとは別の C5aR を認識するような抗体およびプライマー, マクロファージ特異的 MLP 欠損マウスを用いてさらに詳細な解析を行う必要がある。

■ MLPが寄与する抗原とりこみの機序



■ 未解決な問題

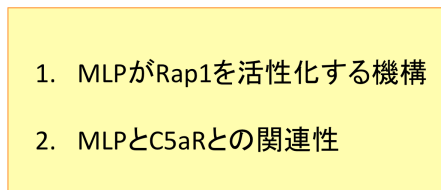


図 19. 研究成果のまとめと課題

(左) 本研究結果から、M細胞において高発現したMLPがリン酸化・脱リン酸化されることにより、Rap1が活性化し、次いでα5β1インテグリンが活性化することでエルシニア菌の取り込みが亢進されることが示唆された。(右) 本研究において、MLPがどのようにRap1を活性化するのか、またMLPがC5aRを介したエルシニア菌の取り込み機構に寄与しているかどうかについては明らかにすることはできなかった。

以上、これら *in vivo*, *in vitro* 両面からの実験結果は、MLPがリン酸化・脱リン酸化されることにより Rap1 を活性化し、次いで活性化した Rap1 によりリガンド応答能を正に制御された α5β1 インテグリン分子がエルシニア菌の侵入起点であること、またエルシニア菌はそのような特徴的戦略により M 細胞を介して宿主に感染することを示す (図 19)。M 細胞の抗原取り込み機構については依然として解決すべき点が山積しているが、本研究結果は MLP を含めたインテグリン関連分子が粘膜ワクチンの標的として重要なカギとなりうることを示唆する。

引用文献

1. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 10(3):159-69. 2010.
2. Goto Y, Kiyono H. Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol Rev* 245(1):147-63. 2012.
3. Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol* 8(1):36-45. 2011.
4. Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 51:311-40. 1997.
5. Suzuki K, Fagarasan S. How host-bacterial interactions lead to IgA synthesis in the gut. *Trends Immunol* 29(11):523-31. 2008.
6. Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends Immunol* 33(4):160-7. 2012.

7. Renz H, Brandtzaeg P, Hornef M. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 12(1):9-23. 2011.
8. Scurlock AM, Vickery BP, Hourihane JO, Burks AW. Pediatric food allergy and mucosal tolerance. *Mucosal Immunol* 3(4):345-54. 2010.
9. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474(7351):307-17. 2011.
10. Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* 31(3):368-76. 2009.
11. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 8(6):411-20. 2008.
12. Bockman DE, Cooper MD. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am J Anat* 136(4):455-77. 1973.
13. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP. Epithelial M cells: gateways for mucosal

- infection and immunization. *Cell* 86(3):345-8. 1996.
14. Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52(1):2-12. 2008.
15. Owen RL. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches—a personal and historical perspective. *Semin Immunol* 11(3):157-63. 1999.
16. Siebers A, Finlay BB. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol* 4(1):22-9. 1996.
17. Jepson MA, Clark MA. Studying M cells and their role in infection. *Trends Microbiol* 6(9):359-65. 1998.
18. Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim DY, Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, Kohda T, Kozaki S, Igarashi O, Kiyono H. A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces

- antigen-specific immune responses. *J Exp Med* 204(12): 2789-96. 2007.
19. Clark MA, Jepson MA, Hirst BH. Exploiting M cells for drug and vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 50(1-2):81-106. 2001.
20. Brayden DJ, Jepson MA, Baird AW. Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov Today* 10(17):1145-57. 2005.
21. Terahara K, Yoshida M, Igarashi O, Nochi T, Pontes GS, Hase K, Ohno H, Kurokawa S, Mejima M, Takayama N, Yuki Y, Lowe AW, Kiyono H. Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J Immunol* 180(12):7840-6. 2008.
22. Sato S, Kaneto S, Shibata N, Takahashi Y, Okura H, Kunisawa J, Yuki Y, Kiyono H. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol* 6(4):838-46. 2013.
23. 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* 462(7270):226-30. 2009.
24. Kanaya T, Hase K, Takahashi D, Fukuda S, Hoshino K, Sasaki I, Hemmi H, Knoop KA, Kumar N, Sato M, Katsuno T, Yokosuka O, Toyooka K, Nakai K, Sakamoto A, Kitahara Y, Jinnohara T, McSorley SJ, Kaisho T, Williams IR, Ohno H. The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat Immunol* 13(8):729-36. 2012.
25. Lo D, Tynan W, Dickerson J, Mendy J, Chang HW, Scharf M, Byrne D, Brayden D, Higgins L, Evans C, O'Mahony DJ. Peptidoglycan recognition protein expression in mouse Peyer's Patch follicle associated epithelium suggests functional specialization. *Cell Immunol* 224(1):8-16. 2003.
26. Hase K, Ohshima S, Kawano K, Hashimoto N, Matsumoto K, Ohno H. Distinct gene expression profiles characterize cellular phenotypes of follicle-associated

- epithelium and M cells. *DNA Res* 12(2):127-37. 2005.
27. Verbrugghe P, Waelput W, Dleriks B, Waeytens A, Vandesompele J, Cuveller CA. Murine M cells express annexin V specifically. *J Pathol* 209(2):240-9. 2006.
28. Nakato G, Fukuda S, Hase K, Goitsuka R, Cooper MD, Ohno H. New approach for m-cell-specific molecules screening by comprehensive transcriptome analysis. *DNA Res* 16(4):227-35. 2009.
29. Suzuki R, Nourani MR, Saino-Saito S, Abe H, Nochi T, Kiyono H, Spener F, Kondo H, Owada Y. Localization of fatty acid binding protein of epidermal type common to dendritic cells and presumptive macrophages in Peyer's patches and epithelial M cells of mouse intestine. *Histochem Cell Biol* 132(6):577-84. 2009.
30. Stumpo DJ, Eddy RL Jr, Haley LL, Sait S, Shows TB, Lai WS, Young WS 3rd, Speer MC, Dehejia A, Polymeropoulos M, Blackshear PJ. Promoter sequence, expression, and fine chromosomal mapping of the human gene (MLP) encoding the MARCKS-like protein: identification of neighboring and linked polymorphic loci for *MLP* and *MACS* and use in the evaluation of human neural tube defects. *Genomics*

- 49(2):253-64. 1998.
31. Li J, Aderem A. MacMARCKS, a novel member of the MARCKS family of protein kinase C substrates. *Cell* 70(5):791-801. 1992.
32. Verghese GM, Johnson JD, Vasulka C, Haupt DM, Stumpo DJ, Blackshear PJ. Protein kinase C-mediated phosphorylation and calmodulin binding of recombinant myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) and MARCKS-related protein. *J Biol Chem* 269(12):9361-7. 1994.
33. Van den Bout I, van Rheenen J, van Angelen AA, de Rooij J, Wilhelmsen K, Jalink K, Divecha N, Sonnenberg A. Investigation into the mechanism regulating MRP localization. *Exp Cell Res* 314(2):330-41. 2008.
34. Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356(6370):618-22. 1992.
35. Calabrese B, Halpain S. Essential role for the PKC target MARCKS in maintaining dendritic morphology. *Neuron* 48(1):77-90. 2005.

36. Allen LH, Aderem A. A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J Exp Med* 182(3):829-40. 1995.
37. Zhu Z, Bao Z, Li J. MacMARCKS mutation blocks macrophage phagocytosis of zymosan. *J Biol Chem* 270(30):17652-5. 1995.
38. Underhill DM, Chen J, Allen LA, Aderem A. MacMARCKS is not essential for phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* 273(50):33619-23. 1998.
39. Chen J, Chang S, Duncan SA, Okano HJ, Fishell G, Aderem A. Disruption of the MacMARCKS gene prevents cranial neural tube closure and results in anencephaly. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(13):6275-9. 1996.
40. Wu M, Chen DF, Sasaoka T, Tonegawa S. Neural tube defects and abnormal brain development in F52-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(5):2110-5. 1996.
41. Kanki H, Suzuki H, Itohara S. High-efficiency CAG-FLPe deleter mice in C57BL/6J Background. *Exp Anim* 55(2):137-41. 2006.

42. El Marjou F, Janssen KP, Chang BH, Li M, Hindie V, Chan L, Louvard D, Chambon P, Metzger D, Robine S. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 39(3):186-93. 2004.
43. Kerneis S, Bogdanova A, Colucci-Guyon E, Kraehenbuhl JP, Pringault E. Cytosolic distribution of villin in M cells from mouse Peyer's patches correlates with the absence of a brush border. *Gastroenterology* 110(2):515-21. 1996.
44. Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26(2):99-109. 2000.
45. Nagatake T, Fukuyama S, Kim DY, Goda K, Igarashi O, Sato S, Nochi T, Sagara H, Yokota Y, Jetten AM, Kaisho T, Akira S, Mimuro H, Sasakawa C, Fukui Y, Fujihashi K, Akiyama T, Inoue J, Penninger JM, Kunisawa J, Kiyono H. Id2-, ROR γ mat-, and LTbetaR-independent initiation of lymphoid organogenesis in ocular immunity. *J Exp Med* 206(11):2351-64. 2009.

46. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459(7244):262-5. 2009.
47. de Lau W, Kujala P, Schneeberger K, Middendorp S, Li VS, Barker N, Martens A, Hofhuis F, DeKoter RP, Peters PJ, Nieuwenhuis E, Clevers H. Peyer's patch M cells derived from Lgr5+ stem cells require SpiB and are induced by RankL in cultured "miniguts". *Mol Cell Biol* 32(18):3639-47. 2012.
48. Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, Kumagai H. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol* 31(11):1007-14. 2003.
49. Clark MA, Hirst BH, Jepson MA. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* 66(3):1237-43. 1998.

50. Isberg RR, Leong JM. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60(5):861-71. 1990.
51. Disatnik MH, Boutet SC, Pacio W, Chan AY, Ross LB, Lee CH, Rando TA. The bi-directional translocation of MARCKS between membrane and cytosol regulates integrin-mediated muscle cell spreading. *J Cell Sci.* 117(Pt19): 4469-79. 2004.
52. Kinashi T. Regulation of integrins by small GTPase Rap 1. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 52(12): 1465-71. 2007.
53. Kim SH, Jung DI, Yang IY, Kim J, Lee KY, Nochi T, Kiyono H, Jang YS. M cells expressing the complement C5a receptor are efficient targets for mucosal vaccine delivery. *Eur J Immunol* 41(11):3219-29. 2011.
54. Kuolee R, Chen W. M cell-targeted delivery of vaccines and therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* 5(6):693-702. 2008.

55. Li J, Zhu Z, Bao Z. Role of MacMARCKS in integrin-dependent macrophage spreading and tyrosine phosphorylation of paxillin. *J Biol Chem* 271(22):12985-90. 1996.
56. Yue L, Bao Z, Li J. Phosphorylated form of MacMARCKS is essential to LFA-1-dependent cell-cell adhesion of U937 monocytic cells. *J Cell Physiol* 181(2):355-60. 1999.
57. Zhou X, Li J. Macrophage-enriched myristoylated alanine-rich C kinase and its phosphorylation is required for the phorbol ester-stimulated diffusion of beta 2 integrin molecules. *J Biol Chem* 275(26):20217-22. 2000.
58. Van den Bout I, Truong HH, Huveneers S, Kuiman I, Danen EH, Sonnenberg A. The regulation of MacMARCKS expression by integrin beta3. *Exp Cell Res* 313(6):1260-9. 2007.
59. Singer M, Martin LD, Vargaftig BB, Park J, Gruber AD, Li Y, Adler KB. A MARCKS-related peptide blocks mucus hypersecretion in a mouse model of asthma. *Nat Med*. 10(2): 193-6. 2004.

60. Park J, Fang S, Crews AL, Lin KW, Adler KB. MARCKS regulation of mucin secretion by airway epithelium in vitro: interaction with chaperones. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 39(1): 68-76. 2008.
61. Liu, Z.J. *et al.* Tyrosine sulfation in N-terminl domain of human C5a receptor is necessary for binding of chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*. *Acta Pharmacol Sin* **32**, 1038-44 (2011).
62. Sinha, B. *et al.* Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5 beta1. *Cell Microbiol* **1**, 101-17 (1999).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの人からご支援・ご助力いただいた。いずれの人とのつながりも、本研究の遂行には必要不可欠であった。この紙面を借りて、深く感謝の意を表したい。本学位論文の校閲にあたり、東京大学免疫学分野の高柳広先生、東京大学分子予防医学分野の松島綱治先生、東京大学医科学研究所幹細胞治療分野の大津真先生、東京大学医科学研究所感染症国際研究センターの三室仁美先生、東京大学医科学研究所分子発癌分野の秋山泰身先生にご協力いただいた。ES 細胞のマイクロインジェクションには、東京大学医科学研究所発生工学分野の吉田進昭先生、坂本怜子さんにご協力いただいた。電子顕微鏡法には、東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリーの相良洋先生、炎症免疫学分野の高橋裕子博士にご協力いただいた。感染実験に用いたサルモネラ菌 (χ 3306 株) は北里大学の松井英則先生より提供いただいた。レトロウイルスによる遺伝子導入法は東京大学医科学研究所細胞療法分野の北村俊雄先生より提供いただいた。また、大学院博士課程に在学中、日本学術振興会の特別研究員 (DC1; 24-2947) に採用していただき、研究面・生活面での資金援助をいただいた。

東京大学医科学研究所炎症免疫学分野の清野宏先生には、スーパーバイザーとして研究室在籍当初より一貫して研究生生活を支えていただいた。清野先生のおかげで、私は研究資金に頭を悩ませることもなく、自由な発想と研究への熱意を抱いてただ純粋に自身の研究テーマと向き合うことができた。また、佐藤慎太郎先生には、遺伝子改変マウスの作製法をはじめ研究に必要な多くのことを教えていただいた。大阪大学微生物研究所の審良静男先生のもとで研鑽を積まれた佐藤先生から、直々に実験技術を学べたことは一生の宝である。M細胞の単離法、染色法については、所属研究室の先達である吉田理人博士、Gemilson Soares Pontes 博士に教えていただいた。ES細胞培養やウェスタンブロットなどを行う上での実験のコツは、同じく所属研究室の先達である大倉英明博士に教えていただいた。日々の研究生生活を送る上では、國澤純先生（現 医薬基盤研究所准教授）、幸義和先生、朴恩正先生、後藤義幸博士、目島未央博士、岩波洋子さん、村野あつのさん、箕田善仁さん、由田淳さん、里永佳代さん、米原遥子さん、小玉由城さん含め炎症免疫学分野の皆さんにご支援いただいた。大学院博士課程を炎症免疫学分野の皆さんと過ごせたことは、有り難いことであり、今後の研究者生活においての糧となると確信している。

最後に、東京大学大学院医学系研究科博士課程の門戸をたたくまでに私を育

てあげてくれた両親についても感謝の意を表したい。大学教授である父，武からは長い大学生活，研究生活を耐えぬくための助言を，自身の経験談も含め語り聞かせてもらった。また，先の見えない将来に不安を抱えて悩んでいた時には，文字通り親身になって人生相談に付き合ってくれた。世話好きの母，基代子は私の体調を常に気遣ってくれ，度々神戸より上京しては，深夜に研究室から帰ってくるような私に温かい手料理を振る舞ってくれた。心身ともに健康で大学院博士課程を過ごせたことは，一重に両親の支えあつてである。