

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 金戸 聡

【背景と目的】

M 細胞はパイエル板のような粘膜関連リンパ組織の上皮層に存在する抗原取り込みに特化した上皮細胞である。周りの上皮細胞に比べて短く疎な微絨毛構造、基底膜側に抗原提示細胞を内包するようなポケット構造といった解剖学的特徴を有しており、これらの特徴を活かすことで、腸管管腔側の抗原を効率良く取り込み、直下の抗原提示細胞に受け渡し、抗原特異的な免疫応答を惹起すると考えられている。しかしながら、M 細胞の抗原取り込み機構に関する分子生物学的解析は進んでいない。

所属研究室ではこれまでに、M 細胞特異的モノクローナル抗体である NKM 16-2-4 抗体を樹立し、この抗体を用いて単離・精製した M 細胞を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、M 細胞特異的分子として Glycoprotein 2 (Gp2), Marcks-like protein (MLP), および転写因子 Spi-B を同定してきた。Gp2 の遺伝子改変マウスを用いた研究から、M 細胞の管腔側に発現する Gp2 がサルモネラ菌や大腸菌の鞭毛タンパクである Fim H を認識し、パイエル板内へそれらの菌を取り込む際に重要な機能を有していることが明らかになっている。また、転写因子 Spi-B の遺伝子改変マウスを用いた研究から、Spi-B が M 細胞の分化・発生を司るマスターレギュレーターであることが明らかとなっている。しかしながら、他の M 細胞特異的分子が M 細胞においてどのような機能を有しているのかについては未だ明らかになっていないものが多い。

本研究で焦点を当てた MLP も、M 細胞における機能は明らかになっていない分子のひとつである。MLP は体組織において脳をはじめ、肺、肝臓と広い組織部位に発現している。MLP は 200 アミノ酸程度からなる分子であり、主にミリスチル化領域、Marcks 相同領域、リン酸化領域からなる。これらの領域を用いることで Protein kinase C の基質として働き、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。その機能について

では相反する報告があるが、マクロファージにおいて MLP は細胞骨格の再編成を介して食食を促進することが示唆されている。本研究では、M 細胞の取り込み機構のさらなる解明を目的として、M 細胞特異的分子である MLP の腸管上皮細胞特異的遺伝子欠損マウスを作製および解析し、M 細胞における役割について検討した。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。

【結果と考察】

1. 腸管上皮細胞特異的 MLP 欠損マウスの樹立

Mlp の第 2 エクソンが Cre-loxP 相同組み替え法により欠損するようにターゲティングベクターを構築し、常法に従ってキメラマウスを作製した。生まれてきたキメラマウスと C57BL/6J マウスとを交配し、さらに、M 細胞を含む小腸上皮細胞に特異的に発現する遺伝子 *villin1* のプロモーター下に Cre リコンビナーゼ遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスとを交配することで目的とする腸管上皮細胞特異的 MLP 欠損 (*Mlp* IECΔ/Δ) マウスを作製した。パイエル板上皮細胞を *Mlp* IECΔ/Δ マウスより調整し遺伝子発現量を解析したところ、*Mlp* の mRNA 量は WT マウスに比べ 8 分の 1 程度に減少した。パイエル板上皮細胞における MLP のタンパク発現も *Mlp* IECΔ/Δ マウスにおいて減少していたことから、*villin1* のプロモーター下で発現制御された Cre タンパク依存的に *Mlp* 遺伝子の発現が制御されていることが示唆された。

2. MLP は M 細胞の形態形成には関与しない

上記にて得られたマウスを用い、電子顕微鏡法も含めた組織学的解析を行った。M 細胞表面を認識するレクチン Ulex Europaeus Agglutinin-1 (UEA-1), NKM16-2-4 抗体, 抗 Gp2 抗体を用いて、パイエル板組織切片の染色を行ったところ、UEA-1 陽性 NKM16-2-4 陽性 M 細胞および UEA-1 陽性 Gp2 陽性 M 細胞は、*Mlp* IECΔ/Δ マウスにおいて野生型マウスと同様に存在した。また電子顕微鏡法により、M 細胞に特徴的な凹んだ微絨毛構造およびリンパ球を内包するポケット構造が野生型マウスと同様、*Mlp* IECΔ/Δ マウスにおいても観察された。これらの結果から MLP の有無は M 細胞の分化や成熟、形態形成に影響を及ぼさないことが示唆された。

3. MLP は M 細胞においてエルシニア菌の取り込みを制御する

次に M 細胞における抗原取り込み能について解析を行った。M 細胞はナノパーティクルや微生物

物を取り込むことが知られている。そこでまず、蛍光標識された直径 200 nm のナノパーティクルをマウスに経口投与し、一定時間後パイエル板内に取り込まれた粒子の数を計測した。パーティクルの取り込み数を野生型マウスと *Mlp* IECΔ/Δ マウスとの間で比較したが、両者に有意な差は認められなかった。次に、M 細胞指向的な病原性微生物であるサルモネラ菌を経口投与した。一定時間後パイエル板内に取り込まれた菌数を計測し、野生型マウスと *Mlp* IECΔ/Δ マウスとの間で取り込まれた菌数を比較したが、両者に有意な差は認められなかった。次いで M 細胞指向的な別種の病原性微生物であるエルシニア菌を用いて同様にパイエル板内への取り込み数を計測したところ、野生型マウスに対し *Mlp* IECΔ/Δ マウスにおいて、エルシニア菌のパイエル板内への侵入が有意に減少した。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、これらの結果は、MLP が M 細胞において既知の Fim H/Gp2 経路を介さずエルシニア菌の取り込みを制御していることを示す。

4. MLP は $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを活性化する

これまでに、エルシニア菌の外膜タンパクである Yad A および *invasin* と宿主の $\beta 1$ インテグリンが結合することが報告されていることから、MLP がインテグリン分子の機能を制御するかについて腸管上皮 MODE-K 細胞株を用いて解析を行った。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となるフィブロネクチンに対して細胞応答能が促進し、細胞伸展の亢進が観察された。一方、MLP のリン酸化領域変異株ではリガンド応答能は増強されなかった。このことはアクチンの再構成の際に、MLP が自身のリン酸化領域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、*Marcks* と同様に MLP も 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た。

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、MLP の脱リン酸化を阻害した後、再度フィブロネクチン上での細胞形態を観察した。MLP を強制発現した細胞株において、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。

低分子量 G タンパクである 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応答性を制御することが報告されている。そこで、MLP がどのようにインテグリン分子の活性化に関わっているのかについて調べるために、Mlp 遺伝子を強制発現させたヒト胎児腎由来 HEK 293 T 細胞株において Rap1 の活性化状態を調べたところ、Mlp 遺伝子導入により Rap1 の活性化が増強することがウェスタンブロット解析により明らかとなった。以上の結果から MLP が Rap1 を活性化することにより 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。

【結論】

これら *in vivo*, *in vitro* 両面からの実験結果から、M 細胞において MLP が Rap1 を活性化し、活性化した Rap1 がさらに $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンのリガンド応答性を正に制御することでエルシニア菌の外膜タンパクを認識していることが示唆された。