

## 「呼吸器M細胞による外因性微粒子取り込み機構とその生物学的意義の解明」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：木村 俊介

## 1. 研究のねらい

花粉、PM2.5、ナノ粒子、ウイルスなどの外因性微粒子は呼吸器を介して体へと影響を及ぼす。これらの微粒子は、ときに気管・気管支を通じ肺まで到達し重篤な症状を引き起こす。呼吸器における生体防御は粘液と線毛上皮による粘液線毛クリアランス、肺胞マクロファージによる貪食による排除が中心であると考えられてきた。しかしながらインフルエンザ、SARS-CoV2などの呼吸器感染症においては、呼吸器粘膜中の抗原特異的IgA、IgGが生体防御に重要な役割を果たし、逆に花粉症、喘息などのアレルギー反応ではIgEが病態形成の中心となる。したがって、呼吸器における獲得免疫系の理解は外因性微粒子と生体の応答の理解において重要である。

微粒子に対する獲得免疫応答が惹起されるためには、生体内に微粒子が取り込まれ免疫系に認識される必要がある。例えばスギ花粉症では抗原分子に特異的なIgE抗体が産生されることが発症の前提となる。一方で粘膜表面と免疫系は上皮バリアによって物理的に隔離されているため、排除から逃れた外因性微粒子は何らかの方法で上皮バリアを通過するものと予想される。

呼吸器粘膜を構成する上皮細胞は概して物質を取り込む能力が低い。ところが腸管のパイエル板には数マイクロメートルもの粒子を取り込む能力を有するM細胞が存在する。このM細胞からの抗原取り込みは粘膜免疫の発動にとって必須なプロセスであり、実際に腸管M細胞を欠損したマウスではIgA量の低下が起こる。

これまで呼吸器にはM細胞は存在しないと考えられてきた。そのような状況下で申請者はウイルス感染時によって誘導される気管支随伴リンパ組織(BALT)にM細胞を見出した。さらには、鼻腔奥の鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)の濾胞上皮や、下気道の気管・気管支上皮にもM細胞が散発的に存在していることを明らかにしてきた。

本研究提案では、呼吸器M細胞という新たな視点から、これまで解明の遅れている外因性微粒子の体内への侵入メカニズムを明らかにしたい。具体的には、1)M細胞からの取り込みの分子機構の解明、2)呼吸器M細胞の分化誘導機構を明らかにして呼吸器特異的M細胞欠損マウスを樹立する。さらに、本マウスを用いて、3)呼吸器疾患の発症におけるM細胞の重要性を検証する。本研究の遂行により、経粘膜ワクチンの開発や呼吸器疾患における新規治療法へ向けた分子基盤を確立する。

## 2. 研究成果

## (1) 概要

M細胞における微粒子取り込みに関わる分子機構について、ProteinXによるイノシトールリン脂質との相互作用が取り込みに関与することを示した。ProteinXはPHドメインをもつタン

パク質であり、その結合するイノシトールリン脂質を特定することに成功した。さらに、Protein X が微粒子の細胞内の取り込み時にアクチン骨格とともに微粒子の周囲に集積すること、培養細胞への強制発現により取り込みが増大することを明らかにした。これは、M 細胞における受容体非依存的な取り込み機構に関与する分子基盤を解明した初めての成果である。

呼吸器の病態形成に関する M 細胞の関与については、インフルエンザ感染マウスにおいて M 細胞が顕著に増加することを明らかにした。呼吸器 M 細胞の分化機構については、その前駆細胞を明らかにすることに成功し、呼吸器 M 細胞特異的欠損マウスの構築に成功している。シングルセル RNAseq 解析と免疫組織学的解析により呼吸器 M 細胞は少なくとも 2 種類に分類できることが明らかになり、発現分子解析から、取り込み能が高い若い細胞と低い老齢の細胞が存在することが示唆された。

これらの成果は、粘膜面からの積極的な微粒子取り込み機構を明らかにするものであり、さらには呼吸器感染症に対して獲得免疫系がどの様に構築されるかを理解する上で重要な知見となる。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「M 細胞トランスサイトーシス機構の解明」

M 細胞は数百 nm から数  $\mu\text{m}$  の粒子、ときに 1  $\mu\text{m}$  の細菌を取り込む。そしてトランスサイトーシス(経上皮輸送)経路により、管腔内物質は上皮バリアを通過する。このような巨大分子の取り込みは、マクロファージなどのプロフェッショナルな貪食細胞が持つファゴサイトーシスに類する機構であり、一般的に上皮細胞は持っていない。つまり、ファゴサイトーシスによる管腔内物質取り込みと、その後のトランスサイトーシスの連携による小胞輸送機構は M 細胞独特のものであり、その分子機構は不明である。

腸管 M 細胞の発現分子網羅的解析により Protein X が M 細胞で高発現していることを見出した。Protein X はイノシトールリン脂質と結合する PH ドメインを持ち、機能未知の分子である。PH ドメインを持つタンパク質の多くがエンドサイトーシス経路に関与していること、マウス組織間の発現比較データベースから Protein X は他の組織ではほとんど発現せず、M 細胞で発現が高い。したがって、Protein X の解析により M 細胞が持つ独自のトランスサイトーシス経路を明らかにできると考えた。

#### Protein X の PH ドメインは Lipid M と結合する。

PH ドメインを大腸菌にて発現、精製を行い、イノシトールリン脂質との結合の解析をリポソーム共沈降実験によって行った。その結果、7 種類のイノシトールリン脂質のうち Lipid M と結合することが明らかになった(図 1)。

#### Protein X は細胞膜突起へと集積する。

GFP-Protein X を HeLa 細胞へと強制発現させ細胞内局在を調べたところ、F-actin と共局在すること、細胞膜上の突起構造に集積していた

#### Protein X は腸管 M 細胞における微粒子取り込みの周囲に集積する。

Protein X に対する抗血清を作製し、マウス腸管パイエル板濾胞関連上皮の免疫組織染色を

行った。その結果、Protein X は M 細胞で発現していることを確認した(図 2)。続いてマウス腸管へと蛍光ナノ粒子を投与した。その後、Protein X の免疫組織染色を行ったところ、M 細胞から取り込まれるナノ粒子の周囲に Protein X が F-actin とともに集積することが明らかになった(図 2)。

#### Protein X の強制発現は Cos-7 細胞における取り込みを促進する。

以上の実験結果は、Protein X が Lipid M と F-actin と相互作用することで、M 細胞からの微粒子の取り込みに関与していることを示している。そこで Cos-7 細胞に Strawberry-Protein X を強制発現させ、70kDa FITC-Dextran の取り込み能をフローサイトメーターによって解析した。その結果、Protein X の強制発現により FITC-Dextran の取り込みが増加していた。

#### Protein X の結合タンパク質の網羅的解析

Protein X の結合タンパク質を網羅的に解析するために、大腸菌によって全長の Protein X と GST との融合タンパク質を発現、精製した。そして、M 細胞で発現するタンパク質から Protein X 結合タンパク質を見出すことを目指した。定常時では腸管上皮における M 細胞の数は極端に少ない。申請者は M 細胞を過剰にもつ遺伝子改変マウス(OPG KO マウス)を所持している。さらに、このマウスに M 細胞の誘導因子である RANKL を投与することで、腸管上皮の 60~70%が M 細胞へとなることを見出している(原著論文 1)。この RANKL 投与 OPG KO マウスから腸管上皮を分離し、GST-ProteinX によるプルダウンアッセイを行った。得られた結合タンパク質を含む試料は さきがけ(微粒子)2期生の今見考志により定量 LC-MS/MS によるプロテオーム解析を行った。その結果、Protein X は複数の Myosin モータータンパク質との結合することが明らかになった。

粘膜面における、積極的な微粒子取り込みの分子機構はこれまでほとんど明らかになっていなかった。本研究の成果は Protein X が Myosin、Lipid M と相互作用し、M 細胞からの取り込みに関与することを示している。現在 Protein X 欠損マウスの作製に成功しており、*in vivo* での取り込みへの関与を解明したい。

#### 研究テーマ B 「呼吸器 M 細胞分化機構の解明」

呼吸器における M 細胞の分化機構を明らかにすることで、呼吸器特異的 M 細胞欠損マウスを作製することができると考え、本研究テーマを実施した。

#### A 細胞は呼吸器 M 細胞の前駆細胞である。

呼吸器 M 細胞は Tnf スーパーファミリーのサイトカイン RANKL によって分化誘導されることをこれまでに明らかにしていた。呼吸器上皮では M 細胞がどの細胞から分化するかが不明であったため、RANKL の受容体 RANK を発現する細胞の探索を行った。当初、RANK 抗体を用いた免疫組織染色によって探索を行ったが、定常状態における RANK の発現は非常に低く、検出ができなかった。そこで、九州大学 澤新一郎教授から RANK-GFP ノックインマウスを分与して頂いた。本マウスは RANK を発現する細胞で GFP が発現するマウスである。GFP 抗体による RANK 発現細胞の同定を試みた結果、Molecular X を発現する A 細胞が RANK を発現することが明らかになった。

続いて、Molecular X-Cre<sup>ERT2</sup> ROSA26 tdTomato マウスによる系統追跡モデルを用いて、A

細胞から M 細胞への分化を検証した結果、予想通り M 細胞は A 細胞から分化することが明らかになった。つづいて、Molecular X<sup>ERT2</sup> RANK<sup>fl</sup> マウスを作製し、呼吸器 M 細胞の欠損マウスの作製を試みた。定常状態では M 細胞の数が少ないため、RANKL を投与による呼吸器 M 細胞の誘導を行った。その結果、Molecular X<sup>ERT2</sup> RANK<sup>fl</sup> マウスでは顕著な M 細胞の減少が認められた。これにより、呼吸器上皮では A 細胞が M 細胞の前駆細胞であると結論づけた。

#### 呼吸器上皮細胞のシングルセル RNAseq 解析

マウスの呼吸器上皮を分離し、シングルセル RNAseq 解析を行った。呼吸器 M 細胞の分化過程を追うために RANKL 投与後経時的な変化を追跡した。その結果、M 細胞の集団は 2 種類存在することが明らかになった。また、RANKL を投与していない定常状態でも M 細胞の集団が存在することが明らかになった。

シングルセル RNAseq 解析から Pseudotime 解析を行ったところ、これまでの結果と一致して A 細胞から M 細胞へと分化することが示された。このとき、2 つの M 細胞集団は、分化の段階が異なる細胞である可能性が示唆された。

#### インフルエンザ感染による M 細胞の誘導

慶應義塾大学医学部呼吸器内科 石井誠先生のもとでインフルエンザ感染モデルの構築方法を習得した。インフルエンザ感染によりマウス肺には誘導性気管支随伴リンパ組織が形成され、その近傍上皮に M 細胞が存在していることを明らかにした。

インフルエンザ感染によって誘導される M 細胞も A 細胞が前駆細胞であること、気管内へ投与した微粒子の取り込み能が高いことが明らかとなった。シングルセル RNAseq 解析と一致して、インフルエンザ感染マウスにおいても M 細胞は 2 集団存在することが明らかとなった。

これらの成果は呼吸器上皮系列において新たに A 細胞から M 細胞への分化経路が存在することを示す成果である。一方で、呼吸器における M 細胞の機能が不明である。研究を継続することで、今後感染時に体外の微粒子を取り込む細胞がなぜ誘導されるのかを明らかにすることができると考えている。

#### 当さがけ研究領域内外の研究者との連携

プロテオーム解析にあたっては当さがけ 2 期生今見考志先生と、遺伝子改変マウスの作製にあたっては九州大学 澤新一郎教授と、インフルエンザウイルスの感染モデルの構築にあたっては慶應義塾大学医学部(現所属 名古屋大学)石井誠教授との連携をとり研究を進めている。

### 3. 今後の展開

粘膜面からの M 細胞からの分化や取り込み活性をコントロールすることが可能になれば体外から体内への物質伝達の人工的な制御が可能になると期待できる。粘膜面における抗原特異的 IgA 抗体を誘導する粘膜ワクチンの開発戦略として、M 細胞への選択的な抗原送達候補となっている。動物実験レベルでは M 細胞表面マーカーに対する抗体を用いて、抗原を M 細胞表面に接着させることにより、特異的 IgA 抗体の誘導に成功している。

腸管よりも体表面に近く、胃による消化の影響を受けづらい呼吸器、眼粘膜の M 細胞を標的とすることで、効果的な粘膜ワクチンの開発につながると期待できる。すでに、申請者の研究から呼吸器、鼻涙管 M 細胞の性状が明らかになりつつある。この部位では点眼、点鼻による非侵襲的なワクチン接種が可能と期待される。現状、動物実験の検証では M 細胞を標的とするために抗体を使っているため、高価になることと抗体自体の免疫原性が問題となる。実用には M 細胞へとより安価、安全に効率よく取り込む手法の開発が必要である。この点さえ解決できれば、数年以内に実装化が可能になると考えている。

#### 4. 自己評価

当初の研究計画では研究項目 A では M 細胞培養系による、解析を行う予定であったが、初代培養系における M 細胞の誘導効率、再現性が低く活用できなかった。一方で、M 細胞取り込み機構の解明は Protein X を中心として、培養細胞、in vivo での解析をすすめることにより、これまでほとんど情報がなかった取り込みの分子機構の解明に大きく前進した。今後は、Protein X KO マウスにおける取り込み能を解明することで、粘膜面からの抗原取り込みの分子機構という免疫、細胞生物学の課題に 1 つの答えを出すことができると期待している。

呼吸器 M 細胞の分化機構の解明は順調に進んだ。これにより、呼吸器上皮細胞系列に新たに A 細胞から M 細胞への分化経路を加えることができ、学術的な価値が大きいと考えている。これにより、呼吸器 M 細胞の欠損マウスの作製に成功している。一方で、COVID-19 の影響もありマウスの飼育を一時期減らす必要があったこと、所属研究施設におけるケージ数の制限もあり、思ったようにマウス数を確保することができず、実際にマウスを使った表現型解析の実験は予想より遅れている。実験動物の飼育状況も含めた研究実施体制を考慮し、早い段階で外部飼育施設への委託も可能であった。このような委託経費に研究費を執行する手段も検討すべきであった。

呼吸器疾患の発症における M 細胞の重要性についてはインフルエンザ感染モデルの構築に成功し、感染により M 細胞が誘導されること、その分化機構を明らかにすることができた。しかしながら、重要性については前述のマウス数確保の見通しの甘さにより未だ実施できていない。

呼吸器における免疫応答機構の理解はここ数年で大きく進み、特に呼吸器感染症については注目度が高い。そのような中で、呼吸器上皮が微粒子を排除するだけでなく、取り込む機能を持つことを示せたことは、今後の生体防御機構の研究において大きなインパクトを与えるものだと考えている。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:9件

1. **\*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, and **\*Hase K**. Osteoprotegerin-dependent M-cell self-regulation balances gut infection and immunity. *Nature communications*. 2020, 11, 234

M細胞の分化を抑制する因子として Osteoprotegerin (OPG) を発見した。OPG は分泌タンパク質であり、M細胞分化を促進するサイトカイン RANKL と結合することで分化を抑制する。OPG 欠損マウスでは M細胞が増加することで腸管免疫応答が活性化する。一方で、食中毒の原因となるサルモネラ菌に対する抵抗性は低下していた。よって、腸管において M細胞数の制御が感染防御と免疫応答のバランス維持に重要であることを明らかになった。

2. Oya Y, **\*Kimura S**, Nakamura Y, Ishihara N, Takano S, Morita R, Endo M, \*Hase K., Characterization of M Cells in Tear Duct-Associated Lymphoid Tissue of Mice. *Frontiers in Immunology*. 2021, 12, 779709

眼から鼻をつなぐ鼻涙管は涙によって洗い流された眼表面の異物を鼻腔へと排出する流路となる。マウスとヒトの鼻涙管には涙道関連リンパ組織 (TALT) が存在する。TALT の細胞構成は不明であり、その機能も明らかになっていない。本論文では TALT に腸管と同様の M細胞が存在することを見出し、点眼により投与された抗原が M細胞から取り込まれることを示した。これは眼の抗原粒子に対する免疫応答に TALT が関与することを示唆している。

3. Ishihara N, Nakamura Y, Yakabe K, Komiyama S, Fujimura Y, Kaisho T, **\*Kimura S**, \*Hase K. *Frontiers in Allergy*. 2022, 3, 996657

転写因子 Spi-B は M細胞、B細胞、肥満細胞の分化に関与する。本論文では Spi-B 欠損マウスにおいて食物アレルギーが悪化することを見出した。Spi-B 欠損では食物アレルギー誘導時の抗原特異的 IgE 抗体量増加、下痢症状の悪化が認められた。定常状態ですでに腸管上皮バリア機能の低下、肥満細胞が活性化していた。そして免疫寛容能が低下していた。以上の結果は Spi-B が免疫の恒常性を維持し、アレルギー発症を抑制する因子であることを示している。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のものも含む)

1	発明者	〇〇 〇〇
	発明の名称	〇〇〇〇
	出願人	〇〇大学
	出願日	201x/xx/xx
	出願番号	Xxxxxxx
	概要	100 字程度
2	発明者	〇〇 〇〇
	発明の名称	〇〇〇〇
	出願人	〇〇大学
	出願日	201x/xx/xx
	出願番号	Xxxxxxx
	概要	100 字程度

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

- 2022 年 6 月 30 日 第 74 回日本細胞生物学会大会 シンポジウム 生物間相互作用に基づく生命現象の理解 木村 俊介 「Regulation mechanisms of mucosal immunity and infection by M cells」 (東京都、江戸川区)
- 2020 年 9 月 12 日 第 62 回歯科基礎医学会学術大会 アップデートシンポジウム 1 木村

俊介「RANKL-OPG バランスによる腸管恒常性維持」(web 開催)

3. 2019 年 10 月 12 日 第 61 回歯科基礎医学会学術大会 メインシンポジウム 1 木村 俊介  
「腸管ならびに呼吸器粘膜における RANKL-RANK-OPG による M 細胞の分化制御機構」(東京都、文京区)

#### 受賞

4. 2020 年度 慶應義塾大学薬学部 学部長賞 研究部門
5. 2019 年度 北海道大学大学院医学研究院・大学院医学院・医学部医学科「優秀論文賞」 Sox8 is essential for M-cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice.