

## 腸管上皮Microfold細胞におけるAllograft inflammatory factor1の機能解析

岸川, 咲吏

<https://doi.org/10.15017/1654798>

---

出版情報：九州大学, 2015, 博士（歯学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：全文ファイル公表済

腸管上皮 Microfold 細胞における Allograft inflammatory factor 1 の機能解析

2016 年 3 月

九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座

顎顔面腫瘍制御学分野

岸川 咲吏

指導教員

九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学分講座

顎顔面腫瘍制御学分野

中村 誠司 教授

本研究の一部は下記の学術雑誌に投稿中である。

**Nature Communications, ARTICLE**

**Subject terms: Biological sciences, Immunology**

**Allograft inflammatory factor 1 (Aif1) is a regulator of transcytosis in M cells**

Sari Kishikawa<sup>1,2,#</sup>, Shintaro Sato<sup>1,3,4,5,6#</sup>, Satoshi Kaneto<sup>1</sup>, Shigeo Uchino<sup>7,†</sup>, Shinichi Kohsaka<sup>7</sup>, Seiji Nakamura<sup>2</sup>, Hiroshi Kiyono<sup>1,3,4,\*</sup>.

<sup>1</sup>Division of Mucosal Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639 Japan.

<sup>2</sup>Section of Oral and Maxillofacial Oncology, Division of Maxillofacial Diagnostic and Surgical Sciences, Faculty of Dental Science, Kyushu University, Fukuoka 812-8582 Japan.

<sup>3</sup>Research and Development Center for Mucosal Vaccines, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639 Japan.

<sup>4</sup>Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, Tokyo 102-0076, Japan.

<sup>5</sup>Mucosal Vaccine Project, BIKEN Innovative Vaccine Research Alliance Laboratories, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan.

<sup>6</sup>Mucosal Vaccine Project, BIKEN Center for Innovative Vaccine Research and Development, The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University, Osaka 565-0871, Japan.

<sup>7</sup>Department of Neurochemistry, National Institute of Neuroscience, Tokyo 187-8502, Japan.

# These authors contributed equally to this work.

## 略語表

Aif1: allograft inflammatory factor 1

C.f.u.: コロニー形成単位 (colony forming unit)

DCs: 樹状細胞 (dendritic cells)

Duo ECs: 十二指腸上皮細胞 (duodenal epithelial cells)

FAK: (focal adhesion kinase)

FAE: 濾胞関連上皮細胞層 (follicle-associated epithelium)

GAP: (guanine-exchange factor)

GEF: (GTPase-activating factor)

GP2: glycoprotein2

Il1 ECs: 回腸上皮細胞 (ileal epithelial cells)

LI ECs: 大腸上皮細胞 (large intestinal epithelial cells)

mRNA: messenger RNA

M $\phi$ : マクロファージ (macrophage)

PCR: polymerase chain reaction

PP: パイエル板 (Peyer's Patch)

RT-PCR: real time-polymerase chain reaction

WGA: wheat germ agglutinin

# 目次

要旨	5
緒言	10
材料と方法	13
結果	
研究 1. Aif1 は M 細胞特異的に発現し、その発現は転写因子 Spi-B に依存的である。	
1-1. Aif1 は FAE 特異的に発現する。	
1-2. Aif1 は転写因子 Spi-B 依存的に M 細胞特異的に発現する。	
結果 2. Aif1 は M 細胞の分化、成熟には関与しない。	
結果 3. Aif1 は M 細胞の抗原取り込み能、トランスサイトーシスに関与している。	
3-1. Aif1 欠損マウスでは、蛍光標識ビーズの取り込み能が減弱する。	
3-2. Aif1 欠損マウスでは、グラム陰性食中毒細菌の一つであるエルシニア菌の取り込み能が減弱する。	
3-3. Aif1 欠損マウスの M 細胞では、active $\beta$ 1 インテグリンの発現が減弱する。	
結果 4. エルシニア菌の取り込みには Aif1 を発現する骨髄由来細胞は関与しない。	
結果 5. Aif1 は Rac-Rho シグナリングを刺激することで、トランスサイトーシスを誘導する。	
考察	34
謝辞	39
参考文献	40

## 要 旨

パイエル板 (Peyer's Patches: PPs) は小腸腸管に散在する粘膜関連二次リンパ組織であり、その濾胞領域の管腔側は単層円柱上皮である濾胞関連上皮細胞層 (follicle-associated epithelium: FAE) に覆われている。その FAE にのみ存在する Microfold (M) 細胞は、腸管管腔からの抗原取り込みに特化した腸管上皮細胞として知られている。M 細胞は、きわめて少数の細胞集団であり、また初代培養法が現在まで確立されていないことから、その分化様式や機能発現の過程に関しては未だ不明な点が多い。しかし近年、転写因子 Spi-B が M 細胞の分化において中心的な役割を果たしていることが明らかになり、Spi-B 欠損マウスの FAE では、構造的・機能的に成熟した M 細胞が欠落していることが報告されている。しかしながら、Spi-B によってどのような分子群の発現が誘導され、M 細胞の機能発現に関与しているかについてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、M 細胞の抗原取り込みに関する分子群を同定する目的で野生型マウスと Spi-B 欠損マウスの FAE に発現している遺伝子の発現量を、DNA マイクロアレイ解析を用いて比較、検討した。その結果、抗原取り込みに関連する候補分子の一つとして、Allograft inflammatory factor 1 (Aif1) を同定した。Aif1 はミクログリアやマクロファージに強く発現し、Rac1 シグナリングを介してメンブレンラフリングやファゴサイトーシスに関与していると報告されている細胞質内分子であるが、今回の実験で初めて上皮細胞系列にも発現していることが明らかになった。そこで、Aif1 が M 細胞においてもトランスサイトーシスを介した抗原取り込みに関与しているのではないかと考え、Aif1 の M 細胞における機能解析を行った。

以下に本研究で得られた結果をまとめた。

**1. Aif1 は腸管上皮細胞系列の中では M 細胞特異的に発現し、その発現は転写因子 SpiB に依存的である。**

DNA マイクロアレイの結果を再検証する目的で、野生型マウスと Spi-B 欠損マウスの FAE、十二指腸上皮細胞 (duodenal epithelial cells: Duo ECs)、回腸上皮細胞 (ileal epithelial cells: Ill ECs)、大腸上皮細胞 (large intestinal epithelial cells: LI ECs) を用いて、RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) 法にて、*Aif1* の発現量の比較検討を行った。その結果、*Aif1* の発現量は野生型マウスでは FAE においてのみ有意に高く、Duo ECs、Ill ECs、LI ECs において、その発現は認められなかった。また、Spi-B 欠損マウスでは FAE においても *Aif1* の発現は認められなかった。次に、多重蛍光免疫染色法を用いて、腸管上皮細胞における *Aif1* 分子の発現を確認したところ、RT-PCR の結果と同様に、*Aif1* 陽性の細胞は野生型マウスの FAE 領域においてのみ認められた。さらに、パリエル板をホルマウント染色にて解析したところ、*Aif1* は成熟 M 細胞マーカーである glycoprotein2 (GP2) と共局在していた。以上のことから、*Aif1* は腸管上皮細胞系列において、M 細胞特異的に発現する分子であり、その発現は Spi-B 依存的であることが明らかになった。

**2. Aif1 は M 細胞の分化、成熟には関与しない。**

*Aif1* が M 細胞の分化、成熟に関与しているかどうかを検証するために、M 細胞を形態学的特徴で捉え、野生型マウスと *Aif1* 欠損マウス間でその頻度に差があるかを、走査型電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて観察を行い検討した。結果、野生型マウスの M 細胞に比較し、*Aif1* 欠損マウスの M 細胞では、その形態に変化は認めず、M 細胞の特徴である疎で短い微絨毛と基底膜側に存在するポケット構造等の形態も認めた。さらに、FAE に散在する M 細胞数を測定したところ、*Aif1* 欠損マウスの M 細胞数は、野生型マウスの M 細胞数に比較し、有意差を認めなかった。次に、野生型マウスと *Aif1* 欠損マウスそれぞれの FAE 上に発現する *Gp2* の遺伝子発現量と GP2 陽性 M 細胞数を比較、検討した。その結果、*Aif1* 欠損マウスの FAE における *Gp2* の遺伝子発現量、GP2 陽性 M 細胞数は野生型に比較し、

有意な差を認めなかった。以上の結果から、Aif1 は M 細胞の分化、成熟には関与しないことが示唆された。

### 3. Aif1 は M 細胞の抗原取り込み能、トランスサイトーシスに関与している。

Aif1 が M 細胞の抗原取り込み能に及ぼす影響を検討するために、まず 200nm の蛍光標識ビーズの経口投与を行い、FAE 内へのビーズの取り込みを野生型マウス、Aif1 欠損マウス間で比較、検討した。その結果、Aif1 欠損マウスの FAE 内への蛍光標識ビーズの取り込み量は、野生型マウスに比較し、有意に減少していた。次に、サルモネラ菌 (*Salmonella Typhimurium*) とエルシニア菌 (*Yersinia enterocolitica*) を食中毒細菌のモデルとして、これらの細菌の経口投与をそれぞれ行い、野生型マウスと Aif1 欠損マウスのパイエル板内への取り込みを比較、検討した。その結果、野生型マウスに比較し、サルモネラ菌の取り込みに関して有意な差は認められなかった。しかしエルシニア菌の取り込みは、Aif1 欠損マウスで有意に減少していた。以上の結果から、Aif1 が M 細胞を介した蛍光標識ビーズや、エルシニア菌の取り込みに影響を及ぼすことが示唆された。さらに、エルシニア菌の外膜タンパク YadA を宿主の M 細胞の管腔側細胞膜表面に発現する  $\beta 1$  インテグリンが認識することで、M 細胞への取り込みが起きることが報告されていることから、Aif1 が M 細胞における  $\beta 1$  インテグリンの発現に関与している可能性がある。そこで、これを明らかにする目的で、まず RT-PCR 法を用いて、野生型マウス、Aif1 欠損マウスの FAE に発現する  $\beta 1$  インテグリンの発現量を比較、検討した。その結果、Aif1 欠損マウスの FAE に発現する  $\beta 1$  インテグリンの発現量は、野生型マウスに比較し、有意な差は認められなかった。しかし、 $\beta 1$  インテグリンは抗体により、活性化型 (active) を区別できることから、多重蛍光免疫染色法を用いて、野生型マウス、Aif1 欠損マウスの M 細胞における active と total  $\beta 1$  インテグリンの発現を検討した。その結果、野生型マウスに比較し、Aif1 欠損マウスでは total  $\beta 1$  インテグリンの発現に差は認められなかったが、active  $\beta 1$  インテグリンの発現が減弱していた。この結果から、Aif1 が  $\beta 1$  インテグリンの活性化に影響を及ぼす可能性が示唆された。



#### 4. エルシニア菌の取り込みには Aif1 を発現する骨髄由来細胞は関与しない。

Aif1 は M 細胞だけでなく、骨髄由来細胞であるマクロファージや樹状細胞にも発現していることが報告されている。また FAE 直下の樹状細胞の一部はその突起を伸ばすことで、上皮細胞間隙を介して管腔側からの抗原取り込みを行っていることが報告されている。このことから、抗原取り込みには M 細胞経由のものと、樹状細胞経由のものとが示唆された。そこで放射線を照射したマウスに骨髄移植を行い、抗原取り込みが Aif1 を発現する M 細胞経由であるかどうかを明らかにした。Aif1 欠損マウスに Ly5.1 マウスの骨髄を移植したマウス（上皮特異的 Aif1 欠損マウス：上皮細胞 Aif1 欠損/骨髄細胞 Aif1 発現：Aif1<sup>IECKO</sup>）、Ly5.1 マウスに Aif1 欠損マウスの骨髄を移植したマウス（上皮特異的 Aif1 発現マウス：上皮細胞 Aif1 発現/骨髄細胞 Aif1 欠損：Aif1<sup>IECWT</sup>）を用いて、エルシニア菌の長期感染モデルを作製した。長期感染後の糞便を採取し、エルシニア菌特異的抗体価を ELISA 法にて計測したところ、エルシニア菌特異的 IgA が上皮特異的 Aif1 欠損マウスに比べて、上皮特異的 Aif1 発現マウスでは有意に抗体価が増加していた。このことから、エルシニア菌は Aif1 を発現する M 細胞から取り込まれ、骨髄由来細胞には依存しないことが明らかになった。

#### 5. Aif1 は Rac-Rho シグナリングを刺激することで、トランスサイトーシスを誘導する。

レンチウイルスに Aif1 cDNA を挿入して感染させたマウス小腸上皮細胞由来 MODE-K 細胞株 (AIF1) と未挿入のレンチウイルスを感染させた MODE-K 細胞株 (コントロール: Crt) を作製した。培養用ディッシュがコンフルエントになったところで細胞を回収した。回収した細胞のライセートを用いて、活性化型 Rac1、RhoA、Cdc42 の検出を Pull down assay にて解析を行った。その結果、Aif1 発現 MODE-K 細胞 (AIF1) は Crt に比較し、未刺激下においても活性化型 Rac1 の発現を認めた。しかし、AIF1 における他の Rho ファミリーの活性化は Crt とほぼ同程度であった。この結果から、Aif1 は低分子量 G タンパク Rac1 を誘導することが明らかになった。

以上より、Aif1 は転写因子 Spi-B に依存して M 細胞特異的に発現し、蛍光標識ビーズやエルシニア菌の抗原取り込みには  $\beta 1$  インテグリンの活性化、さらに Rac1 の活性化を制御することで M 細胞の抗原取り込みに寄与することが推察された。

## 緒言

パイエル板 (Peyer's Patches: PPs) は小腸腸管に散在する二次リンパ組織であり、その形態は管腔側に向けてドーム状を形成している。その表面の一部は単層円柱上皮である濾胞関連上皮細胞層 (follicle-associated epithelium: FAE) に覆われている。その FAE に少数存在する M 細胞 (microfold cell: M 細胞) は、腸管管腔からの抗原取り込みに特化した腸管上皮細胞として知られている<sup>1,2</sup>。その特徴として、M 細胞は管腔側に、他の小腸上皮細胞より疎らで短い微絨毛を持ち、また基底膜側には、B 細胞、マクロファージ (macrophage: M $\phi$ )、樹状細胞 (dendritic cell: DC) といった抗原提示細胞 (antigen presenting cell: APC) を抱え込むポケット構造を有していることが挙げられる。この 2 つの特徴によって、M 細胞は、腸管管腔からの抗原取り込みを容易に行い、ポケット構造内に存在する APC に効率的に抗原を渡すことで、迅速な粘膜免疫応答を引き起こすことができると考えられている (図 1)。

M 細胞への分化メカニズムは長らく謎のままであったが、近年転写因子 Spi-B が中心的な役割を果たしていることが報告された<sup>3,4</sup>。そのため、Spi-B 欠損マウスの FAE では野生型マウスの FAE に比べて、M 細胞の特徴である、管腔側の短く疎な微絨毛と基底膜側のポケット構造が欠落してしまうため、未成熟な M 細胞が存在する。このため、Spi-B 欠損マウスは野生型マウスに比較し、サルモネラ菌 (*Salmonella Typhimurium*) やエルシニア菌 (*Yersinia enterocolitica*) などのグラム陰性食中毒細菌の取り込み能が有意に減少することが報告されている。さらに、近年 glycoprotein2 (GP2) が、M 細胞特異的に発現し、転写因子 Spi-B 依存的に発現することが報告された<sup>4,5</sup>。GP2 は哺乳類の膵臓の腺房細胞に発現する分子として知られており、この報告により GP2 が腸管の M 細胞にも発現していることが明らかになった。また、M 細胞に発現する GP2 は、サルモネラ菌や大腸菌などの外膜蛋白に FimH を有するグラム陰性菌を認識することでパイエル板内へ抗原を取り込み、直下に存在する抗原提示細胞に引き渡すことで、抗原特異的免疫反応を引き起こすことが明ら

かになった。しかし、同じグラム陰性細菌であるエルシニア菌の取り込みに関しては、M細胞に発現する  $\beta 1$  インテグリンが、その取り込みに関与することが報告されているが<sup>6,7</sup>、M細胞における  $\beta 1$  インテグリンの発現を制御する分子は明らかになってはいない。GP2欠損マウスでは、エルシニア菌の取り込み量に変化を認めないことから、GP2以外の Spi-B ターゲット分子がエルシニア菌の取り込みに関わっている可能性が示唆されている。しかし、M細胞の培養法が未確立であること、また細胞数が極端に少ないことから、M細胞の分化・能力の発現に関しては未だ不明な点が数多い。そこで、M細胞の分化・能力発現に関する分子を検索する目的で、野生型マウスと Spi-B 欠損マウスの FAE に発現している遺伝子の発現量を、DNA マイクロアレイ解析を用いて比較、検討した。その結果、候補分子の一つとして Aif1 (Allograft inflammatory factor 1)<sup>8,9</sup> を同定した。Aif1 はラット異所性心移植モデルにおいて見いだされた分子であり、慢性拒絶心でその発現が亢進する。Aif1 は移植心冠動脈周囲に浸潤するマクロファージだけでなく、脳に存在するミクログリアなどにも発現し、IFN- $\gamma$  によって制御される分子であることが報告されている<sup>10</sup>。その分子量は 17kDa であり、別名 ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1) とも呼ばれる  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパクであり、EF ハンドモチーフを 1 つ保持している。Aif1 はミクログリア細胞株 MG5 を用いた研究にて、低分子量タンパク Rho ファミリーに属する Rac1 シグナリングを介して、ミクログリアのメンブレンラップリング、ファゴサイトーシスに関与していることがすでに報告されている<sup>11,12,13</sup>。この研究報告により、M細胞においてもその抗原取り込み能（トランスサイトーシス）への関与が示唆された。しかし、腸管上皮細胞における Aif1 の発現とその機能については報告がなされておらず、いまだ不明なままである。そこで、Aif1 分子が M細胞の分化、能力の発現に与える影響を明らかにする目的で、この研究を行った。

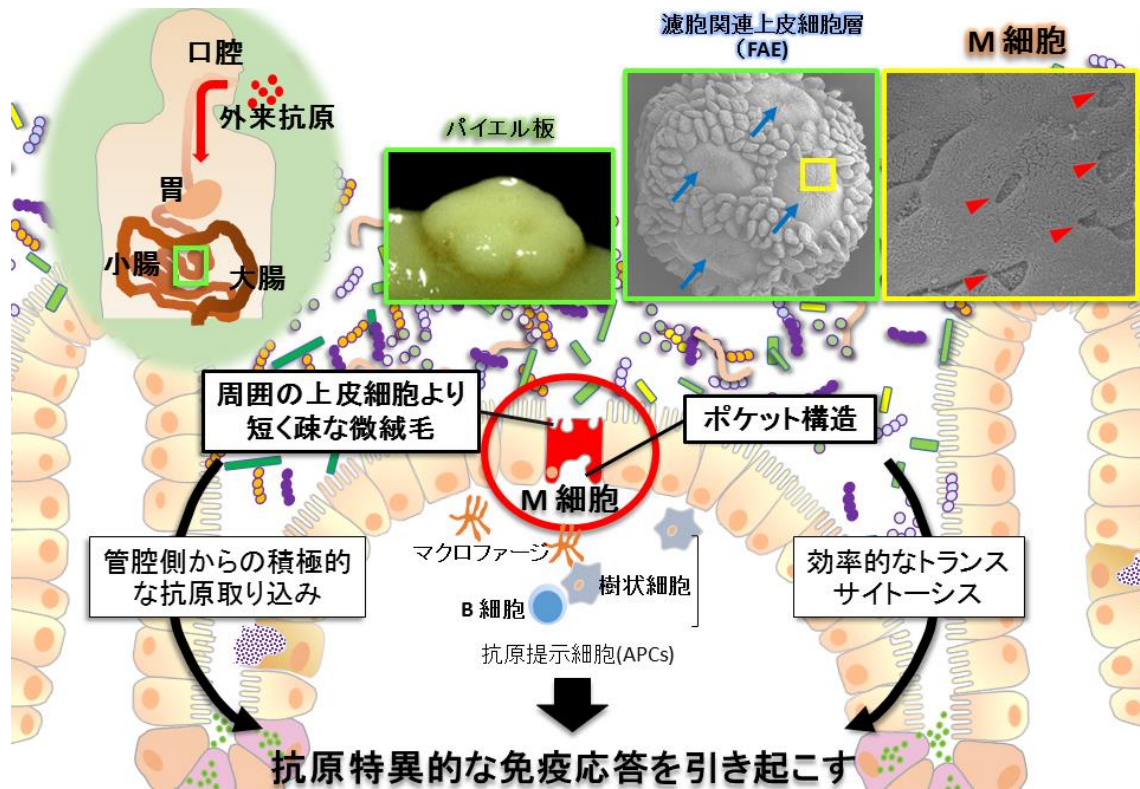


図 1. M細胞を始めとする抗原特異的免疫応答の機序

# 材料と方法

## 1. 実験動物

本研究計画の遂行には、組換え DNA 実験と動物実験が含まれる。前者は遺伝子組換え生物等の第二種使用が機関承認されており（承認番号 K12-11）、後者は東京大学医科学研究所動物実験委員会によって承認されている（承認番号 A11-70、A11-75、A11-77、A11-78、A11-82、A11-84 および A11-85）。その他、特定化学物質等の取り扱いについては東京大学医科学研究所の安全衛生管理規定に従い使用した。

また、Aif1 欠損マウスに関しては、高坂新一先生（東京都国立精神・神経医療センター）、内野茂夫先生（東京都国立精神・神経医療センター、現：帝京大学理工学部バイオサイエンス学科）から譲渡していただき、許可を得て研究を行った。

また、野生型マウス（C57BL/6J）は日本クレアから購入し、東京大学医科学研究所が定める規定に従い研究を行った。

## 2. 組織採取

対象マウスを頸椎脱臼により死亡させた後、小腸を取り出し、10%FCS、ペニシリン・ストレプトマイシン（P/St）入り RPMI (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) に入れた。小腸からパイエル板を取り除き、1×PBS 20 ml にて 3 回洗浄を行い、ホールマウント染色・多重蛍光免疫染色に用いた。また、FAE は、採取したパイエル板を 1 mM DTT (Nacalai tesque) /D-PBS (Nacalai tesque) 20 ml にて 3 回洗浄を行った後、0.5 mM EDTA/1 mM DTT/D-PBS に 25 分、氷上にて静置した。その後実体顕微鏡下にて、スクレイパーを用いて機械的に FAE をパイエル板より剥離した。

## 3. mRNA および complementary DNA (cDNA) の抽出

RNA の抽出には acidified guanidinium-phenol-chloroform 法を用いた。FAE に Trizol® Reagent (Invitrogen, California, USA) を 300  $\mu$ l 加え、ピペッティングにて粉碎した。

200  $\mu$ l のクロロホルム (Nacalai tesque) を加えて攪拌後、3 分間静置した。4 °C、12,000 g で 15 分間遠心した後に RNA を含む水層を採取し、これに 500  $\mu$ l のイソプロパノール (Nacalai tesque) を加えて攪拌後、4 °C、15,000 rpm で 15 分間遠心し、上清の除去後に得られた RNA ペレットを 75 % EtOH (Nacalai tesque) で洗浄後乾燥させ、16  $\mu$ l の Ultra Pure Distilled water (Invitrogen) に溶解した。その後、吸光度計にて RNA の濃度を測定した。cDNA の合成には、約 1.0  $\mu$ g の total RNA、Super Script VILO Master Mix (Invitrogen) を 4  $\mu$ l 加えて合計 20  $\mu$ l とし、室温にて 10 分静置後、42 °C で 1 時間インキュベートした。その後、85 °C で 5 分間加温して酵素を失活させ、直ちに氷冷した。これを Ultra Pure Distilled water で 10 倍に希釈し、mRNA の解析に用いた。

#### 4. real-time polymerase chain reaction (PCR) 法による mRNA 発現の解析

real-time PCR は LightCycler<sup>®</sup>480 SYBR Green 1 Master (Roche、Indianapolis、IN) を用いて行った。滅菌水に SYBR Green 1 Master を 10  $\mu$ l、template DNA を 100 ng、5  $\mu$ M フォワードおよびリバースプライマーをそれぞれ 2  $\mu$ l ずつ加え、全反応量を 20  $\mu$ l とした。反応条件は、熱変性は 95 °C で 1 サイクル目が 5 分、2 サイクル目以降は 10~20 秒間で行い、伸張反応は 72 °C、10~30 秒間とし、全 45 サイクルの増幅を行った。mRNA の発現を解析する分子は、細胞表面分子 (B1 インテグリン)、細胞質内分子 Aif1 とした。各プライマー配列を下記に示す。また、各サンプル間での mRNA 発現量を定量化するために、それぞれの mRNA の発現量はハウスキーピング遺伝子である *Gapdh* の mRNA 発現量を用いて補正し、相対的発現量を算出した。

1) *Gapdh* (forward) 5'- TGTCCGTCGTGGATCTGAC -3'

(reverse) 5'- CCTGCTTCACCACCTTCTTG -3'

2) *Aif1* (forward) 5'-GGATTTGCAGGGAGGAAAA-3'

(reverse) 5'- TGGGATCATCGAGGAATTG-3'

3) *Gp2* (forward) 5'- ATACTGCACAGACCCCTCCA -3'

(reverse)5'- GCAAACCTCTGAGAGTCAGAAACATG -3'

4) *Integrin β1* (forward) 5'- CTGCTTCTAAAATTGAGATCAGGA -3'

(reverse) 5'- TCCATAAGGTAGTAGAGATCAATAGGG -3'

## 5. 免疫組織化学的解析

採取したパイエル板を4%パラホルムアルデヒドに浸し、4°Cにて2時間浸漬した。さらに10%スクロース、20%スクロースに各3時間ずつ浸漬し、O.C.T コンパウンド (Sakura Finetechnical Co. Ltd, Tokyo, Japan) に包埋した凍結ブロックを作製した。クリオスタット (Leica, Tokyo, Japan) を用いて凍結切片 (7 μm) を作製し、VECTOR lab sp2001 Avidin-Biotin blocking kit を使用し、ストレプトアビジン-ビオチン法による免疫組織化学染色を行った。使用した一次抗体は標識あるいは未標識の抗 GP2 ラットモノクローナル抗体 (2F11-C3, Medical & Biological Laboratories Co. Ltd, Aichi, Japan) もしくは Alexa 488 蛍光標識抗体、抗 CD29 ラットモノクローナル抗体 (clone 9EG7: active β1 integrin, BD Bioscience, San Jose, CA)、抗 CD29 ビオチン化抗体 (clone Ha2/5: total β1 integrin, BD Bioscience)、抗 Aif1 ウサギポリクローナル抗体 (Wako, Osaka, Japan) を用いた。続く二次抗体の染色には抗ラット IgG ビオチン化抗体もしくは抗ウサギ IgG ビオチン化抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 3 μg/ml をそれぞれ反応させ、1.25 μg/ml HRP (horseradish peroxidase enzyme) 標識ストレプトアビジン (Pierce) を30分間室温にて反応させた。次に Tyramide Signal Amplification kit (Life Technologies) を用いて染色を行った。F-actin は Alexa 633 蛍光標識 phalloidin 抗体 (Invitrogen) を用いて染色を行った。なお各染色切片の観察には DM IRE1/TCS SP2 confocal microscopy (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて撮影、記録を行った。

## 6. ホールマウント染色

PBSにて洗浄したパイエル板を、BD Cytofix/Cytoperm kit (BD Bioscience) を用いて固



定を行った。4 °C にて 1 時間振盪後、一次抗体として抗 GP2 ラットモノクローナル抗体 (Medical & Biological Laboratories Co. Ltd) と、抗 Aif1 ウサギポリクローナル抗体 (Wako) を 1×Perm Wash (BD Bioscience) を用いてそれぞれ 5 µg/ml と 2.5 µg/ml に希釈し、4 °C にて一晩振盪を行った。二次抗体には抗ラット Alexa 488 蛍光標識抗体と抗ウサギ Cy3 蛍光標識抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)、Alexa 633 蛍光標識 phalloidin 抗体 (Invitrogen) を用いて染色を行い、遮光後 4 °C にて振盪 3 時間を行った。パリエル板の包埋後、観察には DM IRE1/TCS SP2 confocal microscopy (Leica, Wetzlar, Germany) を用いた。

#### 7. 走査型電子顕微鏡もしくは透過型電子顕微鏡による M 細胞の形態観察

洗浄したパリエル板は 2.5 %グルタルアルデヒド、2 %パラホルムアルデヒド、0.1 M リン酸緩衝液の混合液に浸し、室温にて 2 時間静置した。氷上にて 3 %スクロースで 3 回洗浄後、氷上で 1 %四酸化オスミウムに 1 時間浸漬した。その後 15 分ごとに 30 %、50 %、70 %、90 % エタノールで脱水を行った。脱水後のサンプルは t-ブチルアルコールで一晩浸漬を行い、翌日凍結乾燥させ、1 %四酸化オスミウムでコーティングを行った。観察には、S-4200 走査型電子顕微鏡もしくは透過型電子顕微鏡 (Hitachi, Tokyo, Japan)を用いた。

#### 8. 蛍光標識ビーズの経口投与による抗原取り込み実験

24 時間絶食させたマウスに、200 nm 蛍光標識ビーズ-Fluoresbrite® YG Carboxyrate microspheres (Polysciences, Warrington, PA) を最終濃度が約  $4.5 \times 10^{11}$  個/ml に希釈したものを、経口にて 150 µl 投与した。投与後、腸管上部からパリエル板を含めた組織を 2 か所から採取し、4 %PFA 固定後 O.C.T. コンパウンドに (Sakura Finetechnical Co. Ltd) 包埋し、凍結ブロックを作製した。クリオスタット (Leica) にて 10 枚の連続切片を作製し、顕微鏡用デジタルカメラ BZ-9000 series (Keyence, Osaka, Japan) を用いて観察、記録を行い、FAE 内に含まれる蛍光標識ビーズの数を計測し、切片数で除したものを平均

した。

## 9. 菌体調整

ナリジクス酸耐性サルモネラ菌 ( $\chi$ 3306: *Salmonella* Typhimurium with nalidixic acid resistance gene) は ナリジクス酸含有トリプティックソイブロス (tryptic soy broth: TSB) (BD Biosciences, San Jose, CA) 培地 にて一晩 37 °C 振盪インキュベートを行い、エルシニア菌 (ATCC 27729: *Yersinia enterocolitica*) は、TSB 培地にて一晩 26 °C 振盪インキュベートした。翌日、吸光度を Smart Spec Plus (BIORAD, CA, USA) にて計測し、吸光度が 0.1~0.2 になるように新鮮培地を用いて調整を行い、さらに 2 時間それぞれの菌の適温にて振盪を行った。

## 10. 菌体の経口投与による抗原取り込み実験

マウスに菌体数を調整したサルモネラ菌 ( $1 \times 10^9$  CFU/ml)、もしくはエルシニア菌 ( $1 \times 10^{10}$  CFU/ml) を 100  $\mu$ l 経口にて投与し、24 時間後に回腸パイエル板を可能な限り採取した。採取したパイエル板は D-PBS にて洗浄を行い、100  $\mu$ g/ml ゲンタマイシン (Wako) に浸漬して、室温にて 30 分間静置した。D-PBS にて洗浄後、パイエル板の重量を測定し、ホモジナイザーにて破碎した。パイエル板破碎後の懸濁液を、10 倍希釈して、さらに 2 倍希釈を 3 段階行い (10 倍、20 倍、40 倍、80 倍)、25  $\mu$ g/ml ナリジクス酸含有 LB 寒天培地に塗布し、37 °C にて一晩インキュベートしてサルモネラ菌の菌数を測定した。また、エルシニア菌は 400 倍希釈した懸濁液を 5 段階で希釈して (400 倍、800 倍、4000 倍、8000 倍、40000 倍、80000 倍) エルシニア選択寒天培地 (Kanto Chemical Co., Inc, Tokyo, Japan) に塗布し、30 °C 一晩インキュベート後エルシニア菌の菌数を測定した。翌日培地の観察を行い、計測した菌数に希釈率を乗じ、パイエル板の重量にて除して mg あたりの菌数を算出した。

## 11. 骨髄移植

頸椎脱臼にて死亡させたマウスの両側大腿骨と腓骨を採取し、氷上に静置した。骨を P/St 入り 10%FCS、ペニシリン・ストレプトマイシン (P/St) 入り RPMI に入れ、切断した骨から骨髄細胞を 27 G と 10 ml シリンジを用いて洗浄を行い可能な限り取り出した。採取した骨髄細胞を 1400 rpm、4 °C、5 分間遠心を行い、上清を捨てた。沈殿した骨髄細胞に Red blood cell rising buffer (Sigma, Tokyo, Japan) を 1 ml 加え、1 分間室温にて静置した。サンプルに HBSS (Nacalai tesque) を 9 ml 加え、遠心を行った。再度上清を捨て、PBS 20ml に懸濁後、細胞数を計測し、 $2 \times 10^7$  個/100  $\mu$ l になるように調節した。9 Gy の放射線を照射したマウスに、尾静脈から懸濁した骨髄細胞を移入した。移入終了後、ネオマイシン水 (0.2 mg/ml) を移植後 2 週間投与した。骨髄移植したマウスにおける骨髄細胞の定着の有無は、エルシニア感染実験後にすべて、その脾臓細胞における Ly5.1 (CD45.1) マーカーを用いて検討と解析を行い確認を行っている。

## 12. エルシニア菌長期感染モデルの作製

マウスに菌体数を調整したエルシニア菌 ( $1 \times 10^9$  CFU/ml) を、週に一度 100  $\mu$ l を経口投与し、感染から 28 日後にマウス糞便の回収を行った。糞便は 1×PBS にて希釈後 4 °C にてボルテックスを 30 分間行い、4 °C で 15 分間遠心後上清を回収し、-20 °C に保管した。

## 13. total IgA もしくはエルシニア菌特異的 IgA の ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) による定量

96 well プレート (NUNC 442404, Thermo) に 2  $\mu$ g/ml ヤギ抗マウス Ig(H+L) 抗体 (Southern biotech) を 100  $\mu$ l アプライ後、4 °C にて一晩固相化を行った。翌日、PBS-T にてプレートを 4 回洗浄後、1 %BSA/PBS 100  $\mu$ l をアプライし、室温で 2 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、別プレート (BD Falcon 353910, BD) にて 200 倍、400 倍、800 倍、1600 倍、3200 倍、6400 倍に希釈したサンプルを 100  $\mu$ l ずつアプライし、

4 °C にて一晩インキュベートを行った。翌日、4000 倍希釈したヤギ抗マウス IgA-HRP (Southern biotech) をアプライ後、室温にて 2 時間インキュベートを行い、終了後 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) にて反応を検出、反応開始から 2 分後に 1×リン酸水溶液にて反応を停止した。Total IgA の検出と解析には、iMark Micoplate reader (BIORAD) と Microplate manager 6 software (BIORAD) を用いた。

エルシニア菌特異的 IgA の検出では、凍結乾燥したエルシニア菌 1 mg/ml を 96 well プレートに 100 µl アプライ後、4 °C にて一晩インキュベートした。翌日プレートを洗浄後、1 時間室温にてブロッキングを行い、その後別プレートにて 4<sup>1</sup> から 4<sup>4</sup> まで希釈したサンプルをアプライし、室温にて 2 時間インキュベートを行った。以下の行程は、total IgA 定量の ELISA と同様である。

#### 14. Aif1 発現 MODE-K 細胞株を用いた Rac1 発現解析

Aif1 cDNA を、lipofectamine2000 (Life Technologies、Tokyo、Japan) を用いて挿入した。次いで、そのウイルス溶液を MODE-K 細胞に加えて感染させ、感染後 48 時間後以降に実験を行った。コントロール (Crt)、Aif1 発現 MODE-K 細胞 (AIF1) それぞれにおける活性化型 Rac1 の発現は、Rac1/RhoA/Cdc42 pull down assay kit (Cytoskelton、Denver、USA) を用いて解析した。細胞がコンフルエントになった時点で、細胞を cell lysis buffer 500 µl (cytoskeleton) に溶解した。サンプル回収後、PAK-PBD ビーズ (cytoskeleton) もしくは Rhotekin ビーズ (cytoskeleton) にサンプルを加え、4 °C にて 1 時間振盪して、遠心を行った。ビーズを wash buffer にて 2 回洗浄後、3×sample buffer に溶解した。100 °C にて 5 分間インキュベート後、14000 rpm、2 分間遠心を行い、活性化型 Rac1 が溶解している上清を回収した (pull down)。ウエスタンブロット法は、PVDF (GE healthcare、Tokyo、Japan) を用いて 200 V、400 mA にて約 40 分泳動を行い、サブマリン式にて 100 V、400 mA、4 °C、1 時間転写を行った。転写後、5 %スキムミルクにて室温 1 時間ブロッキングを行い、500 倍希釈した一次抗体である抗 Rac1、RhoA、Cdc42 マウスモノクロー

ーナル抗体 (cytoskeleton) もしくは抗 Aif1 ウサギポリクローナル抗体 (Wako) にて、4 °C 一晩インキュベートを行った。翌日 HRP 標識二次抗体を 2000 倍希釈して室温にて 1 時間振盪した。TBST にて 3 回洗浄後、ECL (GE healthcare) を用いて蛍光検出を行い、LAS4000 (GE healthcare) にて解析を行った。

## 15. 統計

統計処理には Student の  $t$  検定、Mann-Whitney の  $U$  検定を用いた。なお、統計解析ソフトとして Graph Pad Prism version3.03 (MDF、Tokyo、Japan) を使用し、 $P < 0.05$  の場合を統計学的有意差ありとした。また、実験はマウス個体 1 匹を、 $n=1$  として実験を行った。

## 結 果

<研究 1> Aif1 は M 細胞特異的に発現し、その発現は転写因子 Spi-B に依存的である。

### 1-1. Aif1 は FAE 特異的に発現する。

DNA マイクロアレイ解析の結果を再検証する目的で、野生型マウスと Spi-B 欠損マウスの FAE、十二指腸上皮細胞 (duodenal epithelial cells: Duo ECs)、回腸上皮細胞 (ileal epithelial cells: Ill ECs)、大腸上皮細胞 (large intestinal epithelial cells: LI ECs) を用いて、RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) 法にて、Aif1 の発現量の比較検討を行ったところ、Aif1 の発現は野生型マウスの FAE においてのみ顕著に高く、Duo ECs、Ill ECs、LI ECs では、発現は認められなかった (図 2a)。また Spi-B 欠損マウスの FAE において、Aif1 の発現は認められなかった (図 2b)。以上の結果から Aif1 は転写因子 Spi-B 依存的に FAE 特異的に発現することが明らかになった。

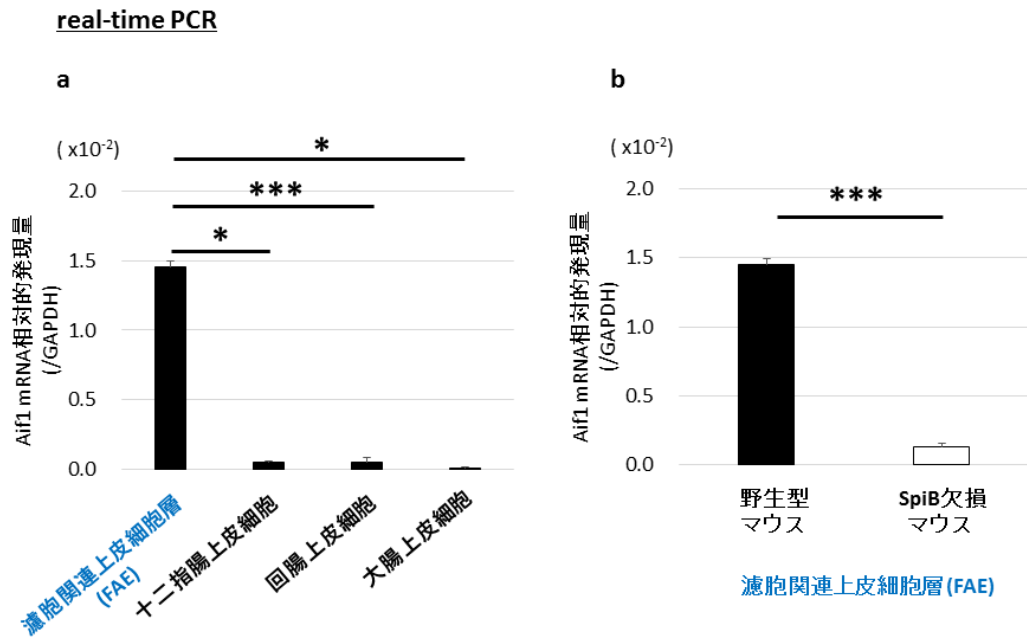


図 2. 腸管上皮細胞における Aif1 の分布

- a. 野生型マウスの各腸管上皮細胞における Aif1 の GAPDH に対する相対的 mRNA 発現量。
- b. 野生型マウスと Spi-B 欠損マウスの FAE における Aif1 の GAPDH に対する相対的 mRNA 発現量。
- a. b. とともに n=3、実験は全て duplicate にて行い、統計には Student の *t* 検定を用いた (\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.001$ )。

## 1-2. Aif1 は転写因子 Spi-B 依存的に M 細胞特異的に発現する。

FAE における Aif1 分子の局在を検索する目的で、野生型マウスのパイエル板をホールマウント染色にて解析したところ、FAE のみにおいて、成熟 M 細胞マーカである glycoprotein2 (GP2、緑色) (図 3a-1) と Aif1 は (赤色) (図 3a-2)、共局在していた (白色の矢頭) (図 3a-3、-4)。しかし、FAE には Aif1GP2 ダブルポジティブ細胞 (白色の矢頭) だけでなく、Aif1 シングルポジティブ細胞、GP2 シングルポジティブ細胞も存在していた。さらに、ホールマウント染色法にて、Spi-B 欠損マウスのパイエル板における Aif1 の発現の有無を確認したところ、成熟 M 細胞マーカである GP2 ポジティブ細胞も Aif1 ポジティブ細胞も認められなかった (図 3b)。また、GP2 欠損マウスと Aif1 欠損マウスの FAE においてそれぞれ、タンパク質レベルにおける Aif1 と GP2 の発現の有無を解析したところ、どちらのマウスにおいてもそれぞれの分子の発現を認めたことから、Aif1 と GP2 はお互いに非依存的分子であることが示唆された (図 3c、d)。



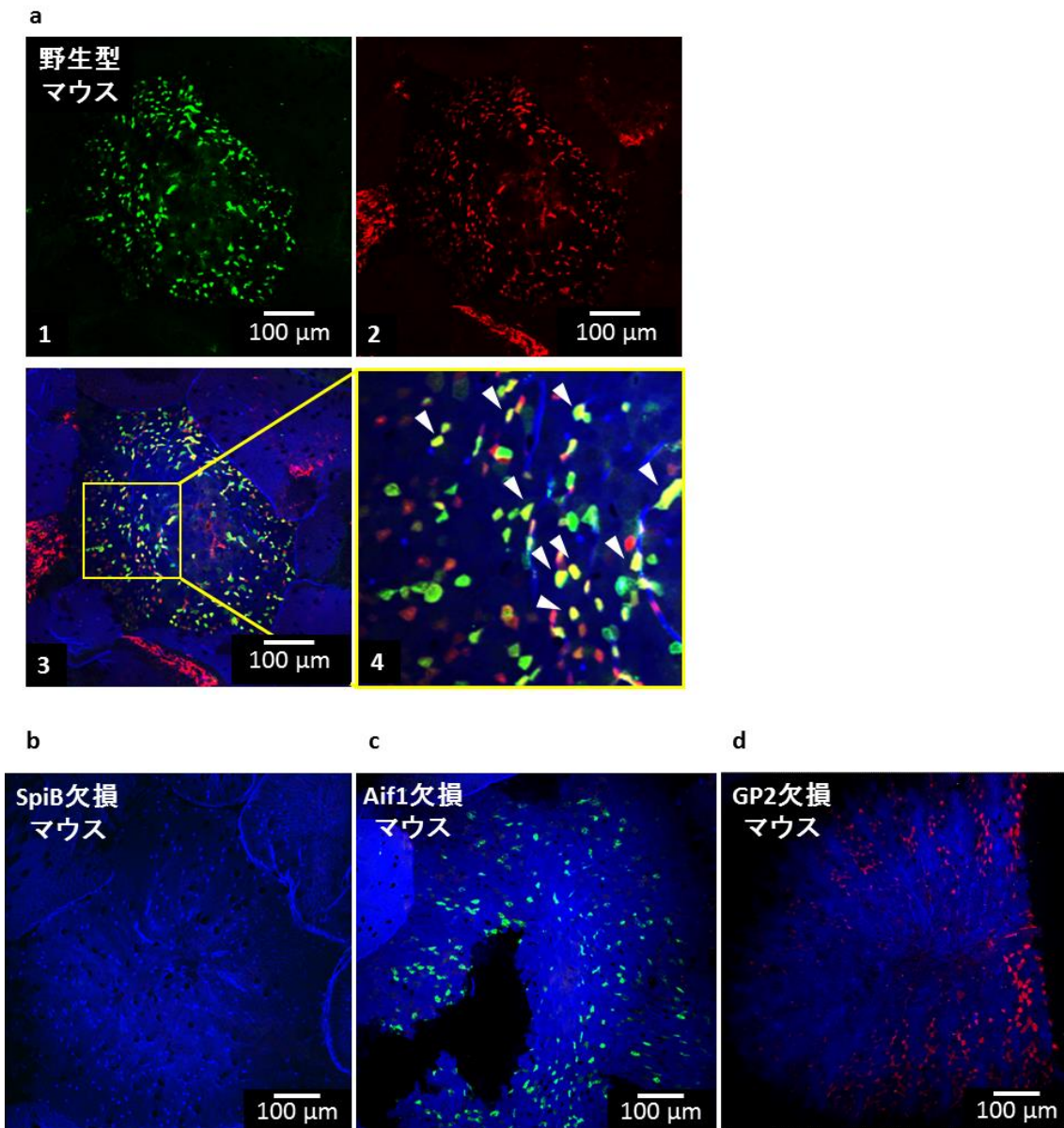


図 3. 各遺伝子欠損マウスの FAE におけるタンパク質レベルでの Aif1 と GP2 の発現

a. 野生型マウスの FAE における GP2 (緑色) (図 3a-1) と Aif1 (赤色) (図 3a-2) および両者の共発現 (黄色) (図 3a-3、-4)、白色矢頭は共発現している細胞を示す (図 3a-4)。図 3a-4 は図 3a-3 の黄色の四角内の強拡大図。

b. Spi-B 欠損マウス、c. Aif1 欠損マウス、d. GP2 欠損マウスにおける、GP2 (緑色) (図 3c) もしくは Aif1 (赤色) (図 3d) の発現。

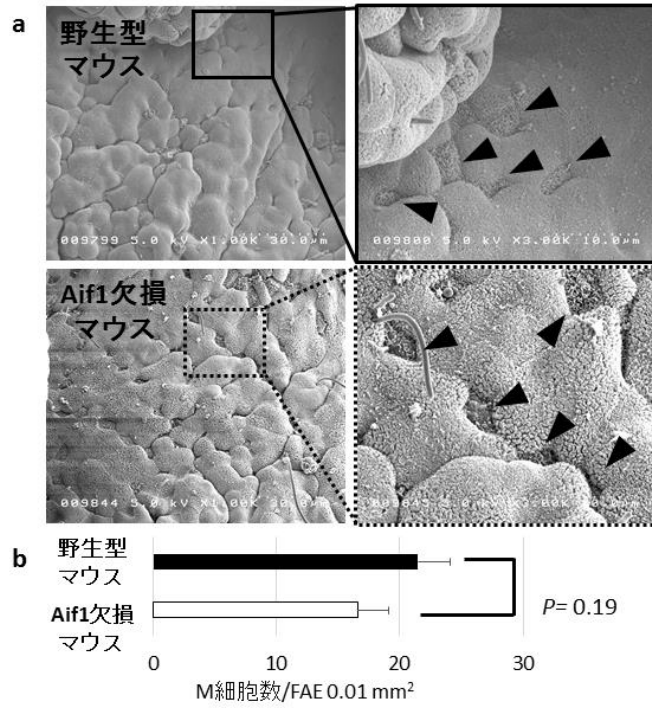
全てそれぞれの欠損マウスを n=3 ずつ用いた。

## <研究 2> Aif1 は M 細胞の分化、成熟には関与しない。

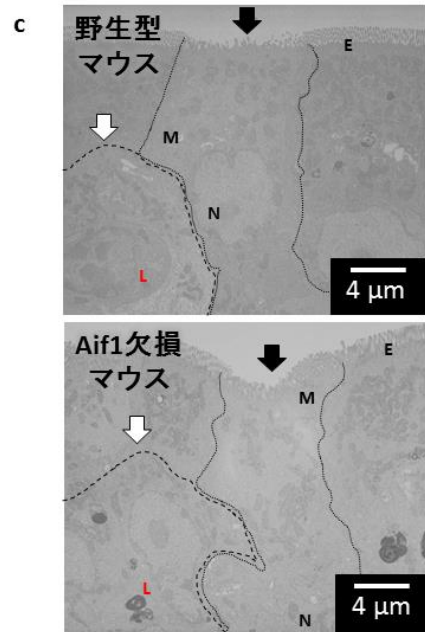
転写因子 SpiB を欠損すると、形態的にも機能的にも未成熟な M 細胞を呈することから、Spi-B 下流分子である Aif1 が M 細胞の形態形に関与している可能性が考えられた。そこで、Aif1 欠損マウスの M 細胞の形態、その頻度の増減を解析する目的で、走査型電子顕微鏡にて野生型マウスと Aif1 欠損マウスのそれぞれの M 細胞の管腔側における形態変化と M 細胞数の頻度を比較、検討した。結果、野生型マウスの M 細胞 (図 4a 上図) に比較し、Aif1 欠損マウスの M 細胞では、M 細胞の大きさに変化は認めなかった (図 4a 下図)。さらに、野生型マウスと Aif1 欠損マウスのそれぞれ 1 個体ずつからパイエル板を可能な限り採取し、その FAE に散在する M 細胞数を測定したところ、Aif1 欠損マウスの M 細胞数は、野生型マウスの M 細胞数に比較し、有意な差を認めなかった (図 4b)。また、透過型電子顕微鏡を用いて M 細胞の特徴である、疎で短い微絨毛 (図 4c: 黒色矢印) と抗原提示細胞等を抱え込むポケット構造 (図 4c: 白色矢印) の有無を検討した。結果野生型マウスの M 細胞 (図 4c 上図) と同様に、Aif1 欠損マウスの M 細胞 (図 4c 下図) においてもその二つの特徴を認めた。このことから Aif1 は M 細胞の形態形成には関与しないことが示唆された。

さらに、野生型マウスと Aif1 欠損マウスの FAE における GP2 の遺伝子発現レベルの比較を real time-PCR を用いて、タンパク質レベルにおける GP2 陽性 M 細胞の数の比較をホールマウント染色を用いて検討を行った。その結果、遺伝子レベル (図 4d) においてもタンパク質レベル (図 4e 左図: 野生型マウス、右図: Aif1 欠損マウス) における発現においても、野生型マウスと Aif1 欠損マウス間で有意な差を認めず、GP2 陽性 M 細胞数にも有意な差は認められなかった (図 4f)。以上の結果から Aif1 は GP2 陽性 M 細胞の発現、頻度に影響を与えないことが示唆された。

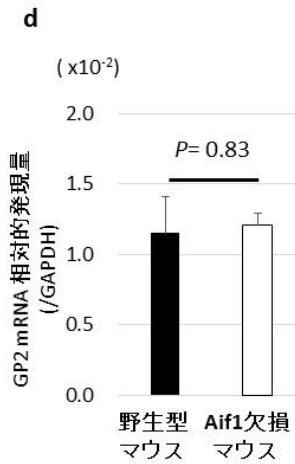
走査型電子顕微鏡



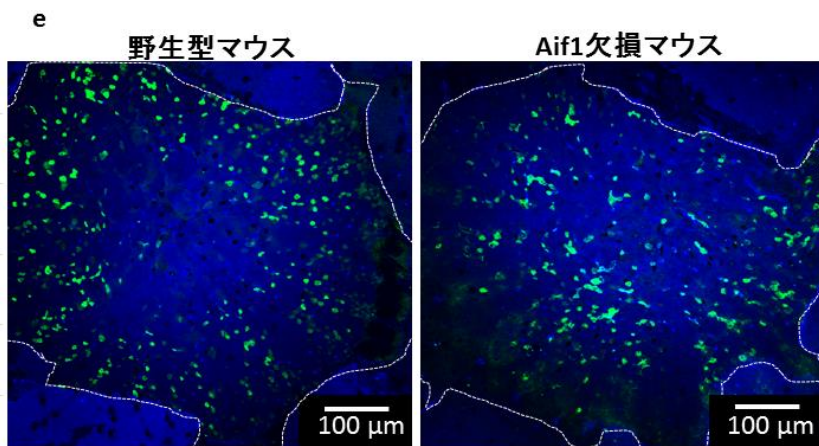
透過型電子顕微鏡



real time-PCR



ホールマウント染色



#### 図 4. 野生型マウスと Aif1 欠損マウスにおける M 細胞の形態及び数的変化の比較

- a. 走査型電子顕微鏡を用いた M 細胞の形態変化の観察（上左図: 野生型マウスの M 細胞分布、上右図: 上左図の黒色の四角内強拡大、下左図: Aif1 欠損マウスの M 細胞分布、下右図: Aif1 欠損マウスの下右図の強拡大）。黒色の矢頭は M 細胞を示す。
- b. 走査型電子顕微鏡を用いた M 細胞の観察による FAE 0.01 mm<sup>2</sup> あたりの M 細胞数の比較。それぞれのマウスから採取した 4 個のピエール板の FAE を観察し、独立した実験を 2 回行った。統計は Student の *t* 検定を用いた。グラフは独立した実験 2 回の合計の平均値を示す。
- c. 透過型電子顕微鏡を用いた M 細胞の特徴における形態変化の観察（上図: 野生型マウスの M 細胞、下図: Aif1 欠損マウスの M 細胞）。M: M 細胞、E: 上皮細胞、N: 核、L: リンパ球、黒色矢印: 疎で短い微絨毛、白色矢印: リンパ球等を抱え込むポケット構造、黒線: M 細胞と上皮細胞との境界、点線: リンパ球とポケット構造の境界。
- d. 野生型マウスと Aif1 欠損マウスの FAE における GP2 の GAPDH に対する相対的 mRNA 発現量。n=3、統計は Student の *t* 検定を用いた。
- e. GP2 のタンパク質レベルでの発現。GP2 陽性 M 細胞（緑色）、F-actin（青色）、白点線内部: FAE。
- f. FAE あたりの GP2 陽性 M 細胞数の比較。n=3 以上、検討可能な 7 個のピエール板を観察し、統計は Student の *t* 検定を行った (\**P* < 0.05)。

＜研究 3＞ Aif1 は M 細胞の抗原取り込み能、トランスサイーシスに関与している。

### 3-1. Aif1 欠損マウスでは、蛍光標識ビーズの取り込み能が減弱する。

Aif1 が M 細胞の抗原取り込み能に及ぼす影響を検討するために、200 nm の蛍光標識ビーズの経口投与を行い、野生型マウス、Aif1 欠損マウスの M 細胞による FAE 内へのビーズの取り込みを検討した。その結果、Aif1 欠損マウスの FAE 内への蛍光標識ビーズの取り込み量は、野生型マウスに比較し、有意に減少していた (図 5a)。

### 3-2. Aif1 欠損マウスでは、グラム陰性食中毒細菌の一つであるエルシニア菌の取り込み能が減弱する。

次に、グラム陰性食中毒細菌である サルモネラ菌 (*Salmonella Typhimurium*) とエルシニア菌 (*Yersinia enterocolitica*) は、M 細胞を介して生体内に取り込まれる細菌として報告されており、サルモネラ菌は外膜タンパクである FimH を GP2<sup>5</sup> が、エルシニア菌は外膜タンパク YadA を B1 インテグリンが認識することで<sup>6,7</sup>、その取り込みが行われる。これら細菌の経口投与をそれぞれ行い、24 時間後に野生型マウスと Aif1 欠損マウスのパイエル板内に生息している菌数を比較・検討した。その結果、野生型マウスに比較し、サルモネラ菌の取り込みに関しては、Aif1 欠損マウスに有意な差は認められなかった (図 5b)。しかし、Aif1 欠損マウスのエルシニア菌の取り込みは、野生型マウスに比較し、有意に減少していた (図 5c)。

### 3-3. Aif1 欠損マウスの M 細胞では、活性型 B1 インテグリンの発現が減弱する。

Aif1 欠損マウスの M 細胞によるエルシニア菌の取り込みが、野生型マウスに比較して減弱したことから、Aif1 が M 細胞における B1 インテグリンの発現さらにはその活性化もしくはシグナル伝達に関与する可能性が示唆された。これを明らかにする目的で、まず real time-PCR 法を用いて、野生型マウスと Aif1 欠損マウスの FAE に発現する total B1 インテグリンの発現量を比較、検討した。その結果、Aif1 欠損マウスの FAE に発現する total B1 インテグリンの発現量は、野生型マウスに比較し有意な差は認められなかった (図 6a)。そ

ここで、B1 インテグリンの抗体は、抗体のクローンによってコンフォメーションな構造変化を認識できる活性型 (active) B1 インテグリン、非活性型 (inactive) B1 インテグリン、またその両方を認識するもの (total) に分けられることが報告されている<sup>14</sup>。次にこれらの抗体を用いて、免疫組織化学染色法にて、野生型マウスと Aif1 欠損マウスの GP2 陽性 M 細胞における active と total B1 インテグリンの発現を検討した。その結果、野生型マウスの GP2 陽性 M 細胞と同様に、Aif1 欠損マウスの GP2 陽性 M 細胞でも total B1 インテグリンの発現を認めた。しかし、active B1 インテグリン抗体にて同様の実験を行ったところ、野生型マウスの GP2 陽性 M 細胞では active B1 インテグリン発現を認めたのに対し、Aif1 欠損マウスの GP2 陽性 M 細胞ではその発現を認めなかった (図 6b、c)。

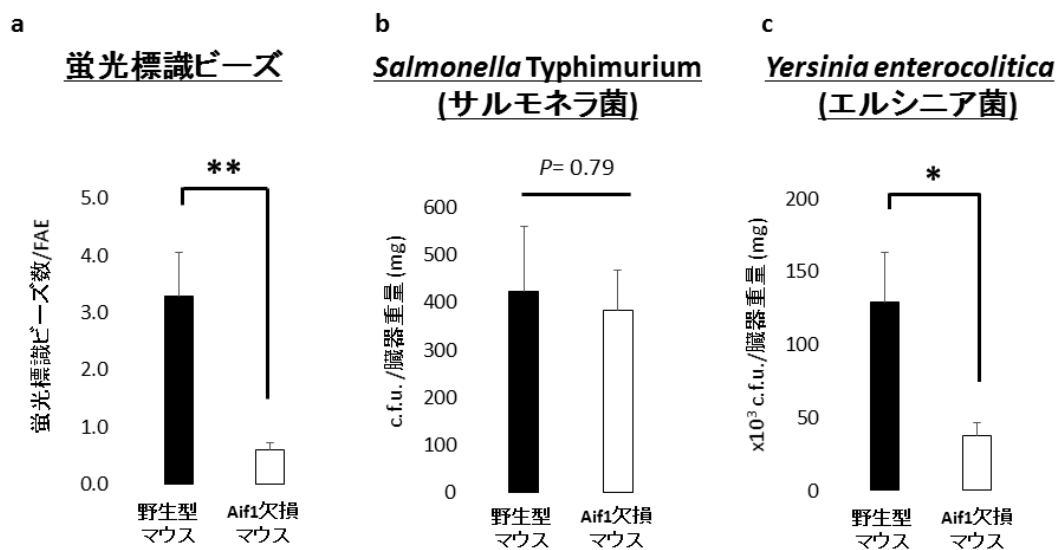
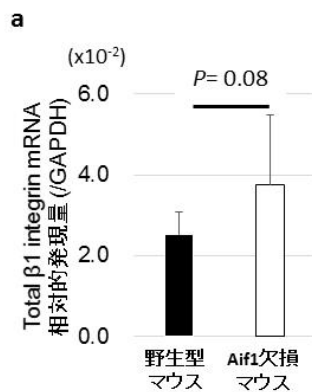


図 5. 野生型マウスと Aif1 欠損マウスの抗原取り込みの比較

- 蛍光標識ビーズに対する取り込み能の比較。FAE 内に取り込まれた蛍光標識ビーズ数を蛍光顕微鏡下にて観察、計測を行った。n=10 (野生型マウス)、n=9 (Aif1 欠損マウス)。
- パイエル板 mg 重量あたりのサルモネラ菌の c.f.u.。
- パイエル板 mg 重量あたりのエルシニア菌の c.f.u.。

平均値の差の検定は全て Student の *t* 検定を行った (\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。

### real time-PCR



濾胞関連上皮細胞層 (FAE)

### 蛍光免疫染色

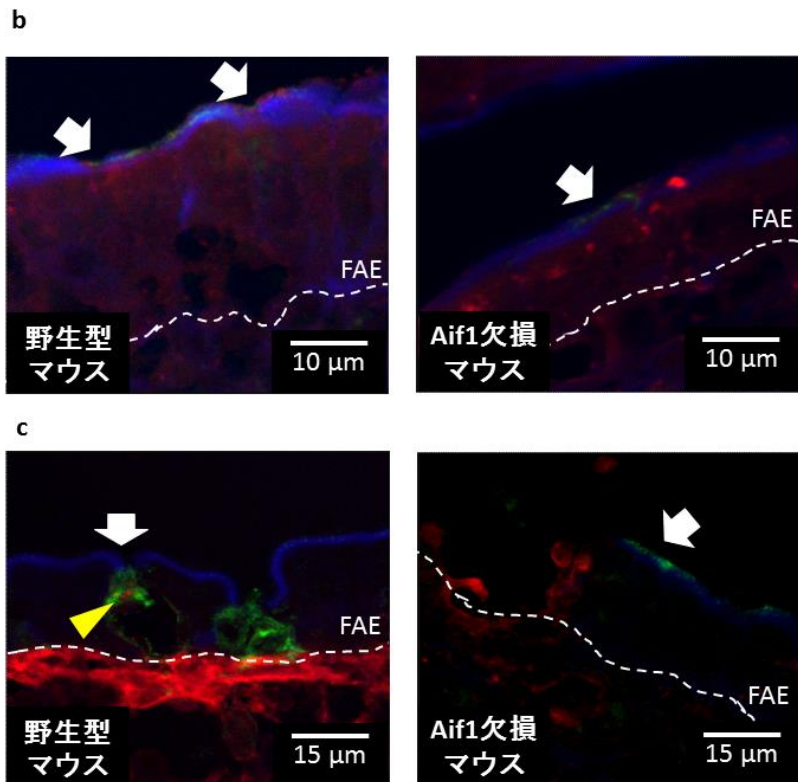


図 6. 野生型マウスと Aif1 欠損マウスの GP2 陽性 M 細胞における  $\beta 1$  インテグリンの発現の検討

- 野生型マウスと Aif1 欠損マウスの FAE における total  $\beta 1$  インテグリンの GAPDH に対する相対的 mRNA 発現量。n=3、統計は Student の  $t$  検定を行った。
- 野生型マウス (左図) と Aif1 欠損マウス (右図) の GP2 陽性 M 細胞における total  $\beta 1$  インテグリンの発現の検討、GP2 (緑色)、total  $\beta 1$  インテグリン (赤色)、F-actin (青色)、GP2 陽性 M 細胞 (白色の矢印)、白色の点線は FAE (白色の点線上部) と間葉組織 (白色の点線の下部)との境界を示す。
- 野生型マウス (左図) と Aif1 欠損マウス (右図) の GP2 陽性 M 細胞における active  $\beta 1$  インテグリンの発現の検討、GP2 (緑色)、active  $\beta 1$  インテグリン (赤色)、F-actin (青色)、GP2 陽性 M 細胞 (白色の矢印)、active  $\beta 1$  インテグリン (黄色の矢頭)、白色の点線は FAE (白色の点線上部) と間葉組織 (白色の点線の下部)との境界を示す。

#### <研究 4> エルシニア菌の取り込みには Aif1 を発現する骨髄由来細胞は関与しない。

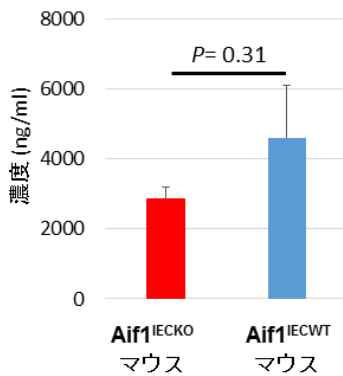
腸管における抗原取り込みには現在、二通りの経路が報告されている。一つは M 細胞を介する経路であり、もう一つが樹状細胞 (DC) 等による経路である。FAE 直下に存在する DC がその突起を腸管上皮細胞間から管腔側に伸ばすことで、管腔側に存在する病原微生物を取り込んでいるという報告がある<sup>15</sup>。Aif1 はもともとマクロファージに発現しているタンパク質だが、DC マーカーである CD11c 陽性細胞にも発現していることが、我々の実験で明らかになっている。このことから、Aif1 欠損マウスにおける抗原取り込み能の低下は、M 細胞における Aif1 の欠損が原因ではなく、マクロファージや DC 等の骨髄由来細胞における Aif1 の欠損が原因である可能性が示唆された。この仮定を踏まえて、9Gy の放射線を照射した Aif1 欠損マウスに Ly5.1 マウスの  $2 \times 10^7$  個の骨髄細胞を移植し、上皮特異的 Aif1 欠損マウス (上皮細胞 Aif1 欠損/骨髄細胞 Aif1 発現: Aif1<sup>IECKO</sup>) を作製した。また、9Gy の放射線を照射した Ly5.1 マウスに  $2 \times 10^7$  個の Aif1 欠損マウスの骨髄細胞を移植して、上皮特異的 Aif1 発現マウス (上皮細胞 Aif1 欠損/骨髄細胞 Aif1 発現: Aif1<sup>IECKO</sup>) を作製した。骨髄細胞が定着する移植から 8 週間後に、両群のマウスに週に 1 度  $1 \times 10^8$  c.f.u. に調整したエルシニア菌の経口投与を行い、これを 4 回行った。感染開始から 4 週間後に糞便を回収し、100 mg/ml になるように PBS にて懸濁した。遠心後上清を用いて ELISA にて解析を行った。結果、感染前後における糞便中 total IgA の産生量は上皮特異的 Aif1 欠損マウスと上皮特定貴 Aif1 発現マウス間で有意な差は認められなかった (図 7a、b)。しかし、糞便中エルシニア菌特異的 IgA の産生量は、上皮特異的 Aif1 欠損マウスに比べて、上皮特異的 Aif1 発現マウスにおいてその産生量が有意に増加していた (図 7c)。この結果より、M 細胞に発現する Aif1 がエルシニア菌の取り込みに寄与していることが明らかになった。



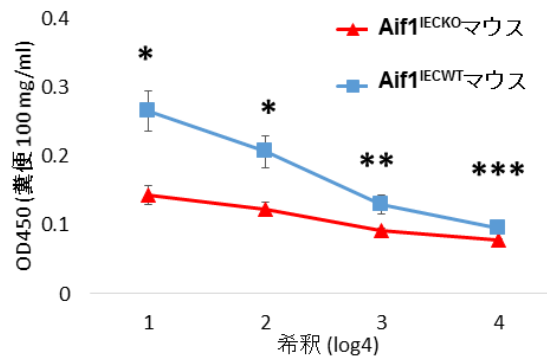
## ELISA

<b>Aif1<sup>IECWT</sup>マウス</b>	上皮(M細胞): Aif1発現 骨髄細胞: Aif1欠損
<b>Aif1<sup>IECKO</sup>マウス</b>	上皮(M細胞): Aif1欠損 骨髄細胞: Aif1発現

### a 感染前糞便中total IgA



### b 感染後糞便中エルシニア菌特異的IgA



### c 感染後糞便中total IgA

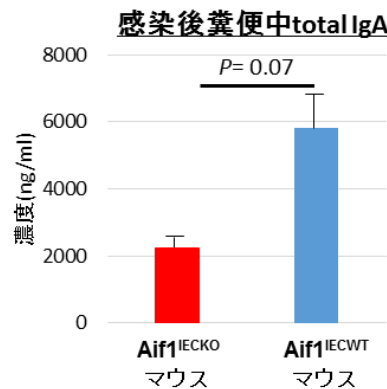


図 7. 骨髄移植マウスにおけるエルシニア菌感染前後の抗体産生量

糞便 100 mg を PBS 1 ml に懸濁し、遠心後その上清を用いて、ELISA にて解析を行った。

- エルシニア菌感染前糞便中 total IgA。
- エルシニア菌感染後糞便中 total IgA。
- エルシニア菌感染後の糞便中エルシニア菌特異的 IgA。

統計は Student の *t* 検定 (a、c)、Mann-Whitney の *U* 検定 (b) を行った (\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ )。

<研究 5> **Aif1 は Rac-Rho シグナリングを刺激することで、トランスサイトーシスを誘導する。**

Aif1 が実際に上皮細胞において Rac1 シグナリングを誘導する分子であるかどうかを、*in vitro* において Aif1 を強制発現させた MODE-K 細胞 (AIF1) と空ベクターを挿入した同細胞 (Ctrl) を回収し、RT-PCR 法により Aif1 の遺伝子発現量、さらに pull down assay を用いて活性化型 Rac1 発現の有無の解析を行った。real time-PCR 法の結果、Ctrl では *Aif1* は発現していないことが明らかになった (図 8a)。また、pull down assay を用いて、活性化型 Rac1 の発現を解析したところ、AIF1 には Ctrl より高く活性化型 Rac1 の発現を認められた (図 8b)。また、AIF1 における他の Rho ファミリーである RhoA (図 8c) や Cdc42 (図 8d) の活性化は、Ctrl と比べてほぼ同程度であった。この結果から、*Aif1* を発現する細胞は、外部刺激を受けずとも Rac1 を誘導し、その活性化を惹起することが明らかになった。

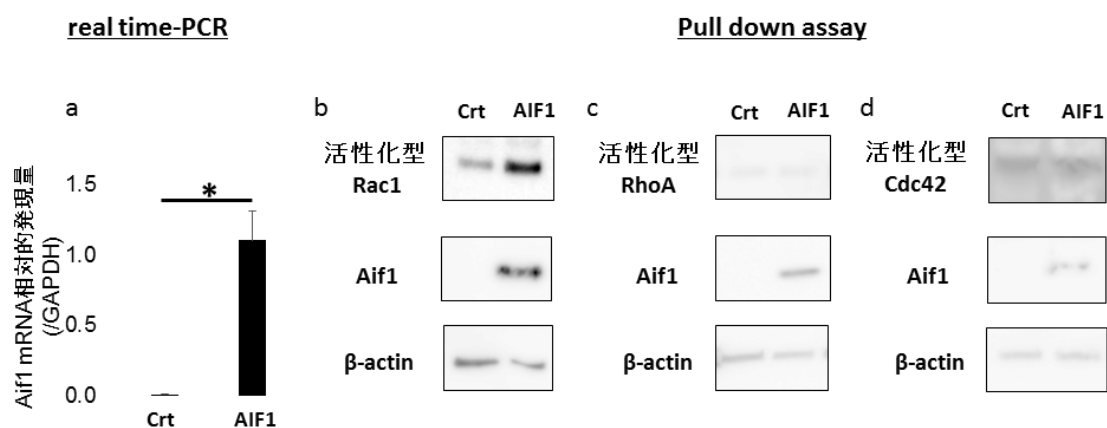


図 8. MODE-K 細胞への Aif1 の導入と発現と活性化型 Rac1 の発現

- MODE-K 細胞に挿入したそれぞれのベクター導入による Aif1 の GAPDH に対する相対的 mRNA 発現量。n=3、統計は Student の *t* 検定を用いた (\**P* < 0.05)。
- 活性化型 Rac1 の検出。2 回独立した実験を行った。
- 活性化型 RhoA の検出。2 回独立した実験を行った。
- 活性化型 Cdc42 の検出。2 回独立した実験を行った。

## 考 察

M 細胞はパイエル板に存在する少数の上皮細胞であり、抗原を自ら取り込む能力（トランスサイトーシス）に特化した腸管上皮細胞として知られているが<sup>1,2</sup>、M 細胞は、その数の極小さ、*in vitro* での培養の確立が未だなされていないことから、未だ不明な点が多い細胞でもある。近年パイエル板の陰窩に存在する *Lgr5* 陽性幹細胞が、*RANKL* から誘導される転写因子 *Spi-B* を発現することで、M 細胞へ分化することが報告された<sup>3, 16</sup>。*RANKL* (Receptor activator of  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  ligand) は TNF ファミリーに属するサイトカインであり、*RANK* (Receptor activator of  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ) は *RANKL* の受容体である。破骨細胞前駆細胞に発現する *RANK* と結合することで、破骨細胞への分化を誘導することが知られており、これに異常をきたすと、大理石病を発症することが報告されている。*RANKL* は、パイエル板の分化には関与しないが、*RANKL* を欠損するとその大きさが縮小してしまうことから、パイエル板の正常な発達には必要だという報告がある<sup>17</sup>。また、腸管上皮細胞は *FAE* を含めすべての上皮細胞が *RANK* を発現しており、*FAE* のみはその直下の間葉系細胞（樹状細胞等）から *RANKL* 刺激を受け、M 細胞へ分化すること、また絨毛 M 細胞に *RANKL* 刺激を行ったところ M 細胞様細胞の発現を認めたことから、M 細胞の発生には *RANKL-RANK* 刺激が必要であることが明らかになっている。一方で、*FAE* 直下に存在する *CCR6<sup>hi</sup>CD11c<sup>int</sup>B* 細胞が M 細胞の分化に寄与しているという報告もある<sup>18</sup>。これは、造血系細胞が *FAE* と *LT6* シグナリングを介して相互作用を引き起こし、*FAE* 特異的に *CCL20* の発現を誘導することで *CCR6<sup>hi</sup>CD11c<sup>int</sup>B* 細胞を *FAE* に遊走させる。これにより、直接もしくは間接的に未成熟な上皮細胞は M 細胞へと分化するというものである。このように M 細胞の発生に関しては二通りの機序が考察されており、未だ決着をみない。

*RANKL* 刺激を受けた絨毛の腸管上皮細胞は、分化初期に *Spi-B* を発現し、その後 *CCL9*、*M-sec*、*Sgnc-1*、*GP2* が発現する。また、*Spi-B* 非依存的に *Marckl1* や *annexin5* 等の発

現も上昇する。しかし、Spi-B 欠損マウスでは、M 細胞の特徴的な形態が消失し、サルモネラ菌やエルシニア菌、蛍光標識ビーズ等の抗原取り込み能が、野生型マウスに比較して有意に低下していることから、これらの Spi-B 非依存的分子は M 細胞の機能に関しては必ずしも必要ではないと考えられている<sup>3</sup>。しかし一方で、*in vitro* において、マウス小腸オルガノイド (mini gut system) を用いた実験では、RANKL 刺激で Spi-B、GP2 の発現が誘導されるが、Spi-B 単独の刺激では GP2 が誘導されなかったことから、RANKL 依存的で、Spi-B 非依存的に M 細胞の分化を制御する分子が存在することが示唆されている<sup>4</sup>。

現在では M 細胞成熟マーカーとして GP2 が用いられている。GP2 は GPI-アンカー型タンパク質の一つで、膵臓腺房細胞に限局して発現する機能未知の分子として同定された。GP2 は腸管において Spi-B 依存的に M 細胞特異的に発現し、サルモネラ菌や大腸菌などの I 型線毛に発現する外膜タンパク FimH を有する病原微生物を認識し、その取り込みを行っている<sup>5</sup>。しかし、エルシニア菌などの FimH を持たないグラム陰性菌の取り込みや、非病原性抗原である蛍光標識ビーズの取り込みなどに関しては、野生型マウスに比較し、GP2 欠損マウスでは差が認められないことから、GP2 以外の Spi-B ターゲット分子の存在が示唆された。

本研究では、そのターゲット分子探索のために、野生型マウスと Spi-B 欠損マウスの FAE に発現する遺伝子の発現量を DNA マイクロアレイ解析により検討を行い、候補分子の一つとして Allograft inflammatory factor 1 (Aif1) を同定した。Aif1 はマクロファージ等に発現し、ファゴサイトーシスに関与しているとされる分子であるが<sup>11</sup>、今回の研究で初めて上皮細胞系列にも発現していることが明らかになった。Aif1 は腸管上皮細胞において、M 細胞特異的に発現し、その発現は転写因子 Spi-B に依存している。しかし、Aif1 欠損マウスの M 細胞は野生型マウスのそれと比べて、形態的・数的変化に明らかな差を認めないことから、M 細胞の分化・成熟には関与していないと考えられた。また、野生型マウスパイエル板の FAE には、成熟 M 細胞マーカーである GP2 シングルポジティブ細胞と Aif1 シング

ルポジティブ細胞がそれぞれ存在することから、M細胞の機能・もしくは発達において、未熟なM細胞が存在することが示唆された。さらにAif1欠損マウスにおける取り込み能を、野生型マウスを用いて比較・検討したところ、Aif1欠損マウスでは、野生型マウスに比較して蛍光標識ビーズ、エルシニア菌の取り込み能が有意に低下していたことから、Aif1はGP2と同様に、M細胞の抗原取り込み能に寄与していることが示唆された。また、サルモネラ菌の取り込みには外膜タンパクであるFimHをM細胞に発現するGP2が認識することで、取り込みが行われているが、Aif1欠損マウスでは、野生型マウスと比較してもGP2陽性M細胞の数的変化を認められなかったこと、サルモネラ菌の取り込み量に有意な差が認められなかったことから、Aif1の発現はGP2の発現に関与しないこと、またAif1が引き起すメンブレンラッフリングは病原性細菌の取り込みには関与しないことが示唆された。

#### 蛍光 *in situ* hybridization

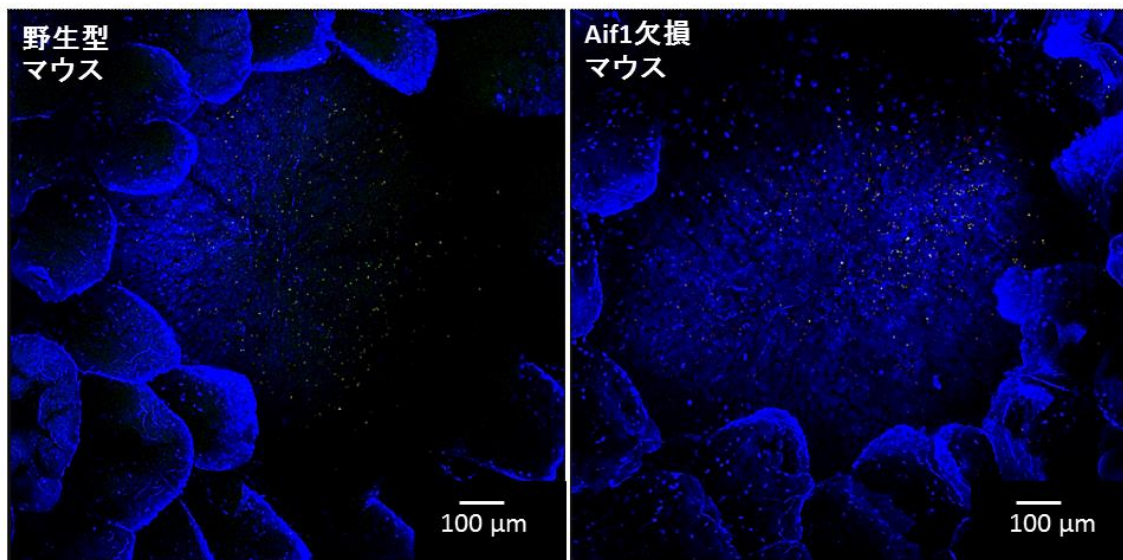


図9. 野生型マウスとAif1欠損マウスパイエル板内における *Alcaligenes spp.*の有無  
*Alcaligenes and Bordetella* (ALBO: 赤色)、*Alcaligenes, Burkholderia, and Comamonas*  
(BPA: 緑色)、WGA (青色)。Aif1欠損マウスパイエル板にも同様に *Alcaligenes spp.*が生息している。独立した実験を3回行った (n=3)。

また、エルシニア菌などの抗原取り込み能に有意差があったことから、腸内細菌の取り込みにも関与している可能性が示唆された。*Alcaligenes spp.*はパイエル板内に生息する共生細菌であり、近年その存在が明らかになった<sup>19</sup>。*Alcaligenes spp.*は、M細胞を介してパイエル板内へ侵入していることが明らかになってはいるが、M細胞がほとんど消失する Spi-B 欠損マウスのパイエル板内に生息する *Alcaligenes spp.*の数は野生型マウスと比較しても、有意な差を認めないという報告があることから<sup>4</sup>、病原微生物の取り込みには Spi-B 依存的、腸内細菌等の共生細菌の取り込みには Spi-B 非依存的、もしくは M 細胞非依存的経路が存在することが示唆されている。この報告から、Aif1 欠損マウスのパイエル板内の *Alcaligenes spp.*の有無を野生型マウスと比較したところ、Aif1 欠損マウスのパイエル板内にも *Alcaligenes spp.*の存在を確認したことから、Aif1 は共生細菌の取り込みには関与していないことが示唆された。(図 9)。

さらに Aif1 に変異を持つミクログリア細胞株は、変異を含まないものと比べ、抗原を取り込むファゴサイトーシスにおいてメンブレンラッピングが惹起されないことが報告されている<sup>11</sup>。メンブレンラッピングは、低分子量 GTP アーゼの一つであり、Rho ファミリーに属する Rac1 によって制御されている。Aif1 に変異があると、Rac1 からのシグナルが脆弱化もしくは消失するため、メンブレンラッピングは惹起されないことが判明している<sup>11, 20</sup>。メンブレンラッピングの機序は、インテグリンが細胞外から受けた刺激により、接着斑キナーゼ (FAK: Focal Adhesion Kinase) や Src キナーゼが活性化される。さらにその下流にシグナルが伝達され、Rac1 が活性化されることで、アクチンのリモデリングを介してメンブレンラッピングが誘導される<sup>21</sup>。Rac1 の不活性化、活性化に関わる因子として、それぞれ GAPs (GTPase-activating proteins) と GEFs (guanine-exchange factors)が知られているが、Aif1 はどちらの報告にもない分子である。さらに、Aif1 がインテグリンカスケードに関与しているという報告も未だなく、M 細胞特異的な機序であることも考えられた。

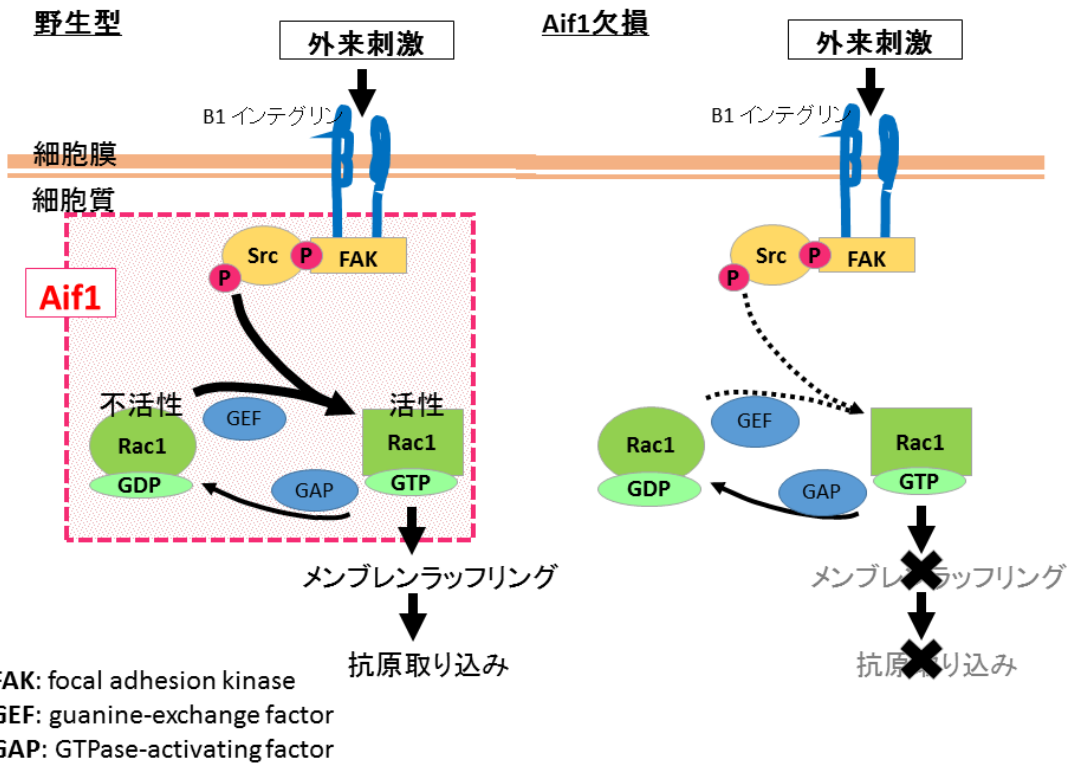


図 10. Aif1 は  $\beta 1$  インテグリンの活性化と Rac1 シグナリングを介して M 細胞の抗原取り込み能に寄与する

本研究では、Aif1 が腸管上皮細胞の中で M 細胞特異的に発現しており、M 細胞において  $\beta 1$  インテグリンを活性化することでエルシニア菌の取り込みに寄与し、また Rac1 シグナリングを惹起することで M 細胞の抗原取り込み能に関与していることを明らかにした (図 10)。

抗原取り込みに寄与する M 細胞を標的とした分子が解明されることで、M 細胞を介した経粘膜ワクチンの基盤確立が期待され、侵襲性の低い治療法の開発の一手となりうることが期待される。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導を頂きました清野宏教授ならびに中村誠司教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導頂きました佐藤慎太郎助教に深謝致します。最後に、常に励ましの言葉を頂きました東京大学医科学研究所炎症免疫学分野ならびに九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野の皆様に深く感謝致します。



## 参 考 文 献

1. Owen, R.L. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches--a personal and historical perspective. *Semin Immunol* **11**, 157-163 (1999).
2. Kraehenbuhl, J.P. & Neutra, M.R. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 301-332 (2000).
3. Kanaya, T. *et al.* The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat Immunol* **13**, 729-736 (2012).
4. Sato, S. *et al.* Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol* **6**, 838-846 (2013).
5. Hase, K. *et al.* Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* **462**, 226-230 (2009).
6. Clark, M.A., Hirst, B.H. & Jepson, M.A. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of Yersinia pseudotuberculosis to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* **66**, 1237-1243 (1998).
7. Isberg, R.R. & Leong, J.M. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**, 861-871 (1990).
8. Ito, D. *et al.* Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* **57**, 1-9 (1998).
9. Ohsawa, K., Imai, Y., Nakajima, K. & Kohsaka, S. Generation and characterization of a microglial cell line, MG5, derived from a p53-deficient mouse. *Glia* **21**, 285-298 (1997).
10. Imai, Y., Ibata, I., Ito, D., Ohsawa, K. & Kohsaka, S. A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* **224**, 855-862 (1996).

11. Ohsawa, K., Imai, Y., Kanazawa, H., Sasaki, Y. & Kohsaka, S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* **113** ( Pt **17**), 3073-3084 (2000).
12. Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y. & Kohsaka, S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* **88**, 844-856 (2004).
13. Kanazawa, H., Ohsawa, K., Sasaki, Y., Kohsaka, S. & Imai, Y. Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma -dependent pathway. *J Biol Chem* **277**, 20026-20032 (2002).
14. Arjonen, A., Alanko, J., Veltel, S. & Ivaska, J. Distinct recycling of active and inactive  $\beta$ 1 integrins. *Traffic* **13**, 610-625 (2012).
15. Niess, J.H. *et al.* CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* **307**, 254-258 (2005).
16. de Lau, W. *et al.* Peyer's patch M cells derived from Lgr5(+) stem cells require SpiB and are induced by RankL in cultured "miniguts". *Mol Cell Biol* **32**, 3639-3647 (2012).
17. Knoop, K.A. *et al.* RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol* **183**, 5738-5747 (2009).
18. Ebisawa, M. *et al.* CCR6hiCD11c(int) B cells promote M-cell differentiation in Peyer's patch. *Int Immunol* **23**, 261-269 (2011).
19. Obata, T. *et al.* Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7419-7424 (2010).
20. Autieri, M.V., Kelemen, S.E. & Wendt, K.W. AIF-1 is an actin-polymerizing and

Rac1-activating protein that promotes vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res* **92**, 1107-1114 (2003).

21. Berrier, A.L., Martinez, R., Bokoch, G.M. & LaFlamme, S.E. The integrin beta tail is required and sufficient to regulate adhesion signaling to Rac1. *J Cell Sci* **115**, 4285-4291 (2002).