

受賞講演 2

M細胞の分化を制御する遺伝子の発見とM細胞欠損マウスを用いた腸管免疫応答の評価

金谷高史

独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター

体外環境との境界をなす腸管粘膜上皮には、食物の摂取に伴い様々な外来性の抗原が侵入してくる。この中には生体にとって有害な細菌やウイルスも含まれていることから、腸管粘膜は常に感染症の危険に曝されているといえる。これらの外来抗原に対する防御システムを備えるため、腸管にはパイエル板をはじめとする免疫組織が発達している。パイエル板を覆う上皮細胞層には、M細胞と呼ばれる特殊な腸管上皮細胞が点在している。M細胞の役割は腸管内の抗原を取り込み、パイエル板の免疫担当細胞に抗原を供給することであり、腸管における抗原特異的な免疫応答に重要であるとされる。

これまでM細胞を欠損するモデル動物は存在しなかったため、生体内におけるM細胞の重要性を実証することは困難であった。本研究ではM細胞欠損マウスを用いた実験系を確立するため、M細胞の分化を制御するマスター遺伝子の探索を行った。これまでに複数のM細胞特異的に発現する遺伝子が発見されているが、分化に関与する遺伝子は同定されていなかった。これはM細胞の分化を経時的に観察するための有効な手段がなかったからである。近年、サイトカインの一種であるRANKLをマウスへ投与すると、通常M細胞が存在しない絨毛にM細胞が誘導されることが報告された。この現象を活用し、M細胞の分化段階を詳細に解析したところ、Etsファミリー転写因子の一つであるSpi-BがM細胞に発現することを見出した。Spi-B欠損マウスではM細胞が完全に消失していたことから、*Spib*がM細胞分化のマスター遺伝子であることが証明された。Spi-B欠損マウスに*Salmonella enterica* serovar Typhimurium（ネズミチフス菌）を経口感染させたところ、パイエル板への取り込みが大幅に減少することが観察された。このパイエル板への抗原取り込みの減少が、実際に免疫応答を阻害するかどうかを評価した。野生型およびSpi-B欠損マウスに、ネズミチフス菌を認識して活性化するT細胞（SM1-T細胞）を移入した後に、ネズミチフス菌を経口感染させてパイエル板でのSM1-T細胞の活性化を観察した。その結果、野生型マウスと比較してSpi-B欠損マウスではSM1-T細胞の活性化が低下することが明らかとなった。この発見により、Spi-B欠損マウスをM細胞欠損モデルマウスとして用いることが可能となった。

The identification of master regulator for M-cell differentiation and the evaluation of mucosal immune response in M-cell-deficient mice

Takashi Kanaya

RIKEN Center for Integrative Medical Sciences

The mucosal surface of the mammalian gut is continuously exposed to a variety of foreign proteins and microorganisms, some of which are potentially harmful for the host. To protect from these dangers, the intestinal mucosa has evolved specialized organized lymphoid tissues such as Peyer's patches (PPs), the inductive site for intestinal immunity. Because PPs lack afferent lymphatics, they directly sample intestinal luminal antigens across the epithelial barrier to initiate immune responses. This task is accomplished by specialized epithelial cells within the follicle-associated epithelium covering the lymphoid follicles of PPs known as M cells. M cells possess a high capacity for transcytosis, which allows the rapid transport of antigens to underlying lymphoid tissues and subsequent antigen-specific immune responses. Thus, M-cell-mediated antigen transport is important for the initiation of mucosal immune responses; however, the mechanisms of M-cell differentiation are poorly understood because of the rarity of these cells. Recently, exogenous treatment of mice with receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), which is one of tumor necrosis factor superfamily cytokines, was identified as a strong inducible factor of ectopic M-cell differentiation in the villous epithelium of small intestine. Therefore, we took advantages of RANKL treatment to understand M-cell differentiation. Firstly, we examined the expression of multiple M-cell markers (Marcksl1, CCL9 and GP2) upon RANKL treatment, and found that M-cell markers exhibited distinct expression patterns. The localization of these M-cell markers in crypt-villus axis after RANKL treatment indicates that Marcksl1 expression begins at an early stage of M-cell differentiation, whereas expression of CCL9 and GP2 requires further maturation. On the basis of these findings, we propose that *in vivo* RANKL treatment is a powerful experimental tool for tracing the individual steps of M-cell differentiation. Next we attempted to identify M-cell lineage-specific transcription factors expressed early in M-cell differentiation by examining whole gene expression profile during RANKL administration. As a result, we identified that Spi-B, an Ets family transcription factor, was highly upregulated shortly after RANKL treatment. Its expression was clearly observed in the nuclei of GP2-positive M cells, indicating the substantial role of Spi-B in M-cell differentiation. To determine the role of Spi-B in M-cell differentiation, we examined *SpiB*^{-/-} mice. *SpiB*^{-/-} mice lacked GP2-positive M cells, whereas Marcksl1-expressing cells were remained in *SpiB*^{-/-} mice. Considering the expression of GP2 in mature M cells, *SpiB*^{-/-} mice were hypothesized to have defect in M-cell function. To assess this possibility, we investigated the transcytosis of antigens in PPs of *SpiB*^{-/-} mice by orally administrating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*). As expected, we found that translocation of *S. Typhimurium* was markedly decreased in PPs of *SpiB*^{-/-} mice compared with that of wild-type mice. Consistent with the defect in transcytotic capability, *S. Typhimurium*-specific T-cell activation was severely impaired in *SpiB*^{-/-} mice. Taken together, we conclude that Spi-B is a master regulator of M-cell differentiation and *SpiB*^{-/-} mice can be used for elucidating the physiological and pathological functions of M cells.