

## 「インフルエンザ感染における呼吸器 M 細胞の役割」

慶應義塾大学 薬学部 准教授

木村 俊介

## 要旨

M 細胞は腸管のパイエル板濾胞上皮に存在し管腔内抗原を取込み、抗原提示細胞へと受け渡すことで粘膜免疫応答の開始に働く上皮細胞である。M 細胞からの抗原取込みは腸粘膜における特異的 IgA 抗体の産生に寄与し、生体防御に重要な役割を果たす。

気管・気管支は腸管と同じ管腔状の粘膜組織であり、空気中の異物が侵入しやすい。一方で、パイエル板のような粘膜リンパ組織は存在せず、感染症などにより後天的に気管支随伴リンパ組織が誘導される (iBALT)。恒常的なリンパ性器官が無いこの部位の免疫誘導機構には不明な点が多く、M 細胞の存在も不明であった。申請者は正常マウスの気管上皮に少数の M 細胞が存在すること、そしてインフルエンザ感染モデルにおいて iBALT 濾胞上皮に多数の M 細胞を認めた。

本研究では呼吸器 M 細胞の前駆細胞を明らかにし、そして呼吸器特異的 M 細胞欠損マウスの作製に成功した。M 細胞欠損マウスでは、インフルエンザ感染による体重変化などの主要な表現型において大きな影響は認められなかった。一方で、縦隔リンパ節におけるリンパ球構成において変化が認められた。これは、M 細胞が感染時の免疫応答に関与することを示す成果である。

## 背景・目的

呼吸器や消化器は多くの外来抗原や微生物と接する。これらの異物に対する個体防御のため、粘膜組織は高度な免疫システムを備え、生体恒常性の維持に貢献する。粘膜免疫システムの誘導装置として機能するパイエル板などのリンパ組織は、絶えず外来抗原をモニターし抗原特異的 IgA の産生を行う。こうした免疫監視が正常に機能するためには粘膜上の抗原が上皮を越えて、リンパ濾胞に取り込まれる必要がある。そのためリンパ濾胞を覆う濾胞上皮には M 細胞と呼ばれる特殊な上皮細胞が存在し、粘膜面に存在する抗原を取込み、トランスサイトシス経路を通して上皮下の樹状細胞に受け渡す役割を担う [1,2]。

M 細胞の抗原取込みはリンパ濾胞の成熟、腸粘膜における特異的 IgA 抗体の産生に寄与し、感染性細菌に対する生体防御、常在菌叢の制御などの恒常性維持に重要な役割を果たす。一方で、M 細胞は物質の取り込みに特化した構造を取るため、物理的バリアが比較的弱く異物の侵入口となる。これまでに、ウイルス、細菌、異常プリオンタンパク質、毒素などが M 細胞から体内へと侵入することが報告されている [2]。

つまり、M 細胞は粘膜免疫応答を活性化させる一方で、異物の侵入口ともなる両面性を持つ細胞である [3]。腸管 M 細胞では感染、免疫応答における役割が明らかになりつつあるが、呼吸器での役割には不明な点が多い。本研究では、呼吸器 M 細胞欠損マウスを作製し、インフルエンザウイルス感染における M 細胞の役割を明らかにすることを目的とした。

## 方法

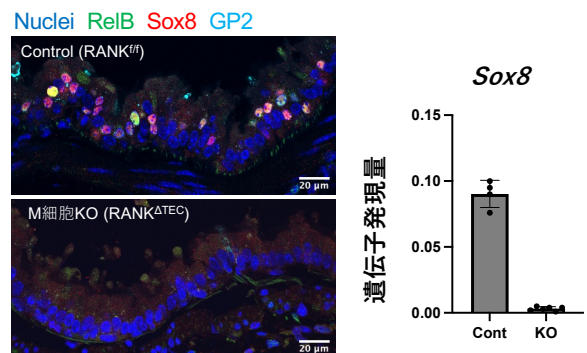
呼吸器 M 細胞の分化には Tnf スーパーファミリーの RANKL が必須であることが明らかになっている [4]。そこで、呼吸器において RANKL の受容体 RANK を欠損するマウス RANK<sup>ΔTEC</sup> を作製した。本マウスにおける M 細胞欠損をリコンビナント RANKL 投与とインフルエンザ感染によって確認した。さらに、インフルエンザ感染

大腸菌 BL21(DE3)へと pGEX4T-2 mRANKL を形質転換し、0.1 mM IPTG 添加後、25°C 16 時間の振盪培養によってリコンビナント GST-RANKL を発現させ、GST-Accept により精製した。精製後の GST-RANKL は PBS により透析後、1 日 1 回 10 μg/g マウスへと腹腔内投与を 3 日間行い、4 日目に過剰量のイソフルランによって安楽死させ、肺を摘出し、4% パラホルムアルデヒドにより固定後、凍結組織切片を作製し、anti-Sox8 antibody [5], anti-RelB antibody [6], anti-GP2 antibody [7]を用いて M 細胞の免疫組織染色を行った。インフルエンザウイルス感染は 50 PFU の PR8 株 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) を経気管投与により感染させ、14 日後に安楽死後、肺を摘出、M 細胞の免疫染色を行った。また、未固定の肺から RNA を抽出し、定量的 PCR 法により Sox8 の mRNA 発現量を測定した。同様に感染後の肺組織、縦隔リンパ節を回収し、フローサイトメトリーによる免疫細胞の解析を行った。

## 結果

RANK<sup>ΔTEC</sup> とコントロール RANK<sup>flox/flox</sup> マウスへと GST-RANKL を投与し、免疫染色を行った結果、RANK<sup>flox/flox</sup> マウスでは RANKL の投与により気管から気管支の上皮において Tnfaip2, Sox8, GP2 陽性となる M 細胞の誘導が認められた。一方で、RANK<sup>ΔTEC</sup> マウスにおいては M 細胞の誘導は認められなかった。さらに、インフルエンザ感染においても同様に RANK<sup>ΔTEC</sup> マウスでの M 細胞は顕著に数が減少していた (図 1)。

インフルエンザ感染後のマウス肺のフローサイトメトリー解析では、縦隔リンパ節において、インフルエンザ特異的 CD4 陽性 T 細胞、メモリー T 細胞の減少が認められた。



## 考察

気管上皮特異的 RANK 欠損マウスでは RANKL 投与による M 細胞の誘導が抑制された。これはインフルエンザ感染においても同様であった。この結果は RANKL-RANK シグナルがインフルエンザ感染における M 細胞の誘導にも必要であることを示している。今後インフルエンザ感染において RANKL を発現する細胞を同定することで、呼吸器 M 細胞を誘導する細胞を明らかにしていくことで、感染における M 細胞誘導機構の理解につながる。本研究では M 細胞欠損マウスにおいてインフルエンザ感染における CD4 T 細胞の減少が認められた。これはインフルエンザ感染における免疫応答に M 細胞が関与している可能性を示す。一方で、インフルエンザ特異的抗体、感染後の体重減少には顕著な差は認められなかった。今後さらなる解析を進め呼吸器 M 細胞の機能を明らかにしていく必要がある。

## 共同研究者

該当なし

## 引用論文

- [1] Kimura S., Molecular insights into the mechanisms of M-cell differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues. *Anat Sci Int.* 93:23-34, 2018
- [2] Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A., Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* 6:666-77, 2013
- [3] 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. *Nat commun.*, 11:234, 2020
- [4] Kimura S, Mutoh M, Hisamoto M, Saito H, Takahashi S, Asakura T, Ishii M, Nakamura Y, Iida J, Hase K, Iwanaga T. Airway M Cells Arise in the Lower Airway Due to RANKL Signaling and Reside in the Bronchiolar Epithelium Associated With iBALT in Murine Models of Respiratory Disease. *Front Immunol.* 10:1323, 2019
- [5] Kimura S, Kobayashi N, Nakamura Y, Kanaya T, Takahashi D, Fujiki R, Mutoh M, Obata Y, Iwanaga T, Nakagawa T, Kato N, Sato S, Kaisho T, Ohno H, and \*Hase K., Sox8 is essential for M-cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice. *J Exp Med* 216(4): 831-846, 2019
- [6] Kimura S, Yamakami-Kimura M, Obata Y, Hase K, Kitamura H, Ohno H and Iwanaga T. Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches. *Mucosal Immunol.* 8: 650–660, 2015
- [7] 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, and Ohno H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462:226-30, 2009

## 助成研究に関連した発表論文

該当なし