

	こばやし のぶひで
氏名	小林 伸英
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲第 5036号
学位授与の日付	平成31年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Sox8による腸管M細胞の分化調節機構とその免疫学的意義の解明
論文審査委員	(主査) 長谷 耕二 教授(博士(薬学)) (副査) 有田 誠 教授(博士(薬学)) 多胡 めぐみ 准教授(博士(薬学))

論文内容の要旨

【背景】

哺乳類の腸管粘膜には膨大な共生細菌叢が存在し、同時に食事由来の抗原や病原体を含む外来微生物に常に暴露されている。そのため、腸管には腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphatic tissue: GALT) と呼ばれる独自の粘膜免疫系が発達し、分泌型 immunoglobulin (Ig) A の産生といった粘膜免疫応答により腸管恒常性を維持している。GALT の特徴の一つは外来抗原の積極的な取り込みである。M (Microfold) 細胞はパイエル板などのリンパ濾胞を覆う上皮層に存在する、抗原取り込みに特化した特殊な上皮細胞である。M 細胞は頂端膜側から取り込んだ抗原を基底膜側から排出し、直下の抗原提示細胞へと引き渡す抗原トランスサイトシスと呼ばれる機能を持つ。これにより、T 細胞依存的な粘膜免疫応答が開始される。M 細胞を欠損したマウスでは腸管における分泌型 IgA 産生や抗原特異的な免疫応答が減弱する。したがって、M 細胞は粘膜面の免疫監視および免疫応答の誘導に重要な役割を果たしていると考えられる。

M 細胞は他の全ての腸上皮細胞と同様に、腸の陰窩深部に存在する腸上皮幹細胞から分化する。M 細胞の分化開始には receptor of NF- κ B ligand (RANKL) シグナルが重要な役割を果たしている。パイエル板上皮直下の領域には RANKL を発現する特殊な間質細胞である M-cell inducer (MCi) 細胞が存在し、M 細胞の分化を誘導している。RANK シグナルの下流では、古典的 (RelA/p50) および非古典的 (RelB/p52) な nuclear factor- κ B (NF- κ B) 経路が活性化する。非古典的経路の転写因子である RelB/p52 は、M 細胞の分化に必須の役割を果たす Ets ファミリー転写因子である Spi-B の発現を直接誘導する。

Spi-B 欠損マウスでは M 細胞が消失する。一方で、*SpiB* を腸上皮細胞に強制発現させても成熟 M 細胞マーカーである glycoprotein (GP) 2 の発現を誘導することはできない。このことから、Spi-B は M 細胞の分化成熟に必須であるものの十分ではなく、その過程には Spi-B 以外の未知の転写因子が介在することが予想されてきた。

申請者は過去に行われた M 細胞のトランスクリプトーム情報の再解析から、M細胞

に高発現する転写因子として、Sry-type high-mobility-group box (SOX)ファミリー転写因子である Sox8 を同定した。SOX ファミリー転写因子は哺乳類の発生過程において重要な役割を果たすことが知られているが、これまで腸管における Sox8 の発現や機能に関する報告は認められない。そこで本博士論文研究において申請者は、Sox8 が M 細胞分化制御に関与する可能性を検証するとともに、M 細胞を介した粘膜免疫応答への寄与を検討した。

【方法】

パイエル板上皮の単離および解析

EDTA 処理によってパイエル板の単層上皮を剥離した。遺伝子発現は qPCR および RNA sequencing、タンパク質の発現は蛍光免疫染色によって解析した。

フローサイトメトリー

マウスパイエル板を取得し、collagenase および DNase I により細胞を分散した。Fc 受容体をブロッキングした後、蛍光標識抗体を用いて細胞表面抗原を染色した。細胞内抗原を染色する場合には固定・膜透過処理を行った後、蛍光標識抗体による染色を行った。染色した細胞の解析には LSR II Flow Cytometer または FACS Aria III を用いた。

M 細胞の機能評価

パイエル板への抗原取り込みは蛍光標識ビーズまたは *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) Δ *aroA* 株を経口投与し、取り込まれたビーズの個数または組織懸濁液の菌体数を測定することで解析した。糞便または血清中の IgA および IgG は ELISA によって測定した。

オルガノイド培養

マウスから小腸オルガノイドを樹立し、200 ng/mL RANKL 存在下で 3 日間培養することで M 細胞を誘導した。オルガノイドへの遺伝子導入はレンチウイルスベクターを用いた。

転写制御機構の解析

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) アッセイでは、十分量の M 細胞を得るために、GST-RANKL リコンビナント蛋白質を野生型マウスに 3 日間腹腔内投与することにより絨毛上皮に異所的に誘導した M 細胞を用いた。ネガティブコントロールとして GST 蛋白質をマウスに投与した。M 細胞を含む小腸上皮を剥離し、RelB または Sox8 に対する抗体を用いて ChIP アッセイを行なった。Gp2 プロモーター領域の転写活性化は、Gp2 上流 2.5 kbp をクローニングしたルシフェラーゼレポータープラスミドを上皮細胞株に導入することで解析した。

【結果】

1. Sox8 はパイエル板上皮で M 細胞特異的に発現する

qPCR によってパイエル板上皮と絨毛上皮における *Sox8* の遺伝子発現を比較したところ、パイエル板上皮で *Sox8* が高発現することが確認された。マウスに GST-RANKL を腹腔内投与することによって M 細胞を絨毛上皮に異所的に誘導したところ、GST-RANKL 投与群において *Sox8* の発現上昇が認められた。*Sox8*⁺細胞の局在を検討したところ、*Sox8*⁺細胞は M 細胞マーカーの一つである *Tnfrsf25*⁺細胞と共局在していた。以上の結果から、*Sox8* はパイエル板上皮で M 細胞特異的に発現することが明らかになった。

パイエル板上皮のホールマウント蛍光免疫染色および定量イメージサイトメトリーによって、M 細胞の分化段階を詳細に解析した結果、*Sox8* は未熟 (GP2⁻) M 細胞と成熟 (GP2⁺) M 細胞の両方で同等に発現が認められた。

2. *Sox8* は M 細胞の成熟に必須の因子である

Sox8 遺伝子を欠損したマウス (*Sox8*^{-/-}マウス) のパイエル板を解析したところ、成熟 M 細胞マーカーである GP2⁺細胞が野生型 (*Sox8*^{+/+}) マウスに比べ顕著に減少していた。次に、パイエル板上皮の遺伝子発現を qPCR によって比較したところ、*Sox8*^{-/-}マウスでは *Gp2* の発現が顕著に減少していたほか、複数の M 細胞関連遺伝子が減少していた。*Sox8*^{-/-}マウスにおける、*Tnfrsf25*⁺ および *Spi-B*⁺ 未熟 M 細胞の減少は僅かであることから、*Sox8* は M 細胞の成熟に寄与すると考えられた。

GP2⁺ の成熟 M 細胞は未熟 M 細胞と比較し、蛍光標識ビーズの高い取り込み能を有する。また、GP2 は *S. Typhimurium* などの取り込み受容体として機能する。そこで、*Sox8* 欠損による M 細胞の機能的な影響を評価するため、蛍光標識ビーズおよび *S. Typhimurium* をマウスに経口投与し、パイエル板への取り込み量を解析した。その結果、*Sox8*^{-/-}マウスではビーズおよび菌体の取り込み量が顕著に減少していた。以上の結果から、*Sox8* は M 細胞の機能的な成熟に必須の因子であることが明らかとなった。

今回用いた *Sox8*^{-/-}マウスは全身で *Sox8* を欠損しているため、MCi 細胞など他の細胞を介して M 細胞の分化に影響を与えている可能性がある。そこで、*Sox8*^{-/-}マウスのパイエル板における RANKL の発現量を解析したところ、野生型と比較して差はみられなかった。また、パイエル板上皮における *RelB*⁺ 細胞の分布も野生型と同様であった。このことから、*Sox8*^{-/-}マウスにおいても RANKL-*RelB* シグナルは正常に伝達していると考えられた。さらに、小腸上皮オルガノイドを用いて RANKL 刺激による M 細胞への分化能を検討したところ、*in vivo* における観察結果と同様に、*Sox8* 欠損によって GP2⁺ 細胞および M 細胞関連遺伝子の発現が減少していた。小腸オルガノイドは上皮細胞以外を含まないことから、上皮性の *Sox8* が M 細胞の成熟に重要であることを確認した。

3. *Sox8*^{-/-}マウスでは IgA 応答が遅延する

Sox8^{-/-}マウスのパイエル板を組織染色によって解析したところ、リンパ濾胞のサイズ

が野生型に比べ縮小しており、胚中心 B 細胞領域の縮小も観察された。さらに、パイエル板に存在する免疫細胞をフローサイトメトリーにより解析したところ、離乳直後の若齢（4 週齢）*Sox8*^{-/-}マウスのパイエル板では、胚中心反応を促進する T follicular helper (Tfh)細胞、胚中心(Germinal center: GC) B 細胞、および IgA⁺ B 細胞が有意に減少していた。一方で、6 週齢の *Sox8*^{-/-}マウスでは野生型マウスと比べて有意な差は見られなかった。また、4 週齢マウスにおける腸間膜リンパ節、脾臓、胸腺の免疫細胞の構成はほぼ野生型と同等であった。

次に、糞便中の分泌型 IgA 量を ELISA によって解析したところ、*Sox8*^{-/-}マウスでは 4 週齢で IgA 量が有意に減少していた。同様に、*Sox8*^{-/-}マウスでは腸内細菌特異的な IgA の割合も、4 週齢において有意に減少していた。これらの免疫異常は、いずれも 6 週齢以降の *Sox8*^{-/-}マウスでは検出されなかったことから、*Sox8* 依存的に誘導される M 細胞は離乳後の若齢期における粘膜免疫系の成熟を促進することが示唆された。さらに、抗原特異的な IgA 応答を検討するため、破傷風トキソイド (tetanus toxoid: TT) の fragment C を発現する組み換え *S. Typhimurium* (r*Salmonella*-ToxC)をマウスに経口感染させたところ、*Sox8*^{-/-}マウスでは TT 特異的な血清中 IgG 値の誘導が遅延する傾向が見られた。

4. 非古典的 NF-κB 経路が *Sox8* の発現を制御する

M 細胞分化に必須の転写因子である *Spi-B* の欠損マウスを解析したところ、*Spib*^{-/-}マウスのパイエル板上皮でも *Sox8* の発現は残存していた。*Sox8* の発現を誘導する転写因子を明らかにするため、オルガノイドにレンチウイルスベクターを用いて RelA/p50、RelB/p52 および *Spib* を導入した。その結果、RelB/p52 を導入した場合のみ、*Sox8* の発現が誘導された。さらに、抗 RelB 抗体を用いた ChIP assay を行なったところ GST-RANKL によって M 細胞を誘導した群で *Sox8* のプロモーター領域における RelB の結合が有意に増加していた。以上の結果から、非古典的 NF-κB 経路が M 細胞における *Sox8* の発現を誘導していると考えられた。

5. *Sox8* は *Gp2* の発現を直接制御する

Sox8 および *Spi-B* が制御する遺伝子を明らかにするため、*Sox8*^{-/-}マウスおよび *Spib*^{-/-}マウスのパイエル板上皮におけるトランスクリプトームを RNA-Seq 法によって網羅的に解析した。その結果、*Sox8* または *Spi-B* の欠損によりそれぞれ 114 または 359 個の遺伝子の発現が野生型と比べて有意に減少し、このうち共通して減少する遺伝子は 41 個であった。野生型と比べて 2 倍以上の減少が見られた遺伝子に絞ったところ、*Gp2* を含む 17 個の遺伝子が得られた。

Sox8 は *Gp2* の発現を直接制御していると仮説を立て、*Gp2* のプロモーター領域に対するレポーターアッセイを行なった。その結果、*Sox8* の強制発現により *Gp2* のプロモーター活性が顕著に上昇した。一方で、*Spib* による *Gp2* プロモーターの活性化は見ら

れなかった。さらに、抗 Sox8 抗体を用いて、ChIP assay を行なった結果、M 細胞を誘導した群で *Gp2* のプロモーター領域における Sox8 の結合活性が有意に上昇していた。以上の結果から、Sox8 は *Gp2* のプロモーター領域に直接結合し、その転写活性を増強することが明らかとなった。

【考察】

本研究では M 細胞の分化成熟に寄与する転写因子として新たに Sox8 を同定した。Sox8 は SOX ファミリー転写因子のうち、Sox9、Sox10 を含む SOXE サブグループに属する。Sox8 は主に精巣と脳に発現が見られる。*Sox8*^{-/-}マウスは精巣セルトリ細胞の分化不全により、雄性不妊となる。また、脳における Sox8 の機能は、Sox9 または Sox10 と代償的であり、*Sox8*^{-/-}マウスに脳神経系の目立った表現型はない。一方、Sox8 が腸上皮系細胞に発現するという報告はなく、本研究によって初めてパイエル板 M 細胞での発現が明らかとなった。

M 細胞の初期分化を誘導する RANKL シグナルは非古典的 NF-κB 経路を活性化し、転写因子 RelB と p52 のヘテロダイマーが核内に移行し、転写を制御する。M 細胞分化に必須の転写因子である Spi-B は、RelB/p52 によって直接制御を受けていることが報告されている。Spi-B の場合と同様に、RelB/p52 は *Sox8* のプロモーター領域に結合し、*Sox8* の発現を高めることが本研究で明らかとなった。また、Sox8 と Spi-B は互いの発現に必須ではなかった。したがって、*Sox8* と *Spib* は RelB によって並列に誘導されると考えられる。

GP2 は M 細胞表面に発現し、抗原取り込み受容体として機能する。成熟した M 細胞は GP2 を発現するとともに蛍光標識ビーズの高い取り込み能を持ち、GP2⁻ Spi-B⁺ の未熟な M 細胞は低い取り込み能を持つ。GP2 は Spi-B 依存的に発現するが、*Spib* の強制発現では *Gp2* の発現を誘導することができず、これまでその発現を直接制御する因子は知られていなかった。本研究により、Sox8 は *Gp2* のプロモーター領域に結合し、その転写活性を増強することを明らかにした。また、*Sox8*^{-/-}マウスでは受容体非依存的にトランスサイトosisされる蛍光標識ビーズの取り込み量も減少していた。したがって、Sox8 は単に受容体の発現を制御している訳ではなく、機能的な成熟 M 細胞の分化に必須の因子であると考えられる。

Spib^{-/-}マウスでは Sox8 の発現が残存するにも関わらず、GP2 が発現しない。このことから、*in vivo* では Sox8 単独では *Gp2* の誘導に不十分であると考えられる。SOX ファミリー転写因子はパートナー分子とヘテロダイマーを形成することで標的遺伝子に対する十分な転写活性を持つことが知られる。Sox8 の場合においても、パートナー分子の存在が *in vivo* での *Gp2* の誘導に必要であると考えられる。したがって、M 細胞分化に寄与するさらなる転写因子の存在が示唆され、今後の探索が必要である。

Sox8 の欠損により、離乳後の若齢マウスにおいてパイエル板の胚中心反応と腸管の

IgA 産生量が減少していた。一方、この免疫異常は 6 週齢の成獣 *Sox8*^{-/-} マウスでは回復するため、IgA 応答への影響は若齢期に限定されていると言える。その理由として、*Sox8*^{-/-} マウスでは未熟な M 細胞が多く残存していることが考えられる。未熟 M 細胞も弱いながらも抗原取り込み能を持つため、加齢に従い成熟 M 細胞の機能を代償している可能性がある。M 細胞の各分化段階における生理的意義については今後さらなる研究が必要である。

【結論】

本研究により、*Sox8* が M 細胞分化に寄与する新たな転写因子であり、離乳後の腸管 IgA 応答に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

M 細胞はその抗原取り込み機構により粘膜免疫応答の誘導に重要な役割を果たしている。このため、効率的な免疫応答を誘導が期待できる粘膜ワクチンのターゲットとして開発が進められている。その一方で、赤痢菌などの病原体は M 細胞を感染の門戸として利用しており、生体にとってその存在は諸刃の剣であると言える。したがって、M 細胞による免疫誘導の詳細なメカニズムを明らかにすることは、粘膜免疫系の理解に加え、粘膜ワクチンや感染症の新たな治療法の開発へと繋がることが期待される。しかしながら、M 細胞の分化や抗原取り込み機構の詳細な分子メカニズムは十分に明らかになっていない。本論文において申請者は、M 細胞に高発現する転写因子として新たに *Sox8* を同定した。申請者は、遺伝子欠損マウスの解析を通し、*Sox8* の M 細胞分化と粘膜免疫応答における重要性を明らかにした。さらに、*Sox8* を介した M 細胞分化誘導機構を分子レベルで解明した。

申請者はまず、トランスクリプトーム解析の結果 M 細胞特異的に発現すると考えられた転写因子である *Sox8* について、実際にパイエル板上皮において M 細胞特異的に発現することを確認した。次に、*Sox8*^{-/-} マウスのパイエル板上皮および小腸オルガノイドを解析した結果、野生型と比較して成熟 M 細胞が顕著に減少することを見出した。さらに、*Sox8* の欠損によりパイエル板への抗原取り込みが減少し、離乳後の若齢マウスにおいて胚中心反応と腸管 IgA 応答が減弱することを明らかにした。また、*Sox8* を介した M 細胞分化の分子メカニズムとして、*Sox8* は RANKL シグナルの下流で非古典的 NF-κB 経路の転写因子である RelB/p52 によって直接誘導されることを見出した。さらに、*Sox8* は成熟 M 細胞マーカーである *Gp2* のプロモーター領域に結合し、その転写活性を増強することを明らかにした。本研究により、*Sox8* が M 細胞の分化成熟に寄与し、離乳後の腸管 IgA 応答に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

口頭発表に対し、副査の有田教授からは「Sox8はM細胞の機能的成熟に重要とのことだったが、M細胞の機能的成熟には他にどのような分子が寄与しているのか。」との質問があり、申請者は「トランスサイトosis自体を制御する分子であるAif1の発現が、Sox8の欠損により完全ではないが減少していた。実際に成熟M細胞の機能を規定する分子は不明であるが、トランスクリプトーム解析でSox8欠損により減少が見られた遺伝子を精査することで明らかになるかもしれない。」と返答した。また、副査の多胡准教授からは「M細胞分化においてSox8、Spi-Bは非古典的NF-κB経路によって誘導されるということだが、古典的経路は関係しないのか。」との指摘があり、申請者は「古典的NF-κB経路もM細胞分化に必須であることが報告されており、非古典的経路であるRelBの発現自体を上昇させる。」と返答した上で「古典的経路によって誘導されるM細胞特異的遺伝子も報告されている。」と述べた。他に会場からは「Spi-BとSox8が分化に重要と発表されていたが、この二つでM細胞分化の十分条件と言えるか。」との質問があり、申請者は「盲腸のリンパ組織(cecal patch)の上皮にもM細胞が存在し、Spi-BとSox8の両者が発現しているが、GP2陽性の成熟M細胞は認められない。このことから、M細胞の成熟を制御するさらなる因子が存在すると考えられる。」と返答した。その他にも複数の質問があったが、概ね的確に返答していた。

本研究は未だに不明な点が多いM細胞分化を制御する新たな転写因子としてSox8を同定し、その腸管免疫系における役割を個体から分子レベルに渡って解明したものであり、その学術的意義はきわめて大きいと考えられる。また、申請者は口頭試問に対する確に返答し、研究内容に対する深い知識と洞察力を持っていると判断できる。以上より、本研究は博士(薬科学)を授与するにふさわしいものであると判定した。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

Kimura S, Kobayashi N (co-first author), Nakamura Y, Kanaya T, Takahashi D, Fujiki R, Mutoh M, Obata Y, Iwanaga T, Nakagawa T, Kato N, Sato S, Kaisho T, Ohno H, Hase K. Sox8 is essential for M-cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice. *J. Exp. Med.* in Press.

【参考論文】

1. Kobayashi N, Kon S, Henmi Y, Funaki T, Satake M, Tanabe K. The Arf GTPase-activating protein SMAP1 promotes transferrin receptor endocytosis and interacts with SMAP2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453: 473-479, 2014.

2. Kon S, Kobayashi N, Satake M. Altered trafficking of mutated growth factor receptors and their associated molecules: implication for human cancers. *Cell. Logist.* 4: e28461, 2014.