

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	小林 伸英
主論文題名： 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				
(内容の要旨)				
<p>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寄与している。GALT の特徴の一つは外来抗原の積極的な取り込みであり、それを担っているのは GALT を覆う濾胞関連上皮層に存在する M (Microfold) 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受け渡す抗原トランスサイトosisと呼ばれる機能を有する。抗原を受け取った抗原提示細胞がナイーブ T 細胞に抗原提示を行うことで、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。</p> <p>M 細胞は腸の陰窩深部に存在する腸管上皮幹細胞から分化する。M 細胞の分化開始には receptor of NF-κB 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特殊な間質細胞である M-cell inducer (MCi) 細胞が存在し、M 細胞に RANKL を供給している。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-kappa B (NF-κB) 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。</p> <p>Spi-B 欠損マウスでは M 細胞が消失する。一方で、<i>SpiB</i> 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。</p> <p>私は過去に行われた 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</p>				

告は認められない。そこで私は、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。

Sox8 遺伝子はパイエル板上皮および GST-RANKL によって誘導した M 細胞に発現が確認された。Sox8⁺ 細胞の局在を検討したところ、Sox8⁺ 細胞は M 細胞マーカーである Spi-B⁺ 細胞および Tnfaip2⁺ 細胞に発現が認められた。Sox8 は Spi-B と同時期に M 細胞分化の初期に発現し、未熟 (GP2⁻) M 細胞と成熟 (GP2⁺) M 細胞の両方に同等に発現が認められた。

Sox8 遺伝子欠損マウス (Sox8^{-/-}マウス) を解析したところ、パイエル板上皮で GP2⁺ 細胞の数が野生型と比べ顕著に減少していた。また、Spi-B⁺ および Tnfaip2⁺ の未熟 M 細胞も僅かではあるが有意な減少が見られた。Sox8^{-/-}マウスのパイエル板上皮の遺伝子発現を調べたところ、Gp2 の発現が顕著に減少し、他の複数の M 細胞関連遺伝子の発現も有意に減少していた。成熟 M 細胞は未熟 M 細胞に比べ高い抗原取り込み能を有するが、Sox8^{-/-}マウスでは蛍光標識ビーズおよび *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) Δ aroA 株の取り込み量が顕著に減少していた。これらの結果から、Sox8^{-/-}マウスでは成熟 M 細胞が減少していると考えられた。

Sox8^{-/-}マウスのパイエル板における RANKL の発現を検討したところ、遺伝子発現、タンパク質発現ともに野生型と差は見られなかった。また、パイエル板上皮における RelB⁺ 細胞の分布についても差は見られなかった。したがって、Sox8 が欠損しても MCi 細胞や RANK-RelB シグナル自体には影響しないと考えられた。さらに、小腸オルガノイドを用いて 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 の欠損により GP2⁺ 細胞が減少し、Gp2 およびその他の M 細胞関連遺伝子の発現が低下していた。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。

Sox8^{-/-}マウスのパイエル板を解析したところ、リンパ濾胞のサイズが野生型に比べ縮小しており、4 週齢マウスのパイエル板において胚中心 B 細胞領域の縮小が観察された。パイエル板に存在する免疫細胞を解析したところ、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。次に、腸管 IgA 応答への影響を検討したところ、Sox8^{-/-}マウスでは糞便中の分泌型 IgA および腸内細菌特異的 IgA の産生が低下していた。興味深いことに、Sox8 の欠損による成熟 M 細胞の減少は週齢に関わらず観察されるのに対し、免疫系の異常はいずれも 6 週齢以降の Sox8^{-/-}マウスでは検出されなかった。このことから、Sox8 依存的に誘導される成熟 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。破傷風トキソイド (tetanus toxoid: TT) の fragment C を発現する組み替え *S. Typhimurium* (*Salmonella*-ToxC) を経口感染させたところ、Sox8^{-/-}マウスでは TT 特異的な IgG 応答が遅延する傾向が見られた。以上の結果から、Sox8 の欠損により粘膜免疫応答が遅延すると考えられた。

主 論 文 要 旨

M細胞分化に必須である Spi-B を欠損したマウス (*Spib*^{-/-}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。そこで、Sox8 の発現を誘導する転写因子を明らかにするため、小腸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 を発現させた場合のみ、Sox8 の発現誘導が見られた。さらに、GST-RANKL 投与によって M 細胞を誘導した小腸上皮細胞を用いて抗 RelB 抗体による Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay を行なったところ、M 細胞を誘導した群で Sox8 のプロモーター上における RelB の結合が有意に上昇していた。Sox8 と Spi-B の発現は互いに依存しないことから、M 細胞において RelB/p52 は Sox8 と *Spib* の発現を並列に制御していると考えられた。

Sox8 および Spi-B によって制御される遺伝子を明らかにするために、*Sox8*^{-/-}マウスおよび *Spib*^{-/-}マウスのパイエル板上皮のトランスクリプトームを RNA sequencing により解析した。その結果、*Sox8*^{-/-}マウスでは 114 個、*Spib*^{-/-}マウスでは 359 個の遺伝子発現が有意に減少しており、そのうち共通して減少する遺伝子は *Gp2* を含む 41 個であった。qPCR およびトランスクリプトーム解析で *Sox8*^{-/-}マウスで顕著に減少が見られた *Gp2* が Sox8 の直接の標的遺伝子であるという仮説を立て、*Gp2* のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイを行なった。その結果、Sox8 の強制発現によって *Gp2* のプロモーター活性の増強が見られたが、*Spib* の強制発現では差は見られなかった。さらに、抗 Sox8 抗体を用いて ChIP assay を行なったところ、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 の結合が有意に上昇していた。以上の結果から、Sox8 は *Gp2* を直接の標的遺伝子としていると考えられた。

本研究の結果をまとめると、Sox8 は RANKL シグナルの下流で非古典的 NF- κ B 経路によって *Spib* と並列に転写が誘導され、*Gp2* を含む標的遺伝子の活性化により、M 細胞の成熟に寄与していると考えられる。Sox8 を欠損したマウスでは高い抗原取り込み能を持つ成熟 M 細胞が減少し、結果として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内細菌特異的な分泌型 IgA 産生が遅延する。したがって、Sox8 は M 細胞分化に必須の転写因子であり、離乳後の腸管 IgA 応答に重要な役割を果たしていると考えられる。