

博士学位論文 2018（平成30）年度

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

【要約版】

慶應義塾大学大学院薬学研究科

小林伸英

目次

略語	2
第1章 序論	4
第2章 実験材料と方法	7
第3章 結果	16
第4章 考察	22
第5章 参考文献	25
謝辞	31

略語

本論文では以下の略語を使用する。

Aif1: Allograft inflammatory factor 1

c.f.u.: colony forming unit

ChIP: chromatin immunoprecipitation

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

FAE: follicle-associated epithelium

FISH: fluorescent in situ hybridization

GALT: gut-associated lymphatic tissue

Gapdh: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GC B cells: germinal center B cells

GP2: glycoprotein 2

GST: glutathione-S-transferase

HBSS: Hank's balanced salt solution

Ig: immunoglobulin

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

M cells: Microfold cells

MCi: M-cell inducer

MLN: mesenteric lymph nodes

PBS: phosphate buffered saline

PPs: Peyer's patches

qPCR: quantitative polymerase chain reaction

RANK: receptor activator of NF- κ B

RANKL: receptor activator of NF- κ B ligand

RNA-Seq: RNA Sequencing

SED: sub-epithelial dome

Sox8: Sry-type high-mobility-group box 8

S. Typhimurium: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Tc cells: cytotoxic T cells

Tfh cells: follicular helper T cells

Th cells: helper T cells

Treg cells: regulatory T cells

TT: tetanus toxoid

VE: villus epithelium

第1章 序論

ヒトを含む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¹。全身性免疫応答が体内に侵入にした病原体などに対する応答であるのに対し、粘膜免疫応答では非感染状態であっても分泌型 IgA の産生を誘導し、腸内細菌叢の恒常性維持や病原体の排除に寄与している²。したがって、GALT が管腔内の抗原に対して適切な免疫応答を誘導するためには、通常は粘膜バリアを透過しない管腔内抗原を敢えて体内に取り込み免疫応答を誘導する必要がある。この抗原取り込みを担う細胞が、GALT の上皮層に存在する Microfold (M)細胞である^{3,4}。GALT の代表的な構成要素であるパイエル板は小腸に散在する二次リンパ組織である⁵。パイエル板を構成するリンパ濾胞の管腔側表面は絨毛が未発達な濾胞関連上皮 (follicle-associated epithelium: FAE) によって覆われている。M 細胞はこの FAE 上に 10%程度存在する稀な上皮細胞である。M 細胞の頂端膜側から取り込まれた抗原は基底膜側から排出され、直下の抗原提示細胞へと引き渡されることにより粘膜免疫応答が開始される³。この取り込みの過程は抗原トランスサイトosisと呼ばれる。形態的には M 細胞は短く疎らな微絨毛 (Microfold) を持つ細胞として電子顕微鏡下で観察される。M 細胞は基底膜側が内側に大きく挟れたポケット状の構造をしており、内部に樹状細胞などの抗原提示細胞を抱え込んでいる。この特異な形態により迅速なトランスサイトosisを可能にしていると考えられている³。M 細胞は抗原取り込み受容体を複数発現している⁶⁻⁹。M 細胞表面に発現する受容体の一つである Glycoprotein (GP) 2 は、グラム陰性細菌の 1 型線毛タンパク質である FimH およびボツリヌス毒素複合体に含まれる haemagglutinin をリガンドとする^{6,10}。GP2 を欠損したマウスでは、FimH を有する細菌の取り込み量が減少し、サルモネラ菌に対する抗原特異的免疫応答が減弱する⁶。M 細胞が取り込むのは細菌だけではなく、蛍光標識ビーズなどの受容体を介さないと考えられる物質や可溶性抗原なども積極的に取り込む^{11,12}。M 細胞でトランスサイトosis自体を制御する因子である Allograft inflammatory factor

(Aif) 1 を欠損したマウスでは、抗原取り込みおよび腸内細菌特異的な IgA 産生が減弱する¹³。また、M 細胞を完全に欠損する RANK^{ΔIEC} マウスでは、腸管内の分泌型 IgA の産生が長期にわたり減弱する¹¹。これらの知見から、M 細胞は抗原取り込みを介して腸管における粘膜免疫応答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管上皮細胞と同様に、クリプト (Crypt、陰窩) 深部に存在する腸管上皮細胞から分化する¹⁴。M 細胞は、receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) シグナルを受けて初めて分化が誘導され、RANKL またはその受容体である RANK を欠損したマウスでは M 細胞が完全に消失する^{11,14,15}。パイエル板 FAE 直下の領域 (sub-epithelial dome: SED) には特殊な間質細胞である M-cell inducer (MCi) 細胞が存在し、RANKL の供給源として M 細胞の分化に必須の役割を果たす¹⁶。RANKL が RANK に結合するとアダプター分子である TRAF6 依存的に古典的 (RelA/p50) および非古典的 (RelB/p52) NF-κB 経路が活性化し、そのどちらの経路も M 細胞分化に必須である^{17,18}。非古典的経路の転写因子である RelB/p52 は Ets ファミリー転写因子である Spi-B の発現を直接誘導し、M 細胞の分化に必須の役割を果たす^{14,19,20}。Spi-B を欠損したマウスでは成熟 M 細胞が認められず、抗原取り込みおよび特異的粘膜免疫応答が減弱する¹⁹。

M 前駆細胞はクリプト底部にある幹細胞から発生し、分化初期段階において Spi-B を発現する。その後、分化が進むにつれて FAE 中央部に向かって移行する過程で、成熟 M 細胞マーカーである GP2 を発現する^{4,21}。Spi-B⁺GP2^{high} 細胞は高い抗原取り込み能を持つ成熟 M 細胞であり、Spi-B⁺GP2^{low} 細胞は抗原取り込み能の低い未熟 M 細胞であると考えられている²¹。近年の研究から、M 細胞の分化や成熟を促す細胞内シグナルや転写因子の一部が明らかにされている。例えば、腸管上皮細胞に RelA/p50 または RelB/p52 を強制発現させると *Spib* を含む複数の M 細胞特異的遺伝子の発現誘導が認められる¹⁸。一方で、これらの転写因子または *Spib* を強制発現させた場合においても、成熟 M 細胞マーカーである *Gp2* の発現誘導は認められない。このことから、既知の転写因子のみでは M 細胞の完全な分化誘導には不十分であり、M 細胞分化に必要な他の転写因子の存在が示唆される。先行研究によって、M 細胞特異的に発現する遺伝子群の探索が行われた^{14,19,22}。私は、その中で M 細胞に高発現する転写因子として *Sox8* に着目した。Sry-type high-mobility-group box (SOX) ファミリー転写因子は哺乳類の発生過程に

重要な役割を果たすが、腸管上皮系細胞において Sox8 が発現するという報告はなく、その機能は全く不明である²³。そこで、本博士論文研究では Sox8 の M 細胞の分化および機能における役割を検証した。

第2章 実験材料と方法

2-1 抗 Sox8 抗体の作製

抗 Sox8 抗体は先行研究に従い北海道大学大学院医学研究院の木村俊介博士が作製したものを供与していただいた²⁴。マウス Sox8 の 2-60 アミノ酸残基を glutathione-S-transferase (GST) 融合タンパク質として大腸菌に発現させ、精製タンパク質をモルモットに免疫し、抗血清を得た (Frontier Institute, Ishikari, Japan)。得られた抗体の特異性は Sox8 欠損マウス (Sox8^{-/-}マウス)を用いて確認した。

2-2 実験動物

Sox8^{-/-}マウスは Mutant Mouse Regional Resource Centers より入手した (B6;129S7-Sox8^{tm1Mkob}/Mmnc; stock number 030471-UNC)。Sox8^{-/-}マウスは 129vRv (1-15%)と C57BL6 (85-99%) の混交系であったため、野生型 C57BL/6 マウスと複数回戻し交配を行い、F1-F4 世代を遺伝子およびタンパク質の発現解析、F3-4 世代を免疫学的な解析に用いた。Spib 欠損マウス (Spib^{-/-}マウス) は和歌山県立医科大学医学部の改正恒康教授より分与して頂いた²⁵。コントロールとして、免疫学的解析には同腹個体を、その他の実験では同腹個体または日本クレア社より購入した C57BL/6J マウスを用いた。

2-3 上皮細胞の単離

FAE は過去の報告にしたがって単離した^{21,22}。すなわち、マウスより小腸またはパイエル板を採取し、洗浄後、30 mM EDTA/5 mM dithiothreitol (DTT)/Hank's balanced salt solution (HBSS)中で氷上 20 分間インキュベートした。単層の上皮および FAE は実体顕微鏡下で 29G の注射針を用いてシート状に剥離することで単離した。

2-4 定量的 PCR (quantitative PCR: qPCR)

上皮、オルガノイドまたはパイエル板の RNA は TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて単離した。cDNA は iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて合成した。合成された cDNA は

SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad)を用い CFX-connect (Bio-Rad)にて解析した。PCR は 95°C 30 秒、95°C 5 秒、60°C 15 秒を 40 サイクルという条件により行った。内部標準には *Actb*、*Rpl32* または *Gapdh* 遺伝子を用いた。

2-5 RANKL 投与による M 細胞の誘導

GST および GST-RANKL リコンビナント蛋白質は北海道大学大学院医学研究院の木村俊介博士より供与していただいた²¹。野生型マウスに 250 µg の GST-RANKL を 3 日間腹腔内投与することにより、絨毛上皮に異所的に M 細胞を誘導した。

2-6 蛍光免疫染色および定量イメージサイトメトリー

単離した FAE のホルマウント染色においては、4% paraformaldehyde (PFA)で氷上 30 分間固定し、PBS で 3 回洗浄した。オルガノイド のホルマウント染色は、氷冷した Gentle Cell Dissociation Reagent (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada)中でゲルを融解し、PBS で 2 回洗浄後、3.7% formaldehyde/PBS で室温 15 分間固定した。パイエル板切片の染色は、OCT で凍結切片を作製後、4% paraformaldehyde (PFA)で 15 分間固定した。各サンプルは PBS で 3 回洗浄し、10%のロバ血清でブロッキング処理を 1 時間行った後、anti-Sox8 antibody、anti-Tnfaip2 antibody (Kimura et al., 2012)、anti-GP2 antibody (MBL, Nagoya, Japan)、anti-Spi-B antibody (R & D systems, Minneapolis, MS, USA)、anti-RANK antibody (R & D systems)および anti-RANKL antibody (Biolegend, San Diego, CA, USA)を用い 0.2% saponin/0.2% bovine serum albumin/PBS 中で 4°C で一晩染色した。核の染色には 4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI)を用いた。各サンプルは共焦点レーザー顕微鏡 (FV300 または FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)にて観察した。定量イメージサイトメトリー解析は FV1000 および FV10-ASW software (Olympus)の photon-counting mode を用いて取得した画像について ImageJ software を用いて解析した。

2-7 Fluorescent in situ hybridization (FISH)

FISH は Quantigene View RNA ISH Cell Assay (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)を用い、若干の改変を加えて行なった。単離した上皮は 4% PFA/0.5% glutaraldehyde/PBS で氷上

3 時間固定し、4% PFA/PBS に移しさらに 4°C で一晩インキュベートした。50 mM glycine/PBS で 3 回洗浄後、detergent solution (Affymetrix) で 10 分間前処理し、protease QS (dilution 1 : 400 in PBS; Affymetrix) または 0.1 mg/ml proteinase K (Kanto Chemical co., Inc., Tokyo, Japan) /PBS で室温 10 分間処理した。以降は製品プロトコルに従った。*Spib* (Cat. No. VB4-13734) および *Sox8* (VB1-13736) に対する特異的 oligonucleotide probe sets は Affymetrix からより購入した。

2-8 蛍光ビーズの取り込み量の評価

マウスを 24 時間絶食させた後、 2×10^{11} 個の Fluoresbrite YG Microspheres - 0.20 μm (Polysciences, Warrington, PA, USA) を経口投与した。3 時間後、空腸から 2 個のパイエル板を採取し、OCT に包埋し、液体窒素で凍結した。クライオスタットにて 10 枚の連続切片を作製し、核を DAPI で染色した。各サンプルは BZ9000 (KEYENCE, Osaka, Japan) で観察し、取り込まれたビーズの個数を目視カウントした。

2-9 経口感染させた細菌取り込み量の評価

テトラサイクリン耐性 *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) $\Delta aroA$ 株は北里大学生命科学研究所の松井英則博士より供与していただいた。マウスに 5×10^8 colony-forming units (c.f.u.) の *S. Typhimurium* ($\Delta aroA$) を経口投与し、感染させた。24 時間後、3 つの回腸パイエル板と腸間膜リンパ節を採取し、500 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin (Thermo Fisher Scientific) を含む PBS 中で 30 分間インキュベートした。サンプルは 1mM DTT を含む PBS で洗浄後、滅菌 PBS 中で破砕し、遠心分離によって宿主細胞を除いた。上精を 10 倍ずつ段階希釈し、15 $\mu\text{g/ml}$ tetracycline (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., Tokyo, Japan) を含む Luria-Bertani agar plates に撒き、37°C で培養した。コロニー数を計測し、c.f.u. を算出した。

2-10 腸管オルガノイド培養

マウスから十二指腸を採取し、洗浄後 5 mm 程度に細断した。腸の断片は 2 mM EDTA/PBS 中で室温 5 分間インキュベートした後、ピペッティングにて洗浄し、上精を

除いた。腸断片はさらに、2 mM EDTA/PBS 中で氷上 30 分間インキュベートした。上精を HBSS に置換し、ピペッティングによってクリプトを単離した。70 μ M のセルストレーナーで夾雑物を取り除き後、単離したクリプトは DMEM/F12 medium (STEMCELL Technologies) に再懸濁した。クリプトの数をカウントし、500 個のクリプトを Matrigel (Corning, One Riverfront Plaza Corning, NY, USA) に再懸濁し、24 well プレートに撒いた。培地には IntestiCult organoid growth medium (STEMCELL Technologies) を用い、2 日ごとに培地交換した。M 細胞の誘導は、200 ng/mL recombinant mouse RANKL (Affymetrix) を培地に添加し、3 日間インキュベートすることで行った。

2-11 フローサイトメトリー

マウスからパイエル板を採取し、細断後 2% FBS/0.1 mg/ml collagenase/0.1 mg/ml DNase I /12.5 mM HEPES/RPMI 1640 中で 37°C で振盪することで細胞を分散した。腸間膜リンパ節、脾臓、胸腺はプランジャで押しつぶすことによって細胞を得た。細胞を回収し、anti-CD16/CD32 (Fc γ R) antibody (Biolegend) を含む 2% FBS/PBS 中でブロッキングした。細胞は以下の抗体を用いて染色した: anti-CD3 ϵ (clone 17A2), anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8a (53-6.7), anti-CD45R (30-F11), anti-CD95 (Jo2), anti-CXCR5 (SPRCL5), anti-GL7 (GL-7), anti-IgA (C10-1), and anti-PD-1 (J43) (Thermo Fisher Scientific, Biolegend, BD Bioscience または Tonbo Bioscience より購入)。フローサイトメトリーは LSR II flow cytometer (BD Bioscience) によって行い、得られたデータは FlowJo 10 software (Tree Star, Ashland, OR) を用いて解析した。

2-12 Bug-IgA フローサイトメトリー

Bug-IgA フローサイトメトリー法は先行研究に従った²⁶。マウスから採取した糞便を PBS に懸濁し、遠心分離によって糞便残渣を除去した。細菌を含む上精はビオチンまたは蛍光色素を付加した以下の抗体によって染色した: anti-IgA (Clone: C10-1)、anti-Igk light chain (187.1)、BD Bioscience (San Jose, CA)。生きた細菌は DAPI によって染色した。フローサイトメトリーは Aria III flow cytometer (BD Bioscience) を用いて行い、得られたデータは FlowJo 10 software によって解析した。

2-13 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

マウスから採取した糞便はプロテアーゼ阻害剤カクテル(Complete EDTA-free; Roche, Basel, Schweiz)を含む PBS で懸濁し、4°C で遠心分離した。上精は 2% BSA/PBS で希釈した。MaxiSorp plates (Thermo Fisher Scientific)は goat anti-mouse IgA (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)で室温 1 時間コーティングした。プレートは 0.1% Tween20/TBS (TBS-T)で 5 回洗浄後、2% BSA/PBS で室温 30 分ブロッキングした。希釈したサンプルをプレートに加え、室温で 1 時間インキュベートした。TBS-T で 5 回洗浄後、プレートに HRP-conjugated goat anti-mouse IgA antibodies (Bethyl Laboratories)を加え、室温で 1 時間インキュベートした。TBS-T で 5 回洗浄後、プレートに 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)を加えた。1.2 M sulfuric acid を加えて反応を停止させ、450 nm における吸光度を計測した。

2-14 免疫および破傷風トキソイド (tetanus toxoid: TT) 特異的 ELISA

破傷風毒素の fragment C を発現する組み換え *S. Typhimurium* (r*Salmonella*-ToxC Δ aroA, Δ aroD)および TT は阪大微生物病研究会 (Osaka, Japan)より分与していただいた。マウスは 5×10^7 c.f.u.の r*Salmonella*-ToxC を経口投与することで免疫した。継時的に糞便および血清を採取し、特異的 IgA または IgG を ELISA 法によって解析した。MaxiSorp plate を 500 ng/well の TT で 4°C で一晩コーティングした。ブロッキング以降は 2-13 と同様に行なった。

2-15 *in vitro* B 細胞分化誘導

B 細胞はマウス脾臓から採取した細胞を MojoSort mouse pan B cell isolation kit (Biolegend)を用いて製品プロトコルに従って単離した。IgA⁺ B cell の誘導では、B 細胞を 2 μ g/ml F(ab')₂-Goat-anti-mIgM (Thermo Fisher Scientific)、5 μ g/ml anti-mCD40 (3/23, Biolegend)で刺激し、1 ng/ml recombinant human (rh) TGF- β 1、5 ng/ml recombinant mouse (rm) IL-5、20 ng/ml rmIL-21 (all from Biolegend)、10 nM atRA (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)を添加した、5% v/v fetal calf serum (FCS; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)を含む advanced RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific): complete media で 6 日間培養

した。IgG1⁺および IgE⁺ B 細胞の誘導では、B 細胞を 20 ng/ml rmIL-21、50 ng/ml rmIL-4 (Biolegend)、anti-mIgM、anti-mCD40 を添加した complete media で 6 日間培養した。IgG2a⁺ B 細胞の誘導では、B 細胞を anti-mIgM と anti-mCD40 で刺激し、20 ng/ml rmIL-21 と 50 ng/ml rmIFN- γ (Biolegend)を添加した complete media で 6 日間培養した。

2-16 *in vitro* T 細胞分化誘導

ナイーブ T 細胞はマウス脾臓から採取した細胞を MojoSort mouse naïve T cell isolation kit (Biolegend)を用いて製品プロトコルに従って単離した。iTreg 細胞の誘導では、ナイーブ CD4⁺ T 細胞を high-binding 96-well plate (Corning)に固定した anti-TCR β mAb (H57-597; BioXCell, West Lebanon, NH, USA, 5 μ g/ml)および可溶性の anti-CD28 mAb (37.51; BioXCell, 2 μ g/ml) で刺激し、0.5 ng/ml rhTGF- β 1 および 10 ng/ml rmIL-2 (Biolegend)を添加した complete media で 2 日間培養した。刺激した T 細胞は rhTGF- β 1 および rmIL-2 を添加した complete media でさらに 3 日間培養した。Th1 細胞の誘導では、ナイーブ CD4⁺ T 細胞を固定化した anti-TCR β mAb および可溶性の anti-CD28 mAb、anti-mIL-4 (11b11; BioXCell) で刺激し、10 ng/ml rmIL-2 および 10 ng/ml rmIL-12 (Biolegend)を添加した complete media で 2 日間培養した。刺激した T 細胞は anti-mIL-4、rmIL-2、rmIL-12 を含む complete media でさらに 3 日間培養した。Th2 細胞の誘導では、ナイーブ CD4⁺ T 細胞を固定化した anti-TCR β mAb と可溶性の anti-CD28 mAb および anti-mIFN- γ (R4-6A2, BioXCell)で刺激し、10 ng/ml rmIL-2 および 10 ng/ml rmIL-4 を添加した complete media で 2 日間培養した。刺激した T 細胞は anti-mIFN- γ 、rmIL-2、rmIL-4 を含む complete media でさらに 3 日間培養した。Th17 細胞の誘導では、ナイーブ CD4⁺ T 細胞を固定化した anti-TCR β mAb と可溶性の anti-CD28 mAb、anti-mIL4 および anti-mIFN γ で刺激し、25 ng/ml rmIL-6 (Biolegend)、0.1 ng/ml rhTGF- β 1 および 300 nM FICZ (Abcam)を添加した complete media で 2 日間培養した。刺激した T 細胞は anti-mIL4、anti-mIFN- γ 、rmIL-6、rhTGF- β 1 および FICZ を含む complete media でさらに 3 日間培養した。

2-17 レンチウイルスベクターによる遺伝子導入

レンチウイルスを用いたオルガノイドへの遺伝子導入法はすでに報告されている¹⁸。

レンチウイルスを含む培養上清は RelB、RelA、p50、p52 を組み込んだ SIN vector (CSII-CMV-RfA-IRES2-Venus, 17 µg)、pCAG-HIVgp (10 µg)、pCMV-VSV-G-Rev (10 µg) into Lenti-X 293T (5 × 10⁶/15 ml) (Clontech, Mountain View, CA, USA) を Polyethylenimine Max (Polysciences, Warrington, PA) を用いて製品プロトコルに従い一過性にトランスフェクションすることによって得た。全てのベクターは理化学研究所バイオリソース研究センターの三好浩之博士に供与していただいた。24 時間培養後、10 µM forskolin を含む培地でさらに 48 時間培養した。宿主細胞を除去した後、超遠心によってウイルスを精製した。単細胞に解離したオルガノイド を 250 µl のウイルスを含む培地に懸濁し、32 °C、600 × g で 1 時間延伸した、細胞を Matrigel に再懸濁し、2-3 日間培養した。

2-18 クロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation: ChIP)

ChIP には、250 µg の GST または GST-RANKL を 3 日間腹腔内投与した C57BL/6 マウスの小腸上皮を用いた。十二指腸から単層上皮を単離し、1% formaldehyde/PBS で 37°C で 10 分間固定した。固定反応は glycine (final 125 mM) を加えることで停止した。固定した細胞は RIPA buffer (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を用いて溶解した。クロマチンは Micrococcal Nuclease (TAKARA Bio, Shiga, Japan) を用いて 200-800-bp に断片化し、ソニケーションによって核膜を破砕した。断片化したクロマチン を含む細胞溶解液は Dilution buffer (16.7 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl) によって希釈した。免疫沈降は control rabbit IgG (clone DA1E, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) または anti-RelB antibody (C1E4, Cell Signaling Technology) または anti-Sox8 antibody (ab104245, Abcam, Cambridge, UK) および Dynabeads Protein A (VERITAS, Santa Clara, CA, USA) を用いて 4 °C で一晩行なった。沈降後、磁気ビーズは low-salt buffer (20 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl) で 5 回、high-salt buffer (20 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl) で 3 回、TE buffer (Nacalai tesque) で 2 回洗浄した。免疫複合体は elution buffer (10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% SDS) 中で 65°C で 4 h インキュベートすることで溶出し、さらに proteinase K (55°C, 1 h) を加えて脱クロスリンクした。沈降した DNA 断片は ChIP DNA Clean Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA, USA) を用いて精製

した。ChIP-qPCR 解析は KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いた。PCR プライマーは各遺伝子における NF κ -B consensus sequence または SOX-binding sequence を含むプロモーター領域に対して設計した(Table S1)。

2-19 RNA Sequencing (RNA-Seq)

²²RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて FAE より RNA を抽出し、SMART-Seq v4 Ultra Low input RNA kit for sequencing を用いて製品プロトコル(Takara Bio)に従い cDNA ライブラリを作製した。かずさ DNA 研究所において HiSeq 2000 platform (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いて 50-bp single-end reads を得た。全てのデータは DDBJ Sequence Read Archive (Accession code: DRA006978)に登録済みである。

2-20 細胞株の培養

CMT93 および HEK293T 細胞は 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS)、1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific)、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)で培養し、3 日ごとに継代した。

2-21 ルシフェラーゼアッセイ

マウス *Spib* および *Sox8* のコーディング領域は RANKL によって刺激したオルガノイドの cDNA を鋳型として PCR 法によって増幅し、pcDNA3.1 vector (Life Technologies) にサブクローニングした。*Gp2* プロモーター領域 (0 to -2494 nucleotides)は C57BL/6 マウスのゲノム DNA から増幅し、pCRII-Blunt-TOPO vector (Life Technologies)、続いて pGL4.11 vector (Promega, Madison, WI, USA)にサブクローニングした。HEK293T または CMT93 を 24-well プレートに播種し、Lipofectamine 3000 (Life Technologies)を用いて発現ベクターをトランスフェクションした。24 時間後、ルシフェラーゼ活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて解析した。

2-22 統計処理

2 群間の差の統計解析には、等分散性が見られた場合には t 検定を、不等分散の場合には Mann–Whitney 検定を使用した。3 群間の差の統計解析には one-way ANOVA を用い、有意差が見られた場合には Tukey の多重比較検定を行なった。不等分散の場合には Kruskal–Wallis 検定を使用した。全ての統計解析は GraphPad Prism 7 を用いて行った。 P 値が 0.05 未満の時、有意な差があると判定した。

第3章 結果

3-1 Sox8 は RANKL 依存的に M 細胞に発現する

過去に行われた M 細胞特異的遺伝子を探索したデータベースを参照し、M 細胞特異的に発現する転写因子候補として Sox8 に着目した^{14,19,22}。qPCR 法によって FAE と絨毛上皮 (villus epithelium: VE) における Sox8 の遺伝子発現を比較したところ、FAE 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することが可能である^{15,21}。そこで、GST-RANKL または GST (対照群) 投与マウスにおいて絨毛上皮における Sox8 の発現を比較したところ、GST-RANKL 投与群においてのみ Sox8 の発現上昇が認められた。このことから、Sox8 は RANKL シグナルの下流において M 細胞に発現することが示唆された。

実際に Sox8 が FAE で M 細胞特異的に発現しているのかを検討するため、蛍光免疫染色法によって Sox8 陽性細胞の局在を検討した。その結果、Sox8 陽性細胞は M 細胞マーカーの一つである Tnfrsf25 陽性細胞と共局在していた。このことから、Sox8 は FAE において M 細胞特異的に発現することが明らかになった。また、免疫細胞を多く含む FAE 直下の SED 領域やリンパ濾胞においては Sox8 のシグナルは確認されなかった。さらに、マイクロアレイデータベースである RefDIC を用いて、各種組織や免疫細胞における Sox8 の発現を比較した²⁷。Sox8 はこれまで発現することが報告されている脳や脊髄に加えて FAE において高発現しており、各種免疫系細胞における発現はほとんど認められなかった。

3-2 Sox8 は M 細胞の分化過程において構成的に発現する

M 細胞は発現する分子の違いによって未熟 (Spi-B⁺ GP2^{low}) M 細胞と成熟 (Spi-B⁺ GP2^{high}) M 細胞に分類することができる²¹。FAE 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 M 細胞と成熟 M 細胞に同等に発現が認められた。一方で、Spi-B の発現は未熟 M 細胞でより高く、成熟 M 細胞では発現が低下すると考えられた。M 細胞はクリプト底部に存在する腸管上皮幹細胞から生じ、分化にしたがって FAE 中央部分に移行する。そのため、FAE においてはクリプト底部からの距離が分化段階を反映する²¹。Sox8⁺ 細

胞は距離的に Spi-B⁺ 細胞と同様であり、Tnfaip2⁺ 細胞や GP2⁺ 細胞に比べクリプトに近い位置に存在した。したがって、Sox8 は Spi-B と同様に分化の初期段階で M 細胞に発現すると考えられた。蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションの結果においても、Sox8 の mRNA は *Spib* と同様にクリプト中央部分から発現が認められた。さらに、免疫染色によって蛍光強度とクリプト底部からの距離の関係を解析したところ、Spi-B の発現レベルはクリプトから FAE 中央に近づくにつれて減少していたが、Sox8 についてはそのような減少傾向は見られなかった。以上の結果から、Sox8 は未熟 M 細胞から成熟 M 細胞まで同等に発現することが明らかとなった。

3-3 Sox8 は M 細胞の成熟に必須の因子である

Sox8 がパイエル板において M 細胞特異的に発現することから、Sox8 は M 細胞の分化成熟に関与するとの仮説を立てた。この仮説を検証するため、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。興味深いことに、成熟マーカーである GP2⁺ を発現する M 細胞が野生型マウスに比べ Sox8^{-/-}マウスでは顕著に減少していた。Sox8^{+/+}マウスでは 10.4 ± 2.85 cells/100 μm^2 の GP2⁺M 細胞が見られるのに対し、Sox8^{-/-}マウスでは 0.85 ± 0.09 cells/100 μm^2 まで減少した。また、Tnfaip2⁺ および Spi-B⁺ 細胞もわずかではあるが有意に減少が認められた。次に、FAE の遺伝子発現を qPCR 法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、M 細胞特異的遺伝子である *Spib*, *Tnfaip2*, *Aif1*, *Ccl9* の発現も有意に減少するか、または、減少傾向が認められた。一方で、M 細胞分化の初期段階で Spi-B 非依存的に発現する *Marcks11* および FAE 全体に発現する *Ccl20* については有意な差は見られなかった。以上の結果から、Sox8 の欠損によって成熟 M 細胞が減少することが示唆された。さらに、FAE のホールマウント免疫染色画像を詳細に解析したところ、Sox8^{+/+}マウスではクリプトから FAE 中央まで見られる Spi-B⁺ 細胞が、Sox8^{-/-}マウスでは FAE 辺縁部 (より低い分化段階) までしか存在していないことがわかった。また、Sox8^{-/-}マウスにおける Tnfaip2⁺ および Spi-B⁺ 細胞の減少は僅かであることから、Sox8 は M 細胞の成熟過程に寄与すると考えられた。

GP2 陽性の成熟 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²¹。また、GP2は*Escherichia coli*や病原体である*S. Typhimurium*などの取り込み受容体として機能する⁶。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^{-/-}マウスではビーズの取り込み量が顕著に減少していた。同様に、*S. Typhimurium*のパイエル板への取り込みと腸間膜リンパ節への移行がSox8^{-/-}マウスで有意に減少していた。すなわち、Sox8^{-/-}マウスにおけるM細胞は機能的に未成熟であることがわかった。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。

3-4 腸管上皮細胞が固有に発現する Sox8 が M 細胞分化を制御する

パイエル板のSED領域に存在するMCi細胞の発現するRANKLは、M細胞の分化に必須である¹⁶。本研究に用いたSox8^{-/-}マウスは全身でSox8を欠損しているため、MCi細胞などM細胞以外の細胞への影響を否定できない。そこで、パイエル板におけるRANKLおよびその受容体であるRANKの発現を免疫染色法によって比較したところ、Sox8^{-/-}マウスでも野生型と同様に発現が認められた。また、RANKL遺伝子の発現量を比較したところ、野生型およびSox8^{-/-}マウスで差は見られなかった。さらに、FAEのホールマウント・イメージサイトメトリーによってRANKシグナルの下流であるRelBの蛍光強度を解析した。その結果、FAEのRelB⁺細胞にはRelB^{int}とRelB^{high}の二つの集団が存在することが明らかとなったが、そのどちらもSox8^{+/+}マウスとSox8^{-/-}マウスで差は見られなかった。以上の結果から、Sox8の欠損はMCi細胞におけるRANKLの発現および下流のRANK-RelBシグナルには影響を及ぼさないと考えられた。

次に、小腸上皮細胞のみからなるオルガノイド培養系を用いてSox8欠損によるM細胞分化への影響を解析した。小腸オルガノイドはM細胞の誘導因子であるRANKL存在下で培養すると、GP2陽性のM細胞へと分化する¹⁴。一方で、Sox8^{-/-}オルガノイドでは、*in vitro*における結果と同様に、GP2⁺細胞および*Gp2*遺伝子の発現が野生型と比べ顕著に減少し、他のM細胞関連遺伝子は僅かに減少または差が見られなかった。以上の結果から、上皮細胞に発現するSox8がM細胞の成熟に重要であることが確認された。

3-5 Sox8^{-/-}マウスでは IgA 応答が遅延する

パイエル板では胚中心反応によって体細胞超突然変異が促進され、高親和性の IgA 陽性 B 細胞が誘導される^{28,29}。M 細胞による抗原取り込みは胚中心反応に重要な役割を果たしており、M 細胞欠損マウスではパイエル板の胚中心反応が減弱し、腸管 IgA 産生量および腸内細菌特異的 IgA 量が減少する^{11,16}。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いた。パイエル板切片の胚中心の大きさを免疫染色法によって比較したところ、Sox8^{-/-}マウスでは GL7 によって染色される胚中心 B 細胞領域の縮小が観察された。次に、パイエル板の免疫細胞の構成をフローサイトメトリーによって解析した。その結果、4 週齢マウスのパイエル板において、B 細胞および T 細胞の総細胞数が Sox8^{-/-}マウスで有意に減少していた。注目すべきことに、Sox8^{-/-}マウスでは胚中心反応に重要な T follicular helper (Tfh)細胞および胚中心 (Germinal center: GC)B 細胞が減少していた。さらに、Sox8^{-/-}マウスでは IgA⁺ B 細胞の減少も確認された。一方で、6 週齢マウスでは免疫細胞の構成に有意な差は見られなかった。

次に、Sox8^{-/-}マウスの腸管における分泌型 IgA の産生量を検討した。糞便中の総 IgA 量を ELISA 法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。一方で、6 週齢および 10 週齢では有意な差は見られなかった。同様に、腸内細菌特異的な IgA も Sox8^{-/-}マウスでは 4 週齢において有意に減少していたが、6 週齢では差が見られなかった。さらに、特異的免疫応答を検討するため、r*Salmonella*-ToxC をマウスに経口感染させ、TT 特異的な糞便中 IgA および血清中 IgG を ELISA 法により解析した。その結果、Sox8^{-/-}マウスでは TT 特異的 IgG の産生が遅延する傾向が見られた。

3-6 Sox8^{-/-}マウスにおける全身の免疫細胞の構成

Sox8 欠損による全身の免疫細胞の構成への影響を 4 週齢マウスで検討した。腸間膜リンパ節、脾臓、胸腺におけるほとんどの免疫細胞についてその構成に差は見られなかった。腸間膜リンパ節の Th2 細胞のみパイエル板と同様に Sox8^{-/-}マウスで有意に減少していた。次に、Sox8^{-/-}マウスにおける B 細胞および T 細胞の各エフェクター細胞への

分化能を *in vitro* で検討した。B 細胞については各サブセットへの分化能に野生型と差は見られなかった。T 細胞については Th2 細胞 (GATA3⁺) の割合が *Sox8*^{-/-}マウスで僅かに減少したが、Treg 細胞 (Foxp3⁺)、Th1 細胞 (T-bet⁺)、Th17 細胞 (RORγt⁺) への分化には差が見られなかった。以上の結果から、*Sox8* 欠損による免疫細胞の異常は腸管免疫系に限られ、全身の免疫系への影響は少ないと考えられた。

3-7 Sox8 の発現は Spi-B に依存しない

Spi-B は M 細胞分化に必須の因子であり、複数の M 細胞関連遺伝子の発現を制御する^{18,19,25}。*Sox8* が Spi-B の制御下にある可能性を検討するため、*Spib*^{-/-}マウスを用いてパリエル板 FAE における遺伝子発現を解析した。*Spib*^{-/-}マウスの FAE では *Sox8* の減少傾向が見られたが発現は残存していた。また、過去の報告と同様に *Spib*^{-/-}マウスで *Gp2* の発現が顕著に減少していたが、*Ccl20* については差が見られなかった¹⁹。FAE のホルマウント免疫染色により *Sox8* タンパク質の発現を解析したところ、*Spib*^{-/-}マウスにおいても *Sox8*⁺細胞が残存していた。以上の結果から、Spi-B は *Sox8* の発現に必須ではないと考えられた。

3-8 非古典的 NF-κB 経路が Sox8 の発現を制御する

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 を導入した場合のみ、*Sox8* の発現が誘導された。そこで、抗 RelB 抗体を用いた ChIP assay によって RelB のプロモーター領域への結合を検討した。十分量のゲノム DNA を得るため、GST-RANKL 投与によって絨毛上皮に誘導した M 細胞を用い、GST 投与群をネガティブコントロールとした。その結果、GST-RANKL 投与群では *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。NF-κB の結合サイトを含まない *Sox8* 上流 10 kb の領域ではこのような結合の増加は見られなかった。さらに、既に RelB の結合が報告されている *Spib* に加え、*Ccl20* のプロモーターにおける RelB の結合も有意に上昇していた。以上の結果から、RelB は *Sox8* と *Spib* を含む M 細胞関連遺伝子の発現を並列に制御していると考えられた。

3-9 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 FAE 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することが明らかとなった。このうち、*Sox8*^{-/-}および *Spib*^{-/-}マウスで共通して減少する遺伝子は 41 個であった。さらに、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。ただし、減少が見られた遺伝子の中には間質系細胞に関連する遺伝子(e.g. *Col5a1*, *Col4a2*, *Madcam-1*, *Cxcl13*, *Bgn*)や血球系細胞に関連する遺伝子(e.g. *Cxcr5*, *Cd22*, *Il21r*, *Ltb*)も含まれており FAE サンプルにはこれらの細胞が混入していた可能性がある。

トランスクリプトーム解析と qPCR 解析の両方において *Sox8* 欠損により *Gp2* の発現が顕著に減少していたことから、*Sox8* は *Gp2* の発現を直接制御していると仮説を立てた。そこで、CMT93 または HEK293T の二つの細胞株に *Sox8* または *Spib* を強制発現し、*Gp2* のプロモーター領域（開始コドンから上流 2.5 kbp 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、GST-RANKL によって絨毛上皮に誘導した M 細胞に対してクロマチン免疫沈降を行なった。その結果、GST-RANKL 投与群において *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。SOX ファミリー転写因子の結合サイトを含まない *Gp2* の上流 6 kb 部分では *Sox8* の結合増加は見られなかった。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。

第4章 考察

本研究では M 細胞の分化に寄与する転写因子として新たに Sox8 を同定した。SOX ファミリー転写因子は DNA 結合ドメインである high-mobility-group (HMG) box を共通して持ち、哺乳類の性決定因子として知られる Sry と 60%以上の相同性を有する転写因子であり、その多くが哺乳類の発生過程において重要であることが知られる²³。Sox8 は SOX ファミリー転写因子のうち、Sox9、Sox10 を含む SOXE サブグループに属し、互いのアミノ酸配列に 50%程度の相同性を有している³⁰⁻³²。このうち、Sox9 は腸管のクリプトにおいて Wnt シグナルの下流で発現し、パネート細胞とゴブレット細胞の分化に関与する³³⁻³⁵。一方、Sox8 は主に精巣と脳に発現が見られる。Sox8 は精巣において、Sox9 とともに精子形成を支持するセルトリ細胞の分化に寄与する³⁶⁻³⁸。Sox8^{-/-}マウスはセルトリ細胞の分化不全の結果、雄性不妊となる。また、脳においてもその発現が認められるが、その機能は 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^{31,39,40}。これまで Sox8 が腸管または免疫系の機能に関係するという報告は認められず、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。

Sox8 はパイエル板 FAE の M 細胞および RANKL によって誘導された M 細胞に発現していた。RANKL シグナルは非古典的 NF- κ B 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、転写を制御することが知られる¹⁷。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¹⁸。Spi-B の場合と同様に、RelB/p52 は Sox8 の発現を誘導し、RelB は Sox8 のプロモーター領域に結合することが本研究により明らかとなった。また、Sox8 と Spi-B の欠損マウスを解析したところ、Sox8 と Spi-B はそれぞれ互いの発現に必須ではなかった。したがって、Sox8 と Spib は RelB によって並列に転写制御を受けていると考えられる。また、M 細胞関連遺伝子の一つである Ccl20 のプロモーター領域においても RelB の結合が見られた。Ccl20 は M 細胞だけでなく FAE 全体に発現する分子であり、FAE 直下で RANKL を発現する MCi 細胞特異的に RANKL を欠損したマウスでは、FAE 全体で Ccl20 の発現が見られなくなる¹⁶。これらの知見から、RANKL-RelB シグナルは M

細胞の分化のみならず、FAE 全体の遺伝子発現を制御していると考えられる。しかしながら、FAE のすべての細胞に RANKL シグナルが伝達されているならば、なぜ限られた細胞のみが Spi-B および Sox8 を発現して M 細胞に分化するのかという疑問が生じる。B 型精原細胞に由来する Gc1-Spg 細胞において Wnt シグナルによって Tcf4/ β -catenin および c-Myc が Sox8 プロモーター上に結合し、転写を誘導することが報告されている⁴¹。腸管上皮細胞においては幹細胞の維持に Wnt シグナルが必須であることはよく知られており、パネート細胞、FOXL1⁺テロサイト、GLI1⁺間葉系細胞が Wnt の供給源として報告されている^{35,42,43}。M 細胞分化においてこれらのシグナルが関係するかは今後の研究課題である。

GP2 は M 細胞表面に発現し、1 型線毛細菌およびボツリヌス毒素の受容体として機能する^{6,10}。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²¹。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^{14,18}。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。このことから、Sox8 は *Gp2* の発現を直接制御していると考えられる。GP2 自体は取り込み受容体の一つであるが、*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。すなわち、*Sox8* 欠損により機能的に成熟な M 細胞が減少することが明らかとなった。したがって、Sox8 は単に受容体の発現を制御しているのではなく、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となる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^{44,45}。例えば、Sox10 のパートナー分子としては PAX3 や KROX20 が知られ、パートナー分子との組み合わせによって細胞・組織特異的な遺伝子発現の制御 (Sox10/PAX3 はメラノサイト、Sox10/KROX20 はシュワン細胞特異的) を可能にしていると考えられている⁴⁴。Sox8 の場合においても、M 細胞特異的な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。

Sox8 と Spi-B の共発現では *Gp2* プロモーターの活性化が増強されなかったことから、Sox8 のパートナーは Spi-B ではなく、Spi-B の下流あるいは RANKL シグナルで誘導される他の転写因子であることが示唆される。一方で、Spi-B による転写制御にもヘテロダイマーを形成する他の転写因子の存在が重要であり、パートナーが異なると標的遺伝子も変化することが報告されている²⁵。したがって、M 細胞分化に寄与するさらなる転写因子（群）の存在が示唆され、今後の探索が必要である。

M 細胞は腸管における分泌型 IgA の産生に重要な役割を果たしている¹¹。Sox8 の欠損により、4 週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。しかしながら、*Sox8*^{-/-}マウスにおける IgA 産生の減弱は加齢とともに消失し、8 週齢マウスの IgA 産生量は野生型と同等であった。M 細胞を完全に欠損したマウスでは 13 週齢に至る成体マウスにおいても IgA 産生の減弱が持続するのに対し、*Sox8* 欠損による IgA 応答への影響は若齢期に限定されていると言える¹¹。その理由として、*Sox8*^{-/-}マウスでは Spi-B および *Tnfrsf25* 陽性の未熟な 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²¹。また、パイエル板では lysozyme-expressing Peyer's patch DC (LysoDC) と呼ばれる樹状細胞が FAE を貫通して抗原を取り込むという報告があり、*Sox8*^{-/-}マウスにおける成熟 M 細胞の不在を代償しているのかもしれない⁴⁶。トランスクリプトーム解析の結果では、FAE で Sox8 によって制御を受けている遺伝子は Spi-B の制御下にある遺伝子のおよそ 3 分の 1 程度であった。影響を受ける遺伝子が少ないことにより、*Sox8* 欠損による免疫学的な表現型は RANK や Spi-B の欠損マウスに比べて限定的な影響に留まっ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。

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、離乳直後の腸管 IgA 産生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。*Sox8*^{-/-}マウスは成熟 M 細胞を欠損する新たなモデルマウスとして、M 細胞機能の解明や病態モデルとして有用であると考えられる。

第 5 章 参考文献

1. Kurashima, Y. & Kiyono, H. Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing. *Annual review of immunology* **35**, 119–147 (2017).
2. Fagarasan, S. & Honjo, T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature Reviews Immunology* **3**, 63 (2003).
3. Mabbott, N., Donaldson, D., Ohno, H., Williams, I. & Mahajan, A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal immunology* **6**, 666–77 (2013).
4. Kimura, S. Molecular insights into the mechanisms of M-cell differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues. *Anatomical science international* **93**, 23–34 (2018).
5. Peyer's patches: Organizing B cell responses at the intestinal frontier. (2018). doi:10.1111/imr.12400
6. Hase, K. *et al.* Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* **462**, 226–30 (2009).
7. Nakato, G. *et al.* Cutting Edge: *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **189**, 1540–4 (2012).
8. Clark, M., Hirst, B. & Jepson, M. M-cell surface $\beta 1$ integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. (1998).

9. Kim, S.-H. H. *et al.* C5a receptor-targeting ligand-mediated delivery of dengue virus antigen to M cells evokes antigen-specific systemic and mucosal immune responses in oral immunization. *Microbes and infection* **15**, 895–902 (2013).
10. Matsumura, T. *et al.* Botulinum toxin A complex exploits intestinal M cells to enter the host and exert neurotoxicity. *Nature communications* **6**, 6255 (2015).
11. Rios, D. *et al.* Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria. *Mucosal Immunology* **9**, 907–916 (2015).
12. Cunningham, A. L. *et al.* M-Cells Contribute to the Entry of an Oral Vaccine but Are Not Essential for the Subsequent Induction of Protective Immunity against *Francisella tularensis*. *PLOS ONE* **11**, e0153402 (2016).
13. Kishikawa, S. *et al.* Allograft inflammatory factor 1 is a regulator of transcytosis in M cells. *Nature communications* **8**, 14509 (2017).
14. 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’. *Molecular and cellular biology* **32**, 3639–47 (2012).
15. Knoop, K. A. *et al.* RANKL Is Necessary and Sufficient to Initiate Development of Antigen-Sampling M Cells in the Intestinal Epithelium. *The Journal of Immunology* **183**, 5738–47 (2009).
16. Nagashima, K. *et al.* Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nature immunology* **18**, 675–682 (2017).
17. Walsh, M. C., Choi, Y., Walsh, M. C. & Choi, Y. Biology of the RANKL–RANK–OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Frontiers in Immunology* (2014).

doi:10.3389/fimmu.2014.00511

18. Kanaya, T. *et al.* Development of intestinal M cells and follicle-associated epithelium is regulated by TRAF6-mediated NF- κ B signaling. *The Journal of experimental medicine* (2018).

doi:10.1084/jem.20160659

19. Kanaya, T. *et al.* The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nature immunology* **13**, 729–36 (2012).

20. Sato, S. *et al.* Transcription factor Spi-B–dependent and –independent pathways for the development of Peyer’s patch M cells. *Mucosal Immunology* **6**, 838–46 (2012).

21. Kimura, S. *et al.* Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches. *Mucosal Immunology* **8**, 650–60 (2015).

22. Hase, K. *et al.* Distinct Gene Expression Profiles Characterize Cellular Phenotypes of Follicle-Associated Epithelium and M Cells. *DNA Research* **12**, 127–37 (2005).

23. Kamachi, Y. & Kondoh, H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* **140**, 4129–4144 (2013).

24. Stolt, C., Schmitt, S., Lommes, P., Sock, E. & Wegner, M. Impact of transcription factor Sox8 on oligodendrocyte specification in the mouse embryonic spinal cord. *Developmental biology* **281**, 309–17 (2005).

25. Sasaki, I. *et al.* Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood* **120**, 4733–43 (2012).

26. Koch, M. A. *et al.* Maternal IgG and IgA Antibodies Dampen Mucosal T Helper Cell Responses in Early Life. *Cell* **165**, 827–841 (2016).
27. Hijikata, A. *et al.* Construction of an open-access database that integrates cross-reference information from the transcriptome and proteome of immune cells. *Bioinformatics (Oxford, England)* **23**, 2934–41 (2007).
28. Tsuji, M. *et al.* Preferential Generation of Follicular B Helper T Cells from Foxp3⁺ T Cells in Gut Peyer's Patches. *Science* **323**, 1488–1492 (2009).
29. Hirota, K. *et al.* Plasticity of TH17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nature Immunology* **14**, 372 (2013).
30. Barrionuevo, F. & Scherer, G. SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **42**, 433–436 (2010).
31. Weider, M. & Wegner, M. SoxE factors: Transcriptional regulators of neural differentiation and nervous system development. *Seminars in cell & developmental biology* **63**, 35–42 (2017).
32. She, Z.-Y. Y. & Yang, W.-X. X. Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development? *Seminars in cell & developmental biology* **63**, 13–22 (2017).
33. Bastide, P. *et al.* Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *The Journal of Cell Biology* **178**, 635–648 (2007).
34. Mori-Akiyama, Y. *et al.* SOX9 Is Required for the Differentiation of Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. *Gastroenterology* **133**, 539–546 (2007).

35. Sato, T. *et al.* Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**, 415–8 (2011).
36. KENNEDY, C. L., KOOPMAN, P., INA, Y. & O'BRYAN, M. K. Sox8 and Sertoli-cell Function. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1120**, 104–113 (2007).
37. O'Bryan, M. K. *et al.* Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. *Developmental Biology* **316**, 359–370 (2008).
38. Barrionuevo, F. J. *et al.* Sox9 and Sox8 protect the adult testis from male-to-female genetic reprogramming and complete degeneration. *eLife* **5**, (2016).
39. Stolt, C., Lommes, P., Friedrich, R. P. & Wegner, M. Transcription factors Sox8 and Sox10 perform non-equivalent roles during oligodendrocyte development despite functional redundancy. *Development (Cambridge, England)* **131**, 2349–58 (2004).
40. Turnescu, T. *et al.* Sox8 and Sox10 jointly maintain myelin gene expression in oligodendrocytes. *Glia* **66**, 279–294 (2018).
41. Kataruka, S., Akhade, V. S., Kayyar, B. & Rao, M. R. Mrhl Long Noncoding RNA Mediates Meiotic Commitment of Mouse Spermatogonial Cells by Regulating Sox8 Expression. *Molecular and cellular biology* **37**, (2017).
42. Shoshkes-Carmel, M. *et al.* Subepithelial telocytes are an important source of Wnts that supports intestinal crypts. *Nature* (2018). doi:10.1038/s41586-018-0084-4
43. Degirmenci, B., Valenta, T., Dimitrieva, S., Hausmann, G. & Basler, K. GLI1-expressing

mesenchymal cells form the essential Wnt-secreting niche for colon stem cells. *Nature* **558**, 449–453 (2018).

44. Kondoh, H. & Kamachi, Y. SOX–partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **42**, 391–399 (2010).

45. Kamachi, Y., Cheah, K. & Kondoh, H. Mechanism of regulatory target selection by the SOX high-mobility-group domain proteins as revealed by comparison of SOX1/2/3 and SOX9. *Molecular and cellular biology* **19**, 107–20 (1999).

46. Lelouard, H., Fallet, M., de Bovis, B., Méresse, S. & Gorvel, J. Peyer’s Patch Dendritic Cells Sample Antigens by Extending Dendrites Through M Cell-Specific Transcellular Pores. *Gastroenterology* **142**, 592-601.e3 (2012).

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究全般に渡って直接御指導を賜りました慶應義塾大学薬学部 長谷耕二教授に心から感謝いたします。

本研究をともに推進し、御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院 木村俊介助教に心から感謝いたします。

本研究を行うに際して有益なる御助言と御指導を賜りました慶應義塾大学薬学部 金倫基教授、高橋大輔助教に深く感謝いたします。

本研究をともに推進し、特に免疫学的解析に多大なご協力を賜りました慶應義塾大学薬学部 中村有孝特任助教に深く感謝いたします。

本研究を行うに際して実験・解析に多大な御協力を賜りました理化学研究所 大野博司博士、金谷高史博士、かずさ DNA 研究所 藤木亮次博士、北海道大学大学院歯学研究院 武藤麻未博士、Francis Crick Institute 尾畑佑樹博士、北海道大学大学院医学研究院 岩永敏彦教授、千葉大学医学部 加藤直也教授、中川倫夫講師、大阪大学微生物病研究所 佐藤慎太郎特任准教授、和歌山県立医科大学先端医学研究所 改正恒康教授に深く感謝いたします。

本研究に御協力下さいました慶應義塾大学薬学部 藤村由美子様、永井基慈様、室井きさら様、高野俊介様に深く感謝いたします。

他大学から公務員を経て現れた私を受け入れ、楽しい大学院生活を過ごさせていただいた慶應義塾大学薬学部生化学講座の皆様に深く感謝いたします。

私を支えてくれた家族と、2018年2月に他界した愛猫小次郎に深く感謝いたします。

本研究の一部は日本学術振興会特別研究員奨励費（DC1）を用いて行いました。日本学術振興会に深く感謝いたします。