

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 新生児腸内細菌叢形成メカニズムの解明
(英語) Investigation for the molecular mechanism underlying shape
of intestinal microbiota in neonates.

研究開発担当者 (日本語) 北海道大学遺伝子病制御研究所 准教授 澤 新一郎
所属 役職 氏名： (英語) SAWA SHINICHIRO

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

<和文>

M細胞が腸内細菌叢形成に果たす役割の検討

平成28年度は東京大学医学系研究科・高柳広教授らとともに腸管リンパ組織（Gut Associated Lymphoid Tissue=GALT）に存在する ILC3 に注目し、GALT の管腔側に存在する腸管上皮の一種、Microfold 細胞（M細胞）形成における ILC3 の役割を検討した。M細胞は TNF ファミリーサイトカインの一種、RANKL 依存的に分化することが知られている(Knoop, *J. Immunology*, 2009)。また、GALT の一種であるパイエル板は胎仔期に形成され、M細胞は新生仔パイエル板の上皮にも存在することが知られている。新生仔パイエル板には ILC3 が数多く存在し、RANKL を強く発現する。一方、パイエル板の上皮直下には RANKL を発現する間葉系細胞が存在する事も知られているが、生体内において M細胞誘導に重要な役割を果たす RANKL 産生細胞はこれまで不明であった。また、新生仔期から存在する M細胞が腸内細菌叢の形成にどのような役割を果たすか、という疑問についてもこれまで明らかでなかった。まず、Vil1-Cre マウスと RANK^{flox/flox} マウスを交配し、上皮細胞特異的に RANKL 受容体である RANK を欠損させ、M細胞が欠損するマウス（RANK^{ΔEpi}）を作製した。RANK^{ΔEpi} マウスを成体期（8週齢）における腸内細菌叢を 16S リボソーム RNA で網羅的に解析し、野生型マウスと比較した。主座標解析を行った結果、両群には明らかな細菌叢の相違が認められた。特に、*Segmented Filamentous Bacteria* (SFB)が RANK^{ΔEpi} マウスで増加していた。また、RANK^{ΔEpi} マウスではパイエル板の B細胞集簇が低下しており、腸管腔内における細菌特異的 IgA 産生が障害されていた。おそらく、M細胞欠損による抗原取込みの低下が細菌抗原特異的な B細胞分化と IgA 産生を障害し、細菌叢の構成を変容させたと考えられた。次に、M細胞分化における ILC3 の役割を明らかにするため、Vav1Cre マウスと RANKL^{flox/flox} マウスを交配し、血球系細胞特異的な RANKL 欠損マウス（RANKL^{ΔHem}）を作製し、M細胞分化を検討した。パイエル板内の ILC3 はリンパ節形成に重要な Lymphoid Tissue inducer (LTi)細胞と機能的な相同性を持つため、パイエル板の B細胞濾胞形成や IgA 産生に影響を与えことが予想されたが、RANKL^{ΔHem} マウスではパイエル板 B細胞分化に影響がなかった。さらに、RANKL^{ΔHem} マウスでは成体マウス腸内細菌叢の変容も観察されなかったため、ILC3 はパイエル板 M細胞の分化誘導を介した腸内細菌叢の形成には寄与しないことが明らかになった。一方、腸管の間葉系細胞特異的に RANKL を欠損させた RANKL^{ΔMes} マウスでは M細胞欠損とパイエル板 B細胞集簇低下、腸内細菌特異的 IgA 産生障害が認められ、RANK^{ΔEpi} マウスと同様の腸内細菌叢の変容も観察された（文献2：Nagashima, Sawa et al, *Nat. Immunol*, 2017）。

<英文>

Identification of M cell inducer cells in the GALTs and assessment for the impact of M cell on the tuning of gut microbiota

In 2016, I investigated roles of group 3 innate lymphoid cells (ILC3s) on the differentiation of Microfold (M) cell, a kind of epithelial cells that located on the luminal side of Gut-Associated Lymphoid Tissues (GALTs) in collaboration with Prof. Hiroshi Takayanagi at the University of Tokyo. It is reported that M cells differentiate from epithelial cells in response to RANKL, a kind of TNF family cytokine. Peyer's patches (PPs) are a kind of GALTs

that contain M cell on the luminal side. ILC3s abundantly exist in neonatal PPs and express high amount of RANKL. However, exact source of RANKL required for M cell development in vivo as not precisely determined. Additionally, it is not known whether M cells contribute to the formation of gut microbiota or not. In this project, we first generated epithelial cell-specific RANK deficient $RANK^{\Delta Epi}$ mice by mating $Vil1-Cre$ and $RANK^{flox/flox}$ mice. We found that $RANK^{\Delta Epi}$ mice that lack M cells harbored distinct composition of gut microbiota from littermate controls based on 16S ribosomal RNA sequence. Interestingly, higher frequency of Segmented Filamentous Bacteria (SFB) was observed in feces of $RANK^{\Delta Epi}$ mice. We also found decreased number of $IgA^+ B$ cells in PPs and lower concentration of IgA in feces. As to the actual source of RANKL required for M cell differentiation, we identified particular mesenchymal cells that localize just beneath the epithelium of PPs. Mesenchymal cell-specific RANKL deficient $RANKL^{\Delta Mes}$ mice had no M cells, harbored less $IgA^+ B$ cells and altered bacterial composition similar to $RANK^{\Delta Epi}$ mice. However, hematopoietic cell-specific RANKL deficient $RANKL^{\Delta Hem}$ mice had normal number of M cells and harbored bacterial composition similar to littermate controls. Taken all these result together, ILC3-derived RANKL had no impact on M cell differentiation and alteration of gut microbiota. (Nagashima, Sawa et al, *Nat. Immunol*, 2017)

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1件、国際誌 2件)

1. Lucas Onder, Urs Mörbel, Natalia Pikor1, Mario Novkovic, Hung-Wei Cheng, Thomas Hehlhans, Klaus Pfeffer, Burkhard Becher, Ari Waisman, Thomas Rüllicke, Jennifer Gommerman, Christopher Müller, Shinichiro Sawa, Elke Scandella and Burkhard Ludewig. Lymphatic endothelial cells control initiation of lymph node organogenesis. *Immunity*, in press
2. Kazuki Nagashima, Shinichiro Sawa, Takeshi Nitta, Masanori Tsutsumi, Tadashi Okamura, Josef M. Peninger, Tomoki Nakashima and Hiroshi Takayanagi. Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nat Immunol.*, 18(6), 675-682 (2017)
3. Kazuo Okamoto, Tomoki Nakashima, Masahiro Shinohara, Takako Negishi-Koga, Noriko Komatsu, Asuka Terashima, Shinichiro Sawa, Takeshi Nitta, and Hiroshi Takayanagi. Osteoimmunology: the conceptual framework unifying the immune and skeletal systems. *Physiological Reviews*. in press
4. 澤 新一郎 「新生児腸内細菌叢はどのように形成されるか？」生体の科学 2017; 68(2):1-4

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Mesenchymal organizer cell-derived RANKL induces terminal differentiation of LT_i cell. Shinichiro Sawa、口頭発表、7th International Workshop of Kyoto T cell Conference、芝蘭会館（京都市左京区）、2017年3月13日～2017年3月17日、国内
2. Microenvironment for the lymph node organogenesis, Shinichiro Sawa、口頭発表、11th International Symposium of The Institute Network "Frontiers in Biomedical Sciences"、徳島大学藤井記念ホール（徳島市）、2017年2月26日～2017年2月27日、国内
3. Tomoki Nakashima and Hiroshi Takayanagi, Mesenchymal organizer cell-derived RANKL induces terminal differentiation of LT_i cell, Shinichiro Sawa、口頭発表、45th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology、沖縄コンベンションセンター（宜野湾市）、2016年12月05日～2016年12月07日、国内
4. Mesenchymal organizer cell-derived RANKL induces terminal differentiation of LT_i cell, Shinichiro Sawa、ポスター発表、EMBO Conference Innate lymphoid cells-2016（国際学会）、Kalkscheune（ドイツ・ベルリン）、2016年11月30日～2016年12月02日、国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし