

## 特殊な腸管上皮細胞, M細胞の生物学

大野博司

M細胞はパイエル板などの腸管免疫組織を覆う上皮領域に存在する特殊な腸管上皮細胞である。M細胞は細菌などの腸内抗原を積極的に取り込んで腸管免疫組織に供給することで、腸管免疫応答の誘導に重要な役割を果たすと信じられてきた。しかし、その機能の分子メカニズムは永らく不明であった。最近筆者らは、M細胞上に発現する glycoprotein2 という GPI アンカー型分子が細菌の受容体として腸管免疫応答誘導に重要な役割を担うことを発見した。このほか、プリオンタンパク質などいくつかの GPI アンカータンパク質が M細胞の管腔側表面に発現することも見出しており、M細胞上の細菌認識受容体として機能している可能性がある。これらの分子を含め、最近同定された M細胞特異的分子群を足がかりに M細胞の機能や分化の分子機構の理解が進めば、新たな経口ワクチンや抗アレルギー薬の開発など、遠くない将来研究成果を社会に還元できるであろう。

### 1. はじめに

われわれの体において、体内外の境界は皮膚および粘膜によって形成されている。皮膚が角質や数層の表皮細胞により体表面に比較的堅牢な防壁を形成しているのに対し、粘膜、その中でも特に腸管粘膜は1層の円柱上皮細胞と粘液に覆われているのみであり、比較的脆弱と言える。腸管内には、われわれの身体を構成する全ての細胞の数よりもはるかに多い、100兆個以上にも及ぶ膨大な数の細菌が常在細菌叢として棲み着いている。さらに、食物とともに病原性細菌・ウイルスを含む種々の微生物が侵入してくる。加えて、腸管はその主な機能である栄養分の吸収のため、とりわけ小腸において絨毛と呼ばれる棒状あるいは舌状の突起構造をなし、さらに個々の上皮細胞の腸管内腔に面した細胞膜（頂端面）には微絨毛という、整然と密集した細長いブラシの毛のような構造を有することで、300~400

m<sup>2</sup>にも及ぶとされる広大な表面積を持つように進化を遂げた(図1)<sup>1-4)</sup>。これらの要因が重なった結果として、腸管や呼吸器系を含めた粘膜面は、大部分の病原体の侵入経路となっている。従って粘膜は、病原体をはじめとするさまざまな腸内抗原から個体を守る最前線として、最も重要な部位の一つと考えられる。そこでわれわれの体は、特殊な免疫系を発達させ、外界と接する粘膜最前線における生体防御機能を高めてきた<sup>1-4)</sup>。本総説では、腸管における生体防御機構について概説したのち、腸管免疫系が正常に機能する上で重要な役割を果たすと考えられる特殊な腸管上皮細胞, M細胞について、筆者らの研究成果を含めた最近の知見を紹介したい。

### 2. 腸管における生体防御バリア

腸管粘膜上皮の大部分は吸収上皮細胞が占めるが、その一部(小腸で約10分の1, 大腸では約5分の1)は杯細胞であり、腸管粘膜表面は、この杯細胞から分泌されるムチンと水を主成分とする厚さ100-300 μmにも達する粘液層により覆われている(図1)<sup>1-3)</sup>。粘液層は腸管粘膜を外敵から保護する物理的バリアとして機能する。常在細菌や病原菌, ウイルスなどの微生物はその表面にレクチン様タンパク質を持つものが多く、これにより腸管上皮細胞表面の糖鎖構造と結合することで細胞表面に付着する。粘液層や、次に述べる糖衣の糖鎖は多様性に富んでおり、多くの

独立行政法人理化学研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター 免疫系構築研究チーム (〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22)

Biology of M cells, a unique subset of intestinal epithelial cells

Hiroshi Ohno (Laboratory for Epithelial Immunobiology, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, 1-7-22 Suehiro, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan)

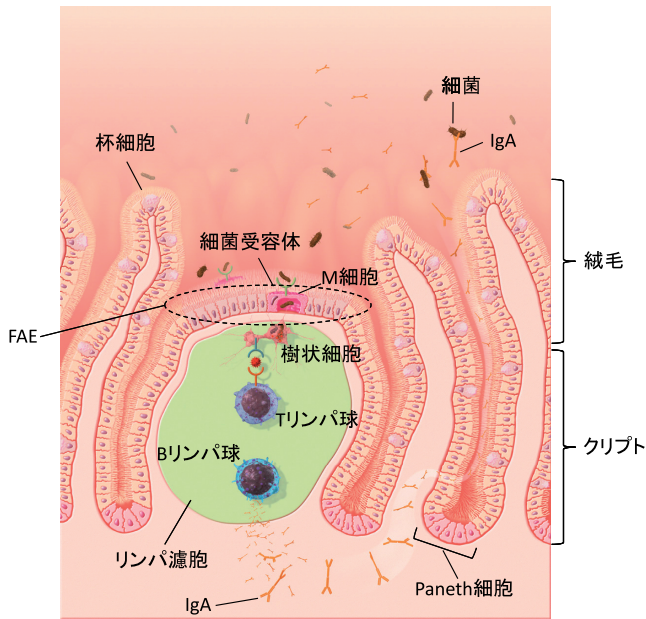


図1 小腸の模式図

パイエル板などのリンパ濾胞を覆う上皮領域は follicle-associated epithelium (FAE) と呼ばれ、そこにM細胞が点在する。M細胞による腸内細菌などの抗原に対する腸管免疫応答誘導は、以下のように進行すると考えられる。すなわち、①M細胞の管腔側表面に発現する glycoprotein 2 (GP2) などの細菌受容体が、結合した菌を細胞の中に取り込んで基底膜側まで輸送し、樹状細胞などの抗原提示細胞に受け渡す。②樹状細胞が細菌を受け取って分解し、抗原の断片をT細胞に提示する。③T細胞は活性化され、B細胞に指令を送る。④B細胞は分化・成熟して、IgA抗体をつくり出す。IgAはクリプトや絨毛部の腸管上皮細胞に発現する多量体Ig受容体により腸管腔内に分泌され、細菌を排出したり、監視したりする。絨毛には粘液を産生する杯細胞、またクリプト底部には抗菌物質を産生するPaneth (パネート) 細胞が存在し、腸管粘膜面における物理化学的な生体防御の一端を担っている (リンパ濾胞とFAEは特に拡大して描いてある)。詳しくは本文参照。(文献7より改変)

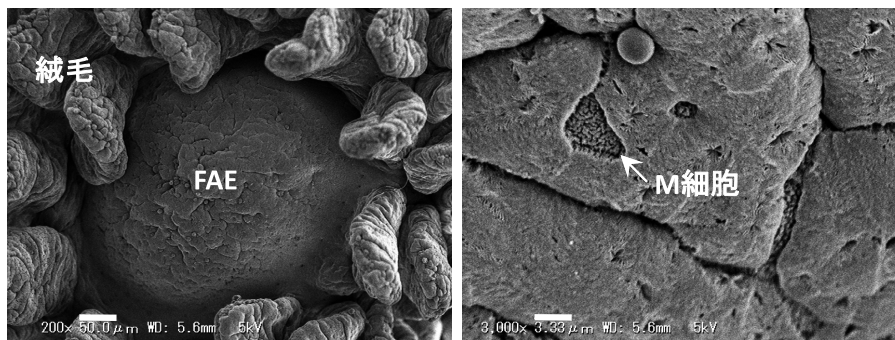


図2 マウス小腸粘膜面の走査電子顕微鏡写真

左、写真中央のドーム状の部分がFAE。それを囲んで絨毛が舌状の突起を形成している。スケールバーは50 μm。右、FAEの強拡大像。M細胞には微絨毛が発達していないため、周囲の細胞より表面が陥凹して見える。この倍率では微絨毛は識別できず、またM細胞を囲むFAE上皮細胞間の境界もはっきりしない。スケールバーは3.3 μm (文献8より転載)

常在細菌や病原菌、ウイルスのレクチン様タンパク質と結合して捕捉することで、これらの上皮細胞層への到達を阻止する物理的バリアーとして機能すると考えられる。粘液の分泌量は成人では1日に数~十リットルにも達し、分泌された粘液は捕捉した微生物などの体外への排出を促す。

粘液層のバリアーを突破してきた微生物には、さらに第2、第3のバリアーが待ち受けている。腸管上皮細胞の頂端面細胞膜には、先にも述べたように微絨毛が整然と林立している。さらに微絨毛には、ムチン様構造を持つ細胞膜貫通タンパク質が存在し、厚さ数百nmの糖衣 (glycocalyx) と呼ばれる層を形成して細胞表面を密に覆っている<sup>1-3)</sup>。糖衣の糖タンパク質は負の電荷を持ち、膵臓から分泌された消化酵素が付着している。また、絨毛の吸収上皮細胞の微絨毛には、膜貫通型消化酵素も発現している。

したがって、糖衣は食物の最終的な消化が起こる場であり、分解産物であるアミノ酸や単糖は素早く吸収上皮細胞膜から吸収される。一方、抗原となり得る高分子やウイルス、細菌が拡散・透過により糖衣をくぐり抜けて細胞膜に到達することは容易ではなく、糖衣は吸収上皮の物理的バリアーとしての役割を果たしている。

ヒト小腸上皮の観察において、微絨毛は細胞表面の5 μmあたりに約40本存在し、その直径は約100 nmとの報告がある<sup>4)</sup>。すなわち、2本の微絨毛の間隔は約25 nmと計算される。これはアルブミンなどの典型的な可溶性球状タンパク質分子の大きさと似たようなスケールである。したがって、微生物が粘液層や糖衣のバリアーをすり抜けて来たとしても、隣接する微絨毛の間を通過して、実際にエンドサイトーシスが起る微絨毛の根元の上皮細胞表面に到

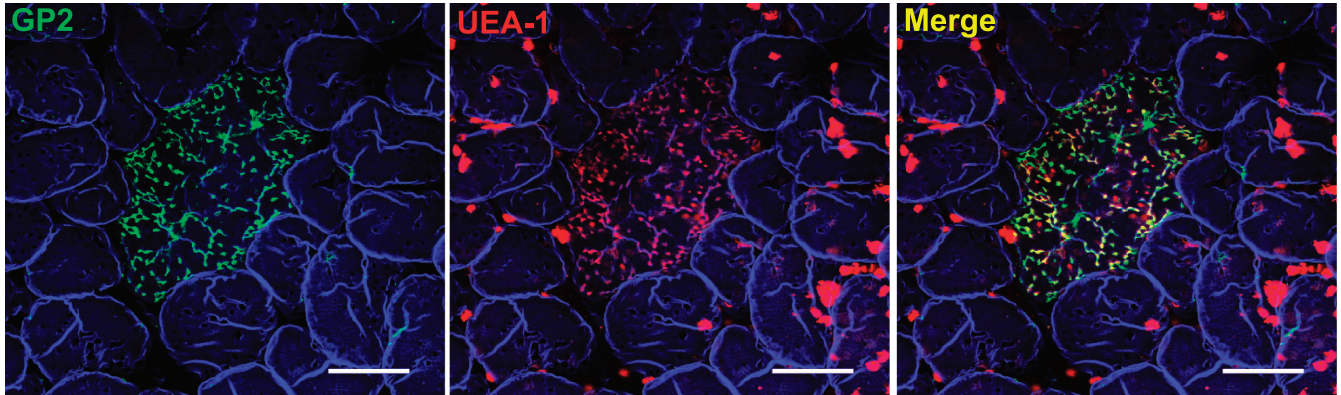


図3 マウスパイエル板のホールマウント染色像

左はGP2 (緑), 中央はUEA-1 (赤), 右は両者の二重染色像。青はアクチン線維 (F-アクチン)。各パネル中央右上から左下の楕円状の部分がFAE。それを取り囲んでF-アクチン染色による絨毛の輪郭が見て取れる。GP2の染色がほぼFAEに限局しているのに対し、UEA-1ではFAEのほか、絨毛部にも杯細胞の強い染色が認められる (本ホールマウント標本では、クリプト底部のPaneth細胞は観察できない)。FAEにおけるGP2陽性細胞は、その多くがUEA-1の染色と重なっていることから、GP2はM細胞にのみ発現していると考えられる。スケールバーは100  $\mu$ m。

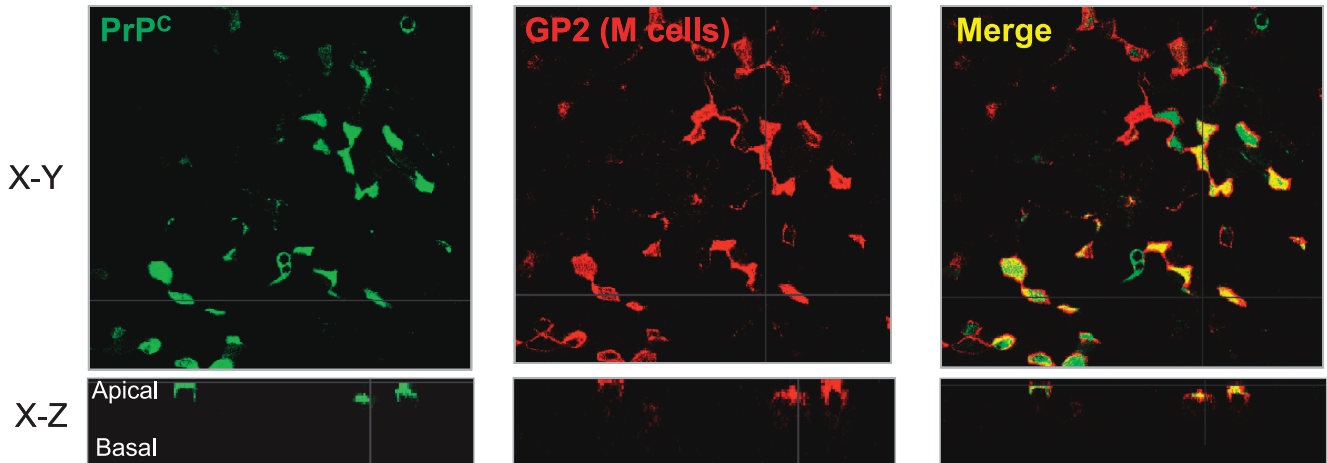


図4 プリオンタンパク質のM細胞管腔側細胞膜への発現

マウスパイエル板FAEのホールマウント染色像。左はプリオンタンパク質 (緑), 中央はGP2 (赤), 右は両者の二重染色像。プリオンタンパク質はFAEに点在する細胞にのみ染色が認められ、その多くがGP2陽性のM細胞と重なっていることから (黄色)、プリオンタンパク質はM細胞に強く発現していると考えられる。また、X-Z断面像では、プリオンタンパク質は管腔側 (apical) 細胞膜上にGP2と共局在する形で染色されている。(文献35より転載)

達するのは難しいと考えられる。

また、腸管上皮の幹細胞が存在するクリプト底部には、腸管上皮の一種であるPaneth細胞が幹細胞と隣接して存在し、抗菌ペプチドやリゾチームなどの抗菌作用を有する分子を分泌することで、粘膜表面を除菌している。さらに、次項に述べる腸管免疫系により誘導・産生される分泌型IgA (免疫グロブリンA) も、細菌やウイルス自体、さらには病原菌が分泌する毒素と結合することで、その上皮への結合や体内への侵入を阻害し、糞便中への排出を促進する<sup>1~4)</sup>。

### 3. 腸管免疫系

このように、腸管には物理的・化学的バリアーが存在するが、さらに腸管には腸管免疫系という特殊な末梢免疫系が発達し、生体防御の最前線である広大な腸管粘膜面の防御に当たっている。そのために、全末梢リンパ球の実に60-70%が腸管免疫系に集積しており、体内最大の末梢 (あるいは二次) 免疫組織をなす。腸管免疫系は脾臓や末梢リンパ節を中心とする全身免疫系とは異なる独自の免疫系を構築しており、免疫誘導組織としてのパイエル板 (Peyer's patch) や孤立リンパ小節 (isolated lymphoid follicle, ILF) などのいわゆる腸管関連リンパ組織 (gut-associated

lymphoid tissue, GALT) や、免疫実効組織である上皮細胞間リンパ球 (intraepithelial lymphocyte, IEL), 粘膜固有層の IgA<sup>+</sup> 形質細胞などからなる。GALT には、脾臓やリンパ節と同様の組織だった免疫構造であるリンパ濾胞が存在し、そこで IgA の産生誘導がなされる。複数のリンパ濾胞が集まって構築されたリンパ組織を集合リンパ小節と呼び、肉眼で観察可能な直径 2~3 mm の円盤状構造としてヒトをはじめとする多数の動物の小腸に確認されている。マウスでは、小腸の全長にわたって、腸間膜付着部の反対側に 8~10 個の集合リンパ小節が点在しており、これをパイエル板と呼ぶ。ヒトでは上述のような小型の集合リンパ小節に加え、特に若年者において回腸末端部付近に短径 1~3 cm, 長径 2~10 cm にも達する小判型の集合リンパ小節がやはり腸間膜付着部の反対側に観察され、これをパイエル板と呼んでいる。集合リンパ小節はマウスでは盲腸にもよく発達しており、caecal patch (パイエル板のように日本語の用語として定着したものはない。ここでは盲腸板とする。これに関連して、ニワトリでも二本に分岐した盲腸に集合リンパ小節が発達しており、盲腸扁桃 [caecal tonsil] という名称が付けられている) と呼ばれる。ヒトでは虫垂がこれに相当すると考えられ、「虫垂は腸の扁桃」と記述する教科書もある。集合リンパ小節は大腸の特に下部にも発達しており、colonic patch (やはり適切な日本語の用語はない。ここでは大腸板としておく) と呼ばれる。一方、ILF は、その名の通り単一のリンパ濾胞が点在するもので、特に大腸で多く見られる。腸管免疫系は、どのような微生物・異物が腸管の中に存在するかを常に監視し、これら腸内抗原に対して IgA 抗体産生を主体とする適切な免疫応答を起こすことで、病原体を排除したり腸内常在細菌叢のバランスを維持したりしている。

#### 4. FAE と M 細胞

上述した GALT のリンパ濾胞を覆う腸管上皮細胞領域は、通常の絨毛上皮細胞とは性質の異なる上皮細胞からなり、濾胞被覆上皮 (follicle-associated epithelium; FAE) と呼ばれる (図 1, 図 2)<sup>1,2,5-8)</sup>。絨毛を覆う上皮では、大多数を占める吸収上皮細胞に加え、杯細胞、腸管内分泌細胞が存在するが、FAE には杯細胞や腸管内分泌細胞はほとんど見られない<sup>1,2,5,6)</sup>。また、FAE に隣接するクリプトには Paneth 細胞も余り認められない。これは、リンパ濾胞の免疫細胞との相互作用により、これらの細胞の分化が抑制されるためと考えられる。

FAE の上皮細胞は円柱上皮であり、発達した微絨毛と糖衣を有するなど、形態的には吸収上皮細胞とよく似ている。しかし、FAE 上皮細胞の微絨毛における膜貫通型消化酵素の発現は絨毛の吸収上皮細胞に比べ著しく低レベルであり、そのため FAE では食物由来の異物抗原が消化さ

れることなく上皮表面に到達しやすい<sup>1,2,5,6)</sup>。また、杯細胞や Paneth 細胞が分化してこないため、FAE はほとんど粘液層に覆われておらず、また抗菌物質も少ない。さらに、多量体 Ig 受容体 (粘膜固有層で産生される二量体 IgA と結合して上皮細胞内に取り込み、小胞輸送により細胞質を横切って運搬し、最終的に腸管内腔へと IgA を分泌する) の発現も FAE の上皮では欠如しているため、FAE では IgA の分泌も認められない<sup>1,2,5,6)</sup>。

しかし、FAE の最も際だった特徴は、M 細胞という粘膜抗原の取り込みに特化した特殊な細胞の存在である<sup>1,2,5,6)</sup>。M 細胞はヒトやマウスでは FAE の細胞の 5~10% を占める。約 90 年前、竹尾結核研究所の熊谷健三郎博士は、ウサギに経口投与した結核菌 (生菌, 死菌とも) やヒツジ赤血球がパイエル板や盲腸リンパ濾胞の FAE からリンパ濾胞へと選択的に取り込まれ、「其他ノ胃, 腸粘膜ヲ精査セシモ菌ノ進入或ハ存在セル部分ヲ発見シ得ザリキ」と述べている<sup>5,9,10)</sup>。その後 50 年を経て、Bockman と Cooper がウサギ盲腸とニワトリ Fabricius 囊の FAE にフェリチンやインクの粒子を盛んに取り込む細胞を発見した<sup>11)</sup>。さらにその翌年、Owen と Jones はヒト FAE にも同様の細胞が存在することを見出した<sup>12)</sup>。そして、この細胞が通常の FAE 上皮細胞と異なり、管腔側細胞膜が規則正しく密集した微絨毛構造を有しておらず、代わりに短い不規則なひだ状の突起 (microfold) が存在し、膜状 (membranous) の形態をなすことから、これらの単語の頭文字を取って M 細胞と名付けた<sup>12)</sup>。

GALT のユニークな特徴のひとつとして、脾臓やリンパ節などの全身免疫系のように輸入リンパ管が存在せず、腸管内腔から上皮細胞層を介して直接抗原の供給を受けることが挙げられる<sup>1,2,5,6)</sup>。形態学的観察から、M 細胞には腸管管腔内の細菌やウイルス、さらには実験的に与えたラテックスビーズのような非生物粒子をも取り込み、基底膜側へと細胞質を横切って運ぶ、一方向性の「トランスサイトosis」という物質輸送が発達していることが明らかとなってきた<sup>1,2,5,6,8,11,12)</sup>。運ばれた細菌などは上皮下に存在する樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、リソソームのタンパク分解酵素によるプロセッシングを経て抗原提示されることにより粘膜免疫応答を惹起し、最終的には抗原特異的 IgA の産生にいたると考えられる。M 細胞には余りリソソームが発達しておらず、またリソソーム酵素活性も低いことから、M 細胞内では抗原のプロセッシングはほとんどなされないと考えられる<sup>5,6)</sup>。M 細胞の今ひとつの形態的特徴として、「M 細胞ポケット」がある。M 細胞の側基底面細胞膜は大きく袋状に陥凹して空間を形成しており、そこにパイエル板の樹状細胞やリンパ球を抱え込んでいる。このため、M 細胞の細胞質は薄いところでは頂端面と基底面の距離が 3 μm 程しかなく、素早いトランス

サイトーシスを実現している。また、M細胞の表面が短く不規則な突起や皺のように見えるのは、貪食による盛んな細胞膜の取り込みのために微絨毛が十分発達できないからとの説もある。

先に述べたようにM細胞はラテックスビーズのようなものも取り込むことから、無差別で非特異的な貪食能を持つとも考えられる。しかし一方で、コレラ菌の生菌はM細胞から積極的に取り込まれるが、紫外線照射などにより死菌処理すると取り込まれなくなることや、同じ大腸菌でも株の違いにより取り込みに差が見られることから<sup>1)</sup>、取り込み受容体による特異的な取り込み機構の存在も示唆されていた。しかし、その詳しいメカニズムについては長い間不明であった。これは、M細胞の数が全腸管上皮細胞の1/10<sup>7</sup>以下と非常に少なく、また特異的な表面マーカーも見つけられていないことなどから、M細胞の高効率・高純度での単離精製が難しく、結果としてこれまでのM細胞の研究が形態学に終始し、生化学的・分子生物学的解析は皆無に等しい状況にあったことによる。しかし、近年の生命科学研究の技術革新、特にマイクロアレイ解析手法を利用した少量のサンプルでの網羅的遺伝子発現解析の実現により、ここ数年の間にM細胞特異的な遺伝子の同定が報告されるようになった<sup>13~15)</sup>。

## 5. M細胞特異的分子の同定

M細胞特異的遺伝子を単離するためには、M細胞を単離精製する必要があるが、M細胞特異的なマーカーは存在しなかった。そこで、筆者ら<sup>13)</sup>およびVerbruggeら<sup>14)</sup>はそれぞれ独自に、マウス小腸を用いて、M細胞を5-10%含むFAEとM細胞を含まない絨毛領域(villous epithelium; VE)の上皮細胞層をシート状に分離回収する方法を考案した。そして、これらのサンプルから調製したRNAをプローブとしたマイクロアレイによる遺伝子発現解析から、絨毛領域に比較してFAEで高発現する遺伝子群を同定し、定量PCRによりFAE特異的発現の確認された遺伝子についてさらに*in situ*ハイブリダイゼーション法でFAEでの発現パターンを解析することにより、FAE全体あるいはM細胞特異的に発現する遺伝子群を同定した。また清野らのグループは、UEA-1ならびにNKM 16-2-4モノクローナル抗体による染色を指標に、セルソーター(FACS)によるM細胞の単離法を考案した<sup>15)</sup>。UEA-1は*Ulex europaeus*(和名:ハリエニシダ。ヨーロッパ原産の低木で、樹高約2m、春に黄色い花が咲く)というマメ科に属する植物由来のレクチンであり、 $\alpha(1,2)$ -フコースを認識する<sup>6)</sup>。マウス小腸では、M細胞以外に杯細胞、Paneth細胞とも反応するが、マウス以外の動物のM細胞とは反応しない(図3)。一方NKM 16-2-4は、清野らが最近樹立したモノクローナル抗体で、やはり $\alpha(1,2)$ -フコースを含む

糖鎖構造を認識するが、杯細胞とは反応しない<sup>16)</sup>。清野らは、マウス小腸から上皮細胞を単細胞として回収し、UEA-1とNKM 16-2-4の二重陽性細胞をM細胞としてセルソーターにより単離し、マイクロアレイによる発現遺伝子解析を行った<sup>15)</sup>。これらの研究で得られたM細胞特異的な遺伝子群は概ねオーバーラップしていることから、それぞれの解析結果はM細胞特異的な遺伝子を正しく反映していると考えられる。

## 6. M細胞上の微生物受容体

M細胞は、膜タンパク質の細胞内局在もユニークであり、通常の上皮細胞では側基底面細胞膜上に限局して発現する膜タンパク質が、管腔側細胞膜上にも発現することが報告されている。β1インテグリンもそのような分子のひとつである。β1インテグリンはエルシニア菌の受容体となっていることから、M細胞を介するエルシニア菌の侵入に寄与すると考えられる<sup>17)</sup>。また、ポリオウイルスの受容体であり、細胞間接着への関与が示唆されるCD155も、M細胞では通常の腸管上皮細胞に比べ管腔側に強い発現が認められ、ウイルス感染との関連が示唆されている<sup>18)</sup>。

## 7. M細胞の新たな細菌取り込み受容体GP2の発見

最近筆者らが見出したglycoprotein 2(GP2)もM細胞上に発現する細菌受容体である<sup>13)</sup>。GP2は、1990年に膵臓腺房細胞に限局して発現する分子として同定されたグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型膜タンパク質であるが<sup>19,20)</sup>、その機能は長らく不明であり、M細胞での遺伝子発現は予想外の発見であった。GP2のモノクローナル抗体を作製してマウス腸管の組織染色を行ったところ、GP2の染色はパイエル板、ILF、盲腸板や大腸板のFAE領域に点在しており、UEA-1とはほぼ一致して認められたことから、GP2は腸管上皮細胞の中でM細胞特異的に発現することが示唆された(図3)<sup>15,21)</sup>。さらに、ヒトパイエル板FAEの生検組織標本でもGP2の発現が認められたことから、GP2は種を越えたM細胞のユニバーサル表面マーカーであることが示された<sup>21)</sup>。

その後の解析から、GP2は大腸菌(*Escherichia coli*)およびサルモネラ菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium [S. Typhimurium] および Enteritidis)など、菌体表面にI型線毛を有するグラム陰性腸桿菌と、I型線毛の構成タンパク質であるFimH依存的に結合し、これらの細菌を取り込むことが明らかとなった<sup>21)</sup>。

M細胞を介するGALTへの腸内抗原取り込みは、腸管免疫応答の誘導に必要であると考えられてきたが、それを実験的に裏付けた報告はこれまでなされていなかった。S. Typhimuriumは主としてM細胞を介して体内に侵入すると考えられている<sup>1,6,22)</sup>。そこでわれわれは、GP2欠損マウ

表1 Salmonella-ToxC 経口投与時の免疫応答

	野生型マウス	GP2 欠損マウス
抗原特異的 T 細胞活性化	+	-
抗原特異的 IgA (糞便中)	++	±
抗原特異的 IgG (血中)	++	±

スと *S. Typhimurium* を用いることにより、GP2 を介する M 細胞からの細菌の取り込みが、その後の抗原特異的な粘膜免疫応答の惹起に必要であるか否かを検討した。この実験には、抗原性の強い破傷風毒素 C 末断片を発現する遺伝子改変サルモネラ菌 (*Salmonella-ToxC*) の経口免疫モデルを用いた<sup>23)</sup>。*Salmonella-ToxC* を経口投与した後、マウスパイエル板における破傷風毒素特異的なヘルパー T リンパ球の誘導を測定したところ、GP2 欠損マウスでは野生型マウスに比較して著しく低下していた (表 1)<sup>21)</sup>。一般に、B リンパ球による抗体産生には、ヘルパー T リンパ球の働きが必要である。実際、GP2 欠損マウスにおいても腸管免疫応答に特徴的な糞便中への破傷風毒素特異的 IgA 抗体の分泌量も、また全身性免疫の指標である血清中の特異的 IgG 量も、野生型マウスに比較して有意に低下していた (表 1)<sup>21)</sup>。したがって、M 細胞上に発現する GP2 は粘膜表面の免疫監視において重要な役割を果たす抗原取り込み受容体であることが明らかとなった。

*in vitro* 培養系では宿主細胞への侵入が著明に抑制される *inv* 遺伝子欠損 *S. Typhimurium* 株においても、野生型 *S. Typhimurium* ほど効率的ではないものの<sup>24)</sup>、M 細胞への取り込み能は保持しているとの報告がある<sup>25)</sup>。筆者らは GP2 欠損マウスでの野生型 *S. Typhimurium* の取り込み不全に加え、FimH 欠損 *S. Typhimurium* は *inv* 遺伝子を持っているにもかかわらず効率よく M 細胞に取り込まれないことを観察している<sup>21)</sup>。上記の他グループの報告も総合すると、FimH と GP2 の結合は M 細胞による *S. Typhimurium* の効率的な取り込みに不可欠であり、*inv* 遺伝子による侵入機構は取り込みの促進因子ではあるが必須ではないのであろう。

## 8. ニワトリ Fabricius 嚢を用いた新規 M 細胞特異的遺伝子の探索

われわれはさらに、ニワトリ Fabricius 嚢を用いた M 細胞特異的分子の同定も試みた<sup>26)</sup>。Fabricius 嚢はトリの B リンパ球が成熟する中枢リンパ組織のひとつで、総排泄腔で腸管内腔と連絡しており、総排泄腔から嚢内へと移行した腸内細菌の刺激により B リンパ球は抗原受容体の多様性を獲得する<sup>11,27)</sup>。Fabricius 嚢にはこの B リンパ球分化の場であるリンパ濾胞が約 1 万個存在し、その FAE ではほとんど全ての細胞が高度な食食能を示し、M 細胞と考えられる。そこでマウス上皮細胞剥離法を元にニワトリ Fabri-

cus 嚢の FAE ならびに FAE 以外の上皮 (interfollicular epithelium; IFE) の剥離回収法を開発し、ニワトリ Fabricius 嚢の FAE と IFE の遺伝子発現プロファイルの比較からニワトリ FAE 特異的発現遺伝子群を抽出し、さらにマウス FAE 発現遺伝子群と比較することにより、M 細胞特異的遺伝子を同定した<sup>26)</sup>。ニワトリ Fabricius 嚢の FAE と IFE の比較トランスクリプトーム解析の結果、アノテーションの付いている遺伝子のうち 682 個が IFE に比べ FAE で 2 倍以上高く発現していた<sup>26)</sup>。このうち、マウス FAE で VE に比較して高発現する遺伝子群 409 個と共通していたのは 28 遺伝子であった。ニワトリ、マウスの FAE で共通して高発現する遺伝子が 28 個と予想以上に少なかった理由として、先に述べたようにニワトリの FAE がほぼ 100% M 細胞であるのに対し、マウスの FAE では M 細胞は 5~10% にすぎないため、マウスでは M 細胞でかなり高発現する遺伝子しか検出できていない可能性が考えられる。

ニワトリ、マウスの FAE で共通して高発現する 28 遺伝子のうち、免疫系細胞に高発現する遺伝子はパイエル板細胞の混入による可能性があるため除外した。さらに、SPF、コンベンショナル、無菌という異なるマウスの飼育環境にかかわらず FAE で VE の 2 倍以上の発現を示す遺伝子に着目した結果、*Anxa10*、*Clu*、*Prnp* の 3 遺伝子が M 細胞特異的に発現する遺伝子候補として残った。これら 3 遺伝子の FAE における高発現はリアルタイム PCR によっても確認された<sup>26)</sup>。

このうち *Clu* にコードされる clusterin は母乳、脳脊髄液、精液、血液、尿などの様々な体液中に存在し<sup>28)</sup>、また組織ではバリア機能を担う分泌線や粘膜などの上皮に発現しており<sup>29)</sup>、細胞間相互作用、脂質輸送、組織再構築、膜のリサイクリング、精子の成熟、プログラム細胞死など様々な生理機能への関与が示唆されている<sup>28,29)</sup>。*Clu* は、マウスおよびヒトにおいて FAE 全体に発現し、特に M 細胞に強く発現することが他のグループからも示されている<sup>30,31)</sup>。

*Anxa10* は、*in situ* ハイブリダイゼーション解析の結果 M 細胞特異的に発現することが示された<sup>26)</sup>。Annexin ファミリーは  $Ca^{2+}$  依存的にリン脂質と結合することにより様々な生体膜関連機能に関与する<sup>32,33)</sup>。*Anxa10* の遺伝子産物である AnnexinA10 は肝細胞分化や下垂体ホルモンの生合成・分泌への関与が報告されているが、その分子機序は明らかではない。エンドソームに局在し、エンドサイトーシスへの関与が示唆されている AnnexinA6 は<sup>32,34)</sup>、AnnexinA5 と A10 をコードする遺伝子の遺伝子融合により誕生したと考えられることから<sup>33)</sup>、AnnexinA5、A10 もエンドソームでの細胞内輸送への関与が示唆される。AnnexinA5 も M 細胞特異的に発現することから<sup>30)</sup>、これらの分子はトランスサイトーシスに代表される M 細胞特異的

表2 Hsp60 を表出する細菌

細菌	文献
<i>Brucella abortus</i>	38
<i>Clostridium difficile</i>	40
<i>Helicobacter pylori</i>	41
<i>Haemophilus ducreyi</i>	42
<i>Legionella pneumophila</i>	41, 43
<i>Salmonella Typhimurium</i>	44
<i>Streptococcus suis</i>	42
<i>Mycobacterium avium</i>	45
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	46
<i>Borrelia burgdorferi</i>	47

な細胞内輸送を制御している可能性もあり、今後の解析が待たれる。

### 9. M細胞に強発現するプリオンタンパク質の細菌受容体としての可能性

*Prnp* の遺伝子産物であるプリオンタンパク質は、ホルマウント免疫組織染色の結果 UEA-1 および GP2 陽性の M 細胞の管腔側細胞膜上に強く発現していた (図 4)<sup>26,35)</sup>。

プリオンタンパク質も GP2 同様 GPI アンカー型タンパク質であり、伝達性海綿状脳症 (プリオン病) の原因物質として知られるが<sup>36)</sup>、その生理機能はほとんどわかっていない。近年、様々な病原微生物や毒素が GPI アンカー型タンパク質を利用して宿主細胞内に侵入することが示されている<sup>37)</sup>。人獣共通感染症の原因菌として医学・獣医学的にも重要なブルセラ菌 *Brucella abortus* はマクロファージなどの細胞内に寄生して増殖する。この際に、マクロファージ表面に発現するプリオンタンパク質が *B. abortus* から分泌されその菌体表面に付着した Hsp60 と結合することが、その後の *B. abortus* のマクロファージへの侵入に必要であることが示された<sup>38)</sup>。細菌の Hsp60 は免疫原性の高い抗原として知られており<sup>39)</sup>、ブルセラ菌以外にも様々な菌において菌体表面に表出している (表 2)<sup>38,40~47)</sup>。これらのことを総合すると、M 細胞の管腔側細胞膜に発現するプリオンタンパク質は、ブルセラ菌をはじめとする、Hsp60 を表出する一連の細菌の受容体として、それらの菌の取り込みとその後の粘膜免疫応答誘導に重要な役割を果たしている可能性がある。

### 10. M細胞の分化

M 細胞の分化は、リンパ濾胞の細胞群、とくに subepithelial dome (SED) と呼ばれる、FAE 直下の領域に存在する細胞との相互作用によると考えられる。M 細胞も他

の腸管上皮細胞同様、クリプト底部の幹細胞から最終分化した細胞であると考えられている。リンパ濾胞に隣接するクリプトの上皮細胞は、絨毛に隣接したクリプトとは遺伝子発現が異なるとの報告があり<sup>6)</sup>、これも、リンパ濾胞細胞との相互作用の影響と考えられる。しかし、ウサギパイエル板では、腸管内に細菌を投与後 1 時間で M 細胞の著明な増加が観察されることから、M 細胞は何らかの外的刺激により誘導される FAE 細胞の表現型との考えもある<sup>48)</sup>。

1997 年に Kernéis らは、ヒト大腸がん由来の腸管上皮細胞株 Caco-2 をマウスパイエル板細胞と多孔性の膜を隔てて接するように共培養することにより、Caco-2 細胞の一部が M 細胞様の形態を示すとともにビーズやコレラ菌をトランスサイトーシスするように分化する、という *in vitro* M 細胞分化系を開発した<sup>49)</sup>。マウスパイエル板細胞の代わりにヒト T リンパ球腫瘍由来の Jurkat、あるいはヒト B リンパ球腫瘍由来の Raji という細胞株を用いた場合、Raji に比較して Jurkat では M 細胞様の分化誘導能が非常に弱いことから、M 細胞の誘導には B リンパ球が重要な役割を果たすと考えられた。その後、Caco-2 と Raji が物理的に接触できないような共培養の条件でも M 細胞様の分化を誘導できることから、M 細胞の分化には免疫系細胞が分泌する液性因子が重要であり、直接の細胞間相互作用は必要ないのではないかと考えられた<sup>50)</sup>。しかし、この *in vitro* 共培養系は再現が難しいこともあり、M 細胞分化の分子機構に迫るには至っていない。

M 細胞の分化に関与する免疫系細胞の探索に関しては、遺伝子改変マウスを用いた解析から、B リンパ球を欠損するマウスでは、パイエル板の数、大きさ共にかなり減少し、それに伴い FAE の面積や M 細胞数にも減少が認められた<sup>51)</sup>。また、T、B リンパ球の両者を欠損する RAG1 欠損マウスでは、パイエル板は著しく小さくなり、M 細胞もほとんど見出せない<sup>51)</sup>。一方、T リンパ球欠損マウスではパイエル板も M 細胞も野生型マウスとほぼ遜色ないことから、FAE や M 細胞の形成には B 細胞が重要であることが示唆された (表 3)<sup>51)</sup>。しかし、同じく RAG1 欠損マウスを用いた研究で、FAE の面積も M 細胞も著明に減少するものの、FAE 中の M 細胞の頻度には減少が見られないとの報告もあり<sup>52)</sup>、コンセンサスは得られていない。いずれにしても、B、T リンパ球以外のパイエル板細胞でも M 細胞分化を支持できるようである。

一方、FAE と免疫系細胞の相互作用を媒介する可能性のある分子として、FAE 全体に発現するケモカイン CCL20 ならびにその受容体である CCR6 がある。CCR6 欠損マウスでも、パイエル板の大きさと共に M 細胞数の減少が報告されている<sup>53)</sup>。これに関して筆者らは、CCR6 を高発現する B リンパ球サブセットが SED 領域に局在して

表3 各種遺伝子欠損マウスにおけるM細胞数の検討

マウス系統	目視	UEA1	GP2	SEM	MMTV
野生型 (B6)	○	○	○	○	+
野生型 (B/c)	○	○	○	○	+
Igh6 欠損 (Bリンパ球欠損 <sup>a</sup> ) (B6)	△	N.D	N.D	△unfold 有	-
JHD 欠損 (Bリンパ球欠損 <sup>a</sup> ) (B/c)	△	△	○	△unfold 有	-
TCRβ 欠損 (αβTリンパ球欠損 <sup>a</sup> ) (B6)	○	N.D	N.D	○	+
TCRβTCRδ 欠損 (αβ/γδTリンパ球欠損 <sup>a</sup> ) (B6x129)	○	N.D	N.D	○	+
TCRδ 欠損 (γδTリンパ球欠損 <sup>a</sup> ) (B6)	○	N.D	N.D	○	N.D
RAG1 欠損 (リンパ球欠損 <sup>a</sup> ) (B6)	△/×	N.D	○	N.D	N.D
TNFR 欠損 (B6)	△s	N.D	N.D	○	+
CD40L 欠損 (B6x128)	○	N.D	N.D	○	N.D
I <sub>H</sub> D-IgM トランスジェニック <sup>b</sup> (B/c)	○	N.D	N.D	○	+

文献51を中心に、筆者らのデータを追加してまとめた。

<sup>a</sup> 遺伝子欠損の結果として欠損するリンパ球サブセット。

<sup>b</sup> I<sub>H</sub>D 欠損と IgM トランスジェニックを掛け合わせた結果、B細胞欠損が補完されたマウス。

目視：マウスパリエル板は通常は肉眼にて目視可能 (○)。△は、酢酸処理などパリエル板の検出を容易にする方法により目視可 (△s はサイズが小さい)。×はいずれでも目視不可。

UEA1：○は正常の染色像。△は数の減少。

SEM：○は特徴的な形態が確認できる。△は形態異常を示す。

MMTV (マウス乳がんウイルス)：M細胞を介して感染するとされ、M細胞機能の指標として用いられた。+は感染有り、-は感染なし。

N.D：データなし。

おり、この細胞群がM細胞の分化誘導能を持つことを見出している (未発表データ)。また、RAG1 欠損マウスでは、SED 領域に樹状細胞や濾胞樹状細胞の表面マーカー陽性の細胞が集積しているが、リンホトキシンβ受容体シグナルをブロックすることによりこれらの細胞がFAEから消失するとともに、FAE 当たりのM細胞の頻度が有意に低下する。このことから、リンホトキシンβ受容体シグナルがM細胞の分化誘導能を持つ細胞のSEDへの局在に重要であるとの報告もある<sup>52)</sup>。

最近、M細胞の分化誘導因子として、RANKL (receptor activator for NF-κ ligand) が重要であるとの報告がなされた。RANKLはTNFスーパーファミリーに属する膜タンパク質であり、メタロプロテアーゼの働きにより細胞表面から遊離し<sup>54,55)</sup>、受容体であるRANKと結合することによりTRAF6、NF-κBの活性化を介して<sup>56,57)</sup>、破骨細胞の分化に働くとともに、リンパ節の形成や胸腺髄質上皮細胞の分化など免疫組織の構築にも重要であることが示されている<sup>58-61)</sup>。Williamsのグループは、腸管においてRANKは上皮細胞全体に弱く発現しているのに対し、RANKLはパリエル板のFAE直下の間質細胞に限局して発現が見られること<sup>62)</sup>、RANKL欠損マウスではM細胞がほとんど認められないことを見出した<sup>63)</sup>。また、このRANKL欠損マウスでのM細胞の欠落は、全身性にリコンビナントRANKLを投与することで回復すること、さらにRANKL投与により通常ではM細胞の認められない絨毛にも細菌取り込み能を有するM細胞が異所性に出現することが示された。このRANKL誘導性絨毛M細胞はGP2など複数のM細胞

特異的マーカー分子陽性であることから (筆者ら、未発表データ)、このRANKL誘導系を用いてM細胞の分化過程を解析できる可能性がある。

UEA-1陽性で細菌取り込み能を持つM細胞と似通った性質の細胞が絨毛に存在することも報告されている<sup>64)</sup>。しかし、この細胞はGP2を発現しておらず<sup>16)</sup>、FAEのM細胞との関係は不明である。

## 11. おわりに

M細胞は主要な腸内抗原供給源として、腸管免疫系における重要性が広く認められてきたにもかかわらず、最近までその研究は形態学的解析に終始していた。しかし、近年の技術革新とともに、M細胞の機能に分子・細胞生物学的解析を付加することが可能となってきた。その結果、M細胞の管腔側にGP2という分子が特異的に発現し、I型線毛という複数の細菌の菌体表面に共通に発現する分子と結合する、いわゆる分子パターン認識受容体として機能し、それらの細菌を取り込んでGALTに供給することにより、その後の効率的な免疫応答の誘導に重要であることが証明された。さらに、同じくM細胞の管腔側に強発現するプリオンタンパク質も、細菌受容体として機能する可能性がある。GP2とアミノ酸レベルで約50%の相同性を有する、やはりGPIアンカー型のuromodulin (Tamm-Horsfall protein) というタンパク質が存在する。この分子は腎尿管上皮の管腔面に発現し、原尿中に分泌されて尿路感染性大腸菌と結合し、その排除に働くことや、この分子の欠損マウスは尿路感染大腸菌に易感染性であることが



報告されている<sup>65)</sup>。筆者らは、ごく少量ではあるが uromodulin も M 細胞の管腔側細胞膜上に発現することを見出している (未発表データ)。

M 細胞分化の分子機構に関しても、この 10 年ほどでデータが蓄積してきたが、上述のようにそれらの結果には必ずしも整合性があるわけではない。その一因として、最近まで GP2 のような明らかな M 細胞マーカーが存在せず、UEA-1 陽性やアルカリホスファターゼ陰性を指標とせざるを得なかったことが考えられる。GP2 をはじめとする新たな M 細胞特異的分子や、RANKL による M 細胞分化誘導系を足がかりに M 細胞の機能の詳細な理解が進めば、現在よくわかっていない経口免疫寛容などの粘膜免疫系の分子メカニズムが明らかになると期待される。さらに、GP2 などの分子の性質を利用することにより、これまでポリオウイルス以外ではほとんど成功例のない、種々の病原性細菌やウイルスに対する注射によらない「経口ワクチン」、さらにはアレルギー症状の軽減に効果的な経口治療法の開発にも応用が可能となるであろう。

## 文 献

- Kato, T. & Owen, R.L. (2005) in *Mucosal Immunology* (Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R., and Mayer, L. eds.), pp. 131-151, Elsevier.
- Vijay-Kumar, M. & Gewirtz, A.T. (2005) in *Mucosal Immunology* (Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R., and Mayer, L. eds.), pp. 423-434, Elsevier.
- Neutra, M.R. & Kraehenbuhl, J.-P. (2005) in *Mucosal Immunology* (Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R., and Mayer, L. eds.), pp. 111-130, Elsevier.
- Mayer, L. & Walker, A.W. (2005) in *Mucosal Immunology* (Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R., and Mayer, L. eds.), pp. 5-18, Elsevier.
- Owen, R.L. (1999) *Semin. Immunol.*, **11**, 157-163.
- Kraehenbuhl, J.P. & Neutra, M.R. (2000) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **16**, 301-332.
- 大野博司 (2010) 理研ニュース, **344**, 2-5.
- 大野博司, 長谷耕二 (2006) 実験医学, **24**, 3112-3121.
- 熊谷謙三郎 (1922) 大阪醫學會雜誌, **21**, 497-522.
- 藤田恒夫, 牛木辰男 (1992) 新薬と治療, **42**, 15-17.
- Bockman, D.E. & Cooper, M.D. (1973) *Am. J. Anat.*, **136**, 455-477.
- Owen, R.L. & Jones, A.L. (1974) *Gastroenterology*, **66**, 189-203.
- Hase, K., Ohshima, S., Kawano, K., Hashimoto, N., Matsumoto, K., Saito, H., & Ohno, H. (2005) *DNA Res.*, **12**, 127-137.
- Verbrugghe, P., Waelput, W., Dieriks, B., Waeytens, A., Vandosomepele, J., & Cuvelier, C.A. (2006) *J. Pathol.*, **209**, 240-249.
- Terahara, K., Yoshida, M., Igarashi, O., Nochi, T., Pontes, G. S., Hase, K., Ohno, H., Kurokawa, S., Mejima, M., Takayama, N., Yuki, Y., Lowe, A. W., & Kiyono, H. (2008) *J. Immunol.*, **180**, 7840-7846.
- Nochi, T., Yuki, Y., Matsumura, A., Mejima, M., Terahara, K., Kim, D.Y., Fukuyama, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Kawaoka, Y., Kohda, T., Kozaki, S., Igarashi, O., & Kiyono, H. (2007) *J. Exp. Med.*, **204**, 2789-2796.
- Clark, M. A., Hirst, B. H., & Jepson, M. A. (1998) *Infect. Immun.*, **66**, 1237-1243.
- Iwasaki, A., Welker, R., Mueller, S., Linehan, M., Nomoto, A., & Wimmer, E. (2002) *J. Infect. Dis.*, **186**, 585-592.
- Hoops, T.C. & Rindler, M.J. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 4257-4263.
- Fukuoka, S., Freedman, S.D., & Scheele, G.A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2898-2902.
- Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S. I., Lowe, A. W., Waguri, S., Itoh, K., Kiyono, H., & Ohno, H. (2009) *Nature*, **462**, 226-230.
- Jones, B.D., Ghori, N., & Falkow, S. (1994) *J. Exp. Med.*, **180**, 15-23.
- Chatfield, S.N., Charles, I.G., Makoff, A.J., Oxer, M.D., Dougan, G., Pickard, D., Slater, D., & Fairweather, N.F. (1992) *Biootechnology*, **10**, 888-892.
- Clark, M.A., Reed, K.A., Lodge, J., Stephen, J., Hirst, B.H., & Jepson, M.A. (1996) *Infect. Immun.*, **64**, 4363-4368.
- Martinoli, C., Chiavelli, A., & Rescigno, M. (2007) *Immunity*, **27**, 975-984.
- Nakato, G., Fukuda, S., Hase, K., Goitsuka, R., Cooper, M.D., & Ohno, H. (2009) *DNA Res.*, **16**, 227-235.
- Ribatti, D., Crivellato, E., & Vacca, A. (2006) *Clin. Exp. Immunol.*, **145**, 1-4.
- Jones, S.E. & Jomary, C. (2002) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **34**, 427-431.
- Jordan-Starck, T.C., Witte, D.P., Aronow, B.J., & Harmony, J. A.K. (1992) *Curr. Opin. Lipidol.*, **3**, 75-85.
- Verbrugghe, P., Waelput, W., Dieriks, B., Waeytens, A., Vandosomepele, J., & Cuvelier, C.A. (2006) *J. Pathol.*, **209**, 240-249.
- Verbrugghe, P., Kujala, P., Waelput, W., Peters, P.J., & Cuvelier, C.A. (2008) *Histochem. Cell Biol.*, **129**, 311-320.
- Gerke, V., Creutz, C.E., & Moss, S.E. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 449-461.
- Moss, S.E. & Morgan, R.O. (2004) *Genome Biol.*, **5**, 219.
- Pons, M., Grewal, T., Rius, E., Schnitgerhans, T., Jackle, S., & Enrich, C. (2001) *Exp. Cell Res.*, **269**, 13-22.
- 大野博司, 長谷耕二, 中藤 学 (2010) 臨床免疫・アレルギー科, **54**, 105-112.
- Prusiner, S.B. (1982) *Science*, **216**, 136-144.
- Shin, J.S. & Abraham, S.N. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.*, **197**, 131-138.
- Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S., & Katamine, S. (2003) *J. Exp. Med.*, **198**, 5-17.
- Kaufmann, S.H. (1990) *Immunol. Today*, **11**, 129-136.
- Hennequin, C., Porcheray, F., Waligora-Dupriet, A., Collignon, A., Barc, M., Bourlioux, P., & Karjalainen, T. (2001) *Microbiology*, **147**, 87-96.
- Hoffman, P.S. & Garduno, R.A. (1999) *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, **7**, 58-63.
- Frisk, A., Ison, C.A., & Lagergård, T. (1998) *Infect. Immun.*, **66**, 1252-1257.
- Garduño, R.A., Faulkner, G., Trevors, M.A., Vats, N., & Hoffman, P.S. (1998) *J. Bacteriol.*, **180**, 505-513.
- Ensgraber, M. & Loos, M. (1992) *Infect Immun.*, **60**, 3072-

- 3078.
- 45) Rao, S.P., Ogata, K., Morris, S.L., & Catanzaro, A. (1994) *J. Lab. Clin. Med.*, **123**, 526–535.
- 46) Goulhen, F., Hafezi, A., Uitto, V.J., Hinode, D., Nakamura, R., Grenier, D., & Mayrand, D. (1998) *Infect. Immun.*, **66**, 5307–5313.
- 47) Kaneda, K., Masuzawa, T., Yasugami, K., Suzuki, T., Suzuki, Y., & Yanagihara, Y. (1997) *Infect. Immun.*, **65**, 3180–3185.
- 48) Borghesi, C., Taussig, M.J., & Nicoletti, C. (1999) *Lab. Invest.*, **79**, 1393–1401.
- 49) Kernéis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J.-P., & Pringault, E. (1997) *Science*, **277**, 949–952.
- 50) Gullberg, E., Leonard, M., Karlsson, J., Hopkins, A. M., Brayden, D., Baird, A. W., & Artursson, P. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, 808–813.
- 51) Golovkina, T. V., Shlomchik, M., Hannum, L., & Chervonsky, A. (1999) *Science*, **286**, 1965–1968.
- 52) Debard, N., Sierro, F., Browning, J., & Kraehenbuhl, J.P. (2001) *Gastroenterology*, **120**, 1173–1182.
- 53) Lügering, A., Floer, M., Westphal, S., Maaser, C., Spahn, T. W., Schmidt, M.A., Domschke, W., Williams, I.R., & Kucharzik, T. (2005) *Am. J. Pathol.*, **166**, 1647–1654.
- 54) Lum, L., Wong, B.R., Josien, R., Steinman, R.M., Erdjument-Bromage, H., Schlondorff, J., Tempst, P., Choi, Y., & Blobel, C.P. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 13613–13618.
- 55) Hikita, A., Yana, I., Wakeyama, H., Nakamura, M., Kadono, Y., Oshima, Y., Nakamura, K., Seiki, M., & Tanaka, S. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 36846–36855.
- 56) Wong, B.R., Josien, R., Lee, M., Steinman, R.M., Vologodskaya, M., & Choi, Y. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 28355–28359.
- 57) Galibert, I., Tometsko, M.E., Anderson, D.M., Cosman, D., & Dougall, W.C. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 34120–34127.
- 58) Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mak, T.W., Boyle, W.J., & Penninger, J.M. (1999) *Nature*, **397**, 315–323.
- 59) Kim, N., Odgren, P.R., Kim, D.K., Marks, S.C. Jr., & Choi, Y. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 10905–10910.
- 60) Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J.M., Matsumoto, M., Nitta, T., Takahama, Y., & Inoue, J. (2008) *Immunity*, **29**, 423–437.
- 61) Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J.M., Takayanagi, H., Yokota, Y., Yamada, H., Yoshikai, Y., Inoue, J., Akiyama, T., & Takahama, Y. (2008) *Immunity*, **29**, 438–450.
- 62) Taylor, R.T., Patel, S.R., Lin, E., Butler, B.R., Lake, J.G., Newberry, R.D., & Williams, I.R. (2007) *J. Immunol.*, **178**, 5659–5667.
- 63) Knoop, K.A., Kumar, N., Butler, B.R., Sakthivel, S.K., Taylor, R.T., Nochi, T., Akiba, H., Yagita, H., Kiyono, H., & Williams, I.R. (2009) *J. Immunol.*, **183**, 5738–5747.
- 64) Jang, M.H., Kweon, M.N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, C., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y., & Kiyono, H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 6110–6115.
- 65) Mo, L., Zhu, X.H., Huang, H.Y., Shapiro, E., Hasty, D.L., & Wu, X.R. (2004) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **286**, F795–802.
-