

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成14年度採択研究代表者

清野 宏

(東京大学医科学研究所 感染・免疫大部門 炎症免疫学分野 教授)

「M細胞の免疫生物学的解明とそれを標的とする粘膜ワクチンの開発」

1. 研究実施の概要

本計画に関する当面の目的は未知のM細胞特異的抗原分子とその関連遺伝子を探索・同定し、M細胞の免疫生物学的全容を明らかにすることにある。昨年からの成果によりパイエル板の上皮細胞層に存在するM細胞（パイエル板M細胞）のレクチン特異性を駆使した同定とその分離・精製法が確立した。そこでこの手法を自動セルソーターに応用する事により純度の高いM細胞分画が精製出来、それを使った遺伝子、蛋白レベルでの解析が可能となった。そこで、M細胞と上皮細胞特異的モノクローナル抗体作成と両細胞群間を比較してM細胞特異的に発現している遺伝子・分子の同定を進めている。また、パイエル板M細胞解析の過程で、M細胞がパイエル板上皮細胞層だけではなく、そこから離れた絨毛上皮細胞の先端部にも存在する事を発見し、その免疫生物学的解析を開始する事が出来た。

2. 研究実施内容

パイエル板や鼻咽頭関連リンパ節に存在する抗原取込み専門細胞と呼ばれるM細胞に関する基礎的情報は殆どない。未知のM細胞特異的抗原分子とその関連遺伝子を探索・同定し、M細胞の免疫生物学的全容を明らかにし、それを標的とした「M細胞標的粘膜ワクチン」の開発を目指すことが最終目的である。

昨年からの成果によりマウスのパイエル板の上皮細胞層に存在するM細胞（パイエル板M細胞）はレクチンの一つである *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1) により特異的に認識されるが、別のレクチンであるwheat germ agglutinin (WGA) には認識されない。そこで、本研究ではM細胞に対するこのレクチン特異性を利用し、自動セルソーターを用いた新しいM細胞の単離法の確立を目指した。マウスの小腸からパイエル板を切り出し、EDTAによる細胞分散法によってパイエル板上皮を構成する細胞群を分散させたのち、各種蛍光色素を結合させたUEA-1、WGA、そして白血球系細胞マーカーであるCD45特異的モノクローナル抗体を反応させた。

FACS解析の結果、分散させた全細胞はCD45⁺とCD45⁻に区別できる2つの分画、リンパ球系細胞と上皮系細胞から構成されることがわかった。そして、UEA-1⁺M細胞は上皮系細胞分画のみに含まれることがわかった。さらに厳格にパイエル板上皮細胞群のUEA-1⁺、WGA⁻、

CD45⁻分画を検討すると、M細胞であると推定されるの条件を満たす細胞群は全細胞中の約3%であった。

こうして得られたM細胞分画UEA-1⁺/WGA⁻/CD45⁻につき、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、アルシアンブルー染色、fucosyltransferase-1および-2 (FUT-1、FUT-2) のmRNA発現量解析を、上皮細胞分画 (UEA-1⁻/WGA⁻/CD45⁻) と比較検討した。その結果、M細胞分画のALP活性陽性細胞とアルシアンブルー染色陽性細胞は上皮細胞分画に比較して有意に低値であった。一方FUT-1及びFUT-2のmRNA発現量は上皮細胞分画に比較して高い値を示した。以上の結果は、遺伝子発現解析や蛋白質発現解析に使用可能な高純度M細胞分画であることを証明しており、その単離法が確立した。

パイエル板M細胞群と上皮細胞群を確実に高純度で分離精製できる技術が確立された事により、その二つの細胞分画を使って、両者間の遺伝子・蛋白発現パターンを比較し、特異的な分子の探索・同定が可能になり現在、その実験が進んでいる。

この研究過程において、我々はパイエル板等の粘膜誘導組織上皮細胞層だけに存在すると言われていたM細胞が、その事実を覆し腸管円柱上皮細胞からなる絨毛上皮細胞層にもM細胞が存在することを発見し、このM細胞集団を「Villous M cell」と命名した。今後、パイエル板由来M細胞とVillous M cell間における特異性と共通性の検討を膜抗原ならびにその責任遺伝子レベルで進めていく。

3. 研究実施体制

清野 宏グループ

① 研究分担グループ長：

清野 宏 (東京大学医科学研究所、教授)

② 研究項目：

- (1) パイエル板M細胞特異的抗原及び関連遺伝子の同定・分離並びにM細胞免疫生物学的特長の解明
- (2) NALT関連CD3⁻CD4⁺CD45⁺細胞を中心としたM細胞誘導メカニズムの解明
- (3) M細胞をターゲットとしたM細胞標的粘膜ワクチンの開発

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

- Tamagawa, H., Takahashi, I., Furuse, M., Yoshitake-Kitano, Y., Tsukita, S., Itoh, T., Matsuda, H. and **Kiyono, H.** Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of peyer's patches: Preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region. *Lab. Invest.* 83: 1045-1053 (2003)
- Park, E.J., Takahashi, I., Ikeda J., Kawahara, K., Okamoto, T., Kweon, M-N.,

- Fukuyama, S., Groh, V., Spies, T., Obata, Y., Miyazaki, J. and **Kiyono, H.** Clonal expansion of double-positive (DP) IELs by MICA expressed in mouse small intestinal epithelium. *J. Immunol.* 171: 4131-4139 (2003)
- Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J-K., Ohta, N., Iwatani, K., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kawano, S., Sasaki, Y., Hori, M., Takeda, K., Akira, S. and **Kiyono, H.** Development of colitis in STAT6-deficient TCR $\alpha^{-/-}$ mice: A potential of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4 $^{+}$ $\beta\beta$ T cells. *Am. J. Pathol.* 162:263-271 (2003)
- Kobayashi, M., Kweon, M-N., Kuwata, H., Schreiber, R.D., **Kiyono, H.**, Takeda, K., and Shizuo, A. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes Chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 111:1297-1308 (2003)
- Yuki, Y. and Kiyono, H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev. Med. Virol.* 13: 293-310 (2003)
- Boyaka, P.N., Ohmura, M., Fujihashi, K., Koga, T., Yamamoto, M., Kweon, M-N., Takeda, Y., Jackson, R.J., **Kiyono, H.**, Yuki, Y. and Kiyono, H. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvant activity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J. Immunol.* 170: 454-462 (2003)
- Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y., Kweon, M-N., Tamura, S., Kurata, T., Takeda, Y., **Kiyono, H.** and Fujihashi, K. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4 $^{+}$ T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J. Immunol.* 15: 1754-1762 (2003)
- Jang, M-H., Kweon, M-N., Hiroi T, Yamamoto, M., Takahashi, I. and **Kiyono,** Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by cholera toxin-treated bone marrow-derived dendritic cells. *Vaccine* 21: 1613-1619 (2003)
- Kweon, M-N. and **Kiyono, H.** Eosinophilic gastroenteritis: a problem of the mucosal immune system? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3: 79-85 (2003)
- Hino, A., Kweon, M-N., Fujihashi, K., McGhee J.R., and **Kiyono, H.** Pathological role of large intestinal IL-12p40 for the induction of Th2-type allergic diarrhea. *Am. J. Pathol.* 164: 1327-1335 (2004)
- Jang, M-H., Kweon, M-N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, G., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y., and **Kiyono, H.** Intestinal Villous M Cells: An

Antigen Entry Site in the Mucosal Epithelium. Proc.Natl.Acad.Sci. 101:
6110-6115 (2004)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）