

「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 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

- (1) パイエル板 M 細胞特異的抗原ならびに関連遺伝子の同定・分離し M 細胞免疫生物学的特徴の解明

パイエル板や鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT) に抗原取り込み細胞として存在する M 細胞の特異的抗原分子をモノクローナル抗体・プロテオーム解析法により同定する研究を進めてきた。この過程で樹立した、M 細胞特異的候補抗体群に結合させた抗原について、M 細胞への特異的取り込み能や免疫応答等の機能解析の検討も進めている。また DNA マイクロアレイ法及び in situ hybridization 法による包括的遺伝子発現比較並びに既存・新規作製蛋白抗体による免疫染色法により M 細胞特異的分子候補群の中から M 細胞特異的分子の同定も進んでいる。

- (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

我々は NALT において、組織形成誘導細胞である $CD3^{-}CD4^{+}CD45^{+}$ 細胞(NALTi)がパイエル板 $CD3^{-}CD4^{+}CD45^{+}$ 細胞(PPi)とは全く異なる LT 非依存性に組織形成プログラム制御が行われていることを明らかにした。本年度は最近注目されているいくつかのリンパ組織形成関連ケモカイン遺伝子欠損マウスを用いて M 細胞発達過程も含めた NALT 組織形成における役割について検討した。さらに NALTi 細胞と PPi 細胞両者間の特徴的違いについても分子・細胞レベルで明らかにしている。これらの研究に平行して我々は NALT 形成過程における M 細胞発達・分化メカニズムについて解析を行なっている。

2. 研究実施内容

- (1) パイエル板 M 細胞特異的抗原ならびに関連遺伝子の同定・分離し M 細胞免疫生物学的特徴の解明

研究目的

パイエル板に存在する抗原取り込み能を有する M 細胞の標的型粘膜ワクチン開発のための基盤研究として、モノクローナル抗体・プロテオーム解析手法もしくは分子生物学的手法を用いて M 細胞特異的分子の同定・機能解析を行う。

研究方法

定法に従い、マウスパイエル板M細胞に対するハイブリドーマを樹立し、免疫組織学的スクリーニングを行い、M細胞特異的抗体の産生株を選定した。免疫電子顕微鏡解析を行うことにより、M細胞に対する特異性を、形態学的に評価した。また本抗体を用いて免疫沈降した後、LC-MS/MSを用いたプロテオーム解析を行うことによりM細胞特異的抗原分子の同定を試みた。さらには、本抗体とワクチン抗原分子を化学的に結合させた経口ワクチンを作製し、マウスに経口投与することにより、M細胞への効果的なデリバリーを可能とするM細胞標的型粘膜ワクチン開発への研究を推進する。

加えて、UEA-1レクチンの特異性を利用し、生体組織（マウスパイエル板）からUEA-1⁺細胞画分をM細胞としてセルソーターシステムによって分離・精製し、調製したM細胞画分、上皮細胞画分、CD45⁺細胞画分を用いてDNAマイクロアレイ法及びin situ hybridization法による包括的発現遺伝子比較並びに既存・新規作製蛋白抗体による免疫染色法等用いてM細胞特異的分子の同定を行う。

研究結果

作製した約1000種のハイブリドーマクローンを免疫組織学的にスクリーニングした結果、1株がパイエル板M細胞に特異的に反応し、免疫電子顕微鏡解析においても、本抗体は、微絨毛が粗で、ポケット構造を有している典型的なM細胞に特異性を示した。また、プロテオーム解析の結果、本抗体特殊糖鎖を認識していることが示された。現在本抗体とワクチン抗原分子を化学的に結合させた経口ワクチンを作製し、マウスに経口投与することにより、M細胞への効果的なデリバリーを可能とするM細胞標的型粘膜ワクチン開発への研究を推進している。

DNAアレイ法による包括的発現遺伝子比較の結果、M細胞に特異的あるいは有意に発現している遺伝子として約100個の遺伝子が候補に挙げられた。この全ての遺伝子についてin situハイブリダイゼーションとUEA-1を用いた二重染色を行い、そのほとんどがM細胞に発現していることを認めた。さらに、その特異性については我々が新規作製したM細胞特異的抗体でも確認している。その中には新たなM細胞特異的遺伝子として同定され分子も含まれていた。このなかのいくつかに関した既存・合成分子に対する抗体を作製、免疫組織染色によりそのタンパク発現についてもM細胞特異的であることを確認した。

(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

研究目的

NALTは、組織形成誘導細胞であるCD3⁻CD4⁺CD45⁺細胞(NALTi)がパイエル板

CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞(PPi)とは全く異なる LT 非依存性に組織形成プログラム制御が行われていることを我々は明らかにしてきたが、本研究では NALT 形成における NALTⁱ の役割と M 細胞発達への関与について検討する。

研究方法

最近リンパ組織形成に関して注目されているケモカインのうち、とくに CXCL13, CCL19, CCL21 は二次リンパ組織の初期形成や構造維持に必須である。これらのケモカイン遺伝子欠損マウスを用いて M 細胞発達過程も含めた NALT 組織形成における CXCL13, CCL19, CCL21 の役割について検討した。

研究結果

CXCL13 欠損マウスを用いた解析によると胎生期の腸管には CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞の集積を認めず、その結果、パイエル板は形成されなかった。ところが CXCL13 欠損マウスの NALT 原基には CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞の集積が確認された。CCL19 及び CCL21 の発現不全マウスである *plt* マウスの NALT 原基にはコントロールマウスと同等の CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞の集積を認めた。ケモカイン群 CXCL13, CCL19, CCL21 は恒常的に二次リンパ組織で産生が認められ、リンパ組織構築の成熟化に重要な役割を果たしている。そこで我々は NALT 組織構築への関与について検討した。CXCL13 欠損マウスでは特に B 細胞の遊走が阻害されており、B 細胞領域がほとんど認められなかった。コレラトキシンを用いた経鼻免疫によりコントロールマウスの NALT には胚中心が形成されるが、CXCL13 欠損マウスの NALT には胚中心は認められなかった。一方で *plt* マウスの NALT は T 細胞領域の形成不全を認めた。これらの結果をふまえて、これら組織形成関連ケモカインの M 細胞発達関与についての実験が進められている。以上の結果からこれらのケモカインはパイエル板と比較して NALT 初期形成に関与しないことが明かとなったが、M 細胞の発達に関与するかは興味ある課題であり、今後その検討を進めていく。一方で、胚中心形成や T/B 細胞領域など NALT 組織構築の成熟化には CXCL13, CCL19, CCL21 が必須であることが明らかとなった。

3. 研究実施体制

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：

清野 宏（東大・教授）

研究代表者として本研究計画で提案したプロジェクト全ての局面に関与し、総括的責任を果たす。
パイエル板 M 細胞特異的膜抗原ならびに関連遺伝子の同定と M 細胞標的粘膜ワクチンへ向けての基礎研究を担当する。

幸 義和（東大・助手）

寺原 和孝（東大・ポスドク）	M細胞特異的遺伝子の同定と分離を担当し、M細胞遺伝子欠損マウスの作成を担当する。
野地 智法（東大・ポスドク）	マウス由来 M 細胞特異的 mAb 抗体ならびにその抗原同定と解析を担当する。
国澤 純（東大・助手）	温度感受性 S V 4 0 T 抗原発現トランスジェニックマウスM細胞株の樹立及びその特異的遺伝子の同定と分離を担当する。
五十嵐 脩（東大・技官）	M 細胞特異的抗原・受容体のリガンド分子の探索を担当する。
福山 聡（東大・ポスドク）	NALT 組織形成統御サイトカイン探索プロジェクトを担当し、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を担当する。
廣井 隆親（東大・助手）	福山らと連携し、NALT・M細胞プロジェクトに参加する。特に NALT 形成モデルを駆使して NALT 免疫システムのユニーク性と M 細胞発達への関与を検討する。
黒 河 志 保（東大・実験補佐）	五十嵐、野地と連携し、M 細胞受容体のリガンド分子の探索と mAb 抗作製を担当する。
森 昌子(東大・実験補佐)	寺原と連携し、M細胞特異的遺伝子の同定と分離を担当する。
佐藤美恵子（東大・実験補佐）	本プロジェクトの動物の管理を担当する。
富田 詠子（東大・実験補佐）	国立と連携し、本プロジェクトに関するデータ管理、試薬管理を担当する。
松村 亜紀子（東大・実験補佐）	野地と連携し、M 細胞受容体のリガンド分子の探索と抗体産を担当する。
清水 未来（東大・実験補佐）	國澤と連携し、M 細胞株特異的遺伝子の同定を担当する。
目島 未央（東大・実験補佐）	幸と連携し、M 細胞標的ワクチンの開発を担当する。
向井 千文（東大・事務補佐）	事務を執り行う。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Kai Y, Takahashi I, Ishikawa H, Hiroi T, Mizushima T, Matsuda C, Kishi D, Hamada H, Tamagawa H, Ito T, Yoshizaki K, Kishimoto T, Matsuda H, and Kiyono H. Colitis in mice lacking the common cytokine receptor gamma chain is mediated by IL-6-producing CD4+ T cells. *Gastroenterology*. 128: 922-934, 2005
- Kweon MN, Yamamoto M, Rennert PD, Park EJ, Lee AY, Chang SY, Hiroi T, Nanno M, and Kiyono H. Prenatal blockage of lymphotoxin β receptor and TNF receptor p55 signaling cascade resulted in the acceleration of tissue genesis for isolated lymphoid follicles in the large intestine. *J Immunol*. 174: 4365-4372, 2005
- Kobayashi R, Kohda T, Kataoka K, Ihara H, Kozaki S, Pascual DW, Staats HF, Kiyono H, McGhee JR, and Fujihashi K. A novel neurotoxoid vaccine prevents mucosal botulism. *J Immunol*. 174: 2190-2195, 2005
- Nonaka S, Naito T, Chen H, Yamamoto M, Moro K, Kiyono H, Hamada H, and Ishikawa H. Intestinal gamma delta T cells develop in mice lacking thymus, all lymph nodes, Peyer's patches, and isolated lymphoid follicles. *J Immunol*. 174: 1906-1912, 2005
- Ueta M., Hamuro J., Kiyono H, and Kinoshita S. Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331: 285-294, 2005
- Hino A., Fukuyama S., Kataoka K., Kweon MN., Fujihashi K., and Kiyono H. Nasal IL-12p70DNA prevents and treats intestinal allergic diarrhea. *J. Immunol*. 174: 423-7432, 2005
- Ohmura M., Yamamoto M., Tomiyama-Miyaji C., Yuki Y., Takeda Y., and Kiyono H. Nontoxic Shiga toxin derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for the augmentation of antigen-specific immune responses via dendritic cell activation. *Infect. Immun.* 73: 4088-4097, 2005
- Kunisawa J. and Kiyono H. A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense. *Cell Mol. Life Sci.* 62:1308-1321, 2005
- Yuki Y., Hara-Yokoyama C., Guadiz AA., Uda S., Kiyono H, and Chatterjee S. Production of a recombinant cholera toxin B subunit-insulin B chain peptide hybrid protein by *Brevibacillus choshinensis* expression system as a nasal vaccine against autoimmune diabetes. *Biotechnol. Bioeng.* 92:803-809, 2005
- Kunisawa J., Fukuyama S., and Kiyono H. Mucosa-associated lymphoid tissues in the aerodigestive tract: their shared and divergent traits and their importance to the orchestration of the mucosal immune system. *Curr Mol Med.* 5:557-572, 2005
- Takagi H., Hiroi T., Yang L., Tada Y., Yuki Y., Takamura K., Ishimitsu R., Kawauchi H.,

- Kiyono H., and Takaiwa F. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induce oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:17525–17530, 2005
- Ishikawa,H, Kanamori,Y., Hamada,H. and Kiyono,H. Development and function of organized gut-associated lymphoid tissues. In:Mestecky,J., Lamm,ME., Strober,W. Bienenstock,J., McGhee,JR. and Mayer,L. editors. *Mucosal Immunology 3rd*. Amsterdam, ELSEVIER; 385–406, 2005
 - Kweon,MN and Kiyono,H. Allergic diseases in the gastrointestinal tract Mucosa-associated lymphoid tissues in the aerodigestive tract. In: Mestecky,J., Lamm,ME., Strober,W., Bienenstock,J., McGhee,JR and Layer,L. editors. *Mucosal Immunology 3rd Ed.* Amsterdam, ELSEVIER; 1351–1360, 2005
 - Igarashi O., Nochi T., Terahara K., and Kiyono H. Linkage between innate and acquired immunities at the mucosa. *International Congress Series* 1285:84–93, 2005
 - Duverger A., Jackson RJ., van Ginkel FW., Fischer R., Tafaro A., Leppla SH., Fujihashi K., Kiyono H., McGhee JR., and Boyaka PN. *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens. *J.Immunol.* 176:1776–1783, 2006.
 - Jang MH., Sougawa N., Tanaka T., Hirata T., Hiroi T., Tohya K., Guo Z., Umemoto E., Yang B., Seoh JY., Kiyono, H., and Miyasaka M. CCR7 is critically important for migration of immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J immunol.* 176:803–810, 2006
 - Yamamoto M., and Kiyono H. Host defence mechanisms offered by the mucosal immune system. *Nippon Rinsho* 63:suppl4:447–453, 2005
 - Nochi T., and Kiyono H. *Mucosal Immunology.* *Nippon Rinsho* 63:suppl.4:14–19, 2005

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：3 件）