

「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 細胞特異的抗原および関連遺伝子の同定、ならびに M 細胞標的型粘膜ワクチンの開発

これまでの研究で、パイエル板 M 細胞特異的モノクローナル抗体 (NKM 16-2-4) を世界で始めて樹立した。本年度は、NKM 16-2-4 を駆使することで精製度の高い M 細胞の単離技術を確立し、DNA マイクロアレイ法に供することで、信頼性のある遺伝子プロファイリングを行い、抗原取り込みの観点から検討を加え、同定された M 細胞特異的分子をタンパクレベルでの発現特異性も実証した。一方、NKM 16-2-4 をキャリアー分子とした M 細胞標的型粘膜ワクチンが、効果的に抗原特異的免疫応答を全身系のみならず粘膜系に誘導できることを実証することに成功した。

### 2. NALT 関連 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞を中心とした M 細胞誘導メカニズムの解明

我々はこれまでに NALT において、組織形成誘導細胞である CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞 (NALTi) がパイエル板 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞 (PPi) とは全く異なり、LT 非依存性に組織形成プログラムを制御していることを明らかにした。本年度は NALTi の集積異常にともなう NALT 形成不全マウスである Id2 欠損マウスを用いて個体レベルで上気道における M 細胞の役割について検討し、NALT 非依存的 M 細胞を発見した。

## 2. 研究実施内容

### 1. パイエル板 M 細胞特異的抗原および関連遺伝子の同定、ならびに M 細胞標的型粘膜ワクチンの開発

#### 研究目的

パイエル板 M 細胞は、発見から 30 年以上経った今日においても、その抗原取り込み機序は全く明らかにされていない。また近年、我々はパイエル板から遠く離れた絨毛上にも、抗原取り込み能を有する細胞が存在することを見出し、絨毛 M 細胞と命名した。今年度は、これら M 細胞の抗原取り込み機序を解明する目的で、パイエル板 M 細胞、絨毛 M 細胞、吸収上皮細胞の包括的遺伝子

プロファイリングを行い、得られた成果を基盤とした M 細胞標的型粘膜ワクチンを開発することで、効果的なワクチン開発に向けた応用的研究を展開した。

## 研究方法

昨年度までに、我々は世界で初めて M 細胞特異的モノクローナル抗体 (NKM 16-2-4) を作製した。本年度は、本抗体を駆使することで、パイエル板 M 細胞、絨毛 M 細胞および吸収上皮細胞の高い精製度での単離技術を確立し、DNA マイクロアレイ法 (GeneChip) に供することで、包括的発現遺伝子のプロファイリングを行った。また、本抗体を用い、絨毛 M 細胞の詳細な免疫学的・生化学的性状解析を実施した。さらには、M 細胞特異的と同定された遺伝子に関しては、その特異的モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体を作製することで、M 細胞でのタンパクレベルでの発現検討を行った。

## 研究成果

M 細胞の分化誘導機序ならびにその性状を、NKM 16-2-4 を用いて免疫学的かつ生化学的に詳細に解析した結果、絨毛 M 細胞は共生細菌叢を含む腸内環境因子の影響を受けるのに対し、パイエル板 M 細胞の一部はこれらの影響を全く受けないことを明らかにし、それぞれを獲得型 M 細胞、古典的 M 細胞と命名した。また、獲得型 M 細胞、古典的 M 細胞および吸収上皮細胞の包括的遺伝子プロファイリングを実施した結果、古典的 M 細胞特異的遺伝子として、PGRP-S、Sgpe-1、annexin V、GP2、MLP を同定した。

一方、NKM 16-2-4 にワクチン抗原分子 (破傷風トキソイド ; TT) を結合した M 細胞標的型経口ワクチンは、高レベルの TT 特異的免疫応答を全身系 (Serum IgG) のみならず粘膜系 (Fecal IgA) にも誘導できることを実証した。さらにこの M 細胞特異的抗体およびワクチン抗原分子の安定した結合システムの構築ならびに、多種のワクチン抗原分子への多様性を目指し、NKM 16-2-4 の可変領域をコードする部分を作成し、キャリアータンパクとした M 細胞標的型サブユニットワクチンの開発を進めており、安定かつ安全な組み換え型 M 細胞標的粘膜ワクチン開発を推進していく方針である。

## **2. NALT 関連 CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>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

我々はこれまでに NALT 形成が、組織形成誘導細胞である CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞 (NALTi) によって、パイエル板 CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞 (PPi) とは全く異なる LT 非依存性に制御されていることを明らかにした。本研究では NALT 形成における詳細な NALTi の機能的役割と、M 細胞発達への関与について検討した。

### 研究方法

これまでに我々は、Id2 欠損マウスでは、NALTi の NALT 原基への集積が認められず、その結果、NALT 組織形成が始まらないことを報告した。そこで、NALT M 細胞の役割を検討する目的で、

NALT 形成不全マウスである Id2 欠損マウスに様々な抗原を経鼻投与し、その免疫応答を解析した。

## 研究結果

Id2 欠損マウスに tetanus toxin (TT) を発現する r*Salmonella*-ToxC を経鼻投与した。Id2 欠損マウスには NALT が無いにもかかわらず、抗 TT 抗体産生が誘導された。そこで、NALT 非依存性の抗原取り込み機序を解明する目的で、マウスの鼻腔粘膜組織を組織学的に詳細に観察した結果、M 細胞特異的マーカーである UEA-1 陽性の上皮が、NALT に関連しない鼻腔上皮の一部に存在することを明らかにした。この UEA-1 陽性細胞の形態を電子顕微鏡下に検討した結果、パイエル板 M 細胞に特徴的な短い微絨毛を有していたが、ポケット形成はほとんど認めなかった。次に、これらの UEA-1 陽性上皮の抗原取り込み能を検討するために、野生型のマウスや Id2 欠損マウスに、蛍光標識した卵白アルブミン (DQ<sup>TM</sup> ovalbumin) や r*Salmonella*-GFP を経鼻投与し、FACS 解析および組織学的解析をおこなった。その結果、野生型および Id2 欠損マウスでの UEA-1 陽性細胞において、高頻度で経鼻投与抗原由来の蛍光シグナルを認めた。よって、この UEA-1 陽性細胞は、高分子タンパク抗原や細菌など、様々な抗原を取り込む能力を有していることが推測された。

## 3. 研究実施体制

### ①研究者名

清野 宏 (東京大学医科学研究所 教授)

## 4. 研究成果の発表等

### (1) 論文発表(原著論文)

- Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, Takamura K, Park EJ, Kaisho T, Tanaka N, Kurono Y, and **Kiyono H**. Uniqueness of lymphoid chemokine requirement for the initiation and maturation of NALT organogenesis. *J. Immunol.* 177 : 4276-4280. 2006. (Cutting Edge)
- 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.
- Hagiwara Y, Kawamura YI, Kataoka K, Rahima B, Jackson RJ, Komase K, Dohi T, Boyaka PN, Takeda Y, **Kiyono H**, McGhee JR, and Fujihashi K. A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. *J. Immunol.* 177 : 3045-3054. 2006.
- Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Ebisuno Y, Tang BG, Seoh JY, Lipp M, **Kiyono H**, Miyasaka M. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* 176 :

803-810. 2006.

- Maddaloni M, Staats HF, Mierzejewska D, Hoyt T, Robonson A, Callis G, Kozaki S, **Kiyono H**, McGhee JR, Fujihashi K, and Pascual DW. Mucosal vaccine targeting improves onset of mucosal and systemic immunity to *Botulinum* neurotoxin A. *J. Immunol.* 177 : 5524-5432. 2006.
- Nochi T, and **Kiyono H**. Innate immunity in the mucosal immune system. *Curr Pharm Des.* 12 : 4203-4213. 2006.
- Kim N, Kunisawa J, Kweon MN, Eog Ji G, and **Kiyono H**. Oral feeding of *Bifidobacterium bifidum* (BGN4) prevents CD4<sup>+</sup> CD45RB (high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. *Clin.Immunol.*123:30-39. 2007.
- Kunisawa J, Kurashima Y, Gohda M, Higuchi M, Ishikawa I, Miura F, Ogahara I, and **Kiyono H**. Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B cell trafficking for subsequent intestinal IgA production. *Blood* 2007. (in press)
- Kunisawa J, Takahashi I, and **Kiyono H**. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol. Rev.*215:136-153. 2007.
- Takayama N, Igarashi O, Kweon MN, and **Kiyono H**. Regulatory role of Peyer's patches for the inhibition of OVA-induced allergic diarrhea. *Clin.Immunol.*2007. (in press)
- Tamagawa H, Hiroi T, Mizushima T, Ito T, Matsuda H, and **Kiyono H**. Therapeutic effects of roxithromycin in interleukin -10-deficient colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2007. (in press)
- 吉田理人、五十嵐脩、寺原和孝、**清野宏**. 絨毛 M 細胞の形態と機能. *臨床免疫.* 45:236-242. 2006.
- 廣井隆親、塚越百合子、**清野宏** 粘膜系好酸球様樹状細胞による免疫寛容制御  
感染と免疫 221-230 2007.

## (2) 特許出願

平成 18年度特許出願:1 件(CREST 研究期間累積件数:2件)