

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20249028

研究課題名（和文） 粘膜上皮層における抗原取り込みネットワークの解明

研究課題名（英文） Analysis of antigen-uptake network at mucosal epithelial layer

研究代表者

清野 宏 (HIROSHI KIYONO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：10271032

研究成果の概要（和文）：

抗原取り込みに特化した細胞と考えられている M 細胞の、亜集団も含めた外的制御因子や抗原取り込みメカニズム、分化誘導メカニズムを明らかにする目的で、M 細胞特異的発現分子の同定と機能解析を行った。その結果、申請者らが発見した誘導型 M 様細胞は、その抗原取り込み能や形態などから M 細胞と上皮細胞の中間的存在であることが示唆された。新規 M 細胞特異的分子として、GP2、MLP などを同定した。GP2 に関しては、FimH タンパク質を有する特定の細菌群が M 細胞によって効率よく取り込まれるための足場として機能していることを共同研究により明らかにした。また、抗 GP2 抗体を樹立し、この抗体がワクチン抗原の効果的送達に用いることができることを確認した。他の分子についても遺伝子欠損マウスの作製、解析を通して、各分子の M 細胞における機能解析を現在も進めている。

研究成果の概要（英文）：

M (Microfold) cells and related subpopulation cells are known as specialized cells for antigen uptake. To reveal the extracellular regulating factors and the mechanisms for antigen uptake and their differentiation of M cells, we identified several M cell-specific genes, and investigated their functions on M cells. As a result, it was suggested that inducible M-like cells, which have been discovered by our group, were an intermediate cells between Peyer's patch M cells and intestinal epithelial cells. We succeeded in identifying GP2 and MLP as novel M cell-specific molecule. In the case of GP2, our collaborative efforts revealed that GP2 could capture some bacterial groups via FimH protein, and acted as a scaffold to uptake them efficiently. In addition, we established monoclonal anti-GP2 antibody, and verified that this antibody was applicable for effective vaccine antigen delivering to M cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	16,900,000	5,070,000	21,970,000
2009年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2010年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
年度			
年度			
総計	39,100,000	11,730,000	50,830,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：粘膜免疫、M 細胞、上皮細胞、抗原取り込み、共生細菌

1. 研究開始当初の背景

病原性細菌やウイルスの主要侵入門戸である消化器・呼吸器に備わっている粘膜免疫システムは、最前線での防御免疫システムとして絶えず機能することで、我々生体を感染から防御している。この粘膜免疫システムは、パイエル板や Nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) に代表される「誘導組織」と粘膜固有層からなる「実効組織」とに区分される。「誘導組織」には特殊に分化した上皮層 (Follicle-associated epithelium; FAE) が存在し、そこには抗原取り込みを専門とする M (Microfold) 細胞が散在している。これまでの概念では、M 細胞による管腔から誘導組織への抗原取り込みが起点となり、抗原特異的液性・細胞性の両免疫応答が誘導されるとされてきた。しかしながら近年我々は、パイエル板などの「誘導組織」から遠く離れた「実効組織」の絨毛上皮層にも抗原取り込み能を有した絨毛 M 細胞が存在することを発見した (Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 101: 6110-6115, 2004)。さらに絨毛上皮層には直接管腔内に自らの突起を伸ばし異物の取り込みを行っている樹状細胞も存在することが他のグループから報告された (Science, 307: 254-258, 2006)。すなわち粘膜免疫システムには、誘導組織に存在する M 細胞を介した既存の抗原取り込み経路に加え、腸管上皮層にも抗原取り込み経路が複数存在していることが判明してきた。現在、これら異なる抗原取り込み経路を介した免疫誘導制御の違いは、粘膜免疫学の分野において最も注目されている領域の一つである。

2. 研究の目的

本研究では、「粘膜上皮層における抗原取り込みネットワークの解明」という研究課題のもと、パイエル板および絨毛 M 細胞に加え、腸管上皮細胞にも焦点を当て、未だ解明されていない抗原取り込み細胞への分化誘導因子および、その外的制御因子を同定し、抗原取り込みという観点から見た粘膜免疫制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) これまでに我々は、M 細胞特異的モノクローナル抗体 (NKM 16-2-4) の作製に世界で初めて成功し、本抗体を M 細胞の単離精製のツールとして応用することで、パイエル板 M 細胞、コレラ毒素 (CT) 誘導型絨毛 M 細胞ならびに、小腸上皮細胞の遺伝子発現プロファイルを作製した。本研究では、この遺伝子発現プロファイルを定量的 RT-PCR 法を用いて精査を行い、M 細胞の抗原取り込み能や分化に関わる分子の同定を行う。また、

候補遺伝子については in situ hybridization 法や免疫染色法を用いたそれらの分子の M 細胞における局在を確認する。加えて、細胞表面に出ている分子に関してはそれに対するモノクローナル抗体の樹立を試みる。

2) 申請者らが見いだした、上記の CT 誘導型絨毛 M 細胞における抗原取り込み能力を、パイエル板 M 細胞での抗原取り込み能力と比較検討する。CT を経口投与後にタンパク質抗原 (例: FITC 標識卵白アルブミン) および、病原性細菌 (例: GFP 発現サルモネラ菌) を腸管ループ内に投与し、その後の動態を組織学的に評価する。

3) 1) で得られたモノクローナル抗体が M 細胞指向性を持った抗原送達系に応用可能かどうかを経口ワクチンモデルを用いて検討する。可溶性抗原である破傷風類毒素 (tetanus toxoid; TT) をアビジン-ビオチン法によりモノクローナル抗体と結合させた経口ワクチンを作製し、これを週 1 回、計 3 回マウスに経口投与する。最後の投与から 1 週間後に血清と糞便を採取して、それぞれに含まれる TT 特異的 IgG および IgA を ELISA 法により定量する。

4) 1) で、小腸組織において M 細胞特異的と同定された遺伝子について、遺伝子欠損マウスの入手もしくは作製を行い、それらのマウスにおける M 細胞の表現型を解析する。抗原取り込み能に関しては、3) と同様の手法をとる。また、当該分子が M 細胞の分化に関わっている可能性があるため、M 細胞の存在、形態変化を電子顕微鏡解析や、NKM 16-2-4 を用いた共焦点レーザー顕微鏡解析等を駆使して確認する

4. 研究成果

1) 研究初年度は、申請者らが見出したコレラ毒素 (CT) 誘導型の絨毛 M 細胞様細胞における抗原取り込み能力を、パイエル板 M 細胞での抗原取り込み能力と比較検討することを主目的とした。CT を経口投与後にタンパク質抗原 (例: FITC 標識卵白アルブミン) および、病原性細菌 (例: GFP 発現サルモネラ菌) を腸管ループ内に投与し、その後の動態を組織学的に評価した結果、CT 誘導型の絨毛 M 細胞様細胞は、隣接する円柱 (吸収) 上皮細胞と比較して、タンパク質抗原に対する高い取り込み能力を有していたが、病原性細菌に対する取り込み能力は、パイエル板 M 細胞や古典的な絨毛 M 細胞とは異なり全く認められなかった。またこの絨毛 M 細胞様細胞は、我々が先に樹立した M 細胞特異的モノクローナル

抗体 NKM 16-2-4 や、これまで M 細胞マーカーとして多用されてきた UEA-1 によって強く認識されるものの、形態学的には吸収上皮細胞と非常に類似しており、M 細胞と上皮細胞の中間的存在であることが推測された。

2) 我々はパイエル板 M 細胞の膜表面に特異的に発現する分子の一つとして Glycoprotein 2 (GP2) を同定した (JI)。また、GP2 が大腸菌やサルモネラ菌などが持つ FimH タンパク質と結合することで、これらの細菌が効率的に M 細胞によって取り込まれていることを、理化学研究所免疫系構築研究チームとの共同研究により明らかにした (Nature)。

3) GP2 に対するモノクローナル抗体を樹立し、経口ワクチンモデルを用いてこの抗体の抗原送達系における効果を検討した結果、TT 結合抗 GP2 抗体の経口投与により、TT 特異的糞便中 IgA の産生のみならず、血清中 IgG 産生に関しても強い誘導効果が認められた。現在、この抗体がさらに経口免疫寛容の誘導効果を有するかを検討している。

4) パイエル板 M 細胞内に特異的に発現する分子として myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) -like protein (MLP) を同定した。MLP の完全ノックアウトマウスはすでに作製されており、胎生致死であることが報告されていたため、コンディショナルノックアウトマウスの作製を行った。定法に従い変異アレルを有する ES 細胞クローンを樹立した。このクローンを胚盤胞へマイクロインジェクションで移入しキメラマウスを得、これと野生型マウスとの掛け合わせによりヘテロマウスを得た。現在、腸管上皮細胞特異的に Cre タンパク質を発現する Villin1-Cre マウスと交配を開始しており、M 細胞特異的にこの遺伝子を欠損するホモマウスの誕生を待って、その表現型の解析に着手する予定である。

5) 上記 GP2、MLP に加え、我々は最近、新たに 5 つの M 細胞特異的遺伝子を同定した。このうちの一遺伝子に関しては in situ ハイブリダイゼーション法により、小腸上皮細胞において M 細胞特異的であることを確認している。この遺伝子に関してはコンディショナルノックアウトマウスの作製を開始し、M 細胞における機能解析を行う予定である。また、他の 4 遺伝子についても組織学的に M 細胞特異的に発現していることを継続して確認中であり、順次それらの遺伝子産物の M 細胞における機能解析を開始する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Terahara, K., et al., Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem Biophys Res Commun.*, 有, 404, 2011, 822-828.

2. Nochi, T., et al., Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines., *Nat Mater.*, 有, 9, 2010, 572-578.

3. Yuki, Y., et al., In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine that induces protective immunity against botulism in nonhuman primates., *J Immunol.* 有, 185, 2010, 5436-5443.

4. Tokuhara, D, et al.,, Secretory IgA-mediated protection against V. cholerae and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic Escherichia coli by rice-based vaccine., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 有, 107, 2010, 8794-8799.

5. Takahashi, I., et al., Mucosal regulatory cells in the gastrointestinal tract and periodontium., *Periodontol.*, 有, 54, 2010, 247-256.

6. Obata, T., et al.,, Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 有, 34, 2010, 768, 774.

7. Fuglem, B., et al.,, Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium., *Dev Comp Immunol.*, 有, 120, 2010, 2131-2143.

8. Kunisawa J and Kiyono H., Aberrant interaction of the gut immune system with environmental factors in the development of food allergies., *Curr Allergy Asthma Rep.*, 有, 10, 2010, 215-221.

9. Malamut, G., et al.,, IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis., *J Clin Invest.*, 有, 120, 2010, 2131-2143.

10. Kayamuro, H., et al., Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S.,

Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus., J Virol., 有, 84, 2010, 12703-12712.

[学会発表] (計 10 件)

1. KIYONO H., Chaperon-Like Antigen Presentation by Nanogel-Based Vaccine at Nasal Epithelium., Avison Biomedical Symposium 2011., 2011.2.25., Seoul, Korea.

2. KIYONO H., New Prospects on the Aerodigestive Immunity for Mucosal Vaccine Development., Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals., 2010.10.9., Prato, Italy.

3. KIYONO H., Mucosal Nanogel-based Chaperon Vaccine for the induction of protective immunity., 4th Vaccine and ISV Annual Global Congress., 2010.10.4., Vienna, Austria

4. KIYONO H., Intra-Tissue habitation of commensal bacteria in Peyer's patches for gut immunity., 8th German-Japanese Symposium, Regulation of immune response and diseases., 2010.9.27., Cuxhahen, Germany.

5. KIYONO H., Intra-tissue habitation of intestinal opportunistic bacteria in mammalian gut-associated lymphoid tissues for the creation of a mucosal antibody-mediated symbiosis., 40th Annual Meeting DGFI German Society for Immunology., 2010.9.26., Leipzig, Germany.

6. KIYONO H., Mucosal chaperoning nanogel vaccine for the induction of protective immunity., The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity (United States-Japan Cooperative Medical Science Program 23rd Joint Meeting of the AIDS Panels., 2010.9.8., Awaji, Japan.

7. KIYONO H., Role of Intestinal Glycosylation for the Mucosal Immune System and Mucosal Vaccine Development., 1st Asia Pacific Workshop on Neurovirology Seoul 2010, 2010.7.16, Seoul, Korea.

8. KIYONO H., Craniofacial Mucosal Immune System: Uniqueness of lymphoid Organogenesis and Immunological Function for NALT and TALT., The 7th International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways, 2010.7.8, Asahikawa., Hokkaido.

9. KIYONO H., Mucosal Immunity in the Control of Infectious Diseases., Pasteur-Areva Course Anti-Viral Immunity, 2010.5.28, Shanghai., China.

10. KIYONO H., Basic principals of immune responses: innate versus adaptive immunity., The 10th International Advanced Course on Vaccinology in Asia Pacific Region., 2010.5.10., Seoul, Korea.

[図書] (計 2 件)

1. 清野宏、(株)秀潤社、細胞工学「粘膜免疫システム」、2011、p342-409
2. 清野宏、(株)シナジー、臨床粘膜免疫学、2010、722 頁

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清野 宏 (HIROSHI KIYONO)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：10271032

(2) 研究分担者 なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

- 國澤 純 (JUN KUNISAWA)
東京大学・医科学研究所・講師
研究者番号：80376615
- 佐藤 慎太郎 (SHINTARO SATO)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：80447333
- 幸 義和 (YOSHIKAZU YUKI)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：60345030