

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 2 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2011

課題番号：22689015

研究課題名（和文） 粘膜免疫ネットワークにおける時空間ダイナミズムの解明

研究課題名（英文） Spatial immunological network at mucosal immune system

## 研究代表者

國澤 純（JUN KUNISAWA）

東京大学 医科学研究所 准教授

研究者番号：80376615

研究成果の概要（和文）：本研究においては、粘膜組織における生体防御と微生物の時空間制御を解析するためのイメージングシステムを用いた免疫学的研究を遂行した。微生物の動態解析に介しては、化学発光を基盤とした微生物増殖検出システムを用い、肺炎球菌に対する経鼻ワクチン効果を評価する系を確立した。一方、宿主免疫系に関しては、粘膜リンパ組織の上皮細胞層に存在することが示されている M 細胞が鼻腔の上皮細胞層にも存在していることを提示し、新たな病原体取り込みとしていることを宿主側のレクチン染色と蛍光標識微生物を用いたイメージング解析にて示した。さらにマクロ共焦点レーザー顕微鏡を駆使し、抗原提示細胞として機能することが知られている樹状細胞が、パイエル板においては T 細胞領域の形成にも関わることを新たに見いだした。特に経時的な細胞分布の変化が解析出来るようになったことで、樹状細胞によるパイエル板 T 細胞の領域形成においては、ナイーブ T 細胞のパイエル板への進入ではなく、進入後の T 細胞領域での滞留に樹状細胞が重要であることを示すことが出来た。これらの結果は、宿主と微生物の時空間的なイメージング解析が可能となることで初めて得ることの出来た知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed an immunological studies using some imaging system for analyzing bacterial distribution and growth as well as host immune system at mucosal tissues. Using chemiluminescence-based microbial detection system, we can evaluate nasal vaccine effects against Streptococcus pneumoniae. As host immune system, we identified M cell-like cells in the epithelial cell layer of the nasal cavity as a new pathogen uptake pathway. In addition, macro-confocal laser microscopy allowed us to reveal the unique dendritic cell function in the formation of T cell areas in the Peyer's patches by regulating the retention rather than entering step of T cells in the Peyer's patches. Taken together, our imaging systems reveal the novel immunological functions and bacterial distribution and growth, which can be applied to the basic immunological analyses and the evaluation of mucosal vaccines.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2011 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
年度			
年度			
年度			
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

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、イメージング、感染症

### 1. 研究開始当初の背景

蛍光や発光を検出する技術を用いたイメージング手法により生体内での免疫応答の時空間的な動きを解析することが可能となってきた。一方で、免疫系の細胞だけではなく、病原体を含む微生物の動態のイメージングを同時に組み合わせることで、宿主と微生物の両面から生体防御や感染、共生を視覚的に解析することの重要性が認識されるようになっていた。

### 2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者が行ってきたスフィンゴシン1リン酸を介した粘膜免疫細胞の動態制御に関する研究から得られた課題をもとに、腸管ならびに呼吸器感染症モデルを使用し、研究代表者が独自に開発を進めている蛍光・発光システムを用いた微生物と免疫システムのイメージング解析を行い、感染防御機構の時空間ダイナミズムを明らかにする。すなわち3次元空間における細胞分布と時間軸を交えた4次元免疫ネットワークを微生物と生体側の両面から視覚的にとらえつつ、従来の免疫学的手法と組み合わせることで、“粘膜組織における病原体の感染、取り込み、病態形成、排除までの連続的生体免疫応答の時空間ダイナミズムの解明とその関連分子・細胞の同定”を行う。これにより粘膜ワクチン、免疫療法の開発における分子・細胞・個体レベルによる視覚的理論基盤の構築が確立されると期待される。

### 3. 研究の方法

微生物イメージング

吸器と腸管の感染モデルとしてそれぞれルシフェラーゼを発現する肺炎球菌と GFP を発現するサルモネラ属菌を用いる。これら病原体の検出方法として、による化学発光と GFP 等による蛍光の両検出系を併用する。化学発光検出システムにより、病原体の個体レベルでの分布と増殖を経時的に観察しながら、蛍光検出が可能なマクロ共焦点顕微鏡を用いた組織・細胞レベルでの動態を同時に検出する。

免疫イメージング

初発感染部位である上皮細胞層での反応を上皮細胞や微生物取り込み細胞である M 細胞の特異的レクチンを用いて観察する。樹状細胞の動態・機能解析については、CD11c-GFP ノックインマウスを用いる。その他の細胞についても CFSE 等の蛍光試薬や蛍光ノックインマウス等を用いた観察系

を確立していく。

### 4. 研究成果

微生物の動態解析に介しては、ルシフェラーゼによる化学発光を基盤とした微生物増殖検出システムを用い、肺炎球菌に対する経鼻ワクチン効果を解析する系を確立した。すなわち非免疫マウスにおいて呼吸器感染させると菌の増殖に伴いシグナルが増強するのに対し、肺炎球菌に対する経鼻ワクチンを接種したマウスにおいてはシグナルの減弱、もしくは消失が観察された。すなわち本システムを用いることで、同一個体における非侵襲的なワクチン評価が可能となり、ワクチン用 DDS の機能評価を行うことが出来た。

一方、宿主免疫系に関しては、粘膜リンパ組織の上皮細胞層に存在することが示されている M 細胞が鼻腔の上皮細胞層にも類似細胞として存在していることを提示し、新たな病原体取り込みとしていることを宿主側のレクチン染色により確認した。さらに蛍光標識したサルモネラをモデル微生物として用い、レクチン染色した M 細胞様細胞とのイメージング解析を行ったところ、サルモネラが M 細胞様細胞に結合し取り込まれている像が観察された。

さらにマクロ共焦点レーザー顕微鏡を用いたパイル板の組織レベルでの4次元観察システムを用い、抗原提示細胞として機能することが知られている樹状細胞が、パイル板においては T 細胞領域の形成にも関わることを新たに見いだした。蛍光標識した T 細胞の経時的な細胞分布の変化を解析することで、樹状細胞によるパイル板 T 細胞の領域形成においては、T 細胞のパイル板への進入ではなく、進入後の T 細胞領域での滞留に樹状細胞が重要であることを示すことが出来た。

これらの結果は、宿主と微生物の時空間的なイメージング解析が可能となることで初めて得ることの出来た知見であると考えられる。

### 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 14 件)

- 1 J. Kunisawa, E. Hashimoto, I. Ishikawa, and H. Kiyono, A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T

- cells in vitro and in vivo, *PLoS One* 7: e32094, 2012
- 2 S. Takagi, Y. Saito, A. Hijikata, S. Tanaka, T. Watanabe, T. Hasegawa, S. Mochizuki, J. Kunisawa, H. Kiyono, H. Koseki, O. Ohara, T. Saito, S. Taniguchi, L. D. Shultz, F. Ishikawa, Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood* 119: 2768-77, 2012
  - 3 D. Y., Kim, A. Sato, S. Fukuyama, H. Sagara, T. Nagatake, I. G. Kong, K. Goda, T. Nochi, J. Kunisawa, S. Sato, Y. Yokota, C. H. Lee, and H. Kiyono, The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J Immunol* 186: 4253-62, 2011
  - 4 J. Kunisawa and H. Kiyono, Peaceful mutualism in the gut: Revealing key commensal bacteria for the creation and maintenance of immunological homeostasis. *Cell Host Microbe* 9: 83-84, 2011
  - 5 H. Kayamuro, Y. Yoshioka, Y. Abe, S. Arita, K. Katayama, T. Nomura, T. Yoshikawa, R. Kubota-Koketsu, K. Ikuta, S. Okamoto, Y. Mori, J. Kunisawa, H. Kiyono, N. Itoh, K. Nagano, H. Kamada, Y. Tsutsumi, S.I. Tsunoda, Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus. *J Virol* 84: 12703-12, 2010
  - 6 T. Obata, Y. Goto, J. Kunisawa, S. Sato, M. Sakamoto, H. Setoyama, T. Matsuki, K. Nonaka, N. Shibata, M. Gohda, Y. Kagiya, T. Nochi, Y. Yuki, Y. Fukuyama, A. Mukai, S. Shinzaki, K. Fujihashi, C. Sasakawa, H. Iijima, M. Goto, Y. Umesaki, Y. Benno, and H. Kiyono, Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:7419-24, 2010
  - 7 J. Kunisawa and H. Kiyono, Aberrant interaction of gut immune system with environmental factors in the development of food allergy. *Curr Aller Asthma Rep* 10: 215-221, 2010
  - 8 和氣太一、國澤 純、清野 宏 粘膜表層における生体防御システムとしての粘膜免疫機能 表面 49: 13-22, 2011
  - 9 國澤 純 IgA 産生における腸内免疫ネットワーク 実験医学増刊 免疫記憶の制御と疾患治療 29: 100-105, 2011
  - 10 國澤 純、後藤義幸、小幡高士、清野 宏 腸内細菌のパイエル板組織内共生 細胞工学 30: 409-412, 2011
  - 11 國澤 純 マクロ共焦点顕微鏡を用いた粘膜組織における細胞動態 Drug Delivery System 26: 419-421, 2011
  - 12 倉島洋介、網谷岳朗、國澤 純、清野 宏 食物アレルギーの予防および治療的戦略の確立に向けた粘膜免疫研究の展開 アレルギー免疫 18: 66-77, 2011

13. 國澤 純 腸管の生体防御や恒常性維持における脂質メディエーター：スフィンゴシン1リン酸の役割 化学と生物 48: 827-830, 2010
14. 國澤 純 粘膜免疫の新展開－生体最前線における腸内環境との調和と排除－ 無菌生物 40, 25-28, 2010
- [学会発表] (計 23 件)
1. 國澤 純 冬虫夏草関連化合物 FTY720 からの新展開－腸管における生体防御と恒常性維持における脂質とビタミンの役割－ 第 32 回 和漢医薬学総合研究所特別セミナー、富山（富山県民会館）（2011 年 12 月 10 日）
  2. 國澤 純 粘膜免疫からみたワクチン効果 第 54 回日本感染症学会中日本地方会学術集会、奈良（奈良県新公会堂）（2011 年 11 月 26 日）
  3. 國澤 純 Immunological crosstalk with commensal bacteria in the regulation of intestinal IgA responses 消化管と短鎖脂肪酸 シンポジウム、東京（日本大学）（2011 年 11 月 19 日）
  4. 國澤 純 食餌性分子を介した腸管免疫の制御と免疫疾患との関連 第 53 回日本消化器病学会大会、福岡（福岡国際会議所）（2011 年 10 月 21 日）
  5. Jun Kunisawa Lipids and vitamins in the regulation of gut immunity, **JAFI 2011**、東京（東京大学）（2011 年 10 月 18 日）
  6. Jun Kunisawa and Hiroshi Kiyono, Keeping the immunological balance in the gut – functional food and health, **Asia-Pacific Week 2011 Food forum**, Berlin, Germany (September 8, 2011)
  7. 國澤 純 共生細菌による腸管免疫制御システム 第 20 回内毒素・LPS 研究会、東京（順天堂大学）（2011 年 6 月 25 日）
  8. 國澤 純 腸粘膜表層と腸管組織内における免疫共生システム 第 15 回腸内細菌学会、東京（東京大学）（2011 年 6 月 16 日）
  9. Jun Kunisawa, Eri Hashimoto, Izumi Ishikawa, Hiroshi Kiyono, Dietary Vitamin B9 is a Survival Factor of Intestinal Regulatory T Cells, **AAI 2011**, San Francisco, USA (May 15, 2011)
  10. 國澤 純 次世代感染症ワクチンとしての粘膜ワクチン 第 28 回日本医学会総会、東京（2011 年 4 月）
  11. Jun Kunisawa and Hiroshi Kiyono, The uniqueness of mucosa-associated lymphoid tissues for the development of mucosal vaccine, **BIT Life Sciences' 3<sup>rd</sup> World Congress of Vaccine**, Beijing, China (March 2011)
  12. Jun Kunisawa, Takahiro Nagatake, Takashi Obata, Naoko Shibata, and Hiroshi Kiyono, The Unique pathway in the development and maintenance of mucosa-associated lymphoid tissues, 2nd Workshop of Synthetic Immunology, 京都（2010 年 12 月）
  13. Jun Kunisawa, Immunological function of sphingosine 1-phosphate in the regulation of innate and acquired phases of intestinal IgA responses, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (**BMB2010**)、神戸（2010 年 12 月）

14. Jun Kunisawa, Regulation of IgA antibody responses by immunological crosstalk with intestinal environmental factors, **第5回千葉大学 G-COE シンポジウム**、東京 (2010年12月)
15. 國澤 純 次世代ワクチンとしての粘膜免疫とDDS、**第26回日本DDS学会**、大阪 (2010年6月)
16. Jun Kunisawa and Hiroshi Kiyono, MyD88 mediates intestinal IgA production in the maintenance of appropriate composition of commensal bacteria, **The Second International Conference on Modern Mucosal Vaccine, Adjuvants & Micrbicides**, Dublin, Ireland (April 2010)
17. 國澤 純 粘膜組織における免疫学的普遍性と特殊性 **第10回鎌倉カンファレンス**、横浜 (2010年4月)

[図書] (計3件)

- 1 國澤 純 粘膜ワクチンの現状と未来 ドラッグデリバリーシステムの新展開II (監修、永井恒司、岡田弘晃)、シーエムシー出版、149-154, 2012
- 2 國澤 純 自然免疫 腸内共生系のバイオサイエンス - 腸内細菌と免疫の関係 - (財団法人日本ビフィズス菌センター、編) 編集委員・執筆 2011
- 3 國澤 純 粘膜免疫におけるダイナミックな細胞移動-脂質メディエーターの関与- 臨床粘膜免疫学 (清野宏、編) p236-244, 2010

[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◇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

[http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/EnMen/index\\_j.html](http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/EnMen/index_j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 國澤 純  
**東京大学 医科学研究所 准教授**  
研究者番号：80376615

(2) 研究分担者 なし  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし  
( )

研究者番号：