様式Ｃ－１９

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２４年　４月　１日現在

機関番号：３２６６５
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010～2011
課題番号：２２７９１８１６
研究課題名（和文）　有効な経口投与型ワクチンを開発するための腸管粘膜免疫応答誘導機序の解明
研究課題名（英文）　Elucidation of mechanism for induction of intestinal mucosal immune response to develop effective oral vaccine
研究代表者
橋爪　智美（HASHIZUME TOMOMI）
日本大学・松戸歯学部・助手
研究者番号：50419785

研究成果の概要（和文）：経口投与された組換え型サルモネラに対する抗原特異的腸管粘膜免疫応答誘導にはパイエル板の組織構築が重要であり、パイエル板の中で抗原刺激が起こった場合のみ抗原特異的腸管免疫応答が誘導されることが示唆された。また、樹状細胞の遊走に関与しているケモカインレセプター7(CCR7)欠損マウスに組換え型サルモネラを経口免疫した結果、腸管 IgA 抗体応答は遅れるが誘導されることが示され、CCR7 経路は関与しない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cell transfer experiments showed that PP, but not SP-cell transferred mice could elicit the Ag-specific intestinal IgA immunity against orally administered r*Salmonella*. Further, antigen priming solely occurred in PP induces Ag-specific intestinal IgA immunity. On the other hand, CCR7 signaling which is important for dendritic cell migration may not be essential for induction of Ag-specific intestinal IgA immunity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２０１０年度	700,000	210,000	910,000
２０１１年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総　計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学
キーワード：腸管粘膜免疫，分泌型 IgA，サルモネラ，パイエル板，経口投与型ワクチン

１．研究開始当初の背景

(1)研究者らによる研究の流れ

研究者らはこれまでに、経口投与された抗原の種類によって腸管の抗原特異的分泌型 IgA 抗体応答誘導メカニズムが異なってくることを示している。経口投与された可溶性タンパク抗原に対する腸管の抗原特異的IgA抗体応答誘導にはパイエル板は必ずしも必須ではない (J. Immunol. 164:5184-5191, 2000)が、病原性微生物(組換え型サルモネラ)を経口投与した場合には、抗原特異的腸管の粘膜IgA免疫応答誘導にはパイエル板が必要不可欠であると報告している(Infec. Immun. 76:927-934, 2008)。病原性微生物に対する腸管粘膜免疫応答成立にはパイエル板が重要であるという知見は、ほぼ同時期にイタリアの研究グループによっても報告された(Immunity 27:975-984, 2007)。以上のように経口投与された抗原が可溶性タンパクか微生物かで腸管粘膜免疫応答の誘導メカニズ

ムが異なっているという事実は大変興味深い。研究者らは、経口投与された微生物に対する腸管IgA粘膜免疫応答誘導のさらに詳細なメカニズムの解析を遂行中であった。

(2)経粘膜投与型ワクチン開発の流れ

経粘膜投与型ワクチンは口腔内に唾液由来のIgA、歯肉溝浸出液由来のIgG抗体応答を誘導することが可能であり、う蝕、歯周病に代表される口腔感染症に対して２段構えの防御バリアを構築することが可能である。さらに、お米にワクチン抗原を発現させることによって、食べると同時にワクチン効果も期待できるといった食べるワクチンの開発研究もされている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104:10986-10991, 2007)。以上のように経口ワクチンは非常に有用性の高いものであり、次世代型ワクチンとして期待されている。

(3)腸管粘膜免疫応答誘導機序解明の流れ

世界的にも、国内トップレベルの研究期間においても、経口ワクチンの開発、経口免疫寛容によるアレルギーや自己免疫疾患の治療法確立のために消化管の免疫システムについて広く解析が進められている。

２．研究の目的

本研究は、有効で効果的な経口投与型ワクチンの開発を行うための、消化管における抗原特異的粘膜免疫応答誘導メカニズムの解明を目的としている。経口投与された抗原が可溶性タンパクか微生物かで腸管における抗原特異的IgA抗体応答誘導メカニズムが異なる。可溶性タンパクも微生物も経口投与型ワクチンの担体となり得るが、ターゲットとなるワクチン抗原にとって最も効果的な担体が選択できるよう、より詳細な腸管の抗原特異的IgA抗体応答誘導メカニズムの解明を目指す。

３．研究の方法

(1)粘膜免疫誘導成立とパイエル板の組織構築

①γ線照射マウスへの細胞移入実験

正常マウス(C57BL/6)に弱いγ線を照射し生体内のリンパ組織を一度破壊し、そこへ同週齢の正常マウスから分離してきたパイエル板、脾臓細胞を各々尾静脈より移入した。照射線量、移入後に組織の再構築が起こる日数については予備実験を行って決定した。組織切片を作成し免疫染色を行って組織の再構築について確認を行った。その後、破傷風毒素のフラグメントCを発現させた組換え型サルモネラ(r*Salmonella*-Tox C)を経口免疫し、糞便抽出物中の破傷風毒素(TT)に対するIgA抗体価をELISA法で測定した。

②レシピエントマウスのパイエル板におけるドナー由来細胞の定着率

C57BL/6マウスのコンジェニックマウスであるC57BL/6.CD45.1マウスにC57BL/6マウスから分離したパイエル板細胞を移入し、一定期間後パイエル板からリンパ球を回収し細胞の表層マーカーをフローサイトメトリー法で解析した。

③パイエル板欠損マウスへの細胞移入実験

パイエル板欠損マウスを作成し、そこへ同週齢の正常マウスから分離してきたパイエル板細胞、脾臓細胞を各々尾静脈より移入した。一定期間後、r*Salmonella*-Tox Cを経口免疫し、糞便抽出物中のTT特異的IgA抗体価をELISA法で測定した。

(2)腸管関連リンパ組織に所属しているリンパ球サブセットの遊走に関する解析

①リンパ球の遊走阻害実験

正常マウスに、2次リンパ組織、胸腺からのリンパ球の移動を阻害するFTY-720を腹腔内投与し続けた状態でr*Salmonella*-Tox Cを経口免疫し、TT特異的糞便抽出物中IgA、血清中IgA、IgG抗体価をELISA法で測定た。また、マウス脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板、小腸の粘膜固有層から単核細胞を分離し、TT特異的及びトータルIgG、IgA抗体産生細胞数をELISPOT法で測定した。さらに、樹状細胞サブセットの各組織における局在についてフローサイトメトリー法で解析した。

②サルモネラの生体内分布に関する解析

FTY-720投与下でｒ*Salmonella*-Tox Cを経口免疫し1週間後にパイエル板、腸間膜リンパ節、小腸、脾臓を回収し、各組織におけるサルモネラの分布について選択培地中のコロニーを数えることで検討した。

(3)ケモカインレセプター7(CCR7)経路の関与に関する実験

①CCR7欠損マウスを用いた解析

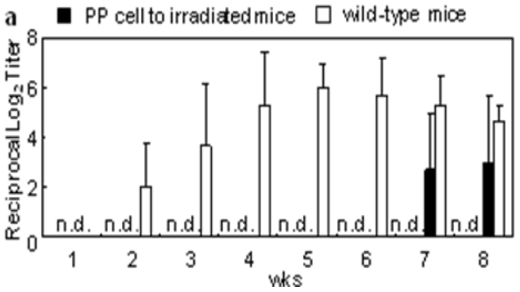
樹状細胞の遊走に深く関与しているCCR7欠損マウスにｒ*Salmonella*-Tox Cを経口免疫し、ELISA法を用いて糞便抽出物中のTT特異的IgA抗体価を測定した。

４．研究成果

(1)経口投与された組換え型サルモネラに対する抗原特異的腸管IgA免疫応答誘導にはパイエル板の立体構造が要求される。

①γ線照射マウスへの細胞移入実験

正常マウスに弱いγ線を照射後正常マウスから分離してきたパイエル板、脾臓細胞を尾静脈から移入し１週間後ｒ*Salmonella*-Tox C を経口投与し、経時的に糞便抽出物中の TT 特異的 IgA 抗体価を測定したところ、パイエル板細胞を移入した群で TT 特異的腸管 IgA 粘膜免疫応答誘導が回復した（図 1）。一方、脾臓細胞を移入した群では回復しなかった（図 1）。また、パイエル板の組織切片を免疫染色した所、パイエル板細胞移入マウス群で



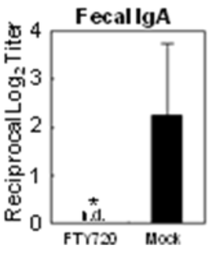
は、T 細胞、B 細胞領域の明確な分離、濾胞樹状細胞クラスターの形成が認められパイエル板の組織構築が回復していることが認められたが、パイエル板細胞を移入していない群では不明瞭なＢ細胞領域等、不完全なパイエル板組織構築が認められた。

図 1　パイエル板細胞を移入したγ線照射マウスにおける TT 特異的糞便中 IgA 抗体価　脾臓細胞移入マウス群:非検出(n.d.)

②コンジェニックマウスを用いた実験
C57BL/6 由来のパイエル板細胞を弱いγ線を照射した C57BL/6.CD45.1 マウスに移入し、1 日後及び１週間後にパイエル板細胞を回収し、レシピエントマウスのパイエル板細胞中におけるドナー由来の細胞の割合について解析した結果、移入後１日目では３割程度であったが、1 週間後では４割に増加していた。
③パイエル板欠損マウスへの細胞移入実験
パイエル板欠損マウスへ正常マウスから分離してきたパイエル板、脾臓細胞を各々尾静脈から移入し１週間後ｒ*Salmonella*-Tox C を経口投与し、糞便抽出物中の TT 特異的 IgA 抗体価を測定した結果、どの細胞移入群でも TT 特異的腸管 IgA 粘膜免疫応答誘は回復しなかった。

　以上の結果から、経口投与された組換え型サルモネラに対する腸管の抗原特異的 IgA 抗体応答誘導にはパイエル板の T 細胞領域、B 細胞領域等を兼ねそろえたリンパ組織構築が重要であるということが示唆された。

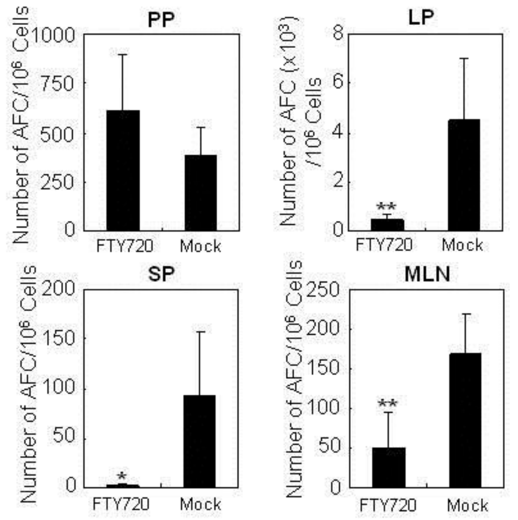
(2)サルモネラ抗原の経口投与後の樹状細胞の遊走は抗原特異的腸管 IgA 抗体応答誘導には関与しない
①FTY-720 を用いた解析



FTY-720 を継続的に正常マウスの腹腔内に投与し、2 次リンパ組織からのリンパ球の遊走を阻害した状態でｒ*Salmonella*-Tox C を経口免疫した結果、TT 特異的腸管 IgA 抗体応答が有意に減少した（図 2）。

図２　FTY-720 投与マウスにおける TT 特異的糞便中 IgA 抗体価

　また、TT 特異的及びトータル IgA 産生細胞数は脾臓、腸間膜リンパ節、小腸の粘膜固有



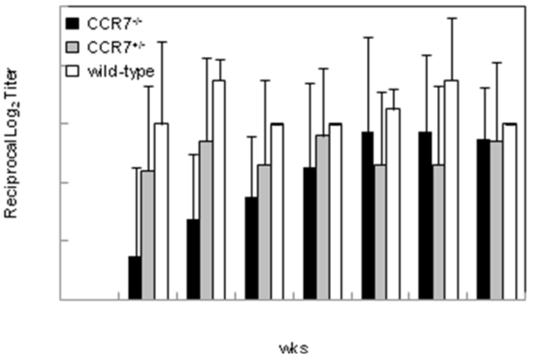
層で有意に減少した一方でパイエル板では増加した（図 3）。一方、FTY-720 投与下における各組織中の樹状細胞サブセット、サルモネラの組織内局在に関する解析から、本研究における FTY-720 投与条件下では、脾臓、腸間膜リンパ節における樹状細胞サブセットの分布、回収されたサルモネラのコロニー数は非投与群と同レベルであり、樹状細胞の遊走、サルモネラの組織分布は FTY-720 に制御を受けていなかった。

図３　FTY-720 投与マウスにおける TT 特異的 IgA 産生細胞数　PP:パイエル板、LP:小腸粘膜固有層、SP:脾臓、MLN:腸管膜リンパ節

　以上の結果をまとめると、FTY-720 投与下でも、サルモネラ抗原、サルモネラ抗原を捕捉した樹状細胞は腸管膜リンパ節に到達していた。にもかかわらず、パイエル板の中にだけ TT 特異的 IgA 産生細胞が誘導蓄積され、

腸間膜リンパ節、脾臓、孤立リンパ小節を含んだ小腸の粘膜固有層には TT 特異的 IgA 産生細胞が誘導蓄積されなかった。従って、経口投与された組換え型サルモネラに対する抗原特異的腸管の IgA 免疫応答誘導はパイエル板で抗原刺激が起こった場合のみ誘導することが示唆された。

(3)CCR7 経路非依存的で経口投与された組換え型サルモネラに対する腸管粘膜免疫応答は誘導される。



①CCR7 欠損マウスにｒ*Salmonella*-Tox C を経口免疫した結果、ヘテロマウス、正常マウスに比較して、誘導は遅れるが、TT 特異的腸管 IgA 抗体応答は誘導されることが示された（図 4)。この事から経口投与された組換え型サルモネラに対する抗原特異的腸管 IgA 粘膜免疫応答誘導には CCR7 経路は必須ではない可能性が示唆された。

図 4　CCR7 欠損マウスにおける TT 特異的糞便中 IgA 抗体価

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０件）

〔学会発表〕（計１件）

① <u>Tomomi Hashizume</u>, et al., Antigen priming for mucosal IgA responses occurs solely in Peyer's patch after oral administration of recombinant *Salmonella*, 14th International Congress of Immunology, 2010年8月26日, 神戸国際会議場

〔図書〕（計０件）

〔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
　橋爪　智美（HASHIZUME TOMOMI）
　日本大学・松戸歯学部・助手
　研究者番号：５０４１９７８５

(2)研究分担者
　　（　　）

　研究者番号：

(3)連携研究者
　　（　　）

　研究者番号：