

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007 ～ 2011

課題番号：19059003

研究課題名（和文） 粘膜免疫と自己識別

研究課題名（英文） Mucosal Immunology and self - discrimination

研究代表者

清野 宏 (KIYONO HIROSHI)

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）：

我々の腸管内に共生している腸内細菌の中には、腸管リンパ組織内を生息場所としているものがあつた。この細菌群の局在には宿主側の粘膜免疫機構が必要であり、その宿主-細菌間の共生機構の破綻は炎症性腸疾患を始めとする慢性炎症の発症に繋がる事が示唆された。また、粘膜免疫の恒常性維持には、腸内細菌、粘膜免疫担当細胞、上皮細胞の三者間相互作用によって厳密に制御されていることが明らかとなり、これらの相互作用の破綻は粘膜免疫のみにとどまらず、全身免疫系の異常にも繋がっている事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we found some gut commensal bacteria, which habit at the inside of gut-associated lymphoid tissue such as Peyer's patches. To make a cohabitation niche in the tissue, the mucosal immune system plays a critical role. It was also suggested that a breakdown of symbiotic relationship between host and microbes led to chronic inflammation such as inflammatory bowel diseases. We also demonstrated that a mutual relationship between commensal microbiota, mucosal immunocompetent cells and intestinal epithelial cells strictly regulated a homeostasis of not only mucosal but also systemic immunity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	28,800,000	0	28,800,000
2008年度	28,800,000	0	28,800,000
2009年度	38,800,000	0	38,800,000
2010年度	33,800,000	0	33,800,000
2011年度	28,800,000	0	28,800,000
総計	159,000,000	0	159,000,000

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：共生細菌、パイエル板、Alcaligenes、フコシル化、IgA、孤立リンパ濾胞、M細胞、Tfh細胞

1. 研究開始当初の背景

腸管に代表される粘膜面は、数百種類の共生細菌に常時曝されているが、我々は巧妙か

つ柔軟な「粘膜免疫システム」を備えることで、非自己である常在細菌に対し偽自己化を確立し、共存状態を創出している。「共生細

菌と免疫系の自己形成」は生体の恒常性維持において非常に重要であるにも関わらず、分子・細胞・個体レベルでの免疫学的機序について殆ど明らかになっていない。世界的に見ても、共生細菌と免疫系の自己形成を含めた免疫生物学的関与・役割とその機序については、その解析が開始されたばかりである。

2. 研究の目的

本研究では、共生細菌、上皮細胞・M細胞、粘膜免疫系細胞群からなる細胞間相互作用の詳細について、無菌状態から常在菌層の確立、そして病態形成という時間的・空間的变化という視点から明らかにすることで、粘膜免疫機構による外界環境因子の偽自己化確立について解明する。また、特定共生菌種による積極的（例、防御）・消極的（例、寛容）免疫誘導の獲得・確立機構について、粘膜免疫側の視点から解析する。無菌・共生・感染・病態形成という種々の条件・状態において同解析を行うことで、いまだ全く解明されていない「共生細菌と粘膜免疫系との相互作用による生体の恒常性維持機構」の実態解明を目指す。

3. 研究の方法

最近になって確立されつつある、16S rRNA クローンライブラリー法等の分子生物学的アプローチを用い、腸管各部位（十二指腸、回腸、結腸、直腸など）における共生細菌（培養不可能なものも含む）の分布を精査する。特に粘液層常在性、上皮細胞接着性および樹状細胞に取り込まれた細菌叢の詳細をパイエル板と絨毛部分に分けて明らかにする。さらに同様の解析をパイエル板欠損マウスや孤立リンパ小節（ILF）欠損マウス、Id2 欠損マウス（パイエル板、ILF、腸管膜リンパ節（MLN）欠損マウス）等の腸管二次リンパ組織欠損マウスを用い、共生細菌と腸管関連リンパ組織との免疫学的相互作用を詳細に解析する。次に、上記の腸内常在細菌遺伝子プロファイル解析により同定された菌種特異的プローブを作製し、FISH 解析と免疫組織学的解析を組み合わせることにより、共生細菌と免疫担当細胞の局在を解明する。

また、特定共生菌種の標準株を用いて、上皮細胞・M細胞、免疫担当細胞群（樹状細胞、B-1/B-2 B細胞、T細胞等）との三次元的細胞間相互作用およびそれに付随する免疫応答について詳細に解析する。まず始めに、*in vivo* において共生細菌を貪食した樹状細胞の種類やその活性化状態を解析する。次いで *in vitro* の培養系を用い、共生細菌を取り込ませた各種樹状細胞と T細胞との共培養システムを用い、抗原特異的 T細胞の制御機構を解析する。これらの結果をふまえて、炎症性大腸炎モデルマウスや日和見感染モデル

などを用い、共生細菌が引き起こす病態の分子・生体レベルでの詳細を解明する。

本研究計画では、理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター粘膜免疫研究チーム（チームリーダー Sidonia Fagarasan）を研究分担者としている。粘膜免疫研究チームは、B細胞および IgA 欠損マウスにおいて分子生物学的手法により腸管の各部位における共生細菌叢の質的・量的変化を解析し、粘膜組織における B細胞および IgA 産生と共生細菌の相互作用の詳細を明らかにする。

4. 研究成果

マウス小腸において、十二指腸から回腸にかけて存在する細菌を解析した結果、十二指腸絨毛部分では、*Proteobacteria*、*Lactobacillus*、*Bacteroides* が、回腸には Segmented filamentous bacteria (SFB) や *Clostridium*、*Lactobacillus* が優勢な細菌である事が明らかとなった。次に、回腸の粘液層及び腸管上皮細胞層における細菌を同定した所、粘液層では *Lactobacillus* や SFB が優勢であるが、上皮細胞層では 90%以上の細菌が SFB である事が明らかとなった。さらに、免疫誘導組織であるパイエル板の上皮細胞層、及び内部に局在する細菌の同定を試みたところ、回腸部位ではパイエル板の上皮細胞層には SFB が、パイエル板内部には *Alcaligenes* が最優勢の細菌であった。

これらの細菌のうち、特に免疫誘導組織であるパイエル板内部に存在する *Alcaligenes* と粘膜免疫機構の相互作用について解析を進めた。Fluorescence *in situ* hybridization 法により、*Alcaligenes* の局在を解析したところ、実際にパイエル板内部に *Alcaligenes* の存在が確認された。さらに、他の二次リンパ組織および小腸絨毛部分についても解析を進めたところ、ILF 並びに MLN においてもその存在が確認されたのに対し、絨毛部分には全く存在しない事が明らかとなった。これらの結果から、*Alcaligenes* は二次リンパ組織特異的に生息可能な細菌である事が考えられた。一方、*Alcaligenes* と粘膜免疫機構の相互作用を検証するために、糞便中の *Alcaligenes* 特異的 IgA 抗体を解析したところ、SPF 環境下では特異的 IgA 抗体が確認されたのに対し、無菌マウスではこれらの抗体は検出されなかった。以上の結果は、代表的な粘膜免疫誘導組織であるパイエル板における細菌、宿主間の共生関係の発見のみならず、共生細菌による新たな免疫誘導機構の可能性を含む重要な発見と言える。さらに解析を進めた結果、*Alcaligenes* のパイエル板内局在性は、マウスのみならず、サルとヒトにおいても認められた。興味深いことに、炎症性腸疾患の一つであるクローン病患者では、

パイエル板内に検出される *Alcaligenes* の定着が有意に減少していた。以上の結果は、パイエル板内における宿主-細菌間の共生機構が、慢性炎症の状態では破綻している可能性を示唆するものである。

次に、共生細菌と上皮細胞並びに M 細胞、絨毛 M 細胞の相互作用についての解析結果について述べる。M 細胞特有の糖鎖修飾構造である α 1,2-フコース特異的に結合するレクチン UEA-1 で小腸上皮細胞を精査したところ、十二指腸側の絨毛では UEA-1 陽性細胞がほとんど観察されなかったのに対し、回腸部位ではほとんどの絨毛上皮細胞が UEA-1 陽性であった。これらの上皮細胞の形態を電子顕微鏡にて観察したところ、典型的な M 細胞や絨毛 M 細胞とは異なり、吸収上皮細胞と同様に規則的な微絨毛を有しポケット構造は見られなかった。これらのフコシル化上皮細胞の分布は腸内細菌の数量と相関する事から、腸内細菌刺激とフコシル化上皮細胞誘導の関係を調べるために、無菌マウス並びに抗生物質処理マウスを作製し解析したところ、フコシル化上皮細胞は完全に消失していた。さらに、代表的な宿主細菌認識受容体である Toll 様受容体のシグナル伝達を司る MyD88 の欠損マウスにおいても、上皮細胞のフコシル化が消失する事を見出した。骨髄移植マウスを用いた実験から、骨髄由来細胞が MyD88 を介してフコシル化上皮細胞を誘導する事が明らかになった。これらの結果から、フコシル化上皮細胞は腸内細菌依存的に骨髄由来細胞を介して誘導される事が明らかとなった。また、様々なノトバイオームマウスの解析結果から、腸内細菌のうち回腸上皮細胞層に最優勢である SFB が、フコシル化上皮細胞を誘導する細菌の一つとして同定された。これらの結果は、上皮細胞のフコースは腸内細菌と宿主間における共生因子である事に加え、腸内細菌、粘膜免疫担当細胞、上皮細胞の三者間相互作用によって制御されている事を示しており、腸管における新たな共生関係成立機構の存在を示唆するものである。

分担研究者である Sidonia Fagarasan のグループは、小腸の IgA 産生には孤立リンパ濾胞における T 細胞非依存的な機構が主である事を明らかにした。また、制御性 FoxP3+CD4+ 細胞がマウスのパイエル板において Tfh 細胞に分化転換することを証明し、FoxP3+細胞が固定された系統ではなく、Tfh 細胞等に変化する可塑性を有した細胞群である事を明らかにした。

次に、Tfh 細胞に高発現する抑制性受容体である Programmed cell death-1 (PD-1) の欠損マウスを解析し、PD-1 が Tfh 細胞と共生細菌との相互作用にどのように関与している

かを解析した。その結果、PD-1 欠損マウスではパイエル板胚中心において Tfh 細胞数が増加しパイエル板の胚中心内部での B 細胞選択に異常が生じていることが見出された。さらに、腸管 IgA の総量は正常マウスと PD-1 欠損マウスで変わりなかったが、PD-1 欠損マウスにおいては IgA で覆われている腸内細菌の割合が正常マウスに比べ減少していたことから PD-1 欠損マウスでは腸内細菌に対する結合力の低い IgA が分泌されていることが示唆された。また、正常マウス及び PD-1 欠損マウスにおける腸内細菌叢を比較したところ、腸内細菌の総数に差は見られなかったものの PD-1 欠損マウスでは腸内細菌叢の構成が大きく変化していた。以上の結果より PD-1 は、腸管 IgA 抗体の選択に関与し腸内細菌を制御することで、腸管免疫系の恒常性維持に関与していることが明らかとなった。一方で PD-1 欠損マウスでは腸内細菌に対する抗体が血清中からも検出されたことから腸内細菌叢の変化が全身免疫系の異常な活性化につながっている可能性が示唆された。このことから PD-1 は腸管のみならず全身免疫系の恒常性維持に関与しているものと考えられた。

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 5 5 件)

- 1) Maruya, M., Kawamoto, S., Kato, LM., and Fagarasan, S. 2013. Impaired selection of IgA and intestinal dysbiosis associated with PD-1-deficiency. *Gut Microbes.* Mar-Apr;4(2):165-71.
- 2) Takase, M., Iida, R., Maruya, M., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., Wakayama, T., Nishigami, S., Fagarasan, S. and Kanagawa O. 2013. Nuclear transferred embryonic stem cells for analysis of B1 B-lymphocyte development. *Int Immunol.* Mar;25(3):145-56.
- 3) Kawamoto, S., Tran, TH., Maruya, M., Suzuki, K., Doi, Y., Tsutsui, Y., Kato, LM., and Fagarasan, S. 2012. The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science.* Apr 27;336(6080):485-9.
- 4) Kim, D-Y., Sato, A., Fukuyama, S., Sagara, H, Nagatake, T., Kong, IG., Goda, K., Nochi, T., Kunisawa, J., Sato, S., Yokota, Y., Lee, CH., and Kiyono, H. 2011. The airway antigen sampling

- system: Respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J. Immunol.* 186: 4253-4262.
- 5) Maruya M, Suzuki K, Fujimoto H, Miyajima M, Kanagawa O, Wakayama T, and Fagarasan, S. 2011. Vitamin A-dependent transcriptional activation of the nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) is critical for the development and survival of B1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 11;108(2):722-7.
 - 6) Goto, Y., and Kiyono, H. 2011. Epithelial cell microRNAs in gut immunity. *Nat Immunol.* 12:195-197.
 - 7) Kunisawa, J., and Kiyono, H. 2011. Peaceful mutualism in the gut: revealing key commensal bacteria for the creation and maintenance of immunological homeostasis. *Cell Host Microbe.* 9: 83-84.
 - 8) Terahara, K., Nochi, T., Yoshida, M., Takahashi, Y., Goto, Y., Hatai, H., Kurokawa, S., Jang, H-M., Kweon, M-N, Domino, SE., Hiroi, T., Yuki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Kobayashi, K., and Kiyono, H. 2011. Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404: 822-828.
 - 9) Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagawa, O and Suzuki, K.2010. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol.* 28:243-73.
 - 10) Suzuki, K., Maruya, M., Kawamoto, S., Sitnik, K., Kitamura, H., Agace, WW and Fagarasan, S. 2010. The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity.* Jul 23;33(1):71-83.
 - 11) Nochi, T., Yuki, Y., Takahashi, H., Sawada, SI., Mejima, M., Kohda, T., Harada, N., Kong, IG., Sato, A., Kataoka, N., Tokuhara, D., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Tsukada, H., Kozaki, S., Akiyoshi, K., and Kiyono, H. 2010. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. *Nature Mater.* 9: 572-578.
 - 12) Tokuhara, D., Yuki, Y., Nochi, T., Kodama, T., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Nanno, M., Nakanishi, U., Takaiwa, F., Honda, T., and Kiyono, H. 2010. Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 8794-8799.
 - 13) Obata, T., Goto, Y., Kunisawa, J., Sato, S., Sakamoto, M., Setoyama, H., Matsuki, T., Nonaka, K., Shibata, N., Gohda, M., Kagiya, Y., Nochi, T., Yuki, Y., Fukuyama, Y., Mukai, A., Shinzaki, S., Fujihashi, K., Sasakawa, C., Iijima, H., Goto, M., Umesaki, Y., Benno, Y., and Kiyono, H. 2010. Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 7419-7424.
 - 14) Fagarasan, S. et al. 2010. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Adv Immunol.* 107:xiii-xiv.
 - 15) Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S and Fagarasan, S. 2009. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science.* 13:323(5920):1488-92.
 - 16) Suzuki, K., and Fagarasan, S. 2009. Diverse regulatory pathways for IgA synthesis in the gut. *Mucosal Immunol.* 2(6):468-71. Review.
 - 17) Tran, TH., Nakata, M., Suzuki, K., Begum, NA., Shinkura, R., Fagarasan, S. and Honjo, T and Nagaoka H.2010. B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress Aicda by overcoming the effects of silencers. *Immunity.* 11(2):148-54.
 - 18) Nochi, T., Yuki, Y., Katakai, Y., Shibata, H., Tokuhara, D., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Nakanishi, U., Ono, F., Mimuro, H., Sasakawa, S., Takaiwa, F., Terao, K., and Kiyono, H. 2009. A Rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing Abs but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J. Immunol.* 183: 6538-6544.
 - 19) Terahara, K., Yoshida, M., Taguchi, F., Igarashi, O., Nochi, T., Gotoh, Y., Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.,

- Beauchemin, N., and Kiyono, H. 2009. Expression of newly identified secretory CEACAM1(a) isoforms in the intestinal epithelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 383: 340-346.
- 20) Knoop, KA., Kumar, N., Butler, BR., Sakthivel, SK., Taylor, RT., Nochi, T., Akiba, H., Yagita, H., Kiyono, H., and Williams, IR. 2009. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J. Immunol.* 183: 5738-5747.
- 21) Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, GS., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Imura, M., Hamura, K., Fukuoka, S., Lowe, AW., Itoh, K., Kiyono, H., and Ohno, H. 2009. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462: 226-230.
- 22) Fujihashi, K. and Kiyono, H. 2009. Mucosal immunosenescence : New developments and vaccines to control infectious diseases. *Trends Immunol.* 30:334-343.
- 23) Nagatake, T., Fukuyama, S, Kim. D-Y., Goda, K., Igarashi.O., Sato,S., Nochi, T., Sagara, H.,Yokota, Y., Jetten, AM., Kaisho, T., Akira, A., Mimuro, H., Sasakawa, C., Fukui, Y., Fujihashi, K., Akiyama, T., Inoue, J., Penninger, J.M., Kunisawa, J., and Kiyono, H. 2009. Id2-, ROR γ t-, and LT β R-independent lymphoid organogenesis in ocular immunity. *J. Exp. Med.* 206: 2351-2364.
- 24) Hashizume, T., Togawa, A., Nochi, T., Igarashi, O., Kweon, MN., Kiyono, H. and Yamamoto, M. 2008. Peyer's patches are required for intestinal IgA responses to *Salmonella*. *Infect. Immun.* 76: 927-934.
- 25) Chang, SY., Cha, HR., Uematsu, S., Akira, S., Igarashi, O., Kiyono, H., and Kweon, M-N. 2008. Colonic patches direct the cross-talk between systemic compartments and large intestine independently of innate immunity. *J. Immunol.* 180:1609-18.
- 26) Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, MH., Yang, BG., Jung, YJ., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, KJ., and Akira, S. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature Immunol.* 9:769-776.
- 27) Terahara, K., Yoshida, M., Igarashi, O., Nochi, T., Pontes, GS., Hase, K., Ohno, H., Kurokawa, S., Mejima, M., Takayama, N., Yuki, Y., Lowe, AW. and Kiyono, H. 2008. Comprehensive gene expression analysis among Peyer's patch M cells, villous M cells and intestinal epithelial cells by DNA microarray analysis. *J. Immunol.* 180: 7840-7846.
- 28) Fehervari1, Z., and Kiyono, H. 2008. The mucosa: at the frontlines of immunity. *Trends Immunol.* 29:503-504.

[学会発表] (計 27件)

Kiyono, H.

- 1) The 6th Annual International Symposium in Institute of Dermatological Science(IDS), Invited Speaker, "Mucosal Decisions of Mutualism and Elimination for Surface barrier system", Seoul, Korea. February, 2012.
- 2) The 15th International Congress of Mucosal Immunology, Invited Speaker, "The Mucosal Gateway System for Antigen-sampling and Homeostatic Niche", Paris, France. July, 2011
- 3) The 8th German-Japanese International Symposium, Regulation of Immune Response and Diseases, Invited Speaker, "Intra-Tissue Habitation of Commensal Bacteria in Peyer's patches for Gut Immunity", Cuxhahen, Germany. September, 2010
- 4) The 83rd Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology, Invited Speaker, "Mucosal Decision of Immunity and Tolerance", Yokohama, Japan. March, 2010
- 5) Trudeau Institute Mucosal Immunology Workshop, Session 1 "Id2, ROR γ t, and LT β R independent initiation of TALT genesis in ocular immunity." and Session 2 "Indigenous Opportunistic Bacteria Inhabit Mammalian Gut-associated Lymphoid Tissues for Gut Immunity", New York,

研究者番号：

- USA. October,2009.
- 6) The 63th Japanese Society for Bacteriology Tohoku District Research Conference, Invited Speaker, “Development of Intestinal Symbiosis by the Mucosal Immune System”, Morioka , Japan. August, 2009.
 - 7) The 91st Japanese Association of Gastroenteology, Chugoku Division Meeting, “The Mucosal Immune System for the Creation of Gut Symbiosis”, Okayama, Japan. June, 2009.
 - 8) The 6th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, Invited Speaker, ”Mucosal Decision of Immunity and Tolerance for Creation of Symbiosis”, Seoul, Korea. May,2009.

Fagarasan, S.

- 1) The 2012 Spring Conference of the Korean Association of Immunologists. “PD-1 Defeciency Skews the Gut Microbiota by altering the IgA Selection in Gut. ” Seoul, Korea. April,2012.
- 2) Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, “T-dependent and T-independent IgA responses in the gut.”, Osaka,December,2009.
- 3) Microanatomy of the Immune Responses in Health and Disease. “T-dependent and T-independent IgA responses in the gut.”, University of Birmingham, UK. September,2009.

〔図書〕(計 1 件)

「臨床粘膜免疫学」清野宏
(株シナジー) 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

シドニア ファガラサン (Sidonia Fagarasan)
理化学研究所・免疫アレルギーセンター科学総合研究センター・チームリーダー
研究者番号：00391970

(3) 連携研究者

()