

令和元年9月11日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14988

研究課題名(和文) M細胞を標的とした粘膜ワクチン用新規アジュバントの開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of M-cell targeting new adjuvant for mucosal immunization

研究代表者

三隅 将吾 (Misumi, Shogo)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：40264311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管関連リンパ組織におけるM細胞により、効果的に抗原を取り込むことは、腸管粘膜免疫応答の誘導にとって重要なステップである。我々は、花粉荷(PI)がin vitro M細胞モデルにおいてヒトCaco-2細胞からM様細胞へ分化させることを明らかにしてきた。さらに、PIは効果的に蛍光ビーズのトランスサイトシスを向上させた。そこで、本研究ではPIのM細胞分化誘導能を評価した。pPCRの結果、PIはローヤルゼリーとは異なるやり方でM細胞分化誘導能を有することが示唆された。これらの結果は、PIがM細胞を介して抗原が効果的に取り込まれることを介して粘膜免疫を調節できることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PIがM細胞を介して抗原が効果的に取り込まれることを介して粘膜免疫を調節できることを示したというデータは、PIが腸管粘膜における免疫応答に影響しうることを意味している。これまでに、伝統・伝承的にミツバチ産品が生活の一部として利用されてきたという背景も含め、今後PI中のどのような成分が粘膜免疫の活性化に寄与できるかを明らかにすることは、新たな粘膜免疫を活性化できる因子の探索に寄与できると思われる。

研究成果の概要(英文)：The effective uptake of antigens (Ags) by specialized M cells of gut-associated lymphoid tissues is an important step in inducing an efficient intestinal mucosal immune response. Pollen load (PI) was found to stimulate the differentiation of M-like cells from human Caco-2 cells in an in vitro M-cell model. Furthermore, PI efficiently enhanced transcytosis of FluoSpheres carboxylate-modified microspheres from the apical side to the basolateral side in the model. Therefore, in this study, we evaluated the ability of PI to promote efficient M-like cell differentiation in an in vitro M cell model. qPCR analysis suggested that PI promotes efficient M-cell differentiation in the different way from Royal jelly. These findings suggest that PI exhibits mucosal immunomodulatory properties via stimulation of effective uptake of Ags through M cells.

研究分野：衛生薬学

キーワード：粘膜免疫 ミツバチ産品

1. 研究開始当初の背景

既存のアジュバントは、強い自然免疫賦活化物質であることが多いが、本申請で開発を目指す粘膜アジュバントは、粘膜免疫応答の”要”で、抗原の取り込み口である”M細胞”への分化誘導能を介し、M細胞の抗原取込み能を促進させることにより、粘膜ワクチンの免疫原性を高める効果を有するものを想定している。M細胞を標的としている点で既存のアジュバントとはタイプが全く異なる。一般的に、アジュバントの有益な作用を最大限引き出し、有害な副作用を最小限に抑えるための技術が求められるが、本技術課題で取り扱う粘膜アジュバントは、すでにヒトに経口的に摂取されているミツバチ産品由来のアジュバントを目指したいと考えている。その背景として、Royal jelly (RJ)がM細胞分化能を有し、M細胞の抗原取込み能そのものを増大させることを見いだしたことに端を発する(*Food Science & Nutrition*, 3, 222-227 (2013))。霊長類を用いた *in vivo* 試験で、RJとタンパク質抗原(fetuin)を経口カプセルに封入し摂取させたところ、fetuin 特異的なIgAの産生能が上昇するという知見を報告することができた(*Food Science & Nutrition*, 3, 222-227 (2013))。その知見をもとに、RJ中のM細胞分化誘導因子を探索する中で、M細胞分化誘導能およびM細胞の抗原取込み促進能を有する新規物質がRJのエーテル画分に含まれていることを特定することができた。本低分子化合物を霊長類の鼻腔内に噴霧すると、M細胞マーカーGP2陽性の細胞が鼻咽頭に誘導できることも最近見出すことができた。また、実際にタンパク質抗原と共に経口カプセルで霊長類に投与すると、抗原特異的なIgAの誘導が確認できている。そのような研究を進める中で、他のミツバチ産品中にもM細胞の機能を活性化するのが存在するのではないかと考え、スクリーニングを実施したところ、花粉荷がRJの約2.5倍程度M細胞の抗原取込み能を上昇させることを見出し、本知見は次世代バイオ医薬品の革新的機能化に関連する技術として有用ではないかと考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

申請者は、ヒトに経口的に摂取されているロイヤルゼリー(RJ)がM細胞分化能を有し、M細胞の抗原取込み能そのものを増大させることを見だし、霊長類を用いた *in vivo* 試験で、RJがアジュバント活性を有していることを明らかにした(*Food Science & Nutrition*, 3, 222-227 (2013))。本研究では、M細胞の抗原取込み能をRJよりもさらに亢進させることができるミツバチ産品中の花粉荷に注目し、花粉荷中のM細胞の抗原取込み能を亢進させる物質を同定し、粘膜ワクチン用アジュバントとしての応用を目指す。

具体的な目的：

- 1) 花粉荷中のM細胞活性化因子の同定

2) 花粉荷のM細胞活性化機構の解明

3. 研究の方法

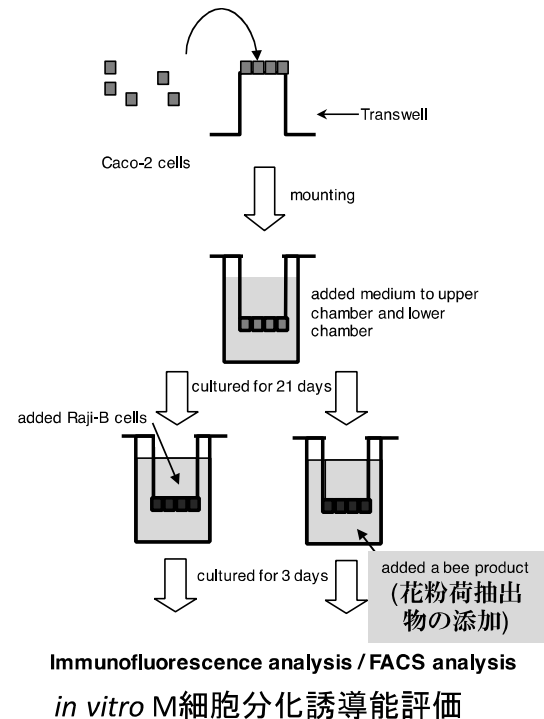
平成27年度：

研究計画1) 花粉荷中のM細胞活性化因子の同定：

*in vitro* M細胞分化モデルを用いたこれまでの実験により、花粉荷由来の抽出物は、蛍光ビーズの取込みを亢進していた。現時点でM細胞の抗原取込み能を亢進させる物質は、すくなくとも花粉荷のリン酸緩衝液抽出物中存在することが判っていることから、さらに分画し、M細胞の抗原取込み能を活性化する因子を同定する。

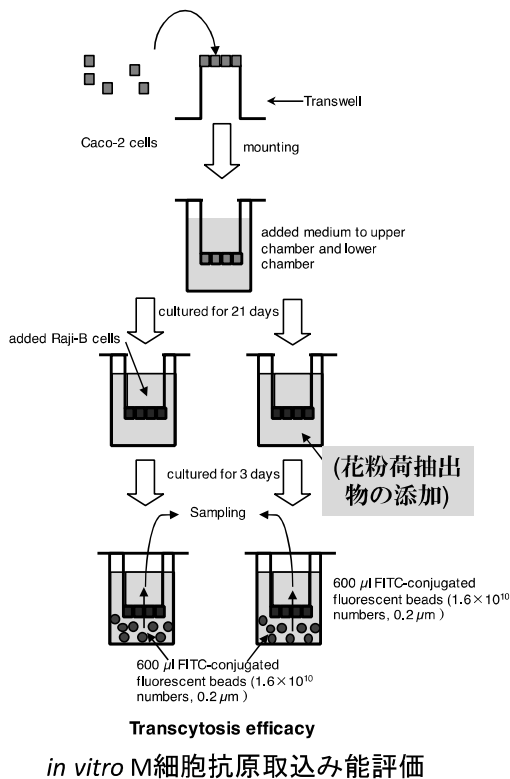
研究計画1方法：

a) *in vitro* M細胞分化誘導能評価のために、Caco-2細胞を用いた *in vitro* M細胞分化モデルを使用する(下図、*Food Science & Nutrition*, 3, 222-227 (2013))。なお、コントロール実験としてRaji-B細胞によってM細胞に分化できることが判っており、分化の確認は抗GP2抗体を用いた細胞染色によって確認できる。本モデルを用いて花粉荷抽出フラクションからM細胞誘導能が含まれるフラクションを探索し、LC-MSおよびNMRによってM細胞分化誘導因子を確定する。



b) 上記操作 a) でM細胞分化誘導能が確認できたフラクションに関して、M細胞抗原取込み能が亢進するかを確認するために、*in vitro* M細胞抗原取込み能評価を実施する(次頁図参照)。本試験もCaco-2細胞を用いた *in vitro* M細胞分化モデルを応用したもので、FITC-ラベルされた蛍光ビーズが重力に逆らって、チャンバー内に取り込まれる量を定量することにより評価する。なお、コントロー

ル実験として Raji-B 細胞によって M 細胞に分化させた M 細胞が、蛍光ビーズを取込めることはすでに確認している (*Food Science & Nutrition*, 3, 222-227 (2013))。



平成 28 年度 :

研究計画 2 ) 花粉荷の M 細胞活性化機構の解明

花粉荷中の M 細胞分化因子の M 細胞分化活性化メカニズム (分化誘導および M 細胞抗原取込み能亢進に関与するレセプターの同定) を明らかにすることにより M 細胞活性化機構を明確にする。

研究計画 2 方法 :

a) qPCR もしくはマイクロアレイ解析 (Affymetrix GeneChip) による M 細胞としてのフェノタイプ解析を実施する。Caco-2 単層膜に候補アジュバント物質を処理し、すくなくとも M 細胞マーカー GP2 遺伝子、CCL9 遺伝子、Anxa5 遺伝子、Marcks11 遺伝子の経時的な発現レベル変動をモニターする。これらの遺伝子の動態は、M 細胞分化の変遷を知る上での重要な情報となる。

b) 電子顕微鏡を用いた形態学的観察 研究計画 1 で見出されてきた、候補アジュバント物質を実験動物 (カニクイザル) に投与し、実際に M 細胞が抗原を取込んでいる様子 (トランスサイトーシス) を TEM 解析により特定する。これまでに霊長類 (カニクイザル) を用いた解析実績があるため、M 細胞誘導能を形態学的に判定する。

c) 上記の結果から推定される分化に必要なレセプターのレポーターアッセイを構築する。具体的に、どのように評価するかは、研究計画 1 ) の成果に依存する。

4 . 研究成果

熊本地震の影響で、インキュベーターや安全キャビネット等の研究装置そのものが破損したために、研究基盤の立て直しに時間を要した。

これまでに申請者は、RJ 中の M 細胞分化誘導因子を探索する中で、M 細胞分化誘導能および M 細胞の抗原取込み促進能を有する新規物質が RJ のエーテル画分に含まれていることを特定することができている (*Food Science & Nutrition*, 3, 222-227 (2013))。実際に、RJ より特定した低分子化合物 (95%以上精製品) を霊長類の鼻腔内に噴霧すると、M 細胞マーカー GP2 陽性の細胞が鼻咽頭に誘導できることも見出すことも明らかにすることができた (PCT/JP2016/061022 出願済)。

本研究では RJ よりも約 2.5 倍程度 M 細胞の抗原取込み能を上昇させることを見出していた花粉荷中の M 細胞活性化因子の同定、花粉荷の M 細胞活性化機構の解明を試みた。本研究で対象として用いた花粉荷には、タンパク質やアミノ酸、食物繊維、ビタミン、ミネラルなども含まれていることが知られている。まず、本研究ではハンニチバナ科ゴジアオイ属シスタス由来の花粉荷を花粉の色の違いで選別した。その後、各色の異なる花粉を (黄色、黒) EMEM を用いて、1, 5, 10% となるようにストック溶液を調製した。最終的に 0.8 および 0.45 μm のフィルターで、濾過滅菌を行って、Caco-2 細胞を用いた *in vitro* M 細胞分化モデル (*Food Science & Nutrition*, 3, 222-227 (2013) 参照) にて M 細胞の分化誘導能およびトランスサイトーシス能を亢進させることができるのかを確認した。その結果、*in vitro* M 細胞分化モデルでは、本来 Raji-B 細胞を Caco-2 単層膜とメンブランを介して共培養することで、Caco-2 細胞を M 細胞に分化させるが、RJ と花粉荷に関しては、Raji-B 細胞を用いなくても、Caco-2 細胞を M 細胞様に分化できる可能性が我々の事前研究で示されていたため、初期の実験では、Raji-B 細胞を用いずに実験を行っていた。しかしながら、後の実験で、実際に投与する可能性のあるヒトの腸管を考慮すると Caco-2 細胞に apical 側から花粉荷を処理し、また basolateral 側からメンブランを介して Raji-B 細胞も共培養する方が M 細胞様の機能を持つように誘導する効率が高いのではないかと結果が得られた。

そもそもひとつの花粉荷には、8000 から 3 万ほどの花粉の粒がふくまれていると考えられ、花粉の細胞壁は非常に硬く、土壤中にあっても何十万年と分解されないものもあるという知見から、花粉そのものの機械的な刺激等によっても、M 細胞の抗原取り込み能が克

進する可能性があるのではないかと考えている。さらに、花粉に随伴する微生物の影響についても考慮する必要があるように考えている。花の花粉は、ミツバチの脚の花粉かごで運ばれるが、巣房に貯蔵される花粉には、花粉かごの周辺にいる微生物と同じ微生物が存在することが明らかにされつつある。本来植物の花蜜は、高浸透圧のためか細菌はあまり見られないが、花粉や貯蔵花粉には *Enterococcus silesiacus*、*Lactobacillus kunkeei*、*Lactobacillus rossiae*、*Pichia guilliermondii*、酵母等がみつかっている。これらの微生物はミツバチのコロニーからも見つかっており、とくに成蜂の腸管内からも分離されていることから、これらの微生物が花粉に付着して M 細胞分化能を発揮し得ている可能性がある。これらの微生物は、病原体ではなく、むしろヒトと同じように正常な腸内細菌叢の構成要素と考えられていることから、この腸内細菌叢が、M 細胞分化に寄与している可能性がある。この分野の研究は、ヒトの健康や予防に関係した興味深い領域になってきているといえる。なお、花粉の色の違いにより、M 細胞様の機能を Caco-2 細胞に誘導することによって、現在までに差は見られなかった。したがって、花粉荷による M 細胞の抗原取込み能を上昇させる機構は、RJ 由来の低分子化合物と異なる機構によって作用していると考えられた。

本研究では、具体的に花粉荷中の M 細胞分化因子を単一の分子としては、分離することができなかった。今後は、それらを特定するために次世代シーケンサー等も用いて花粉荷に含まれる微生物のバランス等に関しても明らかにしていきたいと考えている。

## 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/emhs/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

三隅 将吾 (MISUMI, Shogo)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：40264311

(2)研究分担者

該当無し( )

研究者番号：

(3)連携研究者

高宗 暢暁 (TAKAMUNE, Nobutoki)

熊本大学・イノベーション推進機構・准教授

研究者番号：60322749

(4)研究協力者

井口 有紀 (IGUCHI, Yuki)

東山 未沙 (HIGASHIMYA, Misa)

江藤 比華留 (ETO, Hikaru)

諫山 達弥 (ISAYAMA, Tatsuya)