

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293111

研究課題名(和文) パイエル板組織内共生ネットワークを介した生体防御システムの構築

研究課題名(英文) Construction of immunosurveillance system by symbiotic network in the Peyer's patches

研究代表者

國澤 純 (KUNISAWA, Jun)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ワクチン・アジュバント研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：80376615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸管には腸管免疫システムと呼ばれる精密な免疫システムが備えられており、中でもパイエル板は腸管免疫の制御における中核的な役割を担っている。最近ではその制御に腸内細菌が変わっていることが示されている。本研究においては、研究代表者が独自に見いだしたパイエル板組織内共生細菌である *Alcaligenes* と、腸内細菌とパイエル板依存的に誘導される腸管IgA高産生細胞に関する知見を統合し、*Alcaligenes* を介した腸管での免疫制御について、生体と菌体の両面から解明することを目的に研究を遂行した。その結果、*Alcaligenes* の生菌が持つ機能と菌体成分であるLPSを介した免疫制御について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The intestinal immune system is involved in the maintenance of immunological homeostasis in the gut. It is known that Peyer's patches play a central role in regulating intestinal immunity, which is at least partly regulated by intestinal bacteria. In this study, we aim to clarify the function of *Alcaligenes*, a symbiotic bacteria found in Peyer's patches, in the regulation of intestinal immunity and found that *Alcaligenes* itself and *Alcaligenes* LPS possess unique features to moderately regulate intestinal immunity without induction of excessive inflammation.

研究分野：環境免疫学

キーワード：共生細菌 炎症 IgA抗体 LPS

1. 研究開始当初の背景

腸管には腸管免疫システムと呼ばれる精密かつダイナミックな免疫システムが備えられており、体表面での生体防御と恒常性維持を担っている。その中でも腸管リンパ組織であるパイエル板を起点に誘導される IgA 抗体は、管腔中で病原体に結合、もしくは毒素を中和することで生体防御の中核的な役割を担っており、近年実用化されつつある経口ワクチンの主要実効分子となっている。また古くから、腸内細菌からの刺激が腸管 IgA 抗体の産生に必要であることが知られている。

研究代表者は、腸管 IgA 産生細胞の解析から、これまで均一の細胞集団と考えられていた IgA 産生細胞に、CD11b をマーカーとしたサブセットが存在するを見いだした。CD11b 陽性 IgA 細胞は形質細胞としての形態的特徴や細胞マーカーを示すが、CD11b 陰性 IgA 細胞に比べ、増殖能力と IgA の産生能力が非常に高く、またその誘導・維持に腸内細菌やパイエル板を必要とすることを明らかにした。これに連動した研究から、IgA 誘導組織であるパイエル板の組織内における共生細菌に着目し、メタゲノム解析を行った結果、パイエル板の組織内部に共生する菌として *Alcaligenes* を同定し、「リンパ組織内共生」という新概念を提唱した。

これらを統合的に考えると、*Alcaligenes* を介したパイエル板組織内での免疫制御により、腸管 IgA 高産生サブセットの誘導を始めとする生体防御システムが構築されていると予想されるが、その実体は不明である。

2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者が独自に見いだしたパイエル板組織内共生細菌である *Alcaligenes* と、腸内細菌とパイエル板依存的に誘導される腸管 IgA 高産生細胞に関する知見を統合し、IgA 産生を中核とする生体防御機構における *Alcaligenes* を介した免疫制御について、生体と菌体の両面から解明することを目的に研究を遂行する。

3. 研究の方法

マウス

BALB/c マウスは日本クレアから購入した。CD11c プロモータ下でジフテリア毒素受容体を発現するトランスジェニックマウスは Jackson Laboratory から購入し、500ng のジフテリア毒素 (Sigma-Aldric) を投与することで樹状細胞を除去した。TLR4 欠損マウスはオリエンタルバイオサービス (株) より購入した。マウスは SPF 条件下で飼育し、機関の承認を得た後、ガイドラインに従って実験を行った。

細菌培養

Alcaligenes ならびに大腸菌は NBRC から購入した。死菌体の作製は、細菌を 65 で 30 分間インキュベートすることで行った。

LPS の調製

凍結乾燥した *Alcaligenes* と大腸菌を用い、LPS 抽出キット (invitrogen) により調整した。

腸管ループ assay

イソフルランを用いて麻酔したマウスにおいて単一のパイエル板を含む腸ループを結紮し、 5×10^8 CFU の GFP 発現 *Alcaligenes* を投与した。2 時間後、パイエル板を摘出した後、PBS で洗浄、4%パラホルムアルデヒドにより固定した。本組織を用いた切片を作製後、ビオチン化抗 CD11c 抗体 (BD) により染色し、TSA キットで蛍光を増感後、GFP 標識 *Alcaligenes* と樹状細胞の分布を共焦点レーザー走査顕微鏡 (TCS SP2; Luica) により観察した。

骨髄由来樹状細胞の調整と処理

大腿骨から骨髄を回収し、RPMI1640 培地を用いて細胞をフラッシュアウトした後、赤血球溶解緩衝液で処理した。得られた細胞を GM-CSF を含む RPMI1640 培地に再懸濁し、樹状細胞へと分化させた。得られた樹状細胞は各濃度の菌や死菌体、LPS と反応させ、48 時間後の培養上清中の各種サイトカイン量を CBA kit (BD) で測定した。

4. 研究成果

本事業ではまず始めにパイエル板内における *Alcaligenes* の局在を検討した。蛍光標識した *Alcaligenes* を投与し、パイエル板組織内での局在を観察したところ、*Alcaligenes* はパイエル板の樹状細胞に取り込まれていることが明らかになった。この結果と相関し、樹状細胞を除去したマウスのパイエル板では、共生する *Alcaligenes* が減少していた。そこで次に樹状細胞に焦点を当てた研究を行った。*Alcaligenes* と同じグラム陰性菌である大腸菌をコントロールとして用いた解析から、*Alcaligenes* は樹状細胞に取り込まれた後、樹状細胞の内部で長期生存できることを確認した。また *Alcaligenes* と共培養した樹状細胞からは、IL-10 が産生されること、またその産生は *Alcaligenes* の生存依存的であることが明らかとなった。

次に抗体産生への影響という観点から、抗体産生を増強するサイトカインである IL-6 に着目し、*Alcaligenes* の死菌体を樹状細胞に作用させた際の IL-6 産生を評価した。*Alcaligenes* 死菌体の濃度依存的に樹状細胞からの IL-6 の産生が認められたが、これらの量は大腸菌に比べると低い値であった。本結果を踏まえ、*Alcaligenes* の菌体成分としてリポ多糖 (LPS) に着目した。*Alcaligenes* から精製した LPS を樹状細胞に作用させたところ、死菌体の時と同様、濃度依存的に樹状細胞からの IL-6 の産生が認められたが、大腸菌由来 LPS に比べると、その産生量は有意に低かった。また *Alcaligenes*、大腸菌共に LPS による IL-6 の産生は TLR4 を欠損した樹状細胞においては認められなかったことから、*Alcaligenes* 由来 LPS は TLR4 の弱いアゴニス

トとして機能していると考えられた。このように、Alcaligenes 由来 LPS は TLR4 を介して免疫を活性化するものの、その強度は大腸菌に比べ微弱なものであることが明らかとなり、このことが Alcaligenes がパイエル板組織内部において過剰な免疫応答を惹起することなく宿主免疫系を適度に活性化し IgA 抗体産生を促進しつつ、共生できるメカニズムの一因となっていると考えられた。

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 24 件)

1. Shibata N., Kunisawa J., Hosomi K., Fujimoto Y., Mizote K., Kitayama N., Shimoyama A., Mimuro H., Sato S., Kishishita N., Ishii K. J., Fukase K., and Kiyono H., Lymphoid tissue-resident Alcaligenes LPS induces IgA production without excessive inflammatory responses via weak TLR4 agonist activity. *Mucosal Immunol* 査読有 (2018, in press)
2. Nagatake T., Shioyama Y., Inoue A., Kikuta J., Honda T., Tiwari P., Kishi T., Yanagisawa A., Isobe Y., Matsumoto N., Shimojima M., Morimoto S., Suzuki H., Hirata S., Steneberg P., Edlund H., Aoki J., Arita M., Kiyono H., Yasutomi Y., Ishii M., Kabashima K., and Kunisawa J., 17,18-EpETE-GPR40 axis ameliorates contact hypersensitivity by inhibiting neutrophil mobility in mice and cynomolgus macaques. *J Allergy Clin Immunol* S0091-6749(17): 32949-4, 2017 査読有 (doi: 10.1016/j.jaci.2017.09.053.)
3. Suzuki H., Nagatake T., Nasu A., Lan H., Ikegami K., Setou M., Hamazaki Y., Kiyono H., Yagi K., Kondoh M., and Kunisawa J., Impaired airway mucociliary function reduces antigen-specific IgA immune response to immunization with a claudin-4-targeting nasal vaccine in mice. *Sci Rep* 8(1):2904, 2018 査読有 (doi: 10.1038/s41598-018-21120-7.)
4. Nakamizo S., Honda T., Adachi A., Nagatake T., Kunisawa J., Kitoh A., Otsuka A., Dainichi T., Nomura T., Ginhoux F., Ikuta K., Egawa G., and Kabashima K., High fat diet exacerbates murine psoriatic dermatitis by increasing the number of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Sci Rep* 7(1):14076, 2017 査読有 (doi: 10.1038/s41598-017-14292-1.)
5. Takigawa M., Iida M., Nagase S., Suzuki H., Watari A., Tada M., Okada Y., Doi T., Fukasawa M., Yagi K., Kunisawa J., and Kondoh M., Creation of a claudin-2 binder and its tight-junction-modulating activity in a human intestinal model. *J Pharmacol Exp Ther* 363 (3): 444-451, 2017 査読有 (doi: 10.1124/jpet.117.242214)
6. Hosomi K., Ohno H., Murakami H., Natsume-Kitatani Y., Tanisawa K., Hirata S., Suzuki H., Nagatake T., Nishino T., Mizuguchi K., Miyachi M., and Kunisawa J., Method for preparing DNA from feces in guanidine thiocyanate solution affects 16S rRNA-based profiling of human microbiota diversity. *Sci Rep* 7(1):4339, 2017 査読有 (doi: 10.1038/s41598-017-04511-0)
7. Shibata N., Kunisawa J., and Kiyono H., Dietary and microbial metabolites in the regulation of host immunity. *Front Microbiol* 8: 2171, 2017 査読有 (doi: 10.3389/fmicb.2017.02171)
8. Hirata S., and Kunisawa J., Gut microbiome, metabolome, and allergic diseases. *Allergol Int* S1323-8930(17) 30086-2, 2017 査読有 (doi: 10.1016/j.alit.2017.06.008)
9. Hosomi K., and Kunisawa J., The specific roles of vitamins in the regulation of immunosurveillance, allergy, and inflammation in the gut. *Immune Netw* 17: 13-19, 2017 査読有 (doi: 10.4110/in.2017.17.1.13)
10. Kunisawa J., Metabolic changes during B cell differentiation for the production of intestinal IgA antibody. *Cell Mol Life Sci* 74: 1503-1509, 2017 査読有 (doi: 10.1007/s00018-016-2414-8)
11. Kanaya T., Hase K., Sakakibara S., Kato T., Tachibana N., Sasaki T., Hashimoto Y., Sato T., Watarai H., Kunisawa J., Shibata N., Williams I., Kiyono H., and Ohno H., IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. *J Exp Med* 214(6):1607-1618, 2017 査読有 (doi: 10.1084/jem.20160770)
12. 粕淵真由、木村郁夫、國澤純 腸内環境と腸管免疫・生体防御に関する新しいトピックス **消化と吸収** 39(2): 66-70, 2017 査読無
13. Fung C. F., Bessman N. J., Hepworth M. R., Kumar N., Shibata N., Kobuley D., Wang K., Ziegler C. G., Goc J., Shima T., Umesaki Y., Sartor R. B., Sullivan K. V., Lawley T. D., Kunisawa J., Kiyono H., Sonnenberg G. F., Lymphoid tissue-resident commensal bacteria promote members of the IL-10 cytokine family to establish mutualism. *Immunity*

- 15;44(3):634-46, 2016 査読有 (doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.019)
14. 國澤純、平田宗一郎、清野宏、経粘膜ワクチンデリバリー製剤の開発の現状と今後の展望、*薬剤学* 76: 11-17, 2016 査読無
 15. Goto Y., Lamichhane A., Kamioka M., Sato S., Honda K., Kunisawa J., Kiyono H., IL-10-producing CD4⁺ T cells negatively regulate fucosylation of epithelial cells in the gut. *Sci Rep* 5:15918, 2015 査読有 (doi: 10.1038/srep15918)
 16. Kunisawa J., Sugiura Y., Wake T., Nagatake T., Suzuki H., Nagasawa R., Shikata S., Honda K., Hashimoto E., Suzuki Y., Setou M., Suematsu M., Kiyono H., Mode of bioenergetic metabolism during B cell differentiation in the intestine determines the distinct requirement for vitamin B₁. *Cell Rep* 13, 122-131, 2015 査読有 (doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.063)
 17. Suzuki H., Watari A., Hashimoto E., Yonemitsu M., Kiyono H., Yagi K., Kondoh M., and Kunisawa J., C-terminal Clostridium perfringens enterotoxin-mediated antigen delivery for nasal pneumococcal vaccine. *PLoS One* 10(5):e 0126352, 2015 査読有 (doi: 10.1371/journal.pone.0126352)
 18. Suzuki H., and Kunisawa J., Vitamin-mediated immune regulation in the development of inflammatory diseases. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 15: 212-215, 2015 査読有
 19. Kurashima Y., Kiyono H., and Kunisawa J., Pathophysiological role of extracellular purinergic mediators in the control of intestinal inflammation. *Mediators of Inflammation* 2015: 427125, 2015 査読有 (doi: 10.1155/2015/427125)
 20. Kunisawa J., and Kiyono H., Vitamins mediate immunological homeostasis and diseases at the surface of the body. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 15: 25-30, 2015 査読有
 21. Kunisawa J., Vitamin B9 and ATP in the control and development of intestinal inflammation. *Inflammation and Regeneration* 35: 14-18, 2015 査読有
 22. Goto Y., Obata T., Kunisawa J., Sato S., Ivanov I. I., Lamichhane A., Takeyama N., Kamioka M., Sakamoto M., Matsuki T., Setoyama H., Imaoka A., Uematsu S., Akira S., Domino S. E., Kulig P., Becher B., Renaud J., Sasakawa C., Umesaki Y., Benno Y., and Kiyono H., Innate lymphoid cells govern intestinal epithelial fucosylation. *Science* 345(6202):1254009, 2014 査読有 (doi: 10.1126/science.1254009)
 23. Kunisawa J., Hashimoto E., Inoue A., Nagasawa R., Suzuki Y., Ishikawa I., Shikata S., Arita M., Aoki J., and Kiyono H., Regulation of intestinal IgA responses by dietary palmitic acid and its metabolism. *J Immunol* 193: 1666-1671, 2014 査読有 (doi: 10.4049/jimmunol.1302944)
 24. Kurashima Y., Amiya T., Fujisawa K., Shibata N., Suzuki Y., Kogure Y., Hashimoto E., Otsuka A., Kabashima K., Sato S., Sato T., Kubo M., Akira S., Miyake K., Kunisawa J., and Kiyono H., The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis. *Immunity* 40: 530-41, 2014 査読有 (doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.014)
- 〔学会発表〕(計 96 件中 30 件を記す)
1. 國澤純、微生物の排除と共生を司る腸管免疫システムの理解と応用 **日本薬学会第 138 年会** (2018 年 3 月 28 日)
 2. 國澤純、食と腸内細菌から考える栄養科学の新展開 **第 90 回日本栄養評議会** (2018 年 3 月 14 日)
 3. Jun Kunisawa, Involvement of Diets and Commensal Bacteria in the Regulation of Lipid-mediated Immune Regulation for the Control of Health and Diseases. **4th Microbiome R&D & Business Collaboration Congress** (March 6, 2018)
 4. 國澤純、食と腸内フローラから考える健康科学の最前線 **第 26 回アジア栄養科学ワークショップ** (2018 年 1 月 20 日)
 5. 國澤純、食と腸内フローラが織りなす腸内環境の形成と健康科学への新展開 **平成 29 年度 日本臨床栄養研究会** (2017 年 11 月 26 日)
 6. 國澤純、腸内環境を起点とする創薬・食品研究の現状と将来展望 **第 7 回食品薬学シンポジウム** (2017 年 10 月 28 日)
 7. 國澤純、食と腸内フローラを介した健康維持と疾患 **BioJapan2017** (2017 年 10 月 13 日)
 8. 國澤純、腸内環境に関するビッグデータの集積と機能性食品開発 **食品開発展 2017 記念セミナー** (2017 年 10 月 4

- 日)
9. Jun Kunisawa, Crosstalk between diets and commensal bacteria for the creation of immunologic environment in the gut. **Cold Spring Harbor Asia** (September 6, 2017)
 10. 國澤純、腸内環境に関連するビッグデータの集積と健康科学、創薬、機能性食品開発への展望 **第383回CBI学会研究講演会** (2017年5月12日)
 11. 國澤純、腸内環境を起点に進める創薬研究 **日本薬学会 第137年会** (2017年3月26日)
 12. 國澤純、腸内細菌と食を介した腸内環境の形成と健康・疾患 **第90回日本細菌学会総会** (2017年3月20日)
 13. 國澤純、腸内環境から考えるヘルスサイエンスの最前線 **日本農芸化学会2017年度大会** (2017年3月19日)
 14. 國澤純、健康増進における腸内環境の重要性と Precision medicine & nutrition としての可能性 **彩都産学官連携フォーラム2017** (2017年1月25日)
 15. 國澤純、腸内環境を介した免疫制御と健康科学への新展開 **第20回日本病態栄養学会 年次学術集会** (2017年1月15日)
 16. Jun Kunisawa, Critical Roles of Gut Environmental Factors in the Regulation of Immunosurveillance and Allergic Diseases. **The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology** (December 6, 2016)
 17. 國澤純、腸内環境を介した免疫制御の基礎的解明と応用・実用化研究に向けた展開 **第12回日本食品免疫学会** (2016年11月10日)
 18. 國澤純、健康指標としての腸内細菌 **JASIS2016 ライフサイエンス イノベーションフォーラム** (2016年9月8日)
 19. 國澤純、栄養を介した免疫制御と創薬・機能性食品開発への展開 **日本薬学会第136年会** (2016年3月28日)
 20. 國澤純、栄養 腸内フローラネットワークを介した免疫制御と疾患 **BMFH シンポジウム2016** (2015年2月13日)
 21. 國澤純、粘膜免疫のユニーク性を標的としたワクチンの開発の最前線 **日本薬学会第135年会** (2015年3月28日)
 22. Jun Kunisawa, Lipid-mediated immune network in the development of intestinal allergy **第88回日本薬理学会年会** (2015年3月20日)
 23. 國澤純、腸管免疫ネットワークの学術的解明と創薬・ワクチン開発への展開 **第7回 鈴鹿病態薬学研究会** (2015年2月25日)
 24. 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制御の基礎的解明と免疫創薬への応用 **千里ライフサイエンスセミナー - アカデミア創薬の進展 -** (2015年2月13日)
 25. 國澤純、腸内環境を介した免疫制御とワクチン開発・免疫創薬への展開 **第19回 関西大学先端科学技術シンポジウム** (2015年1月23日)
 26. 國澤純、脂質 免疫ネットワークを起点にした免疫疾患の解明と創薬研究への展開 **第87回日本生化学会** (2014年10月16日)
 27. 國澤純、東洋医学を起点とした粘膜免疫制御メカニズムの解明と創薬への展開 **日本生薬学会第61回年会** (2014年9月13日)
 28. 國澤純、粘膜免疫のユニーク性に基づく粘膜ワクチンの開発・免疫創薬への新展開 **第30回日本DDS学会** (2014年7月31日)
 29. Jun Kunisawa Commensal Bacteria and Diet in the Control of Intestinal Immunosurveillance and Diseases. **18th Annual Meeting of Intestinal Microbiology** (June 12, 2014)
 30. 國澤純、腸内環境ネットワークを介した免疫制御とヘルスサイエンス **第14回日本抗加齢医学会総会** (2014年6月6日)
- 〔図書〕(計7件)
1. Suzuki H., and Kunisawa J., Influence of dietary components and commensal bacteria on the control of mucosal immunity, *Mucosal Vaccines: Innovation for Preventing Infectious Diseases* 2nd edition (Edited by Hirisho Kiyono & Dr David Pascual), Elsevier (in press)
 2. T Nagatake T., Kunisawa J., and Kiyono H., Lymphoid tissues associated with gastrointestinal (GI) mucosa, *Lymph Node Metastasis in Gastrointestinal Cancer* (Edited by Shoji Natsukoshi), Springer (in press)
 3. 平田宗一郎、國澤純 経粘膜ワクチンデリバリー剤の開発と今後の展望、**ドラッグデリバリーシステム - バイオ医薬品創成に向けた組織、細胞内、核内送達技術の開発** (監修、杉林堅次)、シーエムシー出版 (印刷中)
 4. 細見晃司、國澤純 アジュバントのター

ゲットとしての粘膜免疫システム、**次世代アジュバント開発のためのメカニズム解明と安全性評価**(監修、石井健) シーエムシー出版、26-33, 2017

5. J. Kunisawa, Immunity and Nutrition, Encyclopedia of Immunology vol. 5, pp. 120-126, (Edited by Michael J.H. Ratcliffe), Academic Press, Oxford, UK, 2016
6. 細見晃司、國澤純 腸内細菌と粘膜免疫、**ヒトマイクロバイオーム研究最前線** (監修、服部正平) NTS、119-128, 2016
7. 細見晃司、國澤純 マイクロバイオームとワクチン開発、**ヒトマイクロバイオーム研究最前線** (監修、服部正平) p299-306, 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：リピドA

発明者：國澤純、深瀬浩一、清野宏

権利者：一般財団法人阪大微生物病研究会、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

種類：特許権

番号：特願 2017-30179

出願年月日：2017 年 2 月 21 日

国内外の別： 国内

名称：リピドA

発明者：國澤純、深瀬浩一、清野宏

権利者：一般財団法人阪大微生物病研究会、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

種類：特許権

番号：PCT/JP2018/2120

出願年月日：2018 年 1 月 24 日

国内外の別： 国外

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.nibio.go.jp/vaccine_material_project/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國澤 純 (KUNISAWA, Jun)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所ワクチン・アジュバント研究センター・プロジェクトリーダー
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：

(4) 研究協力者 なし
()