

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： M細胞の免疫生物学的解明とそれを標的とする粘膜ワクチンの開発

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

清野 宏 (東京大学医科学研究所 教授)

3. 研究内容及び成果

本研究では、パイエル板やNALT由来のM細胞に加えて、従来まで粘膜免疫システム実効組織として考えられてきた粘膜上皮細胞層での抗原取り込み門戸を精査し、また抗原取り込み関連分子を探索することで病原微生物の新規受容体の同定や、粘膜感染症の新規創薬ターゲット分子としての可能性を提示する研究を推進した。特に、ワクチン抗原をM細胞へ選択的かつ効果的に送達する技術を開発し、「M細胞標的型粘膜ワクチン」開発への基盤を確立した。さらにM細胞免疫生物学を基盤とした新しい領域を開拓すると同時に、ワクチン開発に向けた粘膜免疫の基礎的理論形成においても先導的役割を果たした。

(1) 絨毛上皮における新たなM細胞の発見とその分子・細胞生物学的特徴

腸管結紮モデルを用いた細菌類の取り込み解析法、電子顕微鏡観察、共焦点顕微鏡を用いたレクチン染色組織解析を併用することにより、絨毛上皮層にもM細胞の生物学的特徴を全て有する細胞が存在することを明らかにし、「絨毛M細胞」と名付けた。興味深いことに、この絨毛M細胞は粘膜アジュバントとして頻用されるコレラトキシン(CT)などの炎症性物質刺激により誘導されうることを発見した。これらの炎症性刺激によって誘導された絨毛M細胞は、抗原取り込み能(特に可溶性抗原)を有し、ポケット構造を有するUEA-1陽性細胞として定義されるが、実際には微絨毛の長さや状態は上皮細胞と変わらず、上皮細胞特異的レクチン(Wheat germ agglutinin, WGA)にも陽性反応を示すことから、M細胞と腸管上皮細胞との中間的な細胞(M-like細胞)と推測された。これらの絨毛M細胞およびM-like細胞は、本研究グループが作出に成功したパイエル板M細胞特異的モノクローナル抗体(NKM16-2-4)にも反応すること、およびDNAマイクロアレイを用いた包括的解析において、パイエル板M細胞に特異的な遺伝子群を有意に発現していたことから、これらの細胞はM細胞の亜集団であることが示唆された。M細胞に特異的であるUlex europaeus agglutinin 1 (UEA-1)の細胞側リガンドは(1,2)フコースであり、このフコースの付加はフコース転移酵素の一員であるFucose transferase 1 (FUT1)と Fucose transferase 2 (FUT2)により制御されている。本研究グループは、FUT1あるいはFUT2プロモーターの下流にガラクトシダーゼ遺伝子をノックインしたマウスを用いた解析から、絨毛M細胞およびパイエル板・絨毛M-like細胞における(1,2)フコシル化はFUT2により制御されているのに対して、典型的なFAE-M細胞における(1,2)フコシル化はFUT1により制御されていることを明らかにした。さらには、この過程でFUT1拘束性のM細胞の分化は炎症性物質投与や細菌定着などの外的要因に影響を受けない、つまり、プログラムされている可能性が示された。以上の結果は、小腸上皮層には少なくとも3種類(FAE-M細胞、絨毛M細胞、M-like細胞)の抗原取り込み細胞が存在し、これらの細胞集団は分子・細胞生物学的に異なった特徴を有することを示している。

(2) M細胞関連遺伝子の同定

本研究ではDNAマイクロアレイ法によってFAE-M細胞とCT誘導型M-like細胞の遺伝子発現プロファイリングを行い、M細胞関連特異的遺伝子の同定を試みた。包括的遺伝子発現パターンを比較した結果、FAE-M細胞と吸収上皮細胞間の相関係数は0.285であるのに対し、FAE-M細胞とM-like細胞間およびM-like細胞と吸収上皮細胞間の相関係数はそれぞれ0.402、0.410を示した。つまり、M-like細胞は、FAE-M細胞と吸収上皮細胞両

者の遺伝子発現パターンを共有していることが示された。さらにケモカイン遺伝子の発現を調べた結果、FAE-M細胞において有意な発現が認められたCCL6、CCL9、chemokine-like factorは、M-like細胞においても吸収上皮細胞と比較して有意な発現の上昇が認められた。つまり、一部のケモカイン遺伝子の発現に関してもFAE-M細胞との共通性が示された。次に、DNAマイクロアレイによるスクリーニングの結果、FAE-M細胞において1272遺伝子、M-like細胞において4遺伝子の特異的発現遺伝子が候補に挙げられた。PGRP-S、Sgpn-1、annexin Vはパイエル板のM細胞に特異的に発現する遺伝子として既に報告されているが、これらは全てFAE-M細胞特異的遺伝子群に含まれていた。この結果は、本研究により構築された遺伝子発現プロファイルの信頼性を裏付けている。この遺伝子発現プロファイルの活用により、当研究グループは新たにMARCKS-like protein (MLP)、Glycoprotein 2 (GP2)がFAE-M細胞特異的発現遺伝子であることをin situハイブリダイゼーション法により同定した。この遺伝子発現プロファイルは、M細胞標的型抗原送達系における標的分子のスクリーニングや、M細胞の免疫生物学的機能における分子機序の理解にも有用であると考えられる。

(3) M細胞特異的モノクローナル抗体の樹立とそれを用いたM細胞標的粘膜ワクチン

本研究では、研究課題である「M細胞の免疫生物学的解明とそれを標的とする粘膜ワクチン開発」の名の通り、M細胞を標的とした技術開発を進めることで、効果的な免疫応答を誘導する粘膜ワクチン開発を目的とし、デリバリー分子として応用可能なM細胞特異的モノクローナル抗体の樹立に世界に先駆けて成功した。実際、本モノクローナル抗体に結合させた各種ワクチン抗原を経口免疫することで、効果的な抗原特異的免疫応答が全身系のみならず粘膜系に誘導できることを確認し、毒素ワクチンを用いた場合はその毒素中和効果を実証することにも成功した。粘膜ワクチン(特に経口ワクチン)開発におけるもう一つの重要な課題として、ワクチン抗原の消化管内での安定性の向上が挙げられる。日本人の主食である米の種子には、Protein body (PB)と呼ばれる2種類のタンパク貯蔵器官(PB-I, PB-II)が存在する。中でも、PB-Iは難消化性であることが知られており、当研究グループはこのPB-Iにワクチン抗原を蓄積させ各種消化酵素に対する耐性の向上を試みた研究も同時に展開することで、粘膜ワクチンの具現化を目指した。実際、米種子内に発現させたワクチン抗原は、同一水溶性抗原と比較して、消化酵素ペプシンに対する耐性を示し、効果的に抗原特異的免疫応答を全身系のみならず粘膜系に誘導した。さらには、本米型ワクチンは1.5年以上室温保存してもその免疫原性に変化は無く、通常ワクチンの冷蔵保存に掛かるコストの大幅削減が可能な安価ワクチンになる可能性が示された。

(4) NALT組織形成統制因子とNALT非依存性抗原取り込み上皮細胞

上気道免疫機構を解明するためにはNALTの形成メカニズムのさらなる解明が不可欠であると考え、NALTの発生と構築の分子・細胞レベルでの解析を行なった。近年、リンフォイドケモカイン(CXCL13, CCL19, CCL21)は二次リンパ組織の初期形成や構造維持に必須であることが明らかとなっている。そこで本研究グループはNALT組織形成におけるリンフォイドケモカインの役割について検討した結果、これらのケモカインはNALT初期形成に関与しないことが明らかとなった。一方で、胚中心形成やT/B細胞領域などNALT組織構築の成熟化にはリンフォイドケモカインが必須であることが明らかとなった。従って、ケモカイン依存性においてユニークなNALT形成誘導メカニズムが存在することが示唆された。次にNALT初期形成に必要な遺伝子を同定するためにNALT形成誘導細胞(NALT inducer: NALTi)とパイエル板形成細胞(Peyer's patch inducer: PPI)の遺伝子発現パターンについてサブトラクション法を用いて比較した。NALTiに強く発現していたinterferon regulatory factor 1(IRF1)に注目し、IRF1^{-/-}マウスのNALT形成を検討した結果、驚くべきことにパイエル板やリンパ節の形成は正常であったが、NALT形成はほとんど認められなかった。したがって、IRF1がNALT特異的なリンパ組織形成誘導因子である事を見出した。レクチン組織染色によってM細胞特異的マーカーであるUEA-I陽性の上皮がNALTに関連しない鼻腔上皮の一部に存在することを明らかにした。このUEA-I陽性細胞はM細胞特異的抗体(NKM16-2-4)にも選択的に反応し、パイエル板M細胞に特徴的な短い微絨毛を認め、高分子タンパク

抗原やバクテリアなど様々な抗原を取り込む能力があると考えられた。よって上気道粘膜には NALT 非依存性の M 細胞様の抗原取り込み上皮細胞が存在し、気道由来の抗原に対する特異的免疫応答に關与している事が示唆された。

(5) 脂質メディエーターを用いた粘膜免疫の基礎的解明

本研究においては、絨毛 M 細胞を含む吸収上皮細胞を起点とする腸管免疫システムにおいて働いている腸管免疫システムの機能制御に焦点を当て研究を行った。特に脂質メディエーターの一つであるスフィンゴシン1リン酸を介した遊走制御に注目し、スフィンゴシン1リン酸が粘膜免疫担当細胞の遊走制御において重要な役割を担っていることを発見した。さらに絨毛 M 細胞や吸収上皮細胞層から取り込まれるアレルゲンにより発症すると考えられる食物アレルギーにおいても、病原性細胞の遊走にスフィンゴシン1リン酸が関わっていることを見出した。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

M細胞特異的抗体の作製、絨毛上皮M細胞の発見など粘膜免疫機構の解明に向けた新知見など、粘膜における免疫応答システムの基礎の確立からワクチン開発への道を拓いた研究成果は、高く評価出来る。また、上記抗体とMucoRiceを用いたM細胞標的型粘膜ワクチンは、将来の有効な粘膜ワクチン開発にとって有望な技術であり、今後の臨床応用が期待される。

これらの研究成果は、論文発表(海外47件)、口頭発表(海外52件、国内80件)として発表されている。Immunity 1件、Nature Rev. Immunol 1件、Proc Natl Acad Sci USA 3件、J. Exp. Med. 2件、J. Clin. Invest 1件、Blood 1件 J. Immunol. 22件など、国際的に評価の高い学会誌や国際会議に多くの優れた研究成果を発表した。国内メディア(例:朝日、読売、毎日、日経、産経新聞)や国外メディア(例、ロイター、アソシエイトプレス、LAタイムス、ワシントンポスト)などでも取り上げられた。

下記は中でも特筆すべきものである。

- 1) M細胞特異的モノクローナル抗体 NKM16-2-4 の作製に成功し、この抗体がワクチン抗原の経粘膜投与において M細胞特異的抗原送達分子として使えることを明らかにした。粘膜ワクチン開発に向けての理論的・技術的基盤を確立した。
- 2) 粘膜ワクチン、特に経口ワクチン開発に向けて、コメを用いた自然型粘膜ワクチン送達担体として応用し、注射針不要な次世代ワクチンとしてのコメ型経口ワクチンの開発に成功した。今後の臨床応用が期待される。
- 3) 脂質メディエーターとして知られているスフィンゴシン1リン酸が、粘膜系 T細胞や IgA 前駆細胞の粘膜免疫担当組織間における細胞移出・移動に直接的に關与していることを明らかにした。

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

M細胞の同定も困難であったのに、M細胞特異的抗体の作製、絨毛上皮M細胞の発見など粘膜免疫機構の解明にとどまらず、M細胞を標的にした粘膜ワクチンの開発にまで研究を推進したことを高く評価したい。

本研究は、粘膜における免疫応答システムの基礎の確立からワクチン開発への道を拓いたもので、基礎的にも医学応用的にも大きく貢献するものと高く評価した。今後、多くのバリアーを超える必要があるが、新興・再興感染症対策に貢献出来る粘膜ワクチン開発に向けて大きく寄与

するものと期待される。

また、脂質メディエーターとして知られているスフィンゴシン1リン酸は粘膜免疫誘導に重要な役割を担っており、脂質メディエーターを制御分子として応用した粘膜ワクチンの可能性が示唆された。

4 - 3 . その他の特記事項 (受賞歴など)

本研究成果を推進する過程で、高橋一郎博士は広島大学歯学部教授に、Mi-Na Kweon博士はInternational Vaccine Institute(韓国)の部長に就任した。また、廣井隆親博士は都立臨床医学総合研究所のチームリーダーに就任し、粘膜免疫でのプログラムを立ち上げた。

本研究期間中に、研究代表者の清野 宏教授は野口英世記念医学賞(2007年)及び日本ワクチン学会高橋賞(2007年)を受賞した。