

戦略的創造研究推進事業 C R E S T

研究領域「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

研究課題

「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」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：清野 宏
(東京大学医科学研究所 教授)

1 研究実施の概要

研究の背景とねらい

我々はこれまでに、パイエル板と鼻咽頭関連リンパ組織 (Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue; NALT) が感染防御機構の第一線バリアとして、粘膜免疫システムの誘導・制御に中心的役割を果たしていることを明らかにしてきた。パイエル板や NALT を覆う濾胞被覆上皮 (Follicle-associated epithelium:FAE) には、病原微生物等の外来抗原の取り込みを専門とするM細胞が存在し、粘膜免疫システムにおける抗原門戸細胞として重要な役割を發揮しているが、今日までこのM細胞の抗原取り込み細胞としての、そのメカニズムは全く解明されておらず、さらにはM細胞の起源と分化・発達メカニズムを含めた免疫・発生・生物学的特徴についてもほとんど明らかにされていない。また近年、パイエル板非拘束性粘膜免疫誘導・制御システムの存在も明らかになり、パイエル板以外の粘膜上皮層での新たな抗原取り込み門戸の存在も注目されている。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を同定し、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追及する。さらにはワクチン抗原を M 細胞へ選択的かつ効果的に送達する「M 細胞標的型粘膜ワクチン」を開発することで、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も進める。

研究成果

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

元来、抗原取り込み細胞であるM細胞は、小腸におけるパイエル板に代表されるFAEに局在していると考えられていた。しかしながら、FAEの腸管上皮に占める割合は非常に小さいことから、FAE以外にも抗原取り込み機構が存在することが考えられる。本研究ではFAE以外の領域におけるM細胞の存在を検討するとともに、その分子・細胞生物学的特徴の解明に取り組んだ。M細胞の生物学的特徴は大きく分けて、1) 機能的 (例: 抗原取り込み能)、2) 形態学的 (粗短な微絨毛およびポケット構造)、3) 植物レクチン反応性[例: *Ulex europaeus agglutinin 1* (UEA-1) 反応性及び *Wheat germ agglutinin* (WGA) 非反応性 (UEA-1⁻, WGA⁻)、腸管上皮細胞および杯細胞はそれぞれ UEA-1⁻ WGA⁺、UEA-1⁺ WGA⁺] の3つに大別できる (表1)。

表1 本研究計画実施段階での粘膜上皮構成細胞識別法

細胞	レクチン特異性	
	UEA-1	WGA
M細胞	+	-
上皮細胞	-	+
杯細胞	+	+

我々は、腸管結紮モデルを用いた細菌類の取り込み試験、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、絨毛上皮層にも上述した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（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、最近我々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。

UEA-1の細胞側リガンドは α (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。最近我々は、FUT1あるいはFUT2プロモーターの下流に β 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 α (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 α (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（表2）。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。

表2 本研究計画実施結果に基づくM細胞新分類基準

細胞	NKM16-2-4	FUT1/FUT2	UEA-1	WGA
M細胞 (FAE)	+	FUT1	+	-
M細胞 (絨毛)	+	FUT2	+	-
M-like細胞	+	FUT2	+	+
-----	-----	-----	-----	-----
上皮細胞	-		-	+
杯細胞	-		+	-

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、Sgna-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、当研究グループでは新たに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

粘膜免疫システムは、経粘膜投与抗原に対して抗原特異的免疫応答を粘膜組織と全身免疫両者に誘導する。今日問題視されている新興・再興感染症の大半が粘膜感染型であることから、この粘膜免疫システムを応用した粘膜ワクチンは、次世代型ワクチンとして昨今非常に注目されている。一方で、現在日本で認可されている粘膜ワクチンは、弱毒型生ウイルスを用いたポリオウイルスワクチンのみであり、粘膜ワクチンは実用化に向けた課題が多いのも現状である。粘膜ワクチン開発に向けた課題の一つとして、免疫担当細胞への抗原送達性の低さが挙げられる。特に、粘膜上皮層は、病原微生物等の外来抗原の侵入を防ぐ目的で、Tight junctionによって強固に接着されており、基本的には外来抗原の侵入を許さない。一方で、パイエル板やNALTを代表とする粘膜免疫システム誘導組織を覆うFAEには、抗原取り込みを専門に行うM細胞が存在し、上皮細胞とは相反する機能的特性を有している。M細胞から取り込まれた外来抗原は、M細胞内で何ら分解修飾されることなくM細胞内をトランスサイトシスにより管腔側から基底膜側へと輸送され、FAE下に存在する樹状細胞などの抗原提示細胞に引き渡されることで、生体は抗原特異的免疫応答を誘導するためのプロセスを開始する。しかしパイエル板は、マウスでは小腸に約8-12個しか存在せず、さらにはM細胞の頻度はパイエル板を覆うFAEを構成している上皮細胞群の約10%しか存在しない。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、我々はこの 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。

以上本事業で得られた 2 つのシーズをもとに、現在 M 細胞標的型米ワクチンを開発中であり、免疫担当細胞への抗原送達性、消化管内での安定性といった粘膜ワクチン開発における重要課題を克服した、実用性の高い粘膜ワクチンに近い将来開発できるものと確信する。

4. NALT 組織形成統制因子と NALT 非依存性抗原取り込み呼吸 M 細胞

NALT は、腸管におけるパイエル板と同様の粘膜関連リンパ組織の一つである。これまでに我々は NALT とパイエル板の組織形成誘導細胞は共通の表現型 (CD3⁺CD4⁺CD45⁺) を有するが、NALT の組織形成は lymphotoxin receptor (LTβR) を介したシグナル非依存的であることから、パイエル板の組織形成メカニズムとは大きく異なっている事を報告した。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。そこで我々は 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 初期形成に必須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-1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-1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 (呼吸系M細胞)、気道由来の抗原に対する特異的免疫応答に関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

腸管にはパイエル板を始めとするリンパ組織が存在し、粘膜免疫誘導組織として機能している。これら粘膜免疫誘導組織の上皮細胞層には M 細胞が存在し、管腔内に存在する抗原を粘膜免疫誘導組織内に取り込むことで、外来性抗原に対する免疫応答誘導の場となっている。一方、パイエル板以外の吸収上皮細胞層にも M 細胞が存在することを我々は発見し、絨毛 M 細胞と名付けた。このことはパイエル板などの粘膜免疫誘導組織以外にも、絨毛 M 細胞を介した粘膜免疫誘導経路が存在することを示唆する結果であり、粘膜免疫誘導組織に依存しない免疫応答の機能解明が重要な課題であると考えられる。

そのような観点で粘膜免疫を眺めてみると、腸管にはパイエル板などの粘膜免疫誘導組織に依存しない免疫系も発達している。例えば、絨毛 M 細胞の存在する吸収上皮細胞層には、上皮細胞間リンパ球と呼ばれる特殊な細胞が存在する。上皮細胞間リンパ球の多くは T 細胞から構成されているが、抗原ペプチドと MHC 分子の複合体を認識する $\alpha\beta$ 型 T 細胞受容体を発現する $\alpha\beta$ T 細胞に加え、非古典的 MHC 分子を認識することで自然免疫において重要な役割を担っていると考えられている $\gamma\delta$ 型 T 細胞受容体発現 T 細胞 ($\gamma\delta$ T 細胞) も多く含まれる。また CD 分子の発現パターンも特徴的であり、脾臓などに観察される CD4 陽性もしくは CD8 $\alpha\beta$ 陽性細胞に加え、上皮細胞間リンパ球には CD8 α 分子をホモ二量体で発現する CD8 $\alpha\alpha$ 陽性細胞も存在し、 $\gamma\delta$ T 細胞受容体を発現する主要細胞となっている。すなわち上皮細胞間リンパ球は、絨毛 M 細胞を始めとする吸収上皮細胞を介し取り込まれた抗原に対し、 $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞を機能させることで、自然免疫と獲得免疫の両免疫機構において貢献していると考えられる。また腸管には B 細胞レベルにおいても特有の細胞が存在する。通常、脾臓等に観察される B 細胞は B2 B 細胞と呼ばれ、T 細胞依存的抗原を認識する抗体を産生することで獲得免疫において機能する。一方で、腸管には B1 B 細胞と呼ばれる B 細胞も存在する。B1 B 細胞の少なくとも一部は胎生肝から分化し、腹腔から腸管へと遊走し、脂質や多糖などの T 細胞非依存的抗原を認識する抗体を産生する。これらの B1 B 細胞から産生される抗体が認識する抗原は多くの微生物に共通で発現していることから、B1 B 細胞は $\gamma\delta$ T 細胞と同様、微生物を広範囲にわたり認識することで、自然免疫において重要な役割を担っている。

本研究においては、これら絨毛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。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

パイエル板や NALT を代表とする粘膜免疫システム誘導組織に局在するM細胞に加え、従来まで粘膜免疫システムの実効組織として考えられていた粘膜上皮層に存在する抗原取り込み細胞の免疫細胞学的性状を解析することで、抗原取り込み関連分子群を同定し、さらにはそのリガンド分子または認識抗体を応用することで、臨床応用（M細胞標的型粘膜ワクチン開発）に向けた新しい道しるべをつける。

1. パイエル板及び絨毛M細胞の分子基盤研究

パイエル板 FAE に存在する M 細胞と上皮細胞分画の分離法を確立し、各分画から調製した mRNA をもとに DNA マイクロアレイ解析を実施し、包括的遺伝子発現解析を行うことで、M 細胞特異的遺伝子を同定する。一方で、我々が発見した粘膜免疫システム実効組織に局在する抗原取り込み能を有する絨毛 M 細胞の分子・細胞学的特徴を詳細に把握することで、M 細胞の分子基盤研究を実施する。さらに、M 細胞を含めた粘膜面における粘膜免疫システムへの炎症誘因分子・物質や脂質メディエーターなどの拡張因子の影響について包括的に検討し、M 細胞を代表とする粘膜上皮防御システムについても検討を加える。

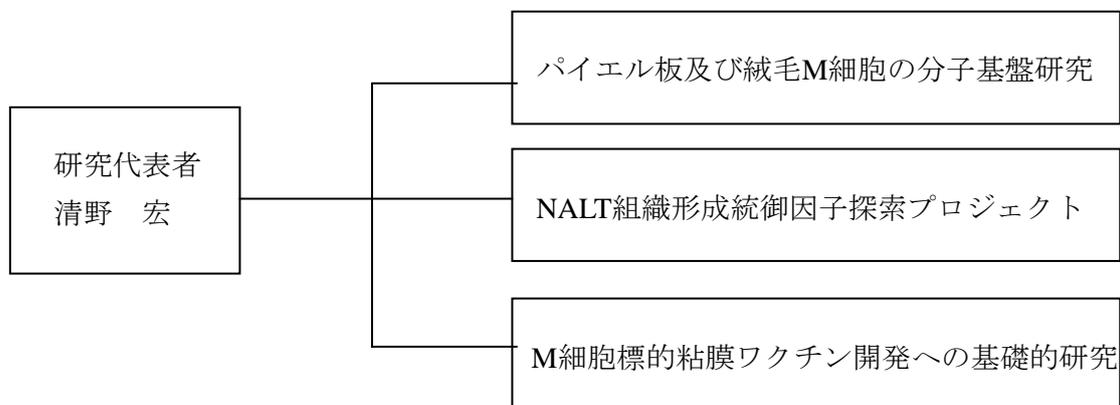
2. M 細胞誘導メカニズム解明に向けての NALT 組織形成統制因子探索プロジェクト

NALT は上気道粘膜免疫機構における抗原特異的な免疫誘導組織として重要な二次リンパ組織と考えられている一方で、その形成メカニズムはほとんど明らかになっていない。我々は NALT 組織形成におけるリンフォイドケモカイン(CXCL13, CCL19, CCL21)の関与を検討するとともに、NALT 組織形成誘導細胞である CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞(NALTi)に特異的に発現する NALT 形成に重要な分子の探索を行う。さらには、NALT に局在する M 細胞を含めた上気道全体における抗原取り込み機序について免疫細胞学的解析を実施する。

3. M 細胞標的粘膜ワクチン開発への基礎的研究

M 細胞特異的モノクローナル抗体を作製することで、M細胞を標的とした新規ワクチンデリバリーシステム（M 細胞標的型粘膜ワクチン）の開発及び消化管内での安定性に優れたコメ型ワクチンの開発への基盤形成研究を進める。同時にワクチン開発に向けた粘膜免疫誘導メカニズムの基礎的解明も進める。

(2) 実施体制



3 研究実施内容及び成果

3-1 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

元来、抗原取り込み細胞である M 細胞は、小腸パイエル板に代表される粘膜下リンパ組織を覆う特殊な上皮層 FAE に局在していると考えられていた。しかしながら、FAE 面積の腸管上皮に占める割合は非常に小さいことや、パイエル板欠損マウスにおいても経口投与抗原に対する免疫応答は正常に起こりうることから、FAE 以外にも抗原取り込み機構が存在することが考えられる。本研究は FAE 以外の領域における M 細胞の存在の検討とその分子・細胞生物学的特徴付けを目的とする。

(1) 絨毛 M 細胞の発見

FAE 以外の領域に M 細胞が存在するか否かを確認するために、マウス小腸を M 細胞特異的レクチンである UEA-1 と上皮細胞特異的レクチンである WGA で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、絨毛部、特に先端部に UEA-1 陽性細胞が存在することが判明した (図 1)。存在形態は主に密集型と分散型に分けられた。WGA の反応パターンを見てみると、UEA-1 陽性細胞の大部分は WGA 陽性の M-like 細胞であった (表 2)。しかしながら、

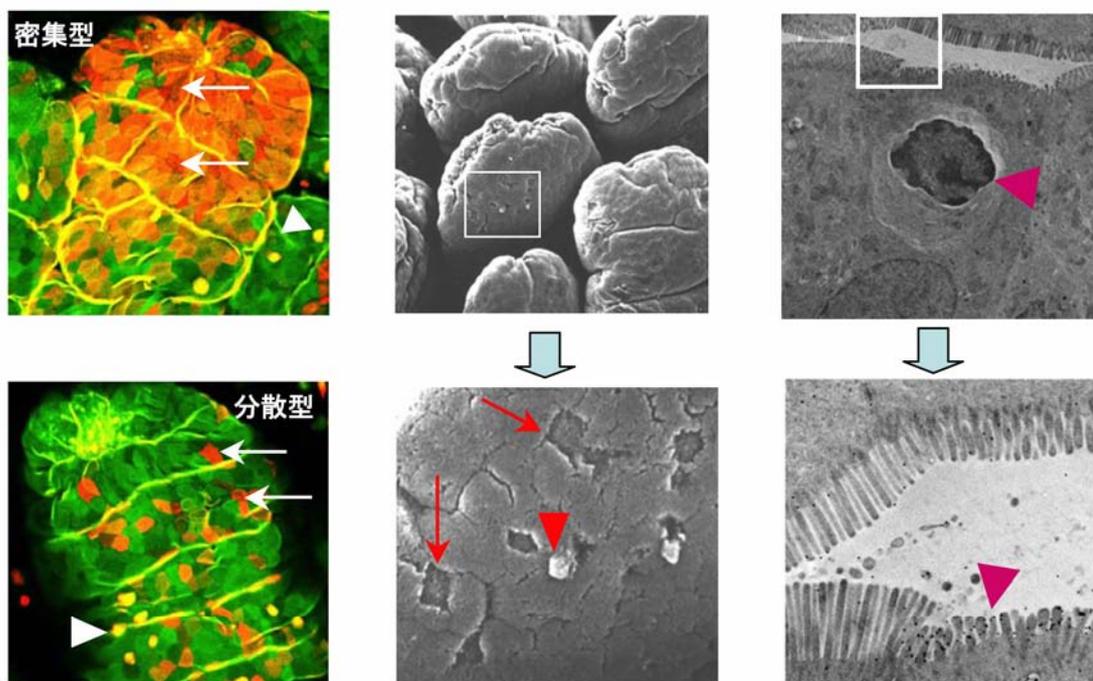


図1 腸管絨毛 M 細胞の生物学的・形態学的特徴

(上段) レクチン UEA-1 (赤)および WGA (緑)で染色した小腸絨毛の共焦点顕微鏡像。矢印:典型的な M 細胞(UEA-1⁺WGA⁻)、矢頭:杯細胞(UEA-1⁺WGA⁺)。

(中段) 小腸絨毛の走査電子顕微鏡像。矢印:M 細胞、矢頭:杯細胞。

(下段) 絨毛M細胞の透過型電子顕微鏡像。ポケットに侵入したリンパ球(左、矢頭)および UEA-1-金コロイド反応性(右、矢頭)が観察される。

非常に低頻度ながら UEA-1 陽性 WGA 陰性という典型的な FAE-M 細胞にみられる反応パターンを示す細胞が存在し (図 1)、この細胞は、形態的 (粗短な微柔毛およびポケット形成) (図 1) および機能的 (抗原取り込み) にも典型的な FAE-M 細胞と同様の特徴を併せ持つことから、我々はこの細胞集団を絨毛 M 細胞と名付けた。さらに、LT β receptor (LT β R) -Ig 処理マウスや TNF/LT α あるいは Id2 欠損マウス (後に、両マウスは、腸管関連リンパ節に属し、パイエル板とともに粘膜免疫誘導組織として期待されている孤立リンパ小節をも欠いていることが判明) などのパイエル板欠損マウスにおいても絨毛 M 細胞が存在すること、およびこのようなマウスにおいても経口投与抗原に対する免疫応答が誘導され得ることから、絨毛 M 細胞が粘膜面を介した免疫応答誘導に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

(2) M 細胞は誘導されるのか?

B 細胞欠損マウスにおけるパイエル板 M 細胞数減少、パイエル板リンパ球が上皮細胞株 (Caco-2 細胞) を M 細胞に分化させること、およびインドメタシン投与や病原性細菌感染

がパイエル板 M 細胞数を増加させるという報告は、M 細胞分化における柔軟性を示している。そこで、我々は絨毛 M 細胞が誘導されるのか否かを調べた。通常、マウスの十二指腸には絨毛 M 細胞はほとんど存在しないが、粘膜アジュバントとして知られるコレラトキシン (Cholera Toxin:CT) や炎症誘発剤として知られるドデシル硫酸ナトリウムを経口投与、ある

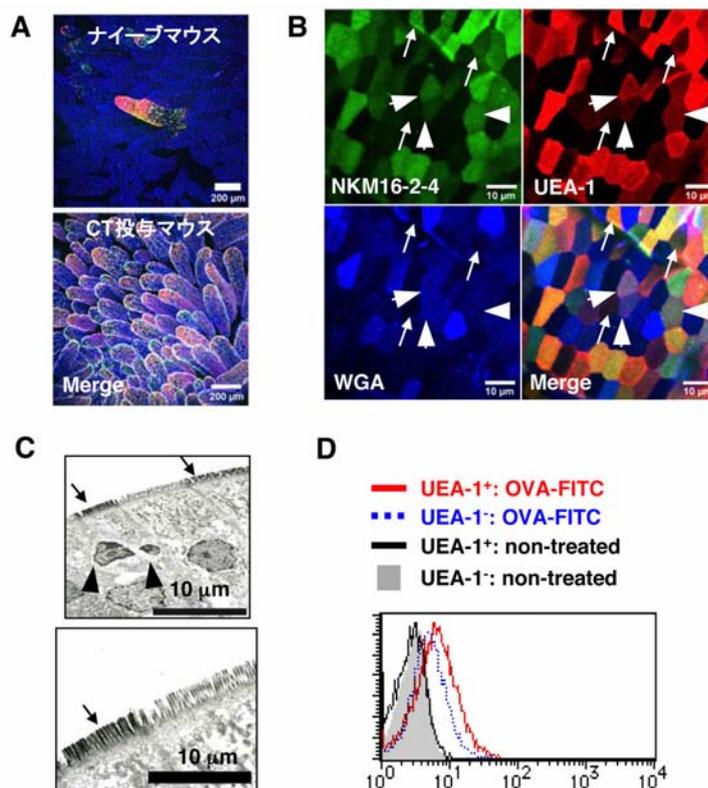


図2 コレラトキシン(CT)投与による十二指腸絨毛 M 細胞の誘導

(A and B) 共焦点顕微鏡像。レクチン UEA-1 (赤)および NKM16-2-4 (緑)に両陽性絨毛 M 細胞は通常ナイーブマウスの十二指腸においては非常に低頻度に存在する(A、上)が、CT 投与後に大部分の細胞が両陽性になる(A、下)。これら両陽性細胞の大部分は WGA 陽性の M-like 細胞(B、矢頭)であり、典型的な WGA 陰性の絨毛 M 細胞(矢印)は低頻度に存在する。(C) CT 投与マウス十二指腸の透過型電子顕微鏡像。UEA-1 陽性 WGA 陰性の絨毛 M-like 細胞(上、矢印)はポケットを形成し、リンパ球の浸潤(上、矢頭)がみられるが、微柔毛の長さは隣接した腸管上皮細胞と同じである(下、矢印)。(D) 腸管結紮法による OVA-FITC 取り込み能の比較。UEA-1 陽性細胞(この場合、大部分が WGA 陽性の M-like 細胞)は UEA-1 陰性の腸管上皮細胞に比して、高い OVA 取り込み能を示す。

いはインドメタシンを皮下注射することによって、非常に高頻度の UEA-1 陽性細胞が誘導されることが分かった (図 2)。これらの UEA-1 陽性細胞は、最近我々が樹立した M 細胞特異的モノクローナル抗体 (NKM16-2-4) に反応することから、これらの細胞集団は、M 細胞亜集団であることが証明された。この M 細胞亜集団は、少数の WGA 陰性絨毛 M 細胞と多数の WGA 陽性 M-like 細胞で構成されること (図 2)、および WGA 陽性 M-like 細胞は同時にパイエル板 FAE にも誘導されていることが判明した。これらの結果は、絨毛 M 細胞および M-like 細胞は様々な腸内環境変化 (外的要因) によって誘導され得ることを示している。さらに興味深いことに、CT 誘導絨毛 M-like 細胞は、抗原取り込み能およびポケット構造を示すものの、微柔毛の長さや状態は通常 of 腸管上皮細胞のそれらと全く同様のものであること (図 2)、および発現レベルは低いものの、パイエル板 M 細胞に恒常的に強く発現している分子が CT 誘導絨毛 M 細胞集団にも誘導されている (表 3) ことから、CT 誘導 M 細胞集団は分化の段階において、典型的な FAE-M 細胞と上皮細胞との中間に位置する細胞集団であると言える。

表 3 CT 誘導 M-like 細胞に強く発現している分子 (トップ 20) とその PP-M 細胞における発現順位

CT-M/IEC	PP-M/IEC	Rank in PP-M/IEC	Common	Description
94	1092	1	Ang4	angiogenin, ribonuclease A family, member 4
76	514	7	1810030J14Rik	RIKEN cDNA 1810030J14 gene
60	319	19	2010016F14Rik	defensin related cryptdin 4
54	135	42		similar to Cryptdin-related protein 1C precursor (CRS1C)
49	116	49	Defcr-rs1	defensin related sequence cryptdin peptide (paneth cells)
49	756	3	Avil	Advillin
48	912	2	Rgs13	Regulator of G-protein signaling 13
46	581	6	Alox5ap	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein
45	139	39	Itln	intelectin a
35	722	4	0610025L06Rik	RIKEN cDNA 0610025L06 gene
35	148	34	Mmp7	matrix metalloproteinase 7
27	97	60	Defcr17	defensin related cryptdin 12, -13, -15, -3, -6, -8, -23, -2
25	0	9057	Gkn1	gastrokine 1
23	103	58	Pla2g2a	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)
21	163	30	Ang4	angiogenin, ribonuclease A family, member 4
21	204	26	Hck	hemopoietic cell kinase
21	27	236	Lzp-s	P lysozyme structural
19	266	22	Defcr-rs7	defensin related cryptdin, related sequence 7
18	19	340	Lyzs	P lysozyme structural
16	139	38	4933424C13Rik	RIKEN cDNA 4933424C13 gene

(3) $\alpha(1,2)$ フコース転移酵素 FUT と M 細胞

一般に M 細胞特異的レクチンとして汎用されている UEA-1 の細胞側リガンドは $\alpha(1,2)$ フコースであり、この糖鎖修飾に関わる糖転移酵素として FUT1 および FUT2 が同定されている。これまで、ストレスや腸内細菌定着刺激などの要因によって FUT2 の mRNA が誘導される

ことが知られているが、M 細胞のフコシル化における FUT の拘束性に関する情報は無い。そこで、我々は FUT1 あるいは FUT2 のコーディング領域を LacZ レポーター遺伝子に入れ替えたマウス（ノックインマウス）を用いて、FUT1 あるいは FUT2 発現細胞の同定を試みた。その結果、FAE-M 細胞におけるフコシル化は FUT1 に拘束されていることが分かった（図 3）。通常、マウスの回腸には、典型的な FAE-M 細胞に加えて、多数の UEA-1 陽

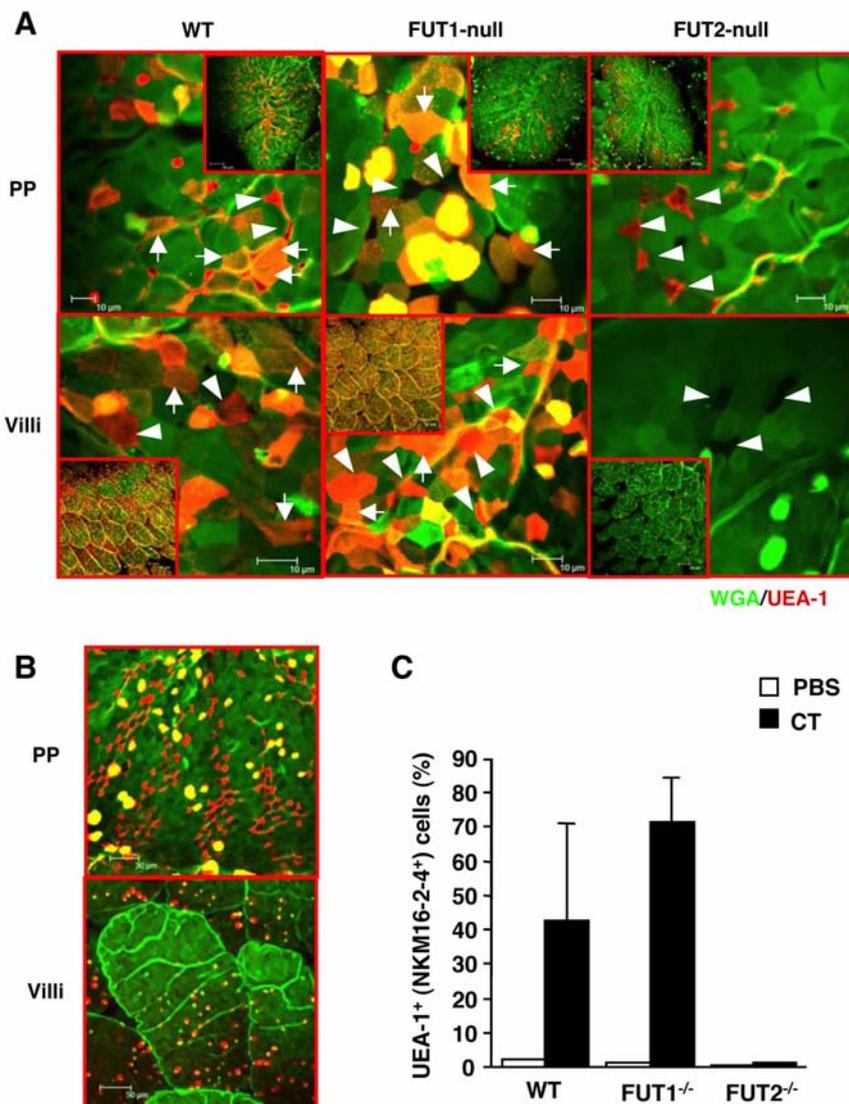


図3 FUT 発現と UEA-1 反応性との相関性

(A and B) レクチン染色を施した WT、FUT1-lacZ、FUT2-lacZ (A) および無菌マウス(B) 回腸組織の共焦点顕微鏡像。通常、回腸においては、典型的な UEA-1 陽性 WGA 陰性の FAE-M 細胞および柔毛 M 細胞 (A、矢頭) に比べて、UEA-1 および WGA 両陽性の M-like 細胞 (A、矢印) が高頻度に存在する。柔毛 M 細胞および M-like 細胞は無菌マウスの回腸には存在しない (B) ことから、これらの細胞集団は腸内細菌誘導型であるといえる。図 4 における LacZ の発現に一致して、FUT1-null 条件下では典型的な FAE-M 細胞のフコシル化が消失し、FUT2-null 条件下では絨毛 M 細胞および M-like 細胞のフコシル化が消失する (A)。FUT2-null 条件下では杯細胞のフコシル化も消失する (A)。

(C) CT 誘導絨毛 M 細胞および M-like 細胞頻度における FUT 欠損の影響 (フローサイトメトリーデータ)。FUT2-null 条件下では NKM16-2-4 UEA-1+ 細胞が誘導されなことから、CT 誘導型絨毛 M および M-like 細胞におけるフコシル化は FUT2 に拘束されているといえる。

性細胞が存在するが、これらの UEA-1 陽性細胞は先に紹介した CT 誘導型 M 細胞亜集団と同様、多数の WGA 陽性 M-like 細胞と少数の WGA 陰性絨毛 M 細胞で構成されている。

表 4 小腸上皮 M 細胞亜集団における WGA 反応性、形態および FUT 拘束性

UEA-1 陽性抗原取り 込み細胞	WGA 反応性	形態		FUT 拘束性
		微柔毛の長さ	ポケット形成	
典型的 FAE-M 細胞	×	短	○	1
絨毛 M 細胞	×	短	○	2
M-like 細胞	○	長	○	2

無菌マウスの回腸には典型的な FAE-M 細胞のみ存在が認められる (図 3) ことから、典型的な M 細胞の分化は外的要因に左右されないこと (プログラム型)、および回腸における M-like 細胞や絨毛 M 細胞は腸内細菌誘導型であると考えられる。興味深いことに、これらの CT および腸内細菌誘導型 M 細胞亜集団におけるフコシル化は FUT2 に拘束されていることが判明した (図 3)。これらの結果は、FUT1 が典型的な FAE-M 細胞を同定する最も信頼性の高いマーカーであること、および FUT1 と FUT2 の発現が、それぞれプログラム型および誘導型 M 細胞に規定されていることを示している。

以上、本研究結果は、小腸上皮には典型的な FAE-M 細胞に加えて、少なくとも 2 種類の UEA-1 陽性抗原取り込み細胞 (絨毛 M 細胞とパイエル板および絨毛の M-like 細胞) が存在しており、これら 3 種類の M 細胞亜集団は WGA への反応性、形態学的特徴、FUT 拘束性により識別できることを示している (表 4)。

3-2 M細胞関連遺伝子の同定

M細胞はその亜集団も含め、パイエル板・孤立リンパ小節といった誘導組織の上皮層にのみ存在する FAE-M 細胞、絨毛上皮層に存在し、FAE-M 細胞と相同の形質を示す絨毛 M 細胞、そして誘導組織と実効組織の両方の上皮層に存在する M-like 細胞に区別される。効率的・効果的な粘膜免疫応答を誘導させるためには、パイエル板などの粘膜誘導組織における抗原感作が必要であることから、FAE-M 細胞の膜表面に特異的に発現する分子を標的とした抗原送達系の構築が望まれる。そこで本研究では、FAE-M 細胞を分離して DNA マイクロアレイ法および *in situ* ハイブリダイゼーション法による遺伝子発現解析を行い、FAE-M 細胞特異的分子の同定を試みた。

(1) 小腸上皮層からの細胞の分離

通常飼育環境下マウスの十二指腸・空腸上皮層には絨毛 M 細胞および M-like 細胞がほとんど存在しないことから (図 4B)、FAE-M 細胞は十二指腸・空腸由来のパイエル板から調製した (図 4A)。吸収上皮細胞は十二指腸・空腸絨毛上皮層から調製した (図 4B)。そして M-like 細胞は、コレラトキシン (CT) を経口投与することにより誘導可能であるため、このマウスの十二指腸・空腸由来の絨毛上皮層から調製した (図 4C)。EDTA による細胞分散法によって得られた細胞群に対して、蛍光標識した M 細胞特異的抗体 NKM 16-2-4、レクチン UEA-1、抗 CD45 (白血球系細胞マーカー) 抗体を用いて標識し、FAE-M 細胞および M-like 細胞(NKM16-2-4⁺UEA-1⁺CD45⁻)、吸収上皮細胞(NKM16-2-4⁻UEA-1⁻CD45⁻)を FACS Aria (BD) によってそれぞれ約 1×10^5 細胞を分離した。

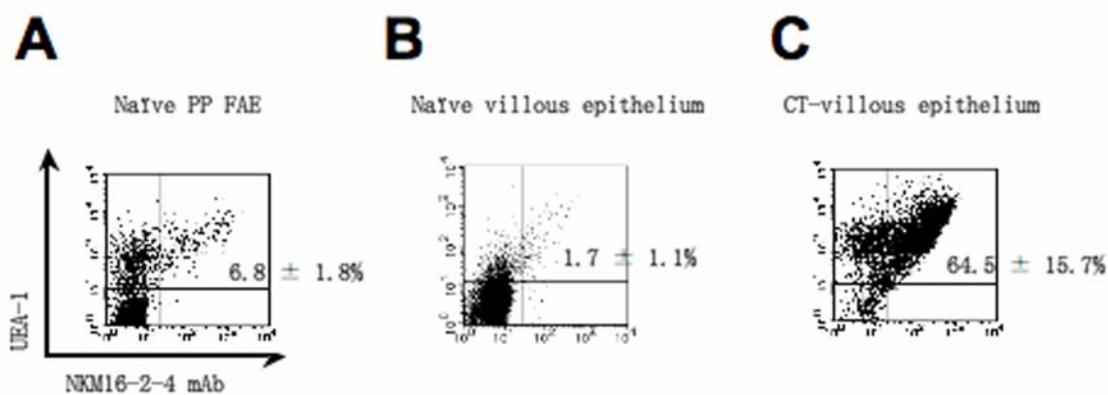


図 4 十二指腸・空腸由来 CD45 陰性上皮細胞集団[パイエル板(A)、絨毛(B)、CT 投与 2 日後の絨毛(C)]の UEA-1 および NKM16-2-4 mAb に対する FACS 展開図

FAE-M 細胞および M-like 細胞は UEA-1 陽性・NKM16-2-4 陽性、吸収上皮細胞は UEA-1 陰性・NKM16-2-4 陰性で示される。図中の数値は M 細胞および M-like 細胞の頻度を示す。FAE-M 細胞(A)、吸収上皮細胞(B)、CT 誘導 M-like 細胞(C)をソーティングし、DNA マイクロアレイ解析に供した。

(2) DNA マイクロアレイによる包括的遺伝子発現パターンの比較

45101 個のプロンプが搭載されている GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った結果、FAE-M 細胞、M-like 細胞、吸収上皮細胞において、それぞれ 17922、14468、15636 個のプロンプで陽性を認めた。包括的遺伝子発現パターンを 3 細胞間で比較した結果、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 (図 5)。このことから、M-like 細胞は、FAE-M 細胞と吸収上皮細胞の中間的遺伝子発現形質を示していると考えられた。

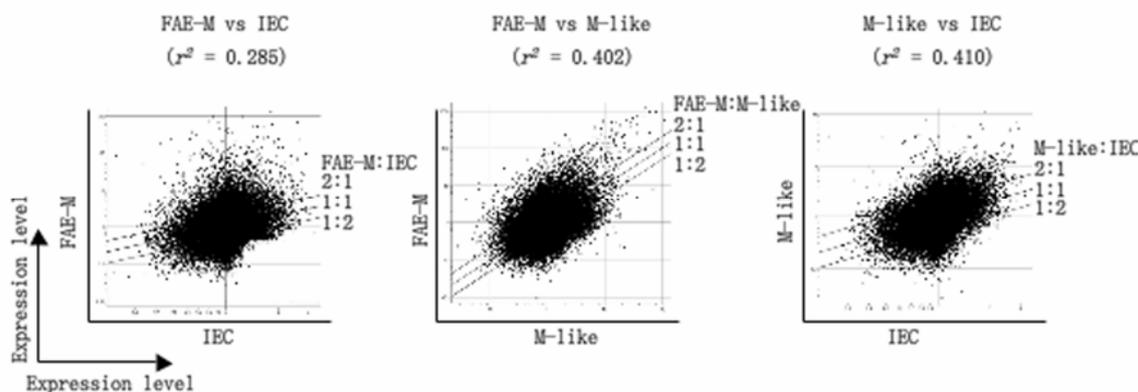


図 5 DNA マイクロアレイ解析より得られた FAE-M 細胞 (FAE-M)、吸収上皮細胞 (IEC)、CT 誘導絨毛 M-like 細胞 (M-like) における包括的遺伝子発現パターンを比較した図
統計解析はウェルチ ANOVA に従った。

(3) ケモカイン遺伝子の発現

ケモカイン遺伝子の発現については、M 細胞を含むパイエル板上皮層に CCL9、CCL20、CXCL16 が有意に発現することが既に報告されている。本研究で得られた遺伝子発現データベースを元にケモカイン遺伝子の発現解析をした結果 (表 5)、FAE-M 細胞において、CCL9、CCL20 の他、CXCL13、CKLF、CCL6、CCL28 の高い遺伝子発現を認めた。さらに CCL6、CCL9、CKLF については、M-like 細胞においても吸収上皮細胞と比較して有意な遺伝子発現の上昇が認められた。つまり、M-like 細胞の一部のケモカイン遺伝子の発現形質に関しても FAE-M 細胞との共通性が示された。一方、CXCL16 の遺伝子発現については、FAE-M 細胞においては有意な発現を認めず、M-like 細胞において有意な発現を認めた。すなわち、既報告の知見と本研究結果を照らし合わせると、CXCL16 はパイエル板上皮層における M-like 細胞に強く発現することが推察された。

表 5 FAE-M 細胞 (FAE-M) 及び CT 誘導絨毛 M-like 細胞 (M-like) におけるケモカイン遺伝子の発現比較

Name	GenBank	吸収上皮細胞に対する相対発現量	
		FAE-M	M-like
CCL9	AF128196	124.8	7.0
CXCL13	AF030636	64.4	-
CKLF	BE852312	52.2	8.3
CCL6	AV084904	30.4	5.1
	BC002073	12.5	4.6
CCL20	AF099052	10.9	-
CCL28	BE196980	2.8	0.7
CXCL16	BC019961	1.1	2.1

(4) FAE-M 細胞特異的発現遺伝子のスクリーニング

遺伝子発現プロファイルをもとに FAE-M 細胞に特異的に発現する遺伝子の候補をスクリーニングした。候補遺伝子の基準を「FAE-M 細胞においてのみ raw value が 100 以上であり、「Present」もしくは「Marginal」として判断される」かつ「FAE-M 細胞における平均発現値が他の 2 つの細胞画分のより 2 倍以上である」と設定した結果、1272 個の遺伝子が選択された。この中には、特異的発現遺伝子であることが既に報告されている PGRP-S、Sgne-1、annexin V 遺伝子に対応する遺伝子も含まれていた。さらに、本研究ではこの候補遺伝子群に含まれ、高発現を示す MARCKS-like protein (MLP) および glycoprotein 2 (GP2) について *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、FAE-M 細胞に特異的に発現する遺伝子であることが新たに同定された (図 6)。GP2 は GPI アンカープロテインであり、FAE-M 細胞の管腔面表面に発現することが予想され、抗原送達系における標的分子となり得ることが期待される。以上の結果は、本研究で確立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。

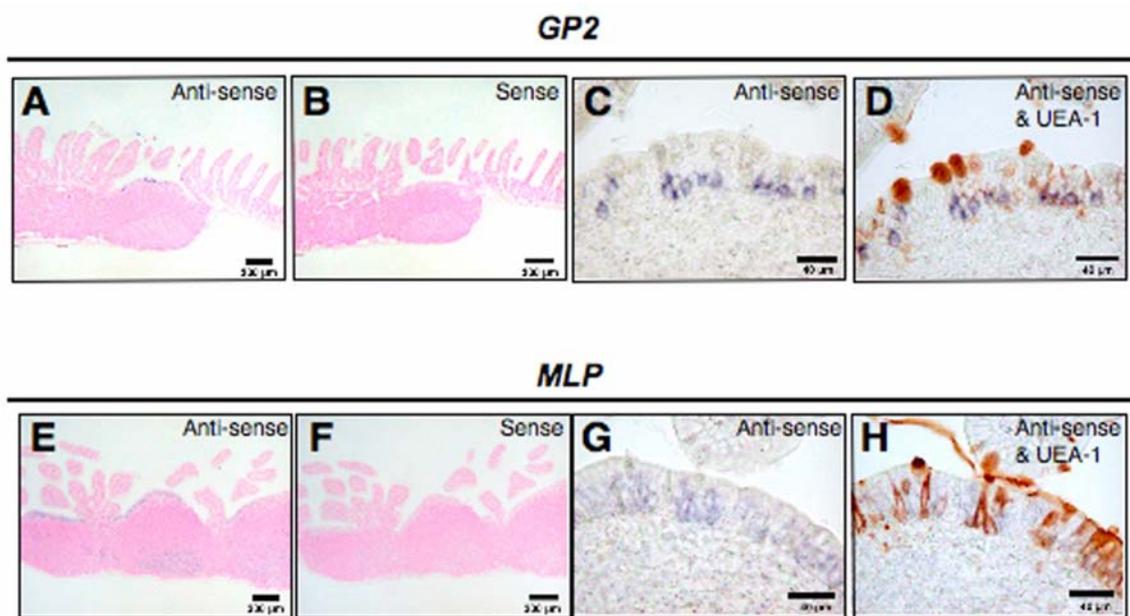


図 6 in situ ハイブリダイゼーションによる GP2、MLP mRNA の発現細胞の同定

標的 mRNA は青色シグナルで示される。A、B、E、F については核染色(桃色)、D、H については UEA-1(褐色)による二重染色像を示す。GP2 および MLP の mRNA 発現はともに腸管上皮層において UEA-1 陽性(FAE-M 細胞)である。

以上、本研究で構築された遺伝子発現プロファイルは M 細胞特異的発現遺伝子の同定のみならず、M 細胞の免疫生物学的機能における分子機序の理解においても少なからず寄与するものと考えられる。

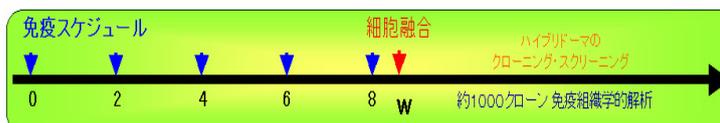
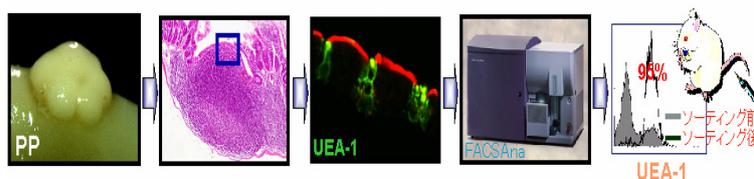
3-3 M細胞特異的モノクローナル抗体の樹立とそれを用いたM細胞標的粘膜ワクチン

(1) M細胞の単離精製ならびに免疫法の確立

M細胞標的型粘膜ワクチンのデリバリー分子として応用可能なマウスM細胞特異的モノクローナル抗体の樹立を目的とし、単離精製マウスM細胞のSDラットへの免疫、ならびに定法に従った細胞融合法による抗体産生ハイブリドーマの作出を試みた(図7)。マウスパイエル板M細胞は、 $\alpha(1,2)$ 型フコースを認識するレクチン UEA-1 に陽性反応を示すことが知られているが、実際には、絨毛上の杯細胞にも反応特異性を示す。本研究では、50匹のBalb/cマウス(7週令、メス)のパイエル板全てを屠殺後速やかに絨毛から切り分けて摘

M細胞特異的モノクローナル抗体の開発に向けて

M細胞の単離精製ならびに免疫法の確立



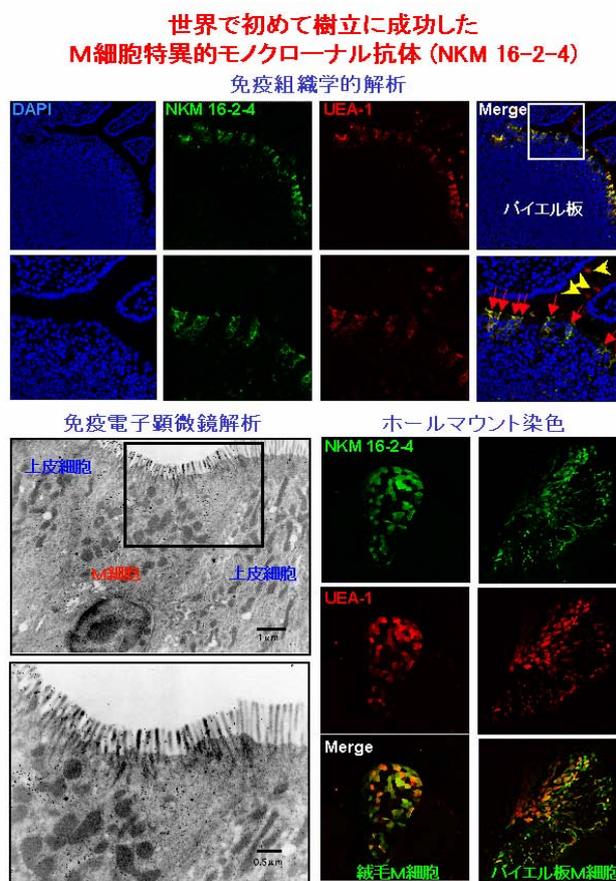
マウス一匹あたり、パイエル板(PP)は8-12個しか存在せず、UEA-1に陽性反応を示すM細胞はその中でも約10%しか存在しません。我々は、ソーティング技術を利用してM細胞を単離精製し、SDラットに免疫することで、M細胞特異的モノクローナル抗体の作製を目指しました。

図7. M細胞特異的モノクローナル抗体樹立プロトコール

出し、1 mM EDTA によってパイエル板 FAE を分散処理した。分散後の細胞は、500 ng/ml の PE 標識 UEA-1 で染色し、FACS Aria に供することで、UEA-1 陽性細胞 (95%以上の精製度) を分取した。0.5-1.0x10⁶ 個の UEA-1 陽性細胞は、アジュバントである TiterMax Gold と混和後、SD ラットの皮内 (フットパット) に免疫した (図7)。隔週、計4回の免疫後、脾臓ならびに鼠蹊リンパ節より単離したリンパ球は、ミエローマ細胞である P3X63-AG8.653 (ATCC, CRL-1580) と 50% (w/v) と polyethylene glycol 1500 の存在下で細胞融合することで、ハイブリドーマを作成した。得られた約1000のハイブリドーマの培養上清は、すべて免疫組織学的解析に供することでM細胞に対する特異性を精査した。M細胞への特異性が確認されたハイブリドーマは、クローニング後、ICRヌードマウスに腹腔投与することで腹水を回収し、IgG画分をProtein Gにより精製後、実験に使用した。

(2) M細胞特異的モノクローナル抗体の樹立

約1000種のハイブリドーマの培養上清を用いたスクリーニングの結果、約50%は反応性を全く有しておらず、また約40%は杯細胞に強い反応特異性を有していた。また残りの約10%は全ての上皮細胞に特異性を有しており、唯一クローン(NKM 16-2-4, Rat IgG2c)がM細胞特異的であることが免疫組織学的に実証された(図8)。NKM 16-2-4は、近年我々が発見した絨毛M細胞にも特異性を有しており、また消化管のみならず呼吸器のNALTに局在するM細胞にも特異的に反応した。また、NKM 16-2-4は、UEA-1陽性の杯細胞には全く反応性を有していなかったことから、新規M細胞マーカーとしての応用性を有していることが示され、事実、NKM 16-2-4を用いた免疫電子顕微鏡解析では、微絨毛が短く疎で、またポケット構造を有しているM細胞に特異的に反応することも確認された(図8)。



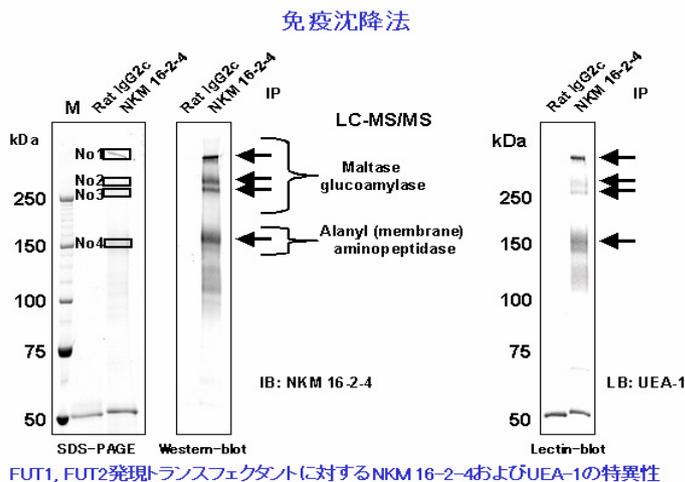
本研究で樹立に成功したM細胞特異的モノクローナル抗体(NKM 16-2-4)は、UEA-1陽性バイエル板M細胞、絨毛M細胞に特異的に反応し、UEA-1陽性杯細胞には全く反応しません。

図8. M細胞特異的モノクローナル抗体NKM 16-2-4の樹立

(3) NKM 16-2-4 の認識分子の同定

NKM 16-2-4の認識分子の同定を目的とし、M細胞から抽出した細胞溶解液をNKM 16-2-4を用いて免疫沈降した結果、本抗体はモノクローナル抗体であるにもかかわらず、予想に反して複数の分子が沈降されることがSDS-PAGE解析ならびにWestern-blot法により明らかとなった(図9)。そこで、410, 275, 260 および 150k Da から成る主な4分子の同定を目的とし、LC-MS/MS解析を実施した結果、410, 175 および 260k Daの3分子はMaltase glucoamylaseとして、また150kDaの分子は、Alanyl (Membrane) aminopeptidaseであることが明らかになった。しかしながら、これらの分子は消化管での食餌性栄養素の最終分解に関与する分子として、腸管上皮細胞に幅広く発現している分子群であり、事実、我々が実施した*in situ* hybridization解析でも、これら2分子のmRNAは、全ての腸管上皮細胞で恒常的に発現していることが確認され、NKM 16-2-4がこれらのタンパク抗原を認識しているのではなく、M細胞特異的な糖鎖構造を認識している可能性が示唆された。

実際、NKM 16-2-4 を用いた免疫沈降後の各種レクチンを用いたレクチンブロット解析では、これらの沈降分子が上述した $\alpha(1,2)$ フコースを認識する UEA-1 に全て認識されることが明らかとなり、本推測を支持していた。そこで、我々は $\alpha(1,2)$ フコースの転移酵素であるマウス FUT1 および FUT2 遺伝子を CHO 細胞に導入し、これら強制発現細胞に対する NKM 16-2-4 の特異性を FACS 法で精査した結果、UEA-1 と同様に強い反応特異性を認めた (図 9)。実際、UEA-1



FUT1, FUT2発現トランスフェクダントに対するNKM 16-2-4およびUEA-1の特異性

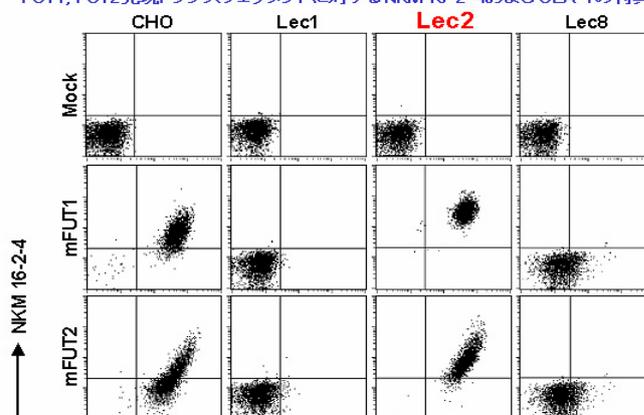


図 9. M細胞特異的モノクローナル抗体NKM 16-2-4の認識抗原の同定

NKM 16-2-4は、FUT1およびFUT2によって修飾される $\alpha(1,2)$ フコースを認識し、その反応性はシアル酸の存在によって変動することが明らかとなった。

の反応性は過剰量の α -L-フコースの前処理で完全に消失するのに対し、本抗体の反応性は全く変化しなかったことから、本抗体の認識構造は、UEA-1 とは異なり $\alpha(1,2)$ フコースのみでなく、 $\alpha(1,2)$ フコースを含む構造体であることが示唆された (図 9)。さらには、CHO 細胞由来シアル酸合成変異株として知られる Lec2 細胞に、上述した FUT1 および FUT2 遺伝子を導入した結果では、UEA-1 の反応性は変化しなかったのに対し、NKM 16-2-4 の反応性は大幅に向上することが明らかになった。本結果は、 $\alpha(1,2)$ フコース近傍に存在するシアル酸の存在によって、NKM 16-2-4 の反応性が消失 (もしくは減少) することを示すものであり、NKM 16-2-4 が多量のシアル酸を有する杯細胞を認識しない最大の理由と考えられた。

(4) NKM 16-2-4 をデリバリー分子としたM細胞標的型粘膜ワクチン

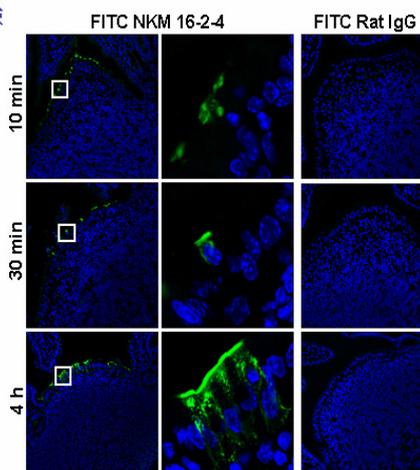
NKM 16-2-4 のM細胞標的型粘膜ワクチンのデリバリー分子としての応用性を追及することを目的とし、FITC 標識した NKM 16-2-4 および正常 Rat IgG を、パイエル板を含む腸管ループ内に投与しその後の動態を組織学的に追跡評価した。その結果、投与 10 分以内に NKM 16-2-4 はM細胞の管腔側に特異的に結合し、投与 30 分後には本抗体はM細胞内にトランスサイトシスにより移行され、投与後 4 時間以内に基底膜へ到達することが実証された (図 10)。正常 Rat IgG を用いた場合では、そのような効果は認められず、NKM 16-2-4 のM細胞

標的型粘膜ワクチンにおけるデリバリー分子としての応用性ならびにM細胞の高い抗原取り込み能力が改めて実証された。

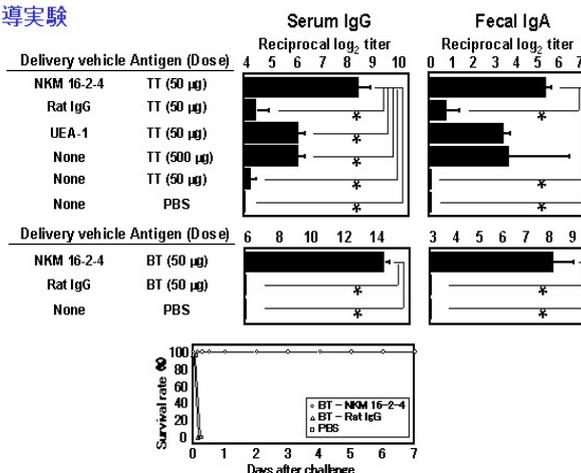
そこで、各種感染症に対するワクチン抗原（例、破傷風トキソイド；TT、ボツリヌストキソイド；BT）を NKM 16-2-4 とアビジン—ビオチン法により化学結合させたM細胞標的型粘膜ワクチンを開発し、粘膜

アジュバントとして用いたコレラトキシン（CT）とともにマウスに経口免疫することで、NKM 16-2-4 をデリバリー分子として応用したM細胞標的型粘膜ワクチンの免疫誘導効果を評価した。コントロールとして、正常 Rat IgG やM細胞に加え杯細胞に特異性を有する UEA-1 に結合させた各種ワクチン抗原および同量もしくは10倍量のワクチン抗原単体も合わせて調整し、CT とともに経口投与した。その結果、期待した通り、NKM 16-2-4 を用いたM細胞標的型粘膜ワクチンは、高レベルの抗原特異的免疫応答を全身系および粘膜系に誘導可能であることが明らかになった（図10）。また、その効果は正常 Rat IgG に結合させたワクチン抗原よりも有意に高く、さらには UEA-1 をデリ

腸管ループ実験



免疫誘導実験



NKM 16-2-4をM細胞標的型粘膜ワクチンのデリバリー分子として応用することで、高レベルの抗原特異的免疫応答を全身系のみならず粘膜系へ、またその予防効果も実証された。

図10. M細胞特異的のモノクローナル抗体の抗原送達分子としての機能

バリー分子とした場合よりも優れていた。この結果は、NKM 16-2-4 のM細胞への抗原デリバリー効果が、M細胞に加え杯細胞にも反応する UEA-1 を上回っていることを *in vivo* での免疫学的評価においても実証するものであり、またこの免疫誘導効果は、10倍量のワクチン単体投与時よりも高いことも実証され、NKM 16-2-4 をM細胞標的型粘膜ワクチンのデリバリー分子として応用することで、ワクチン投与量を 1/10 以下にまで低減可能であることが明らかになった。

さらには、10,000 LD₅₀ 量のボツリヌス毒素を用いたボツリヌス感染実験モデルにおいても、この NKM 16-2-4 を用いたM細胞標的型ボツリヌストキソイドを予め経口投与することで、100%の生存効果を保証できることが証明され（図10）、改めて、本M細胞標的型粘膜

ワクチンの粘膜感染症に対する予防ワクチンとしての応用性の高さが実証された。

(5)M細胞ワクチン送達法としてのコメ型ワクチン

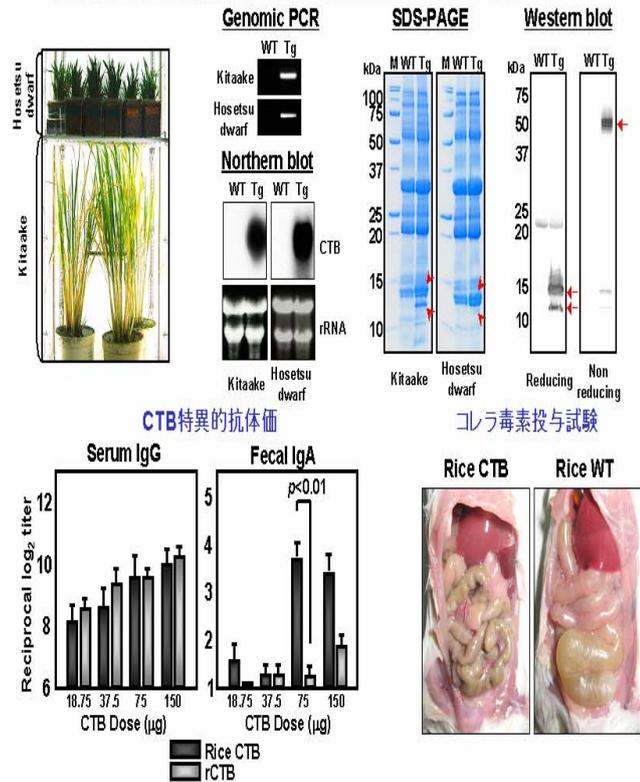
経口ワクチンは食餌性抗原と同様、消化管内に投与されることから、当然ペプシン等の各種消化酵素の分解対象と成り得る。食餌性タンパク抗原の場合、アミノ酸レベルに分解されることが、腸管上皮細胞からの栄養素としての体内吸収に必須であるが、ワクチン抗原の場合、抗原性を保持したまま(免疫誘導に必要なT細胞、

B細胞認識エピトープを保持したまま)、M細胞を含んだFAEに覆われているパイエル板などの粘膜免疫システム誘導組織に送達させることが必要である。我々が日常摂取する穀類の種子には、2種類のProtein body (PB)と

呼ばれるタンパク貯蔵器官 (PB-I および PB-II) が存在し、中でも我々が着目しているコメ種子には難消化性であるPB-Iが豊富に存在することが知られている。そこで本研究では、このPB (特にPB-I) をワクチン抗原の発現媒体として応用することで、消化酵素に対して耐性を有するワクチン開発を展開した(図11)。

コレラワクチンとして頻用されるコレラ毒素Bサブユニット (CTB) をモデル抗原とし、その遺伝子をPB特異的プロモーター制御の下、アグロバクテリウム法により遺伝子導入した(図11)。CTB発現コメは、種子一粒(約20ミリグラム)あたり、約30マイクログラムのCTB蓄積が認められた。また抗CTB抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析の結果、CTBの大半は上述したPB内に局在し、水溶性CTBが完全に分解される条件でのペプシン処理に対しても殆ど分解されなかった。本結果は、PB (特にPB-I) を経口ワクチンの発現媒体とすることで、消化管内での安定性を大幅に向上可能であることを直接的に示すものであり、本ワクチンが免疫原性を保持した状態でパイエル板などの誘導組織に送達可能であることを示唆するものであった。事実、マウスに投与したコメ型CTBはパイエル板に局在する抗原取り込みM細胞によって選択的に取り込まれた(図12)。その結果CTB特異的免疫応答が全身系の

安定性・長期保存性に優れたコメ型経口ワクチン



コメ型経口ワクチンは、消化管内での安定性、常温下での長期保存性に優れており、また効果的に抗原特異的免疫応答の誘導も可能であり、中和効果も実証されました。

図 11. コメ型ワクチン開発に向けての試み

みならず粘膜系に誘導されることが実証された（図11）。さらには、コレラ毒素を用いたコレラ感染実験モデルにおいても、コメ型CTBを事前に経口投与することで、コレラ感染症状の一つである下痢が効果的に抑制されることが実証され、コメ型ワクチンの予防効果が確認された（図11）。また、今回開発したコメ型ワクチンは、免疫原性を保持した状態で、少なくとも1.5年間の常温保存が可能であり、「コールドチェーンフリーワクチン」として、今後

ヒトでの臨床応用に向けた安価開発が期待される。現在は、コメ型ワクチンのM細胞指向性をさらに向上させる為にNKM 16-2-4モノクローナル抗体の単鎖（scFv）遺伝子導入米の作出を進めている。

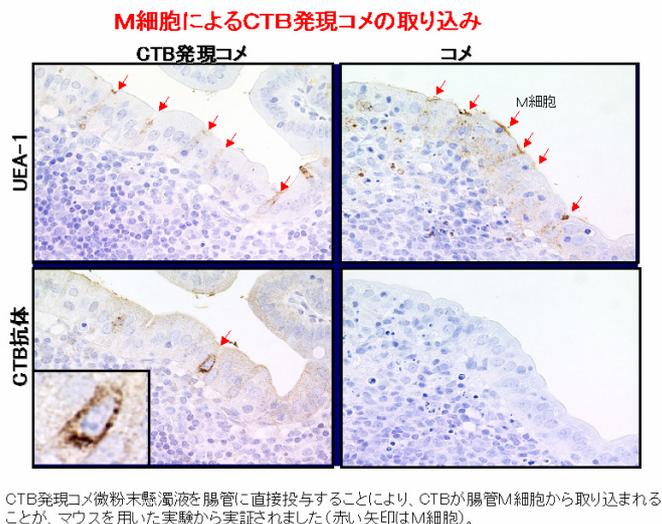


図12. コメ型ワクチンはM細胞に効果的に抗原を送達する

3-4 NALT組織形成統御因子とNALT非依存性抗原取り込み呼吸系M細胞

NALTはヒトワルダイエル扁桃輪に相当する二次リンパ組織と考えられており、腸管におけるパイエル板と同様の粘膜関連リンパ組織の一つである。ここ10年程のさかんな研究により末梢リンパ節やパイエル板に代表される二次リンパ組織形成のメカニズムは炎症性サイトカインの一つであるリンフォトキシン(lymphotoxin: LT)を中心としたサイトカインシグナルが必須であることが明らかとなった。リンパ組織形成が行われる胎生期においてLTを産生する唯一の細胞群であるCD3⁺CD4⁺CD45⁺(IL-7 receptor α^+)細胞がパイエル板やリンパ節の組織形成誘導細胞として必須であると考えられている。一方でNALTの形成過程についてはほとんど検討されていなかった。そこで我々はM細胞も含めた上気道免疫機構の解明を考えた時にNALTの形成メカニズムの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おこない以下の4点を明らかにした。

- 1)パイエル板は胎生15日に組織形成が開始しているが、NALTは出生後7日から10日にかけて組織形成が始まる。
- 2)パイエル板組織形成にはIL-7 receptor, LT, NIK (NF- κ B inducing kinase)などの分子が必須であるが、NALTに関してはこれらのすべての分子に対して非依存性である。
- 3)CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞は二次リンパ組織形成の誘導に重要であると考えられている。NALTにおいてもCD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞がリンパ組織形成に必須であるが、その詳細な生物学的特徴は異なる。
- 4)NALT依存ならび非依存抗原取り込み門戸としての呼吸系M細胞(Respiratory M cell)の存在。

(1) NALT組織形成とリンフォイドケモカイン

近年、リンパ組織形成においてケモカインの関与が注目されている。とくに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。そこで、本研究ではリンフォイドケモカインのNALT組織形成における役割を検討した。CXCL13^{-/-}マウスを用いた解析によると胎生期の腸管にはCD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞の集積を認めず、その結果、パイエル板は形成されなかった。ところがCXCL13^{-/-}マウスのNALT原基にはCD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞の集積が確認された。さらにCCL19及びCCL21の発現不全マウスである*plt/plt*マウスやCXCL13^{-/-}*plt/plt*マウスのNALT原基においても野生型マウスと同等のCD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞の集積を認めた。つまり、NALT組織形成初期段階ではリンフォイドケモカインは全く関与していない事が明らかになった(図13)。以上の結果から、パイエル板形成誘導細胞(Peyer's patch inducer: PPI)とNALT形成誘導細胞(NALT inducer: NALTi)はケモカインに対する依存性が異なる細胞集団である可能性が示唆された。そこで、胎生期

腸管と新生仔鼻腔組織から PPI と NALTi をそれぞれ単離し、ケモカインレセプターの発現を定量的 RT-PCR で解析した。PPI では CXCL13 のレセプター CXCR5 と CCL19/CCL21 のレセプター CCR7 の高い発現が確認されたものの NALTi では CXCR5、CCR7 ともに発現が低かった。FACS 解析により細胞表面における CXCR5 と CCR7 の発現を検討したところ、PPI においては CXCR5、CCR7 ともに発現が確認された。しかしながら NALTi においては両ケモカインレセプターがともに発現していないことが明らかとなった。この結果は PPI と NALTi が異なるサブセットである事を強く示唆するものである。

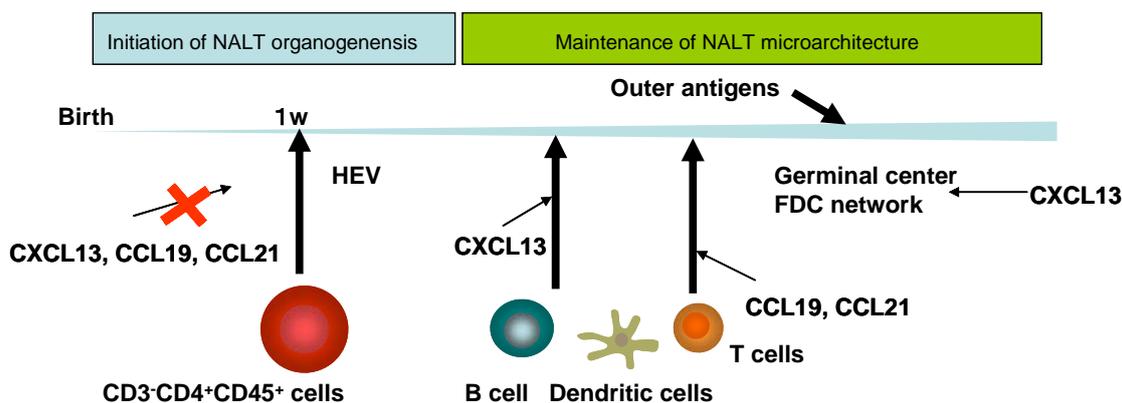


図 13 NALT 形成初期から成熟化にかけてのケモカイン依存性の経時的変化

リンフォイドケモカインは成体において恒常的に二次リンパ組織で産生が認められ、リンパ組織構築の維持・成熟化に重要な役割を果たしている。引き続き我々はリンフォイドケモカインの役割について、NALT 組織構築の維持・成熟化という観点から検討した。成体 CXCL13^{-/-}マウスの NALT では特に B 細胞の遊走が障害されており、NALT での B 細胞数は激減しており、B 細胞領域がほとんど認められなかった。コレラトキシンを用いた経鼻免疫により野生型マウスの NALT には胚中心が形成されるが、CXCL13^{-/-}マウスの NALT には胚中心は形成されなかった。さらに濾胞樹状細胞(follicular dendritic cell: FDC)のネットワークの形成も障害されていた。一方で成体 *plt/plt* マウスの NALT は T 細胞領域の形成不全を認めたものの、経鼻免疫後の胚中心や FDC ネットワーク形成は正常であった。以上の結果から胚中心形成や T/B 細胞領域など NALT 組織構築の成熟化には CXCL13、CCL19、CCL21 が必須であることが明らかとなった (図 13)。

(2) Interferon regulatory factor 1(IRF1) は NALT 形成に必須である

これまでの研究により NALTi と PPI は共に CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞として同定する事が出来るが、機能的にサイトカイン・ケモカイン依存性など全く異なる事が示唆されたため、NALT 形成メカニズムに特異的な遺伝子を同定するために NALTi と 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数多くの遺伝子群の中から炎症性サイトカインのマスター遺伝子としてよく知られている interferon

regulatory factor 1 (IRF1) に注目した。IRF1 の NALT 形成過程における役割を明らかにするために、IRF1 マウスの NALT 形成を検討した。驚くべきことに、IRF1 マウスではパイエル板やリンパ節の形成は正常であったが、NALT 形成は著しく障害されていた。新生仔鼻腔組織を用いて FACS 解析を行うと野生型と同様に IRF1^{-/-} マウスに CD3⁺CD4⁺CD45⁺ 細胞を認めたことから IRF1 は NALTi の分化には関与していないと考えられる。しかし IRF1^{-/-} マウスの新生仔鼻腔組織を共焦点顕微鏡により観察すると、NALT 原基への NALTi の集積が障害されていることが明らかとなった。したがって、IRF1 は NALTi の NALT 原基でのクラスター形成に重要な役割があることが示唆される(図 14)。本研究により、これまで未知であった NALT の組織形成機構に IRF1 が非常に重要な役割を果たすことを発見しただけでなく、PP やリンパ組織の発生を制御する誘導細胞とは異なるサブセットとして IRF1 陽性 NALTi のユニークな性質(CXCR5、CCR7 など)を明らかとすることができた(図 14)。

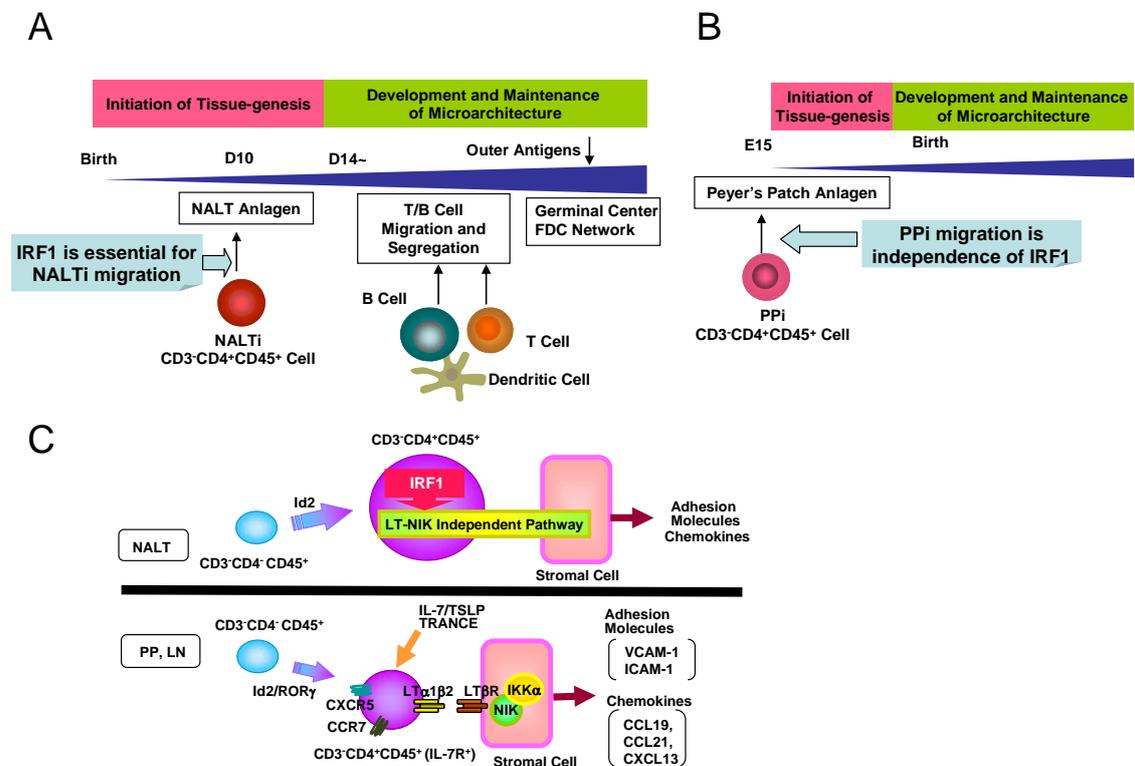


図 14 NALT 組織形成の特異性を反映する IRF1 依存性

A. IRF1 は NALTi に強発現し、NALTi の NALT 原基への遊走に重要な役割を演じる。B. PPi における IRF1 の発現は非常に弱く、PPi の PP 原基への遊走に IRF1 は関与しない。C. NALTi は IRF1⁺CXCR5⁺CCR7⁺CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞として同定され、その分化は Id2 によって制御される。一方、PPi は IRF1⁻CXCR5⁺CCR7⁺CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞として同定され、その分化は Id2 と RORγ によって制御される。

(3) NALT 非依存性抗原取り込み細胞としての呼吸系 M 細胞の発見

我々は続いて上気道免疫系における NALT の役割を解明する目的で NALT 形成不全マウ

スである CXCL13^{-/-}マウスを用いた解析を行った。CXCL13^{-/-}マウスに卵白アルブミン (ovalbumin: OVA)などの抗原と粘膜アジュバントとしてコレラ毒素を同時に経鼻投与すると、抗原特異的な免疫応答が認められた。この結果は NALT 非依存的な免疫誘導機構の存在を示唆するものである。M 細胞はトランスサイトーシス活性の高い抗原取り込み細胞であり、パイエル板などの誘導組織を覆う FAE に高頻度で存在する。最近、我々のグループは腸管粘膜においてパイエル板に関連しない一般腸管上皮細胞層にも M 細胞が発達することを見い出しており、新たな抗原取り込み口として絨毛 M 細胞が機能することを提唱している。そこで、マウスの鼻腔粘膜組織をもう一度組織学的に詳細に観察した。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-1 陽性の上皮細胞が NALT に関連しない一般鼻腔上皮の一部(鼻甲介部)に存在することを発見した(図 15)。この UEA-1 陽性細胞の形態を電子顕微鏡下に検討すると、パイエル板 M 細胞に特徴的な短い微絨毛を認めた (図 15)。次に、これらの UEA-1 陽性上皮細胞の抗原取り込み能を検討するために野生型マウスに蛍光標識した卵白アルブミン (DQTM ovalbumin)や r*Salmonella*-GFP を経鼻投与し、FACS 解析および組織学的解析をおこなった。その結果、鼻粘膜 UEA-1 陽性細胞に高頻度で経鼻投与した抗原由来の蛍光シグナルを認めた。さらに、これらの細胞群は M 細胞特異的モノクローナル抗体である NKM16-2-4 にも反応した(図 15)。よって、この NKM16-2-4 陽性、UEA-1 陽性細胞は高分子タンパク質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。以上の結果から、上気道粘膜面には NALT 非依存性の M 細胞様の抗原取り込み細胞が存在し、気道由来の抗原に対する特異的免疫応答に関与している事が示唆された。我々はこの細胞群を呼吸器系 M 細胞(Respiratory M cell)と呼ぶことを提唱している。

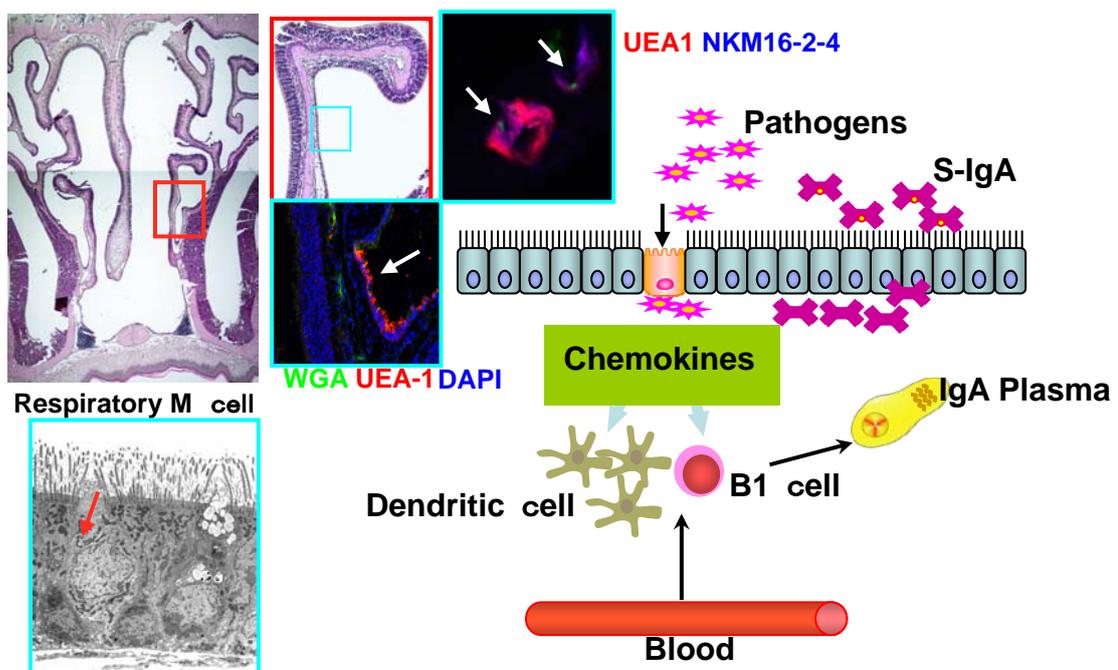


図 15 呼吸系 M 細胞(respiratory M cell)を介した新規抗原特異的抗体誘導メカニズム

次に我々は NALT 非依存性上気道免疫システムを解明するために、細菌性気道感染症の代表的な起原菌である肺炎球菌やインフルエンザ桿菌の主要な構成因子である phosphorylcholine (PC) を抗原として経鼻免疫実験を行った。野生型マウスでは3回の経鼻免疫によって鼻腔粘膜に PC 特異的 IgA 産生細胞を認め、鼻洗浄液中に PC 特異的 IgA の産生が誘導された (図 16)。

さらにこの PC 特異的免疫応答はマウスの肺炎球菌及びインフルエンザ桿菌の経鼻感染防御にも効果的である事も確かめた。

よって、単独抗原 PC によって複数の病原菌の感染を予防できる可能性が示唆された。次に NALT 形成不全マウスである CXCL13^{-/-}マウスを用いて同様の経鼻免疫実験を

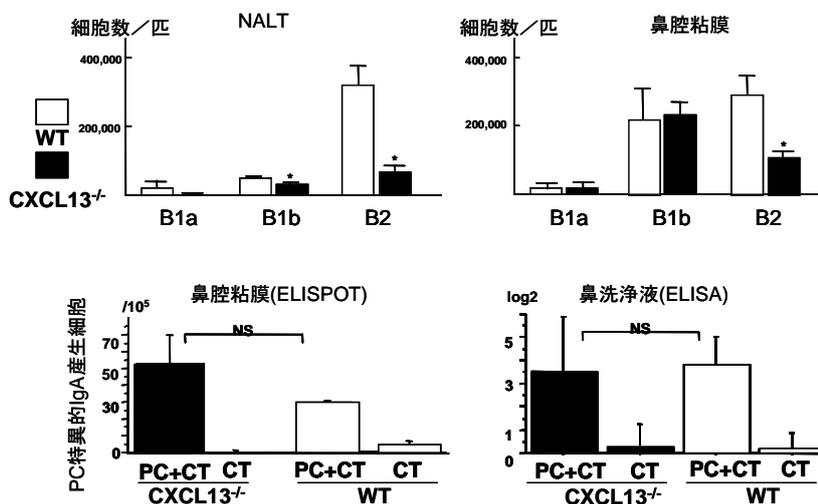


図16 抗原特異的鼻粘膜B細胞応答

行った。OVA の場合と同様に PC を抗原に用いた場合も CXCL13^{-/-}マウスの鼻腔粘膜に PC 特異的 IgA 産生が誘導された(図 16)。B1 細胞は腹腔や腸管、鼻腔粘膜に多く存在する B 細胞分画として知られている。そこで CXCL13^{-/-}マウスでの鼻腔粘膜 B1 細胞の役割について検討した。CXCL13 は腹腔 B1 細胞の維持に必須であり、CXCL13^{-/-}マウスの腹腔 B1 細胞数は著しく減少している。CXCL13^{-/-}マウスにおいては、NALT の B1, B2 細胞、鼻腔粘膜の B2 細胞が激減しているにもかかわらず、鼻腔粘膜の B1 細胞数は野生型と同程度維持されていることが確認された(図 16)。

この B1 細胞は CXCR5 の発現が観察されず、CXCL13/CXCR5 非依存的に鼻腔粘膜に遊走するものと考えられた。さらに鼻腔粘膜 IgM⁺ B1 細胞を LPS や TGFβ 等で *in vitro* 刺激するとクラススイッチに必須の AID の発現を認め、さらにその培養上清中に IgA 産生を認めた。以上の結果から IgA 産生能を備えた鼻腔粘膜 B1 細胞は NALT 非依存的に上気道粘膜免疫応答に関与していることが示唆された。

本研究によって鼻腔粘膜では NALT に関連しない鼻腔粘膜に存在する呼吸系 M 細胞によって抗原が取り込まれ、樹状細胞や B1 細胞によって NALT 非依存性に抗原特異的な粘膜免疫応答が誘導されている事実を示すことができた。

3-5. 粘膜免疫の基礎的解明（脂質メディエーター関連）

これまでの腸管免疫に関する研究においては、パイエル板などの粘膜免疫誘導組織に取り込まれた抗原に対する免疫応答である **Common Mucosal Immune System(CMIS)** 依存的免疫誘導経路に関する研究が中心的に進められてきた。しかしながら我々の研究より、パイエル板など免疫誘導組織以外の吸収上皮細胞層にも絨毛 M 細胞や呼吸器系 M 細胞と呼ばれる抗原取り込み細胞が存在し、**CMIS** 非依存的免疫誘導経路において重要な役割を担っていることが明らかとなった。この絨毛 M 細胞や呼吸系 M 細胞を起点とする **CMIS** 非依存的経路には、外来異物に対する速やかな反応を可能にするために、全身系免疫システムと共通の性質を示す免疫担当細胞群に加え、腸管免疫システムに特有の粘膜免疫担当細胞が備えられている。例えば、通常脾臓などで観察される B 細胞の多くはタンパク質を抗原とする抗体を産生する **B2 B** 細胞であるが、腸管固有層には **B1 B** 細胞と呼ばれる脂質や多糖などの微生物に共通で発現している T 細胞非依存的抗原特異的抗体を産生する B 細胞が多く存在する。また T 細胞においても、脾臓などでは抗原ペプチド/MHC 複合体を認識する $\alpha\beta$ 型 T 細胞受容体を発現する細胞 ($\alpha\beta$ T 細胞) がほぼ全てなのに対し、絨毛 M 細胞の存在する腸管上皮細胞層には、非古典的 MHC 分子を認識することで自然免疫に関与すると言われている $\gamma\delta$ 型 T 細胞受容体陽性細胞 ($\gamma\delta$ T 細胞) も存在する。すなわち、絨毛 M 細胞を起点とする **CMIS** 非依存的免疫システムにおいては、抗原認識機構の異なる T 細胞や B 細胞を配置することで、生体の最前線における防御機構を構築していると考えられる。これら **CMIS** 非依存的経路に存在する細胞の機能解明は、腸管免疫システムが有する生体防御の最前線としての特殊性を明らかにすることにつながると考えられる。

我々は **CMIS** 非依存的免疫システムを制御している分子として、脂質メディエーターの一つであるスフィンゴシン 1 リン酸に着目した。現在までに 5 種類のスフィンゴシン 1 リン酸受容体が同定されており、リンパ球においては 1 型の受容体の発現が認められる。リンパ球は胸腺や二次リンパ節などのリンパ組織からの移出の際、1 型スフィンゴシン 1 リン酸受容体の発現を上昇させることにより、血小板から産生されることで血中に高濃度存在するスフィンゴシン 1 リン酸の濃度勾配に反応し、二次リンパ節から血中へ移行する。このように全身系免疫システムにおけるスフィンゴシン 1 リン酸の重要性は徐々に明らかとなりつつあるが、腸管免疫システムにおけるスフィンゴシン 1 リン酸の関与、特に **CMIS** 非依存的免疫経路における役割についてはほとんど解明されていない。そこで本研究では、絨毛 M 細胞を起点とする **CMIS** 非依存的免疫誘導経路において機能する上皮細胞間リンパ球と **B1 B** 細胞の機能解明を目的に、スフィンゴシン 1 リン酸を介した遊走制御に関する研究を行った。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引き起こされると考えられる食物アレルギーの発症におけるスフィンゴシン 1 リン酸の影響についても検討した。

(1) スフィンゴシン1リン酸による分泌型 IgA 産生制御

腸管に多く存在する B1 B 細胞は脂質や多糖などの T 細胞非依存的抗原を認識する抗体を産生し、微生物を幅広く認識することで、絨毛 M 細胞を介して侵入してくる病原微生物や共生細菌の生体内への侵入を半ば非特異的に防いでいる。そこから産生される IgA 抗体は、腸管 IgA の約半分を占めると考えられており、腸管における生体防御において重要な役割を担っている。パイエル板に代表される粘膜免疫誘導リンパ組織の B 細胞の大部分を占める B2 B 細胞が骨髄で分化し、腸管に到達するのに対し、B1 B 細胞の少なくとも一部は胎生肝から分化し、腹腔から腸管へと遊走する。我々の研究結果から、B1 B 細胞の腹腔から腸管への遊走において、スフィンゴシン1リン酸が重要な役割を担っていることが判明した。腹腔 B 細胞はスフィンゴシン1リン酸受容体を高レベルで発現しており、スフィンゴシン1リン酸を介したシグナルを遮断することが知られている FTY720 で処理したマウスでは腹腔 B 細胞が減少することが確認された。この FTY720 の投与による腹腔 B 細胞の減少は、血中 B 細胞が骨髄に集積したことと、腹腔 B 細胞が腹腔の所属リンパ節である parathymic lymph node から移出できないことが一因であることが判明した。これらの効果により、

FTY720 で処理したマウスの腹腔 B 細胞は腸管に遊走することができなくなり、その結果、腸管分泌型 IgA の産生が減少していた (図 17)。次に B1 B 細胞から産生される T 細胞非依存的抗原に対する腸管 IgA の産生について検討を行った。肺炎などを引き起こす *Streptococcal pneumoniae* の死菌体を経口免疫すると *Streptococcal pneumoniae* に含まれる T 細胞非依存的抗原である phosphorylcholine に対する腸管 IgA の産生が誘導される。前述の FTY720 による腹腔 B 細胞の腸管への遊走抑制効果と相関し、*Streptococcal pneumoniae* の経口免疫により誘導される phosphorylcholine 特異的腸管 IgA の産生も、FTY720 で処理したマウスにおいて減少していた。上記の結果より、スフィンゴシン1リン酸は腹腔 B 細胞を中心とする CMIS 非依存的腸管 IgA の誘導経路において、重要な役割を担っていることが判明した。

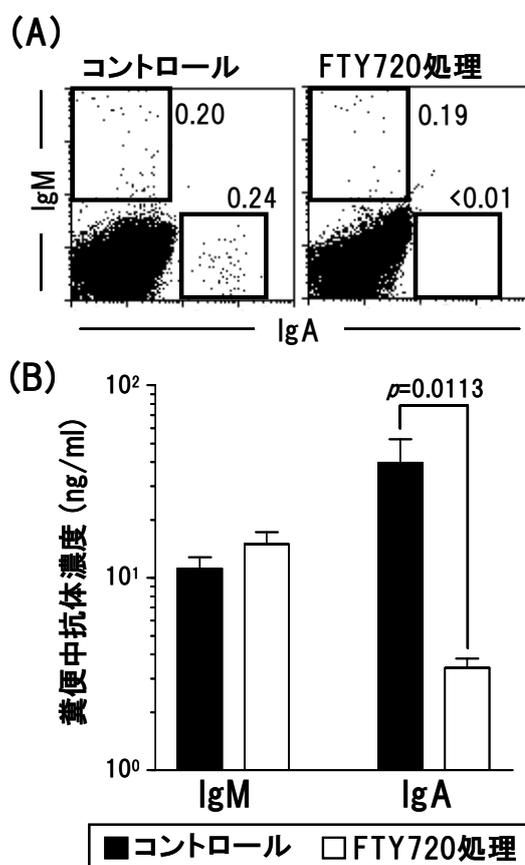


図17 スフィンゴシン1リン酸を介した腹腔B細胞由来腸管IgA産生制御 (A)SCIDマウスに腹腔由来B細胞を移入すると腸管にIgA陽性細胞が観察されるが(コントロール)、FTY720投与群では、IgA陽性細胞が観察されない(FTY720処理)。(B)同様に、FTY720投与マウスにおいては、腹腔B細胞由来の糞便中IgAの産生量も減少している。

(2) 上皮細胞間リンパ球の遊走制御におけるスフィンゴシン1リン酸の関与

腸管上皮細胞層に存在する上皮細胞間リンパ球は $\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞を混在させることで、絨毛M細胞を介して取り込まれた抗原の最初の接触部位である上皮細胞層における生体防御を行っている。最近の研究結果より、CD4もしくはCD8 $\alpha\beta$ を発現する上皮細胞間リンパ球は胸腺のシングルポジティブ細胞から分化するのに対し、 $\gamma\delta$ T細胞の主要構成細胞

であるCD8 $\alpha\alpha$ 発現細胞は、胸腺に存在するT細胞受容体陽性ダブルネガティブ細胞から分化することが明らかとなった。我々の研究結果から、これら異なる上皮細胞間リンパ球前駆細胞の胸腺から腸管への遊走において、スフィンゴシン1リン酸に対する依存性が異なることが判明した。FTY720で処理したマウスの上皮細胞間リンパ球においては、細胞数の減少が確認された。

FTY720に感受性を示す細胞について調べたところ、FTY720によって減少する細胞はCD4もしくはCD8 $\alpha\beta$ を発現している細胞のうち、ナイーブ細胞の表現型を示すものであった(図18)。一方、上皮細胞間リンパ球に含まれるユニークな細胞集団であるCD8 $\alpha\alpha$ 陽性上皮細胞間リンパ球は $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞共にFTY720に対して非感受性であった(図18)。そこでCD8 $\alpha\alpha$ 陽性上皮細胞間リンパ球の前駆細胞と考えられているT細胞受容体発現ダブルネガティブ胸腺細胞の遊走におけるスフィンゴシン1リン酸の関与について検討したところ、CD4もしくはCD8

を発現するシングルポジティブ胸腺細胞がスフィンゴシン1リン酸依存的に胸腺から移出するのに対し、T細胞受容体発現ダブルネガティブ胸腺細胞はスフィンゴシン1リン酸非依存的に胸腺から移出し、血中へ移行した後、腸管へ遊走することが判明した。これらの結果より、上皮細胞間リンパ球はスフィンゴシン1リン酸依存的経路を用いるCD4もしくはCD8 $\alpha\beta$ 陽性T細胞と、スフィンゴシン1リン酸非依存的に腸管へ遊走するT細胞受容体発現ダブルネガティブ胸腺細胞由来CD8 $\alpha\alpha$ 陽性T細胞に分類されることが明らかとなった。これら上皮細胞間リンパ球の遊走におけるスフィンゴシン1リン酸に対する異なる依存性は、腸管における生体防御の多様性をもたせるための一つの機構ではないかと考えている。

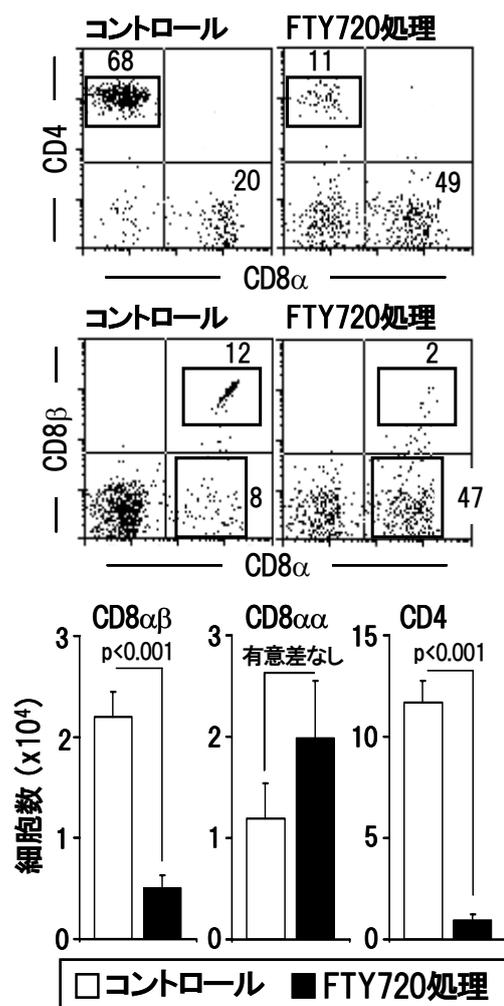


図18 上皮細胞間リンパ球の遊走制御における異なるスフィンゴシン1リン酸依存性 上皮細胞間リンパ球にはCD4、CD8 $\alpha\beta$ 、CD8 $\alpha\alpha$ をそれぞれ発現する細胞が存在する(コントロール)。FTY720投与後には、CD4陽性細胞ならびにCD8 $\alpha\beta$ 陽性細胞の減少が観察されるが、CD8 $\alpha\alpha$ 陽性細胞には変化が認められない(FTY720処理)。

(3) スフィンゴシン1リン酸を標的とした食物アレルギー予防・治療戦略

最近の我々の研究結果より、スフィンゴシン1リン酸が食物アレルギー発症に関わっており、その制御が治療標的の一つになることが判明した。我々が以前開発した食物アレルギーモデルにおいては、アレルゲンの全身感作により活性化されたT細胞が、同一アレルゲンの経口投与により大腸へ浸潤し、Th2型反応を示すことでアレルギー性下痢を引き起こす。アレルギー誘導時にFTY720処理を行い、スフィンゴシン1リン酸を介したシグナルを遮断すると、アレルギー性下痢の発症が完全に抑制された(図19A)。FTY720の投与によりアレルギー性下痢の発症が抑制されているマウスにおいては、全身感作された脾臓T細胞の大腸への遊走が阻害されていた。さらに興味深いことに、病原性T細胞だけではなく、アレルギー発症に関わっているマスト細胞の大腸への浸潤もFTY720の投与により抑制されていた(図19B)。詳細なメカニズムについては現在検討を進めているところであるが、これらの結果は、絨毛M細胞を含む吸収上皮細胞を介して取り込まれたアレルゲンにより引き起こされる病原性T細胞ならびにマスト細胞の遊走にスフィンゴシン1リン酸が関与していることを示した結果であり、スフィンゴシン1リン酸を介した病原性細胞の遊走制御を標的としたアレルギー疾患の予防・治療法の有効性を示唆するものである。

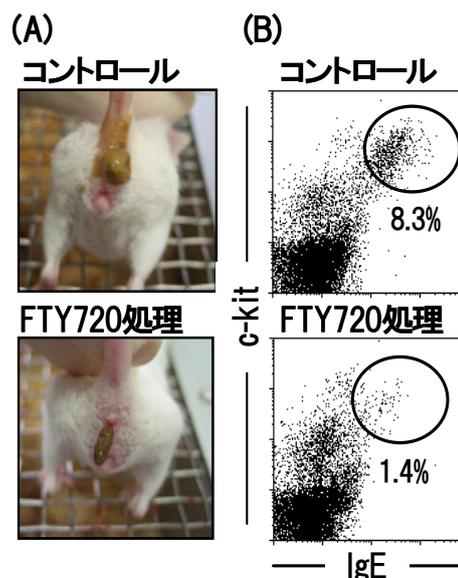


図19 食物アレルギー発症におけるスフィンゴシン1リン酸の関与 (A)アレルゲンの全身感作後、同一アレルゲンを経口投与するとアレルギー性下痢の発症が確認されるが(コントロール)、FTY720を投与すると下痢発症が抑制される(FTY720処理)。(B)FTY720投与により下痢の発症が抑制されたマウスでは、マスト細胞の浸潤抑制も観察された。

以上、我々の研究結果より、絨毛M細胞を介して誘導されるCMIS非依存的免疫経路においてスフィンゴシン1リン酸が重要な役割を担っていることが分かった(図20)。またCD8 α 陽性上皮細胞間リンパ球など一部の腸管特異的細胞は他のリンパ球と異なりスフィンゴシン1リン酸非依存的遊走経路を用いていることが明らかとなった。これは腸管免疫システムが有する全身系免疫システムとの共通性と独自性を示す一つの好例であると言える。またアレルギー発症に関与する病原性細胞の腸管への遊走にもスフィンゴシン1リン酸が関与していることが示された。これらの研究結果より、絨毛M細胞もしくは吸収上皮細胞を介して引き起こされる免疫誘導もしくは粘膜免疫疾患の発症において重要な役割を担っているスフィンゴシン1リン酸を標的とした新規粘膜免疫療法が構築できるものと期待される。

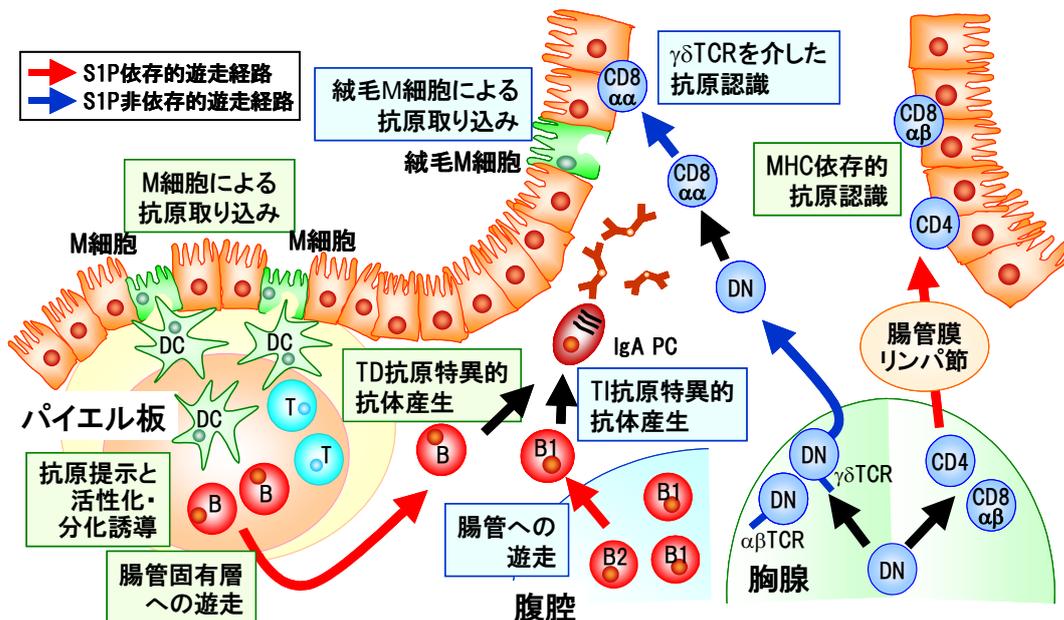


図20 M細胞ならびに絨毛M細胞を介した免疫誘導経路におけるスフィンゴシン1リン酸(S1P)依存性

M細胞を介してパイエル板内に取り込まれた抗原は樹状細胞(DC)を介したリンパ球の活性化ならびに分化誘導を引き起こす。IgA陽性B細胞へと分化したB細胞はS1P依存的にパイエル板を移出し、腸管固有層へと遊走した後、IgA産生形質細胞(PC)へと分化し、T細胞依存的(TD)抗原に対するIgAを産生する。一方、腹腔から腸管へとS1P依存的に遊走してきたB1細胞は、絨毛M細胞を介して取り込まれた抗原のうち、T細胞非依存的(TI)抗原に対するIgAを産生する。一方、上皮間リンパ球の遊走においては異なるS1P依存性が認められる。胸腺で分化したCD4もしくはCD8 $\alpha\beta$ 細胞は、S1P依存的に胸腺から移出した後、腸管膜リンパ節などを経て、腸管上皮細胞層へと移行し、MHC依存的抗原認識により異物を排除する。一方、T細胞受容体(TCR)を発現する胸腺ダブルネガティブ(DN)細胞を前駆細胞とするCD8 $\alpha\alpha$ 細胞はS1P非依存的に胸腺から腸管へ移行した後、 $\gamma\delta$ TCRを始めとする自然免疫系抗原認識により絨毛M細胞を介して侵入してきた異物の排除を行う。

4 研究参加者

研究グループ名：東京大学医科学研究所 炎症免疫学

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
清野 宏	東京大学 医科学研究所	教授	総括	H14.11- H19.10	
幸 義和	東京大学 医科学研究所	助教	M 細胞標的ワクチン	H14.11- H19.10	
福山聡	東京大学 医科学研究所	ポスト・ ドクトラル フェロー	NALT-M 細胞	H14.11- H19.10	
野地 智法	東京大学 医科学研究所	院生 ポスト・ ドクトラル フェロー	ハ イエル板 M 細胞 mAb M 細胞標的ワクチン	H14.11- H17.3 H17.4- H19.10	CREST 研究員
寺原 和孝	東京大学 医科学研究所	ポスト・ ドクトラル フェロー	M 細胞特異的遺伝子	H15.4- H19.10	CRECT 研究員
國澤 純	東京大学 医科学研究所	講師	M 細胞/粘膜免疫	H16.5 - H19.10	
五十嵐 脩	東京大学 医科学研究所	技官	M 細胞/FUT	H14.11- H19.10	
日野 綾子	東京大学 医科学研究所	技官	Villous M 細胞	H14.11- H17.3	
廣井 隆親	東京大学 医科学研究所	助教	腸管・NALT-M 細胞	H14.11- H17.11	
黒河 志保	東京大学 医科学研究所	実験 補助	M 細胞/FUT	H15.1-H18.8	CREST 研究 補助員
秋山 真愛	東京大学 医科学研究所	研究 補助	ハ イエル板 M 細胞mAb	H.15.1 - H16.9	CREST 研究 補助員

佐藤美恵子	東京大学 医科学研究所	実験 補助	動物管理	H16.5 – H18.2	CREST 研究 補助員
朴 恩正	大阪大学微生物 病研究所	院生	M 細胞特異的遺伝子	H15.4-H16.3	CREST 研究 補助員
柴田 壮子	東京大学 医科学研究所	事務 補佐	事務一般	H15.4 – H15.7	CREST 事務員
尾高 慶子	東京大学 医科学研究所	事務 補佐	事務一般	H15.9 – H17.4	CREST 事務員
富田 詠子	東京大学 医科学研究所	事務 補佐	データ管理	H16.8 – H.17.6	CREST 事務員
森 昌子	東京大学 医科学研究所	実験 補助	M 細胞特異的遺伝子	H16.8 – H17.11	CREST 研究 補助員
国立 美恵	東京大学 医科学研究所	実験 補助	データ処理	H16.8- H17.3	CREST 研究 補助員
金 南洲	東京大学 医科学研究所	実験 補助	M 細胞株	H16.2 – H.17.2	CREST 研究 補助員
松村亜紀子	東京大学 医科学研究所	実験 補助	M 細胞リガンド	H17.4. – H19.10	CREST 研究 補助員
山中未来	東京大学 医科学研究所	実験 補助	M 細胞標的ワクチン	H17.6- H18.3	CREST 研究 補助員
向井千文	東京大学 医科学研究所	事務 補佐 実験 補助	データ管理	H17.6 - H18.3 H18.4 - H19.3	CREST 事務員 CREST 研究 補助員
目島未央	東京大学 医科学研究所	実験 補助	M 細胞特異抗体遺伝 子	H18.1 - H19.3	CREST 研究 補助員
小河原郁子	東京大学	実験	動物管理	H18.4 - H19.10	CREST 研究

石川いずみ	医科学研究所 東京大学 医科学研究所	補助 実験 補助	NALT-M 細胞	H18.4 - H19.3	補助員 CREST 研究 補助員
里永佳代	東京大学 医科学研究所	事務 補佐	事務一般	H18.4 - H19.10	CREST 事務員

5. 招聘した研究者等

なし

6 成果発表等

(1) 原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 47 件)

Kinoshita, N., Hiroi, T., Ohta, N., Fukuyama, S., Park, E.J. and Kiyono, H. Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells. *J. Immunol.* 169: 6187-6192, 2002.

Kweon, MN., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., Van Ginkel, FW., Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., McGhee, JR. and Kiyono, H. A nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE antibodies. *J. Infect. Dis.* 186: 1261-1269, 2002.

Kawahara, M., Matsuno, K., Nakasone, T., Hiroi, T., Kiyono, H., Matsumoto, S., Yamada, T., Yamamoto, N. and Honda, M. Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 21: 158-166, 2002.

Tamagawa, H., Takahashi, I., Furuse, M., Yoshitake-Kitano, Y., Tsukita, S., Itoh, T., Matsuda, H. and Kiyono, H. Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches: preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region. *Lab. Invest.* 83: 1045-1053, 2003.

Park, E.J., Takahashi, I., Ikeda, J., Kawahara, K., Okamoto, T., Kweon, MN., Fukuyama, S., Groh, V., Spies, T., Obata, Y., Miyazaki, J. and Kiyono, H. Clonal expansion of double-positive (DP) IELs by MICA expressed in mouse small intestinal epithelium. *J. Immunol.* 171: 4131-4139, 2003.

Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, JK., Ohta, N., Iwatani, K., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, MN., Kawano, S., Sasaki, Y., Hori, M., Takeda, K., Akira, S. and Kiyono, H. Development of colitis in STAT6-deficient TCR α ^{-/-}mice: a potential of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4⁺ββ cells. *Am. J. Pathol.* 162: 263-271, 2003.

Kobayashi, M., Kweon, MN., Kuwata, H., Schreiber, R.D., Kiyono, H., Takeda, K., and Akira, S. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 111: 1297-1308, 2003.

Boyaka, PN., Ohmura, M., Fujihashi, K., Koga, T., Yamamoto, M., Kweon, MN., Takeda, Y., Jackson, R.J., Kiyono, H., Yuki, Y. and McGhee JR. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J. Immunol.* 170: 454-462, 2003.

Hagiwara, Y., McGhee, JR., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y., Kweon, MN., Tamura, S., Kurata, T., Takeda, Y., Kiyono, H. and Fujihashi, K. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4⁺ T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J. Immunol.* 15: 1754-1762, 2003.

Jang, MH., Kweon, MN., Hiroi, T., Yamamoto, M., Takahashi, I. and Kiyono, H. Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by cholera toxin-treated bone marrow-derived dendritic cells. *Vaccine* 21: 1613-1619, 2003.

Sakaue G., Hiroi T., Nakagawa Y., Someya K., Iwatani K., Sawa Y., Takahashi H., Honda M., Kunisawa J. and Kiyono H. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160-encapsulated hemagglutinating virus of Japan-liposome induces antigen-specific CTLs and neutralizing antibody responses. *J. Immunol.* 170: 495-502, 2003.

Hino, A., Kweon, MN., Fujihashi, K., McGhee JR. and Kiyono, H. Pathological role of large intestinal IL-12p40 for the induction of Th2-type allergic diarrhea. **Am. J. Pathol.** 164: 1327-1335, 2004.

Jang, MH., Kweon, MN., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, C., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y. and Kiyono, H. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 101: 6110-6115, 2004.

Nochi, T., Yuki, Y., Terahara, K., Hino, A., Kunisawa, J., Kweon, MN., Yamaguchi, T. and Kiyono, H. Biological role of Ep-CAM in the physical interaction between epithelial cells and lymphocytes in intestinal epithelium. **Clin. Immunol.** 113: 326-339, 2004.

Ohmura-Hoshino, M., Yamamoto, M., Yuki, Y., Takeda, Y. and Kiyono, H. Non-toxic Stx derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for mucosal immunity. **Vaccine** 22: 3751-3761, 2004.

Mizushima, T., Ito, T., Kishi, D., Kai, Y., Tamagawa, H., Nezu, R., Kiyono, H. and Matsuda, H. Therapeutic effects of a new lymphocyte homing reagent FTY720 in interleukin-10 gene-deficient mice with colitis. **Inflamm. Bowel Dis.** 10: 182-192, 2004.

Yamamoto, M., Kweon, MN., Rennert, PD., Hiroi, T., Fujihashi, K., McGhee, JR. and Kiyono, H. Role of gut-associated lymphoreticular tissues in antigen-specific intestinal IgA immunity. **J. Immunol.** 173: 762-769, 2004.

Shikina, T., Hiroi, T., Iwatani, K., Jang, MH., Fukuyama, S., Tamura, M., Kubo, T., Ishikawa, H. and Kiyono, H. IgA class switch occurs in the organized nasopharynx- and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. **J. Immunol.** 172: 6259-6264, 2004.

Ueta, M., Nochi, T., Jang, MH., Park, EJ., Igarashi, O., Hino, A., Kawasaki, S., Shikina, T., Hiroi, T., Kinoshita, S. and Kiyono, H. Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. **J. Immunol.** 173: 3337-3347, 2004.

Kai, Y., Takahashi, I., Ishikawa, H., Hiroi, T., Mizushima, T., Matsuda, C., Kishi, D., Hamada, H., Tamagawa, H., Ito, T., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Matsuda, H. and Kiyono, H. Colitis in mice lacking the common cytokine receptor gamma chain is mediated by IL-6-producing CD4⁺ T cells. **Gastroenterology** 128: 922-34, 2005.

Kweon, MN., Yamamoto, M., Rennert, PD., Park, EJ., Lee, AY., Chang, SY., Hiroi, T., Nanno, M. and Kiyono, H. Prenatal blockage of lymphotoxin receptor and TNF receptor p55 signaling cascade resulted in the acceleration of tissue genesis for isolated lymphoid follicles in the large intestine. **J. Immunol.** 174: 4365-72, 2005.

Kobayashi, R., Kohda, T., Kataoka, K., Ihara, H., Kozaki, S., Pascual, DW., Staats, HF., Kiyono, H., McGhee, JR. and Fujihashi, K. A novel neurotoxoid vaccine prevents mucosal botulism. **J. Immunol.** 174: 2190-2195, 2005.

Nonaka, S., Naito, T., Chen, H., Yamamoto, M., Moro, K., Kiyono, H., Hamada, H. and Ishikawa, H. Intestinal gamma delta T cells develop in mice lacking thymus, all lymph nodes, Peyer's patches, and isolated lymphoid follicles. **J. Immunol.** 174: 1906-1912, 2005.

Ueta, M., Hamuro, J., Kiyono, H. and Kinoshita, S. Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 331: 285-294, 2005.

Hino, A., Fukuyama, S., Kataoka, K., Kweon, MN., Fujihashi, K. and Kiyono, H. Nasal IL-12p70DNA prevents and treats intestinal allergic diarrhea. **J. Immunol.** 174: 423-7432, 2005.

Ohmura, M., Yamamoto, M., Tomiyama-Miyaji, C., Yuki, Y., Takeda, Y., and Kiyono, H. Nontoxic Shiga toxin

derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for the augmentation of antigen-specific immune responses via dendritic cell activation. **Infect. Immun.** 73: 4088-4097, 2005.

Yuki, Y., Hara-Yokoyama, C., Guadiz, AA., Udaka, S., Kiyono, H. and Chatterjee, S. Production of a recombinant cholera toxin B subunit-insulin B chain peptide hybrid protein by *Brevibacillus choshinensis* expression system as a nasal vaccine against autoimmune diabetes. **Biotechnol. Bioeng.** 92: 803-809, 2005.

Takagi, H., Hiroi, T., Yang, L., Tada, Y., Yuki, Y., Takamura, K., Ishimitsu, R., Kawauchi, H., Kiyono, H. and Takaiwa, F. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induce oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 102: 17525-17530, 2005.

Jang, MH., Sougawa, N., Tanaka, T., Hirata, T., Hiroi, T., Tohya, K., Guo, Z., Umemoto, E., Yang, B., Seoh, JY., Kiyono, H. and Miyasaka, M. CCR7 is critically important for migration of immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. **J. Immunol.** 176: 803-810, 2006.

Fukuyama, S., Nagatake, T., Kim, DY., Takamura, K., Park, EJ., Kaisho, T., Tanaka, N., Kurono, Y. and Kiyono, H. Uniqueness of lymphoid chemokine requirement for the initiation and maturation of NALT organogenesis. **J. Immunol.** 177: 4276-4280. 2006. (Cutting Edge)

Duverger, A., Jackson, RJ, van Ginkel, FW, Fischer, R., Tafaro, A., Leppla, SH., Fujihashi, K., Kiyono, H., McGhee, JR. and Boyaka, PN. *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens. **J. Immunol.** 176: 1776-1783, 2006.

Hagiwara, Y., Kawamura, YI., Kataoka, K., Rahima, B., Jackson, RJ., Komase, K., Dohi, T., Boyaka, PN., Takeda, Y., Kiyono, H., McGhee, JR. and Fujihashi, K. A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. **J. Immunol.** 177: 3045-3054, 2006.

Maddaloni, M., Staats, HF., Mierzejewska, D., Hoyt, T., Robonson, A., Callis, G., Kozaki, S., Kiyono, H., McGhee, JR., Fujihashi, K. and Pascual, DW. Mucosal vaccine targeting improves onset of mucosal and systemic immunity to *Botulinum* neurotoxin A. **J. Immunol.** 177: 5524-5432, 2006.

Kim, NJ., Kunisawa, J., Kweon, MN, Eog, JG. and Kiyono, H. Oral feeding of *Bifidobacterium bifidum* (BGN4) prevents CD4⁺ CD45RB (high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. **Clin. Immunol.** 123: 30-39, 2007.

Kunisawa, J., Kurashima, Y., Gohda, M., Higuchi, M., Ishikawa, I., Ogahara, I. and Kiyono, H. Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B cell trafficking for subsequent intestinal IgA production. **Blood** 109: 3749-3756, 2007.

Takayama, N., Igarashi, O., Kweon, MN. and Kiyono, H. Regulatory role of Peyer's patches for the inhibition of OVA-induced allergic diarrhea. **Clin. Immunol.** 123: 199-208, 2007.

Tamagawa, H., Hiroi, T., Mizushima, T., Ito, T., Matsuda, H. and Kiyono, H. Therapeutic effects of roxithromycin in interleukin -10-deficient colitis. **Inflamm. Bowel Dis.** 13: 547-556, 2007.

Nochi, T., Takagi, H., Yuki, Y., Yang, L., Matsumura, T., Mejima, M., Nakanishi, U., Matsumura, A., Uozumi, A., Hiroi, T., Morita, S., Tanaka, K., Takaiwa, F. and Kiyono, H. Rice-based mucosal vaccine: a new global strategy for cold-chain and needle free vaccination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 104: 10986-10991, 2007.

Kurashima, Y., Kunisawa, J., Higuchi, M., Gohda, M., Shimizu, M., Takayama, N. and Kiyono, H. Sphingosine 1-phosphate- mediated trafficking of pathogenic Th2 and mast cells for the control of food allergy. **J. Immunol.** 179: 1577-1585, 2007.

Nagai, S., Mimuro, H., Yamada, H., Baba, Y., Moro, K., Nochi, T., Kiyono, H., Suzuki, T., Sasakawa, C. and Koyasu, S. Role of Peyer's patches in the induction of Helicobacter pylori-induced gastritis. **Proc. Natl. Acad.**

Sci. USA. 104: 8971-8976, 2007.

Tanaka, N., Fukuyama, S., Fukuiwa, T., Kawabata, M., Sagara, Y., Ito, HO., Miwa, Y., Nagatake, T., Kiyono, H. and Kurono, Y. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. **Vaccine** 25: 2680-2687, 2007.

Makita, S., Kanai, T., Nemoto, Y., Totsuka, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Yamamoto, M., Kiyono, H. and Watanabem M. Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. **J. Immunol.** 178: 4937-4946, 2007.

Ohka, S., Igarashi, H., Nagata, N., Sakai, M., Nochi, T., Kiyono, H. and Nomoto, A. Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor. **J. Virol.** 81: 7902-7912, 2007.

Kunisawa, J., Kurashima, Y., Higuchi, M., Gohda, M., Ishikawa, I., Ogahara, I., Kim, N., Shimizu, M. and Kiyono, H. Sphingosine 1-phosphate dependence in the regulation of lymphocyte trafficking to the gut epithelium. **J. Exp. Med.** 204: 2335-2348, 2007.

Takamura, K., Fukuyama, S., Nagatake, T., Kim, DY., Kawamura, A., Kawauchi, H. and Kiyono, H. Regulatory role of lymphoid chemokine CCL19 and CCL21 in the control of allergic rhinitis. **J. Immunol.** 179: 5897-5906, 2007.

Nochi, T., Yuki, Y., Matsumura, A., Mejima, M., Terahara, K., Kim, DY., Fukuyama, S., Igarashi, O. and Kiyono, H. New generation of mucosal vaccine: Novel M cell specific carbohydrate-targeted vaccination is effective for the induction of antigen-specific immune responses. **J. Exp. Med.** 204: 2789-2796, 2007.

Terahara, T., Igarashi, O., Yoshida, M., Nochi, T., Kurokawa, S., Takayama, N., Yuki, Y., Low, AW. and Kiyono, H. Comprehensive gene expression analysis among Peyer's patch M cells, villous M cells and intestinal epithelial cells by DNA microarray analysis. **J. Immunol.** 2007. (in press)

(2) その他の著作物 (総説、書籍など)

① 総説

(英文)

Kweon, MN. and Kiyono, H. Eosinophilic gastroenteritis: a problem of the mucosal immune system? **Curr. Allergy Asthma Rep.** 3: 79-85, 2003.

Yuki, Y. and Kiyono, H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. **Rev. Med. Virol.** 13: 293-310, 2003.

Kiyono, H. and Fukuyama, S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. **Nat. Rev. Immunol.** 4: 699-710, 2004.

Kunisawa, J. and Kiyono, H. A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense. **Cell. Mol. Life Sci.** 62: 1308-1321, 2005.

Kunisawa, J., Fukuyama, S. and Kiyono, H. Mucosa-associated lymphoid tissues in the aerodigestive tract: their shared and divergent traits and their importance to the orchestration of the mucosal immune system. **Curr. Mol. Med.** 5: 557-572, 2005.

Kunisawa, J., Takahashi, I. and Kiyono, H. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. **Immunol. Rev.** 215: 136-153, 2007.

McGhee, JR., Kunisawa, J. and Kiyono, H. Gut lymphocyte migration: we are halfway 'home'. **Trends Immunol.** 28: 150-153, 2007.

Yuki, Y., Nochi, T. and Kiyono, H. Progress towards an AIDS mucosal vaccine: an overview. *Tuberculosis* 87: S35-44, 2007.

Fukuyama, S. and Kiyono, H. Neuroregulator RET initiates Peyer's-patch tissue genesis. *Immunity* 26: 393-395, 2007.

(和文)

幸 義和 清野 宏 M細胞：その発達と機能 **PNE** 47: 1115-1120 2002

清野 宏, 幸 義和, 高橋一郎 粘膜免疫による感染症制御：次世代型ワクチン開発に向けての展開 **日本医学会雑誌** 130: 41-44 2003

福山聡、黒野祐一、清野宏 上気道、消化管における粘膜関連リンパ組織形成プログラムからみた粘膜免疫の特異性 **化学療法の領域** 19: 1733-1739: 2003

幸 義和 植物ワクチンの応用—食べるワクチン **科学療法の領域** 19: 71-76 2003

福山聡, 黒野祐一, 清野 宏 NALT 形成過程における組織構築の特異性. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー 21(2) 12-13, 2003

福山聡, 識名崇, 黒野祐一, 清野 宏 NALT の形成と機能発現における LT と NIK の役割. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー 21(1) 15-18, 2003.

五十嵐 脩, 清野 宏 粘膜ワクチン開発に向けての基礎研究と最近の展望. **J. Vet. Med.** 157: 743-747, 2004.

幸 義和 清野 宏 花粉症緩和米 **医学のあゆみ** 208: 112-113, 2004.

幸 義和 清野 宏 新興再興感染症のための粘膜ワクチン **細胞工学** 23:801-805, 2004

國澤 純 粘膜免疫システムを用いた粘膜ワクチンならびに免疫療法の開発 **Drug Delivery System** 19: 396-397, 2004.

長竹貴広、福山聡、清野 宏 粘膜免疫と免疫寛容 **アレルギー科**, 18: 467-475: 2004.

野地 智法、清野 宏 粘膜免疫、**臨床免疫学(上)** 63: 14-19, 2005.

山本正文、清野 宏 粘膜免疫による生体防御機構 **臨床免疫学(上)** 63: 447-453, 2005

野地 智法、清野 宏 腸管粘膜免疫の特殊性、**日本医師会雑誌** 134: 43-45, 2005.

寺原和孝、清野 宏 粘膜 M 細胞の新機能 **Annual Review 免疫** 142-150, 2005.

寺原和孝、清野 宏 M細胞生物学の新たな展開—抗原取り込み機構と絨毛M細胞の発見 **第28回阿蘇シンポジウム記録** 99-110, 2005.

幸 義和 清野 宏 感染症予防のための粘膜ワクチンの開発 **実験医学** 23: 2748-2753, 2005.

幸 義和 自己免疫性糖尿病に対する経鼻ワクチンの効果 **臨床免疫** 44. 155-159, 2005

國澤 純 CTL 誘導における抗原提示中間体形成機構の解明 **感染・炎症・免疫** 35: 60-63, 2005.

- 國澤 純 粘膜免疫の特徴と粘膜ワクチンの開発 **生物工学会誌** 83: 246, 2005
- 倉島洋介、國澤 純、清野 宏 腸内感染防御システムとしての粘膜免疫 **最新医学** 3: 115-123, 2005.
- 長竹貴広、福山聡、清野 宏 NALTの形成とケモカイン **臨床免疫** 43: 12-17, **Curr Pharm Des.** 12:4203-13, 2006.
- 吉田理人、五十嵐脩、寺原和孝、清野宏 繊毛 M 細胞の形態と機能. **臨床免疫.** 45:236-242, 2006.
- 後藤 義幸、清野 宏 粘膜免疫システムのユニーク性と疾患・治療応用 **実験医学誌** 24: 1337-1342, 2006.
- 廣井隆親、小幡高士、清野宏 粘膜免疫における IgA クラススイッチ **Molecular Medicine** 42: 342-35, 2006.
- 國澤 純 である？ or とどまる？ -スフィンゴシン 1 リン酸を介した免疫制御- **ファルマシア** 42: 1158-1159, 2006.
- 長竹貴広、福山 聡、清野 宏 粘膜免疫機構とケモカイン **アレルギー・免疫** 13: 38-44, 2006.
- 長竹貴広、福山 聡、清野 宏 マウスにおけるNALT単核球分離法 **日本免疫学会会報** 14: 21, 2006.
- 廣井隆親、塚越百合子、清野 宏 粘膜系好酸球様樹状細胞による免疫寛容制御 **感染と免疫** 221-230, 2007.
- 野地 智法、清野 宏 粘膜ワクチンの近未来、**医学のあゆみ** 221: 917-920, 2007.
- 武富孝治、清野宏 免疫学のニューワールド 粘膜免疫 **国際歯科学士会日本部会雑誌** 38:12-16, 2007
- 武富孝治、清野宏 免疫学の新世界：粘膜免疫 **東京都歯科医師会雑誌** 55 11-17, 2007.
- 幸 義和 清野 宏 感染症粘膜ワクチンの開発 **呼吸器科** 12:66-71, 2007.
- 高村薫、福山聡、清野 宏. 気道の局所免疫 **小児内科** 39: 17-25, 2007.
- 國澤 純、清野 宏 脂質メディエーターによる腸管免疫制御 **実験医学** 25:147-155, 2007
- 國澤 純、合田昌史、清野 宏 粘膜系免疫機構の解析と粘膜ワクチンの開発 **薬学雑誌** 127:319-26, 2007
- 小幡高士、清野 宏 粘膜免疫と共生細菌 **腸内細菌学雑誌** 10 21:277-287, 2007
- 國澤 純、清野 宏 粘膜免疫の分子生物学 **The Frontiers in Medical Sciences** 144-153, 2007.
- 福山聡、長竹貴広、清野 宏 呼吸器関連リンパ組織の組織形成と免疫学的機能 **実験医学増刊号** 25 20:66-72, 2007
- 森倉一朗、福山聡、清野 宏 呼吸器関連リンパ組織形成とケモカイン **臨床免疫・アレルギー科** Vol 48 4:448-455, 2007

野地智法、清野宏 次世代型経口ワクチンによる粘膜感染症予防法の開発 実験医学
増刊号132 163-169, 2007
倉島洋介、國澤 純、清野 宏 粘膜免疫を介したアレルギー克服戦略 **アレルギー** 2007.
(印刷中)

②書籍

Fukuyama, S., Kweon, M-N., Yamamoto, M. and Kiyono H. Dynamism of the mucosal immune system: from tissue organogenesis to immunity. **Current Topics on Tonsils and Mucosal Barriers of Upper Airways**, ELSEVIER B.V., Amsterdam, The Netherlands. pp 33-39, 2003.

Fukuyama, S., Hiroi, T., Kurono, Y. and Kiyono, H. NALT-genesis is induced Id2 gene-dependent CD3-CD4⁺CD45⁺ cells. **Current Topics on Tonsils and Mucosal Barriers of Upper Airways** ELSEVIER B.V., Amsterdam, The Netherlands pp 181-184, 2003.

Ishikawa,H, Kanamori,Y., Hamada,H. and Kiyono,H. Development and function of organized gut-associated lymphoid tissues. In: Mestecky,J., Lamm,ME., Strober,W. Bienenstock,J., McGhee,JR. and Mayer,L. editors. **Mucosal Immunology 3rd**. ELSEVIER; Amsterdam, pp 385-406, 2005.

Kweon,M-N., and Kiyono,H. Allergic diseases in the gastrointestinal tract Mucosa-associated lymphoid tissues in the aerodigestive tract. In: Mestecky,J., Lamm,ME., Strober,W., Bienenstock,J., McGhee,JR. and Layer,L. editors. **Mucosal Immunology 3rd Ed.** Amsterdam, ELSEVIER, pp 1351-1360, 2005.

Igarashi, O., Nochi, T., Terahara, K., and Kiyono, H. The innate immune system: strategies for disease control Linkage between innate and acquired immunities at the mucosa. Taniguchi,M., Akira,S. and Nakayama,T.(editors) **International Congress Series** pp 1285:84-93, 2005.

Fukuyama, S., Hiroi, T. and Kiyono,H. Recent progress in the understanding of the mucosal immune system: from the uniqueness of the genesis of nasopharynx-associated lymphoid tissue to the development of nasal vaccine. **Recent Advances in Otitis Media** BC Decker Inc, Ontario, Canada, pp 37-41, 2005.

Kunisawa, J., McGhee, JR. and Kiyono, H. Mucosal S-IgA enhancement: development of safe and effective mucosal adjuvants and mucosal antigen delivery vehicles. **Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A** (Edited by Charlotte S. Kaetzel), **Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York**, pp. 345-389, 2007.

Kiyono,H., Kunisawa, J., McGhee, JR. and Mestecky, J. The mucosal immune system, **Fundamental Immunology** (Edited by William E. Paul). **Lippincott-Raven, Philadelphia**, in press 2008.

(3) 学会発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

月 日	発表者 (所属)	タイトル	学会名	場 所
H15.2.13	福山聡 (東大医科研)	NALT 形成過程における組織構築の特異性.	第 21 回耳鼻 免疫アレルギー学会	鹿児 島
H15.4.9	福山聡 (東大医科研)	NALT-genesis is induced by Id2 gene-dependent CD3-CD4 ⁺ CD45 ⁺ cells.	5th international symposium on tonsils and mucosal barriers of upper airways.	和歌 山
H16.5.7	野地智法 (東大医科研)	Generation of novel monoclonal antibody with the specificity for the mature stage of intestinal epithelial cells.	The American Association of Immunologists(AAI)	U.S.A
H16.5.7	権 美那 (東大医科研)	Blockage of gestational LT β R and TNFRp55 signaling enhanced organogenesis of isolated lymphoid	The American Association of Immunologists(AAI)	U.S.A

		follicles in the large intestine.		
H16.5.7	上田真由美 (東大医科研)	Expression and function of TLRs in human ocular surface epithelium.	The American Association of Immunologists(AAI)	U.S.A
H16.5.7	山本正文 (東大医科研)	An interconnected gut-associated lymphoreticular cell and tissue network for antigen-specific intestinal IgA immunity.	The American Association of Immunologists(AAI)	U.S.A
H15.10.28	野地智法 (東大医科研)	Characterization of novel junctional related molecule expressed in intestinal epithelial cells(IECS) and intraepithelial lymphocytes(IELs)	第 16 回国際内藤コンファレンス	逗子
H15.12.8	朴 恩正 (東大医科研)	In situ expression of RAE1 message by intestinal epithelial goblet cells.	日本免疫学会	福岡
H15.12.10	野地智法 (東大医科研)	Elucidation of novel marker of mature stage of porcine intestinal epithelial cells.	日本免疫学会	福岡
H15.12.8	福山聡 (東大医科研)	A potential role of CXCR5 expression by CD3-CD4+CD45+ cells for the organogenesis of NALT.	日本免疫学会	福岡
H15.12.10	寺原和孝 (東大医科研)	Isolation and characterization of M cells from murine Peyer's patches.	日本免疫学会	福岡
H15.12.10	廣井隆親 (東大医科研)	Intestinal plasmacytoid DCs regulate the induction of oral tolerance.	日本免疫学会	福岡
H15.12.10	五十嵐脩 (東大医科研)	Development of soluble MHC classII covalently linked with an immunodominant cholera toxin epitope for the detection of antigen-specific mucosal Th cells.	日本免疫学会	福岡
H15.12.10	権 美那 (東大医科研)	Prenatal blockage of LT α R and TNFRp55 signaling cascade resulted in the acceleration for tissue genesis of isolated lymphoid follicles in the large intestine.	日本免疫学会	福岡
H15.12.10	朴 恩正 (東大医科研)	In situ expression of RAE-1 message by intestinal epithelial goblet cells.	日本免疫学会	福岡
H15.12.10	日野綾子 (東大医科研)	Large intestinal epithelial cell, macrophage and dendritic cell originates IL-12p40 contribute the induction of allergic diarrhea.	日本免疫学会	福岡
H16.3	國澤純 (東大医科研)	MHC class I 拘束性抗原プロセッシング機構で産生される抗原中間体の検出方法の開発ならびにその技術を用いた TRiC シャペロニンの機能解析	日本薬学会第 124 年回	大阪
H16.4.20	幸義和 (東大医科研)	Nasal immunization with a recombinant hybrid fusion protein of chorea toxin B-subunit (CTB)-insulin peptide B 9-23(C19S) prevents murine insulin-dependent diabetes.	The American Association of Immunologists (AAI)	U. S. A
H16.4.20	廣井隆親 (東大医科研)	Essential of intestinal plasmacytoid DCs in lamina propria region for the induction of oral tolerance.	The American Association of Immunologists (AAI)	U. S. A
H16.4.20	五十嵐脩 (東大医科研)	Selective localization of MHC class II tetramer-reactive Th cells in the	The American Association of	U. S. A

		lamina propria of mice orally immunized with cholera toxin	Immunologists (AAI)	
H16.7.21	日野綾子 (東大医科研)	Alteration of large intestinal IL-12p40 mediated Th2-type allergic diarrhea by nasal treatment with the p70 plasmid.	The 12 th International Congress of Immunology	カナダ
H16.7.21	五十嵐脩 (東大医科研)	Orally induced CT-B-MHC class II tetramer-reactive CD4 ⁺ T cells are hastily migrated from Peyer's patches to lamina propria region of small intestine.	The 12 th International Congress of Immunology	カナダ
H16.7.21	野地智法 (東大医科研)	Cellular communication between intestinal epithelial cells (IECs) and intraepithelial lymphocytes(IELs).	The 12 th International Congress of Immunology	カナダ
H16.7.21	寺原和孝 (東大医科研)	Isolation and single cell analysis of M cells in follicle associated epithelium of Peyer's patches.	The 12 th International Congress of Immunology	カナダ
H16.7.21	高木英典	Rice-based edible vaccine for peptide immunotherapy against Japanese cedar pollinosis.	The 12 th International Congress of Immunology	カナダ
H16.7.21	廣井隆親 (東大医科研)	Vital role of intestinal lamina Gr-1 ⁺ CD11c ⁺ cells but not Tr cells for the induction of oral tolerance	The 12 th International Congress of Immunology	カナダ
H16.7.21	國澤純 (東大医科研)	TriC protects antigenic intermediates for the MHC class I antigen presentation.	The 12 th International Congress of Immunology	カナダ
H16.10.23	清野宏 (東大医科研)	Past, present and future of mucosal immunology.	Korean Immunology Society Meeting.	韓国
H16.10.25	清野宏 (東大医科研)	Dynamism of the mucosal immune system : uniqueness of NALT tissue genesis and villous M cells for mucosal vaccine development.	Asian Science Seminar in Seoul	韓国
H16.10.25	野地智法 (東大医科研)	Role of Ep-CAM as a key cellular interaction molecule between intestinal epithelial cells(IECs) and intraepithelial lymphocytes(IELs).	Asian Science Seminar in Seoul	韓国
H16.10.25	高山尚子 (東大医科研)	Development of mucosal vaccine:from basic research to clinical application.	Asian Science Seminar in Seoul	韓国
H16.12.1	幸義和 (東大医科研)	自然発症自己免疫糖尿病に対する経鼻ワクチンとしての組換えコレラトキシンBサブユニット・インスリンB鎖ペプチド融合蛋白	日本免疫学会	札幌
H16.12.1	國澤純 (東大医科研)	A novel KOVAK system reveals a pivotal role of cytoplasmic chaperones in the protection of antigenic intermediates during the MHC class I antigen processing.	日本免疫学会	札幌
H16.12.1	國澤純 (東大医科研)	Heat shock protein 90 α associates antigenic intermediates at pre-proteasomal pathway for the MHC class I antigen presentation	第 27 回日本分子生物学会年会	神戸

H17.5.20	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫における多面的免疫 応答のダイナミズム	第 106 回日本耳鼻咽喉 科学会総会・学術集会	大阪
H.17.6.17	清野宏 (東大医科研)	Intestinal villous M cells and eosinophils for regulation of mucosal immune responses.	RCA-JSI International Symposium on Immunology 2005.	横浜
H17.6.26	清野宏 (東大医科研)	Ontogeny of mucosal immune tissues.	The 12 th International Congress of Mucosal Immunology	U.S.A
H17.6.26	國澤純 (東大医科研)	Distinct dependency of sphingosine 1 phosphate-mediated lymphocyte motility in small and large intestinal compartments.	The 12 th International Congress of Mucosal Immunology	U.S.A
H17.6.26	長竹貴広 (東大医科研)	Different organogenesis associated gene expression between NALT and Peyer's patch CD3-CD4 ⁺ CD45 ⁺ inducer cells.	The 12 th International Congress of Mucosal Immunology	U.S.A
H17.6.26	倉島洋介 (東大医科研)	Prevention of antigen-induced allergic diarrhea by the treatment with sphingosine-1-phosphate receptor agonist, FTY720.	The 12 th International Congress of Mucosal Immunology	U.S.A
H17.6.26	五十嵐脩 (東大医科研)	Critical role of mesenteric lymph nodes in directing preferential migration of orally induced, antigen-specific CD4 ⁺ T cells into small intestinal lamina propria.	The 12 th International Congress of Mucosal Immunology	U.S.A
H17.7.8	福山聡 (東大医科研)	Chronological requirement of cytokines and chemokines for the NALT-genesis.	International Airway's Mucosal Immunology (AMIS)	東京
H17.7.10	清野宏 (東大医科研)	Mucosal antigen uptake network for innate and acquired immunity.	The International Uehara Memorial Foundation Symposium	東京
H17.7.24	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫のダイナミズム	日本免疫学会免疫サマ ースクール 2005	千葉
H17.7.26	清野宏 (東大医科研)	Role of villous M cells and intestinal granulocytes for regulation of mucosal immune responses.	US/Japan Immunology Board Symposium.	U.S.A
H17.7.29	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫と疾患	第 2 回日本病理学会カ ンファレンス 2005 道後	愛媛
H17.8.6	清野宏 (東大医科研)	感染防御とアレルギーにおけ る粘膜免疫の関わりとそのユ ニーク性	第 16 回日本生態防御 学会学術総会	東京
H17.8.26	清野宏 (東大医科研)	免疫の新世界:粘膜免疫システ ムのユニーク性と予防・治療戦 略への応用性	北海道医療大学学術フ ロンティア推進事業研 究報告会	北 海 道
H17.9.	國澤純 (東大医科研)	Roles of cytoplasmic chaperones in MHC class I presentation for vaccine design and microbial immunity.	第 5 回あわじしま感染 症・免疫フォーラム (AIFII)	淡 路 島
H17.9.22	清野宏 (東大医科研)	Dynamics of mucosal antigen sampling for the induction of antigen-specific immunity.	The 36 th DGFI-SSI Annual Meeting.	ドイツ
H17.10.6	清野宏 (東大医科研)	21 世紀の免疫学	茨城大学イブニングセ ミナー	茨城
H17.10.27	清野宏 (東大医科研)	生体防御の新展開:粘膜免疫の ダイナミズム	第 54 回日本感染症学 会 東日本地方総会、	東京

			第 52 回日本化学療法学会 東日本支部総会 (合同開催)	
H17.10.29	清野宏 (東大医科研)	Dynamism of mucosal antigen uptake network for development mucosal vaccine.	ICS in Korea.	韓国
H17.11.2	清野宏 (東大医科研)	Dynamism of mucosal immunity : Role of villous M cells and edsinophilic dendritic cells.	韓国ワクチン国際会議	韓国
H17.11.4	福山聡 (東大医科研)	Uniqueness of NALT development and immunity.	The 3 rd stage Surface Barrier International Immunology Study Group 2 nd Meeting.	沖縄
H17.11	國澤純 (東大医科研)	抗原特異的食物アレルギーモデルの確立と新規免疫療法の開発に向けた免疫学的解析	日本食品免疫学会	東京
H17.12	國澤純 (東大医科研)	Sphingosine-1-phosphate- dependent and -independent migration pathway for large intestinal intraepithelial lymphocytes following microbial stimulation.	日本免疫学会総会	横浜
H17.12	長竹貴広 (東大医科研)	Unique chemokine receptores expression between NALT and Peyer's patch inducer cells.	日本免疫学会総会	横浜
H17.12	倉島洋介 (東大医科研)	Sphingosine-1-phosphate receptor agonist mediated immunomanipulation leads to the control of antigen-induced allergic diarrhea.	日本免疫学会総会	横浜
H17.12.22	清野宏 (東大医科研)	The mucosal immune system: A key for the development of new generation vaccine.	CAS-JSPS Asian Science Seminar	中国
H18.1	清野宏 (東大医科研)	宿主・環境免疫学的クロスコミュニケーションを支える粘膜抗原捕捉ネットワーク	Hiroshima International Conference on Education and Science in Dentistry	広島
H18.2.18	清野宏 (東大医科研)	食物アレルギーにおける粘膜免疫の関わり	第 1 4 回関東アレルギークラブ	東京
H18.3.2	高村薫 (東大医科研)	アレルギー性鼻炎におけるケモカイン CCL19 及び CCL21 の機能に関する検討.	第 24 回日耳鼻免疫アレルギー学会	東京
H18.3	清野宏 (東大医科研)	粘膜ワクチン開発へ向けて:新しい展開	第 79 回日本細菌学会	金沢
H18.3	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫 ～腸は免疫の司令塔～	第 141 回日本獣医学会 学術集会	つくば
H18.3	國澤純 (東大医科研)	粘膜免疫システムを応用した粘膜ワクチンの開発	日本薬学会 126 年会	仙台
H18.4	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫を応用した感染症ワクチン開発ストラテジー	第 80 回日本感染症学会総会・学術講演会	東京
H18.4.15	清野宏 (東大医科研)	上気道粘膜免疫 ～最近の展開～	第 5 回近畿北陸気道疾患研究会	大阪
H18.5.13	清野宏 (東大医科研)	M cell targeted mucosal vaccine.	The American Association of Immunologists(AAI)	U.S.A
H18.5.13	幸義和 (東大医科研)	Development of rice-based oral vaccine: a unique and new generation of mucosal vaccination system for enterotoxin.	The American Association of Immunologists(AAI)	U.S.A

H18.5.13	國澤純 (東大医科研)	Sphingosine 1 phosphate-mediated regulatory T cell induction in large intestinal epithelium.	The American Association of Immunologists(AAI)	U.S.A
H18.5.13	高山尚子 (東大医科研)	Peyer's patch NKT and CD4 ⁺ CD25 ⁺ T cells mediated mucosal regulatory network for the control of intestinal allergy.	The American Association of Immunologists(AAI)	U.S.A
H18.5.13	倉島洋介 (東大医科研)	Different roles of sphingosine-1-phosphate in the regulation of mobility of mast cells and eosinophils in the peritoneal and intestinal compartments.	The American Association of Immunologists(AAI)	U.S.A
H18.5.13	合田昌史 (東大医科研)	Regulation of peritoneal B cell mobility to intestine and subsequent production of the intestinal IgA by sphingosine-1-phosphate.	The American Association of Immunologists(AAI)	U.S.A
H18.5.27	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫のダイナミズム:積極的・消極的応答の誘導・制御	シェーグレン症候群セミナー2006	東京
H18.6.9	清野宏 (東大医科研)	Mucosa-associated lymphoid tissue	Jubileumsseminar for Per Brandtzaeg 2006	ノルウェー
H18.6.18	寺原和孝 (東大医科研)	Novel CEACAM1 splice variants expressed by murine small intestinal epithelium.	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11th FAOBMB Congress	京都
H18.7.15	福山聡 (東大医科研)	NALT を中心とした上気道粘膜免疫機構	日本耳鼻咽喉科学会第21回九州連合地方部会教育講演	大分
H18.8.7	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫のダイナミズム	日本免疫学会サマースクール2006	千葉
H18.9.6	寺原和孝 (東大医科研)	Intestinal environmental alteration contributes to the induction of villous M cells.	第6回あわじしま感染症・免疫フォーラム(AIFII)	淡路島
H18.9.6	合田昌史 (東大医科研)	Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B cell trafficking for the subsequent intestinal IgA production.	第6回あわじしま感染症・免疫フォーラム(AIFII)	淡路島
H18.9.6	倉島洋介 (東大医科研)	Requirement of gut microflora-derived stimulation via TLRs for the retention of large intestinal intraepithelial CD8 $\alpha\alpha$ T cells	第6回あわじしま感染症・免疫フォーラム(AIFII)	淡路島
H18.9.21	高村薫 (東大医科研)	アレルギー性鼻炎の病態形成におけるCCR7 Ligandの機能に関する検討.	第45回日本鼻科学会	三重
H18.10.1	清野宏 (東大医科研)	NALT を中心とした上気道粘膜免疫システムのユニーク性:ヒトとマウスの相違点を理解したうえでの経鼻ワクチン開発に向けて	第34回日本臨床免疫学会	東京
H18.10.13	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫研究から迫る	DDW-JAPAN2006	札幌
H18.10.14	清野宏 (東大医科研)	Mucosal decision for immunity, tolerance and infection.	2 nd the Biomolecule Secretion Research Symposium.	韓国
H18.11.25	清野宏	粘膜免疫:免疫とアレルギーの	第43回日本小児アレ	千葉

	(東大医科研)	接点.	アレルギー学会	
H18.12	清野宏 (東大医科研)	Mucosal antigen uptake network : a key for the development of mucosal vaccine.	US-Japan Cooperative Medical science Program, 19 th Joint Meeting of the AIDS Panels.	鹿児島
H18.12.9	清野宏 (東大医科研)	免疫学のニューワールド 粘 膜免疫:基礎から最先端予防医 療への展開	ICD 国際歯科学会日本 部会	東京
H18.12.9	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫:基礎から先端予防医 療への展開	日本性感染症学会	東京
H19.2.10	清野宏 (東大医科研)	粘膜ワクチンへの挑戦	ワクチンワークショップ	東京
H19.2.16	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫によるアレルギー制 御	OSAKA IPOD 日本耳鼻 咽頭科学会総会ラン チオンセミナー	大阪
H19.2.24	清野宏 (東大医科研)	粘膜抗原取込みシステム:プロ グラム型と誘導型M細胞の制 御	第10回京都免疫ワー クショップ学術集会	京都
H19.3.3	清野宏 (東大医科研)	食物アレルギーにおける粘膜 免疫の関わり	第15回関東アレルギー クラブ	東京
H19.3.29	田中紀充 (鹿児島大学)	アレルギー性鼻炎 におけるT細胞応答の制御に 関するCCR7 Ligandの機能	第25回日耳鼻免疫ア レルギー 学会	山梨
H19.3.29	高村薫 (東大医科研)	アレルギー性鼻炎 におけるT細胞応答の制御に 関するCCR7 Ligandの機能	第25回日耳鼻免疫ア レルギー 学会	山梨
H19.3.29	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫:基礎から先端予防医 療への展開	日本薬学会	富山
H19.4.14	清野宏 (東大医科研)	呼吸器粘膜免疫のユニーク性 とダイナミズム	気道分泌研究会	鹿児島
H19.5.18	野地智法 (東大医科研)	Development of needle-free vaccine: rice-based vaccine induced protective immunity against cholera toxin.	The American Association of Immunologists(AAI)	U.S.A
H19.5.18	長竹貴広 (東大医科研)	Presence of Id2- and RORyt-independent lymphoid tissue organogenesis.	The American Association of Immunologists(AAI)	U.S.A
H19.6.10	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫を介したアレルギー制御	第19回日本アレルギー 学会春季臨床大会	横浜
H19.6.16	清野宏 (東大医科研)	腸管免疫システム:基礎から臨 床へ	第12回東京肝臓シン ポジウム	東京
H19.7.8	野地智法 (東大医科研)	粘膜ワクチンの新世代:M細胞 標的型粘膜ワクチン は効果的に免疫応答を誘導す る	第44回日本消化器免 疫学会	東京
H19.7.10	清野宏 (東大医科研)	Airway Immunity: uniqueness in organogenesis program and antigen-sampling system for mucosal vaccine development	13 th International Congress of Mucosal Immunology.	東京
H19.7.10	野地智法 (東大医科研)	New generation of mucosal vaccine:Novel M cell specific carbohydrate-targeted vaccination is effective for the induction of antigen-specific immune responses.	13 th International Congress of Mucosal Immunology.	東京
H19.7.10	國澤純	Microbe and sphingosine	13 th International Congress	東京

	(東大医科研)	1-phosphate regulate the trafficking of distinct subsets of large intestinal interaepithelial T lymphocytes.	of Mucosal Immunology.	
H19.7.10	合田昌史 (東大医科研)	A pivotal role of sphingosine-1-phosphate in the regulation of peritoneal B cell trafficking and subsequent intestinal IgA production.	13 th International Congress of Mucosal Immunology.	東京
H19.7.10	田中紀充 (鹿児島大学)	CXCR5/CXCL13-independent nasal B1 cells for the induction of antigen-specific secretory IgA responses.	13 th International Congress of Mucosal Immunology.	東京
H19.7.10	倉島洋介 (東大医科研)	Type 1 sphingosine 1-phosphate receptor-expressed intraepithelial regulatory T cells for the large but not small intestinal immunity.	13 th International Congress of Mucosal Immunology.	東京
H19.7.10	高橋一郎 (広島大学)	Sustained intestinal MICA expression prevents Th1 and Th2 mediated colitis.	13 th International Congress of Mucosal Immunology.	東京
H19.7.11	五十嵐脩 (東大医科研)	The α (1,2) fucosyltransferase-1(FUT1) identifies typical follicle-associated epithelium(FAE) M cells	13 th International Congress of Mucosal Immunology.	東京
H19.7.11	寺原和孝 (東大医科研)	Villous M cells show an intermediate gene expression profile between Peyer's patch M cells and enterocytes.	13 th International Congress of Mucosal Immunology.	東京
H19.7.11	長竹貴広 (東大医科研)	Tissue-genesis of tear duct-associated lymphoid tissue is independent from the organogenesis-associated transcriptional gene regulation.	13 th International Congress of Mucosal Immunology.	東京
H19.7.11	樋口森生 (東大医科研)	Impaired intestinal IgA responses by inhibiting sphingosine 1-phosphate-mediated B cell trafficking.	13 th International Congress of Mucosal Immunology.	東京
H19.7.25	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫:最先端予防医療としてのワクチン開発へ向けて	食と消化器: 蓼科シンポジウム	長野
H19.8.2	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫を基盤とした次世代ワクチン開発戦略	第28回日本炎症・再生医学会	東京
H19.8.13	清野宏 (東大医科研)	Mucosal mindedness for productive immunity and vaccine	6 th Annual Systems Integration in Biodefence	U. S. A
H19.8.16	清野宏 (東大医科研)	Recent progress in the development of M-cell targeted vaccines	MPI Infection Biology Alumni Meeting, Berlin	ドイツ
H19.8.29	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫の世界:次世代ワクチン開発に向けて	日本免疫学会サマースクール 2007	福岡
H19.10.10	幸義和 (東大医科研)	A needle- and cold chain-free rice based vaccine against cholera toxin.	Keystone Symposia,	南アフリカ
H19.10.19	清野宏 (東大医科研)	MucoRice: コメ発現システムを応用した経口ワクチン開発	第35回日本臨床免疫学会総会	大阪
H19.10.21	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫を基盤としたワクチン開発戦略	第55回日本ウイルス学会学術集会	札幌
H19.10.21	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫の基礎的解明と学問的体系の確立	第51回野口英世記念医学賞受賞講演	東京
H19.11.2	清野宏 (東大医科研)	宿主粘膜免疫系と共生細菌間における相互制御について	第16回腸内フローラシンポジウム	東京

H19.11.6	清野宏 (東大医科研)	NALT and GALT horizons for mucosal immunity	The Korean Association of Immunobiologists 55 th Fall Conference	韓国
H19.11.20	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫のユニーク性とダイナミズム	日本免疫学会	東京
H19.11.21	國澤純 (東大医科研)	Sphingosine-1-phosphate regulates innate and acquired intestinal immunity and its involvement in the development of intestinal immune diseases	日本免疫学会	東京
H19.11.21	野地智法 (東大医科研)	New generation of <i>C. botulinum</i> oral vaccine: Novel M-cell-targeted vaccination effectively induces protective immunity against the botulinum toxin challenge	日本免疫学会	東京
H19.11.21	幸義和 (東大医科研)	Development of rice-based mucosal vaccine for needle and cold-chain free vaccination	日本免疫学会	東京
H19.11.22	野地智法 (東大医科研)	M-cell-targeted and rice-based mucosal vaccine: A new global strategy for needle- and cold-chain free vaccination	日本免疫学会	東京
H19.11.24	清野宏 (東大医科研)	腸管免疫の世界:基礎から臨床への展開	第7回 IBS Forum	東京
H19.11.29	清野宏 (東大医科研)	Dynamism and uniqueness of intestinal immune system	ICOFF2007	京都
H19.12.8	清野宏 (東大医科研)	粘膜免疫学の創成と粘膜ワクチン開発への理論的形成	第2回日本ワクチン学会高橋賞受賞講演	横浜
H19.12.9	幸義和 (東大医科研)	コールドチェーンフリー経口ワクチンの開発	日本ワクチン学会	横浜
H19.12.9	野地智法 (東大医科研)	M細胞標的型粘膜ワクチンによる効果的な粘膜感染症防御免疫の誘導	日本ワクチン学会	横浜
H19.12.9	合田昌史 (東大医科研)	ワクチン開発に向けた脂質メディエーターによるT細胞依存的及び非依存的抗原に対する分泌型IgAならびに血清IgG誘導制御の解明	日本ワクチン学会	横浜
H19.12.9	清野宏 (東大医科研)	The Mucosal Immune System for the Development of Needle and Cold Chain Free Vaccine	Elsevier Congress Congress	スウェーデン

(4) 特許出願

①国内出願 (4件)

発明の名称: 抗原ペプチド・MHC クラスII分子複合体、多量体化抗原ペプチド・MHC クラスII分子複合体、抗原特異的 CD4⁺T 細胞検出体および抗原特異的 CD4⁺T 細胞検出方法

発明者: 清野 宏、幸 義和、五十嵐脩、福井宣規、金鎮卿、黒河志保

出願人：東京大学TLO

出願日：平成15年12月3日

発明の名称：腸管絨毛M細胞の抗原取り込み能・病原微生物侵入機構とそれを使った
ワクチン標的

発明者：清野 宏、権 美那、張 明浩、幸 義和

出願人：独立行政法人 科学技術振興機構

出願日：平成16年3月25日

発明の名称：ワクチン遺伝子導入イネ

発明者：幸 義和、清野 宏、野地智法、廣井隆親、農業生物資源研究所

出願人：幸 義和、清野 宏、野地智法、廣井隆親、農業生物資源研究所

出願日：平成16年4月9日

発明の名称：M細胞特異的抗体

発明者：清野宏、幸義和、五十嵐脩、野地智法、寺原和孝

出願人：株式会社東京大学TLO

出願日：平成18年11月13日

②海外出願（1件）

発明の名称：Rice plant having vaccine gene transferred thereinto

発明者：Yuki Yoshikazu, Kiyono Hiroshi, Hiroi Takachika, Nochi Tomonori,
Takaiwa Fumio Takagi Hidenori, Yang Lijyun, Suzuki Kazuya,
Ebinuma Hiroyasu, Sugita Koichi, Kasahara Saori

特許番号：WO 2005/096806 A1

出願日：April 8, 2005（PCT国際出願）

（5）受賞等

① 受賞

2007年11月2日 第51回野口英世記念医学賞

2007年12月8日 日本ワクチン学会高橋賞

② 新聞報道

2004年4月6日（朝日新聞）「別の病原体侵入口確認」

2004年4月6日（日本産業新聞）「腸の感染症－新ルート発見」

2004年4月6日（日刊工業新聞）「腸管絨毛にもM細胞－東大、粘膜ワクチン開
発に道」

2005年7月25日（日本経済新聞）「エイズウイルス増殖を抑制」

2005年11月7日（朝日新聞）「胃や腸の中、実は外界」

2006年9月22日（日本経済新聞）「鼻からワクチン－東大が投与技術開発」

- 2007年6月12日（毎日新聞）「＜飲むワクチン＞東大医科研など開発 コメにコレラ菌遺伝子」
- 2007年6月12日（日本経済新聞）「コレラのワクチン成分含んだコメ、粉末を飲み予防・東大で開発」
- 2007年6月12日（朝日新聞）「“ワクチン米”を開発 まずは対コレラ 東大医科研」
- 2007年11月6日（毎日新聞）「飲むワクチン開発へ 東大医科研マウスで成功」
- 2007年11月8日（読売新聞）「注射いらず 飲むワクチン 東大が開発」
- 2007年11月9日（毎日新聞）「“飲むワクチン”で病気予防 東大などのチームが新技術」
- 2007年12月3日（産経新聞）「“飲むワクチン” 開発」

(海外紙)

- 2007年6月11日（SCIENTIFIC AMERICAN）
「Scientists Dish Up Rice Vaccine to Fight Cholera」
- 2007年6月11日（REUTERS）「Cholera vaccine now easier to store and use」
- 2007年6月11日（Associated Press）「Rice Engineered to Carry Cholera Vaccine」
- 2007年6月12日（Sience NOW Daily News）「For Combating Cholera, Rice is Nice」
- 2007年6月12日（FOLHA）「Japoneses criam vacina a base de arroz」
- 2007年6月13日（Technology Review）「Vaccinating with Rice」

(6) その他特記事項

8 結び

通常、「食べる・飲む」「吸う」という生理的行為を通して我々の体に入った食物や病原性微生物などの抗原は消化管や呼吸器をとりまくテニスコート5面分に相当する広大な粘膜面を介して取り込まれる。この粘膜面にはユニークな抗原取り込み機能システムが存在しており、その中心的な役割を果たしている粘膜上皮細胞がM細胞であり、この細胞は微絨毛が未発達で粗な状態にあり、基底膜側にはポケット様の構造を有し、その内部には抗原提示細胞をはじめとする各種免疫担当細胞が存在する。M細胞が存在する粘膜上皮層の直下には腸管関連リンパ組織（GALT）、鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）などの粘膜関連リンパ組織が免疫応答誘導の場として存在し、M細胞から取り込まれた抗原はここで処理・提示され、抗原特異的な粘膜免疫応答が惹起される。

これまで小腸に存在するパイエル板が GALT における主たる粘膜免疫誘導の場として知られていたが、我々はCRESTでの研究を通じてM細胞に類似した細胞（絨毛M細胞、M-like細胞

胞)が小腸のみならず鼻腔粘膜組織の上皮細胞層(例:鼻腔部)にも存在すること、およびこの細胞が抗原取り込み機能を有することを報告し、呼吸系M細胞(Respiratory M cell)と名付けました。これは、抗原取り込み専門細胞であるM細胞が、粘膜免疫誘導の要であると考えられている GALT 及びNALTだけではなく、結合組織である腸管粘膜固有層や上気道粘膜面を覆っている上皮細胞層にも発達・存在しており、「M細胞ワールド」と言っても過言ではない新しいドグマの形成に向かっていきます。これらの事実は、M細胞を標的としてワクチンなどの抗原を運ぶことによって、効率良くワクチン抗原に対する粘膜免疫応答を惹起できることを意味します。実際、本研究の中では、M細胞の免疫生物学的解明という「M細胞生物学」の新しい学問的進歩だけでなく、「M細胞標的型粘膜ワクチン」という次世代ワクチン開発に向けて新しいコンセプトと方向性を提示してきました。

この研究期間を通して当研究室から3名の研究者(広島大学 教授 高橋一郎、国際ワクチン研究所(IVI) 部長 権 美那、東京都立臨床研究所 チームリーダー 廣井隆親)が、独立し、粘膜免疫学研究の広がりをつけることができました。CREST「免疫難病・感染症等の先進医療技術」岸本忠三先生、山西弘一両代表をはじめとする統括班(審良静男先生、内山卓先生、野本明男先生、笹月健彦先生、高津聖志先生)の先生方の厳しくまた温かいご指導・ご支援なくしてはこの成果をあげる事をできませんでした。この場をかりて深く御礼申し上げます。また日常の研究推進にあたりJST-CREST研究事務所の方々ならびに戦略的創造研究推進事業本部支援のおかげで、本研究期間中に当初はほとんど未知の世界であったM細胞に関して、同細胞をめぐる免疫生物学的特徴とそれを基盤とした次世代粘膜ワクチン開発へ向けての先導的研究を推進し、成果を収めることができたと思っています。大阪大学微生物病研究所から東京大学医科学研究所に拠点を移して新たな粘膜免疫プログラムを立ち上げる時期にCRESTに参加させていただく機会をいただきました事によりサイエンスはもとより新拠点としての研究立上げを順調なものとししました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。ただ惜しむらくは、5年で終了というのではなくもう少し延長していただき5年間で得られた成果をさらにヒトへの研究に発展出来ればと思いますが、今後もこの研究を継続する為に努力してまいります。

