

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

腸粘膜M細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 千葉 勉

平成 18(2006)年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
腸粘膜M細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発	----- 1
千葉 勉	
II. 分担研究報告	
1. M細胞の同定・単離法の確立に関する研究	----- 15
清野 宏	
2. 腸粘膜M細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発	----- 18
竹田 潔	
3. ドラッグ・デリバリー材料の改良と開発	----- 25
田畑泰彦	
4. 抗原特異的な腸炎モデルの作成及び腸炎実効細胞、 抑制細胞の細胞調節機序の研究	----- 30
若月芳雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 33

腸粘膜M細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発

主任研究者 千葉 勉 京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座・教授

研究要旨: GVHD や炎症性腸疾患に対するより効果的かつ副作用の少ない薬剤を開発する目的で、腸粘膜 M 細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発をおこない、ヒトへの臨床試験を開始した。その結果、まず(1) デキサメサゾン包埋 PL-MS の作製方法の改良をおこない、安定した PL-MS を安定して得る方法を確立し、京都大学医学部附属病院薬剤部において GMP に則った作製を開始した。(2) 上記 PL-MS は直径が 3.5 μm において最も効率よく腸粘膜へ吸収され、またその吸収はコロノパッチ、虫垂パッチでもっとも多いものの、通常の腸粘膜への吸収が観察された。さらに(3) デキサメサゾン包埋 PL-MS からのデキサメサゾンの放出はすみやかにおこなわれた。また本 PL-MS を経口的に投与したところ、デキサメサゾン単独投与と異なり、血中におけるデキサメサゾンの上昇は認められなかった。(4) デキサメサゾン PL-MS は DSS 腸炎ラットにおいて、著明な治療効果をしめした。(5) 上記の結果に基づいて、ヒトの難治性潰瘍性大腸炎症例に対して、デキサメサゾン PL-MS の投与試験を開始したが、第一例目において明らかな治療効果を認め、かつ特に副作用は認めなかった。(6) M 細胞についての基礎的検討において、M 細胞は大腸コロノパッチ、虫垂パッチ上の上皮に最も多く存在するが、通常の大腸粘膜上にもかなりの数が存在する事実が確認された。

分担研究者

清野 宏

東京大学医科学研究所 教授

竹田 潔

九州大学生体防御医学研究所 教授

田畑泰彦

京都大学再生医科学研究所 教授

若月芳雄

京都大学医学研究科 講師

A. 研究目的

わが国では移植技術の進歩によって、肝臓移植をはじめとする臓器移植が普及してきているが、それに伴って、代表的な拒絶反応のひとつである Graft versus host disease (GVHD) 症例が増加してきている。この GVHD の主要な臓器は腸管である。一方近年わが国では潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患(IBD)の増加が著しい。これらの腸疾患の薬物治療は基本的にステロイド

や免疫抑制剤が中心となるが、これらは全身的に投与すると様々な副作用を生じることが知られている。したがって腸粘膜へ特異的に薬物を集積するドラッグデリバリー・システムを確立することが必要となる。

腸粘膜 M 細胞は腸内細菌などの抗原を消化することなくそのまま腸粘膜に取り込ませて、パイエル板などのリンパ装置に存在する抗原提示細胞に抗原を提示させる細胞である。私たちは M 細胞が一定の大きさの粒子を特異的に取り込むことに着目し、ポリ乳酸マイクロスフェア (PL-MS) に薬剤を包埋することによって、腸粘膜のリンパ装置に薬物を特異的に集積させるドラッグデリバリー・システムの開発をおこなった。そしてそれによって、上記の GVHD や IBD に対する、より効果的で副作用の少ない治療法の確立を試みた。

B. 研究方法

- (1) PL-MS の作製方法を工夫することによって、M 細胞や大腸コロノパッチ、大腸粘膜に、より効率的に吸収される PL-MS の剤形の開発を試みた。
- (2) 種々の大きさの PL-MS をクマリンで標識し、経腸的にマウスに投与することによって、パイエル板などの腸粘膜への PL-MS の取り込みの程度また取り込みの部位を比

較検討した。

- (3) 上記で最もよく取り込まれた大きさの PL-MS を用いて、デキサメサゾン包埋 PL-MS からのデキサメサゾンの除放効果を *in vitro* およびマウスの *in vivo* の系で検討した。
- (4) DSS を用いて腸炎ラットを作成し、デキサメサゾン-PL-MS を投与することによって、その治療効果を検討した。
- (5) ヒトにデキサメサゾン-PL-MS を投与し、その治療効果を検討した。
- (6) M 細胞を特異的に染色するレクチン、UEA-1 を用いることによって、腸粘膜の M 細胞の存在部位について詳細な検討をおこなった。

C. 研究結果

- (1) 種々のデキサメサゾン-PL-MS の作製方法を検討した結果、デキサメサゾン溶液 30 μ l に対して PL-MS 100 mg の比率で混合したものをジクロロメタン 2 ml に攪拌し、15秒溶解させた。上記のエマルジョンを異なる重合度をもつポリビニールアルコール (PVA) 溶液に加えてホモゲナイズ処理後、200 ml の PVA に分散されることによってエマルジョンを形成させた。得られたエマルジョンを2日間室温

にて放置することにより溶媒を蒸散させ、液中乾燥法によりデキサメサゾン包埋 PL-MS を作製した。得られた粒子は蒸留水で洗浄後、凍結乾燥した。PVA の重合度ならびに PL-MS の溶解度が微粒子のサイズに与える影響を調べたところ、用いる PVA の重合度が大きくなるとともに、得られる微粒子のサイズが増加することが分かった。さらに PVA 水溶液の表面張力を測定したところ、PVA の重合度の低下とともに表面張力が小さくなる経口が認められた。すなわち、表面張力の低下とともにより大きな表面積をもつ直径の小さな PL-MS が安定して形成され、その結果サイズの小さな PL-MS の形成が可能となった。以上のような方法によって最も安定し、かつデキサメサゾン含有量の多い PL-MS の作製が可能となった。

- (2) 上記(1)によって作製した様々な大きさの PL-MS をクマリンで標識して、マウスに経腸的に投与したところ、クマリン標識 PL-MS は、小腸パイエル板、大腸コロノパッチ、虫垂パッチに特異的に取り込まれた。さらにそれとともに、これらの部位以外の大腸粘膜にもある程度の取り込みが観察された。特に大腸コロノパッチにおけるクマリ

ンの取り込みを PL-MS の大きさを变化させて比較検討したところ、1 視野における吸収されたクマリンの粒子数は、 $3.5 \mu\text{m}$ において 78 個と、もっとも多く取り込まれることが判明した。さらに経腸的に投与した際の大腸粘膜における取り込みを各部位で比較したところ、コロノパッチの 78 個に対して、虫垂パッチでは 52 個と多くの集積が認められた。一方通常の大腸粘膜への取り込みは、これらに対して少なかったか、S 状結腸、左側結腸はそれぞれ 21 個、右側結腸は 8 個と、かなりの取り込みが確認された。

- (3) 上記 $3.5 \mu\text{m}$ のデキサメサゾン包埋 PL-MS の徐放効果を生理食塩水で検討した結果、室温で約 48 時間後にはほぼ 100% 溶液中に放出された。一方マウスに経口的に投与したところ、デキサメサゾン単独投与では投与後 1 時間で血中に高濃度のデキサメサゾンが検出されたが、PL-MS に包埋して投与した際には血中では常に測定感度以下であった。
- (4) DSS 腸炎ラットに、上記のデキサメサゾン PL-MS を経腸的に投与して治療実験をおこなったところ、明らかな抗炎症効果、腸管長の短縮抑制効果、体重減少抑制効

果、生存率の増加効果が観察された。

- (5) 上記の基礎的結果に基づいて、ヒトへの第一例目の投与をおこなった。患者は26歳の男性。2003年に潰瘍性大腸炎を発症、ステロイド大量投与および白血球除去に抵抗性であり、経過中の大腸穿孔をきたした。しかし患者が大腸全摘を拒否したため、回腸ろうを作成した。その後症状は安定していたが残存大腸から出血が生じ、レミケードおよび免疫抑制剤投与をおこなうも症状の改善は得られなかった。そこでステロイド注腸をおこない症状は改善したが、長期使用による副作用のため投与を中止した。以上より副作用を生じることなく大腸の炎症を抑制することを目的として、十分なインフォームドコンセントを得た後デキサメサゾンPL-MSの経腸投与を2006年2月13日から開始した(10 μ g DX/1 mg PL-MS/kg wt)。その結果4週間投与にて炎症は改善傾向を示し、CAI スコアは8から3へと改善した。
- (6) M細胞を特異的に染色するUEA-1レクチンおよび吸収上皮を染色するwheat germ agglutinin(WGA)、さらにCD45抗体で腸粘膜を染色したところ、1

視野中に小腸パイエル板、大腸コロノパッチ、虫垂パッチでは約30個のM細胞が存在していたが、回腸、S状結腸、左側結腸においても約10個弱のM細胞が同定された。一方パイエル板上の上皮細胞を分離して、上記レクチン、抗体でFACS解析をおこなった結果、UEA+WGA-CD45-細胞は約5%存在した。さらにこれらの細胞を他の上皮細胞分画(UEA-WGA+CD45-)や白血球分画(CD45+)と比較したところ、ALP活性は上皮細胞より有意に低く、また peptidoglycan recognition protein Sの発現は有意に高い値を示した。

D. 考察

今回の研究では、まず従来から開発を続けてきたデキサメサゾン PL-MSについて、その作製方法の改良をおこなったが、その結果、PL-MSの大きさを安定的に小さくすることが可能で、かつより高濃度のデキサメサゾンを包埋できるPL-MSの作製方法を見出すことができた。このようにして作製したデキサメサゾン包埋PL-MSをin vitro, in vivoの系で、その腸粘膜への吸収効果、さらにデキサメサゾンの徐放効果を検討したところ、PL-MSの直径が約3.5 μ mの場合に最も効率よく腸粘膜へ吸収され

ることが判明した。さらにその取り込みは経腸的に投与した場合、パイエル板、コロノパッチ、虫垂パッチに最もよく取り込まれたが、S 状結腸や左側結腸においてもかなりの取り込みが観察された。このことから PL-MS はコロノパッチのみならず、通常の腸粘膜にもある程度吸収される可能性が示唆された。

一方このデキサメサゾン PL-MS の徐放を *in vitro* 中で検討した結果、48 時間以内に 100% のデキサメサゾンが徐放されること、さらに *in vivo* で経口的に投与した場合、デキサメサゾン単独では著明な血中レベルの上昇が見られたのに対して、同量のデキサメサゾンを包埋した PL-MS 投与した場合には、血中レベルの上昇がまったくみられないことが明らかとなった。

そこでこのデキサメサゾン包埋 PL-MS をラットの DSS 腸炎モデルに投与したところ、著明な腸炎の抑制効果を認めた。

上記の結果に基づいて、今回ヒトへの第一例投与をおこなった。投与量はデキサメサゾン量として 10 μ g/kg wt を 4 週間投与した。その結果 CAI スコアは 8 点から 3 点へと明らかな改善を認めしめた。またその間デキサメサゾンによると思われる副作用の増強は認められなかった。また患者のコンプライアンスについても特に問題はなかった。

このように今回私達は、デキサメサ

ゾン包埋 PL-MS 作製方法の改良をおこない、さらにその作製について、上記の方法に基づいて、京都大学医学部附属病院薬剤部において GMP に則っておこなったが、その結果現在薬剤の安定した作製が可能となっている。

また当初の計画では、まず大型動物を用いて安全確認の投与実験をおこなう予定であったが、PL-MS についてはすでに徐放を目的としてヒトに臨床応用されていること、またラットを用いた安全確認実験が終了していること、から大型動物による実験をおこなわないで、ヒトへの投与試験を開始した。その結果明らかな治療効果を認めるとともに、特に副作用を認めなかった。今後副作用を十分モニターしながら症例数を増加させていく予定である。

今回の研究では、上記の PL-MS の改良、基礎的検討、さらにヒトへの投与試験のほか、超粘膜 M 細胞についての基礎的検討もおこなった。その結果 M 細胞は従来報告されていたようにパイエル板、コロノパッチ、虫垂パッチの上皮上に数多く存在するとともに、それ以外の腸粘膜にも一定程度存在することが明らかとなった。このことは上述のように、PL-MS がコロノパッチのみならず、通常の S 状結腸や左側結腸にもある程度吸収された事実と合致していた。したがってデキサメサゾン PL-MS の抗炎症効果はコロノパッチのみなら

ず、大腸粘膜全域で発揮されうる可能性が考えられた。

E. 結論

- (1) デキサメサゾン PL-MS 剤形および作製方法の改良をおこない、安定した PL-MS を安定して得る方法を確立し、京都大学医学部附属病院薬剤部において GMP に則った作製を開始した。
- (2) PL-MS は直径が 3.5 μ m において最も効率よく腸粘膜へ吸収され、またその吸収はコロノパッチ、虫垂パッチでもっとも多いものの、通常の腸粘膜への吸収も観察された。
- (3) デキサメサゾン包埋 PL-MS からのデキサメサゾンの放出はすみやかにおこなわれた。また本 PL-MS を経口的に投与したところ、デキサメサゾン単独投与と異なり、血中におけるデキサメサゾンの上昇は認められなかった。
- (4) デキサメサゾン PL-MS は DSS 腸炎ラットにおいて、著明な治療効果をしめした。
- (5) ヒトの難治性潰瘍性大腸炎症例に対して、デキサメサゾン PL-MS の投与試験を開始したが、第一例目において明らかな治療効果を認めたが、特に副作用は認めなかった。

- (6) M 細胞は大腸コロノパッチ、虫垂パッチ上の上皮に最も多く存在したが、通常の大腸粘膜上にもその存在が確認された

F. 健康危険情報

主任研究者・分担研究者も含め、該当する危険情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuda A, Nakase H, Seno H, Nabeshima M, Sawada M, Chiba T. Refractory enterovesical and duodenocolic fistulas in Crohns disease successfully managed with tacrolimus. J Gastroenterol 40:433-435:2005.
2. Matsuura M, Okazaki K, Nishio A, Nakase H, Tamaki H, Uchida K, Nishi T, Asada M, Kawasaki K, Fukui T, Yoshizawa H, Ohashi S, Inoue S, Kawanami C, Hiai H, Tabata Y, Chiba T: Therapeutic effects of rectal administration of basic fibroblast growth factor on experimental murine colitis. Gastroenterology 128:975-986:2005.
3. Fujii S, Tominaga K, Kitajima K, Takeda J, Kusaka T, Fujita T, Ichikawa K, Tomita S, Ohkura Y, Ono Y, Imura J, Chiba T, Fujimori T: Methylation of the estrogen receptor gene in

- non-neoplastic epithelium as a marker of colorectal neoplasia risk in long-standing and extensive ulcerative colitis. *Gut* 54:1287-1292:2005.
4. Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Nanakin A, Kanda N, Uenoyama Y, Sawabu T, Hisatsune H, Seno H, Fujimori T, Chiba T: Possible role of REG I α protein in ulcerative colitis and colitic cancer. *Gut* 54:1437-1444:2005.
 5. Watanabe T, Yamori M, Kita T, Chiba T, Wakatsuki Y. CD4+CD25+T cells regulate colonic localization of CD4 T cells reactive to a microbial antigen. *Inflamm Bowel Dis* 11:541-550:2005.
 6. Nakase H, Nishio A, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Chiba T, Okazaki K: Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Japanese patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 12:62-69:2006.
 7. Uza N, Nakase H, Nishimura K, Yoshida S, Kawabata K, Chiba T: Solitary rectal ulcer syndrome associated with ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc* 63: 355-6: 2006.
 8. Kweon MN, Yamamoto M, Rennert PD, Park EJ, Lee AY, Chang SY, Hiroi T, Nanno M. and Kiyono H. (2005). Prenatal blockage of lymphotixin beta receptor and TNF receptor p55 signaling cascade resulted in the acceleration of tissue genesis for isolated lymphoid follicles in the large intestine. *J.Immunol.* 174:4365-4372.
 9. Kobayashi R, Kohda T, Kataoka K, Ihara H, Kozaki S, Pascual DW, Staats HF, Kiyono H, McGhee JR. and Fujihashi K. (2005). A novel neurotoxic vaccine prevents mucosal botulism. *J.Immunol.* 174:2190-2195.
 10. 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. (2005). Colitis in mice lacking the common cytokine receptor gamma chain mediated by IL-6-producing CD4+ T cells. *Gastroenterology* 128: 922-934.
 11. Nonaka S, Naito T, Chen H, Yamamoto M, Moro K, Kiyono H, Hamada H. and Ishikawa H. (2005). 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.
 12. Ohmura M, Yamamoto M, Tomiyama-Miyaji C, Yuki Y, Takeda Y. and Kiyono H. (2005). 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.
13. Ueta M, Hamuro J, Kiyono H. and Kinoshita S. (2005). Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induces inflammatory cytokines. *Biochem. Biophys.Re.Comm.* 331:285-294.
 14. Hino A, Fukuyama S, Kataoka K, Kweon MN, Fujihashi K. and Kiyono H. (2005). Nasal IL-12p70 DNA prevents and treats intestinal allergic diarrhea. *J.Immunol.* 174:7423-7432.
 15. Takagi H, Hiroi, T, Yang L, Tada Y, Yuki Y, Takamura K, Ishimitsu R, Kawauchi H, Kiyono H. and Takaiwa F. (2005). A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th-2 mediated IgE responses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 29:17525-12530.
 16. Kunisawa J, Fukuyama S. and Kiyono H. (2005). 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.
 17. Kunisawa J. and Kiyono H. (2005). A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation first lines of defense. *Cell Mol. Life Sci.* 62:1308-1321.
 18. Kuwata, K., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsu, T., Koga, R., and Takeda, K.: IkBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41-51 (2006).
 19. Ogawa, A., Tagawa, T., Nishimura, H., Yajima, T., Abe, T., Arai, T., Taniguchi, M., Takeda, K., Akira, S., Nimura, Y., and Yoshikai, Y.: Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas-dependent apoptosis in Peyer's patch and liver at an early stage after bile duct ligation in mice. *Gut* 5, 105-113 (2006).
 20. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
 21. Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S.: Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6, 1087-1095 (2005).
 22. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N.

- A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable *Haemophilus influenzae* from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
23. Yukawa, K., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Bai, T., Maeda, M., Takeda, K., Akira, S., and Iso, H.: Reduced prepulse inhibition of startle in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 16, 673-675 (2005).
24. Matsukawa, A., Kudo, S., Maeda, T., Numata, K., Watanabe, H., Takeda, K., Akira, S., and Ito, T.: Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J. Immunol.* 175, 3354-3359 (2005).
25. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S.: Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19-28 (2005).
26. Ohkawara, T., Takeda, H., Nishihira, J., Miyashita, K., Nihiwaki, M., Ishiguro, Y., Takeda, K., Akira, S., Iwanaga, T., Sugiyama, T., and Asaka, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 412-421 (2005).
27. Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A., and Moreno, E.: MyD88, but not Toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 73, 5137-5143 (2005).
28. Yang, S., Takahashi, N., Yamashita, T., Sato, N., Takahashi, M., Mogi, M., Uematsu, T., Kobayashi, Y., Nakamichi, Y., Takeda, K., Akira, S., Takada, H., Udagawa, N., and Furusawa, K.: Muramyl dipeptide enhances osteoclast formation induced by lipopolysaccharide, IL-1b, and TNF- α through nucleotide-binding oligomerization domain 2-mediated signaling in osteoblasts. *J. Immunol.* 175, 1956-1964 (2005).
29. Shindou, H., Ishii, S., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Shimizu, T.: Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A: lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J. Immunol.* 175, 1177-1183 (2005).
30. Kitching, A. R., Turner, A. L., Wilson, G. R., Semple, T., Odobasic, D.,

- Timoshanko, J. R., O'sullivan, K. M., Tipping, P. G., Takeda, K., Akira, S., and Holdsworth, S. R.: IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2023-2033 (2005).
31. Yang, R., Murillo, F. M., Delannoy, M. J., Blosser, R. L., Yutzy, W. H. 4th, Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., Roden, R. B.: B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88. *J. Immunol.* 174, 7912-7919 (2005).
32. Yang, R., Wheeler, C. M., Chen, X., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Pastrana, D. V., Viscidi, R. P., and Roden, R. B.: Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J. Virol.* 79, 6741-6750 (2005).
33. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., and Barsh, G. S.: PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J. Clin. Invest.* 115, 951-958 (2005).
34. Yukawa, K., Iso, H., Tanaka, T., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: Down-regulation of dopamine transporter and abnormal behavior in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 15, 819-825 (2005).
35. Kumanogoh, A., Shikina, T., Suzuki, K., Uematsu, S., Yukawa, K., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Ko-Mitamura, E. P., Takegahara, N., Marukawa, S., Ishida, I., Morishita, H., Prasad, D. V., Tamura, M., Mizui, M., Toyofuku, T., Akira, S., Takeda, K., Okabe, M., and Kikutani, H.: Nonredundant roles of *Sema4A* in the immune system: Defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in *Sema4A*-deficient mice. *Immunity* 22, 305-316 (2005).
36. Hirotsu, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K.: The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* 174, 3650-3657 (2005).
37. Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S., and Watanabe, M.: MyD88-deficient mice

- develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J. Gastroenterol.* 40, 16-23 (2005).
38. Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yoshie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T., Akira, S., Ogawa, K., and Harada, M.: Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. *Stem Cells* 23, 252-263 (2005).
39. Yukawa, K., Kishino, M., Goda, M., Liang, X. M., Kimura, A., Tanaka, T., Bai, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Ueyama, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., and Akira, S.: STAT6 deficiency inhibits tubulointerstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 225-230 (2005).
40. Akamine, M., Higa, F., Arakaki, N., Kawakami, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 352-361 (2005).
41. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
42. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
43. Takeda, K.: Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity. *Cur. Med. Chem. AIAA.* 4, 3-11 (2005).
44. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).
45. Takeda, K.: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 11, 51-55 (2005).
46. Eshita Y, Uemoto S, Tabata Y, Sakamoto S, Egawa H, Hashida T, Inui K, Tanaka K: Drug delivery system using microspheres that contain tacrolimus in porcine small bowel transplantation. *Transpl. Int.* 17:841-847:2005.
2. 学会発表
1. 井上聡子、仲瀬裕志、西尾彰功、千葉勉：クローン病におけるクラリスロマイシ

- ン治療の有効性の検討:第102回日本内科学会講演会, 2005.4.7
2. 玉置敬之、仲瀬裕志、千葉 勉: 難治性クローン病 12 例に対する Tacrolimus の有効性の検討: 第 102 回日本内科学会講演会, 2005.4.7
 3. 井上聡子、仲瀬裕志、上野 哲、宇座徳光、北村 浩、浅田全範、玉置敬之、松浦 稔、西尾彰功、千葉 勉: 潰瘍性大腸炎に対する FK506 の緩解導入および維持効果の検討: 第 91 回日本消化器病学会総会, 2005.4.14
 4. 玉置敬之、仲瀬裕志、岡崎和一: クローン病に対する治療として *Mycobacterium paratuberculosis* は標的となりうるか?: 第 91 回日本消化器病学会総会, 2005.4.14
 5. 松浦 稔、仲瀬裕志、田畑泰彦、西尾彰功、岡崎和一、千葉 勉: 炎症性腸疾患に対する basic FGF 注腸療法の基礎的検討: 第 42 回日本臨床分子医学会学術集会, 2005.7.22
 6. 井上聡子、仲瀬裕志、西尾彰功、千葉 勉: 炎症性腸疾患の炎症および上皮再生における転写因子 NF- κ B の重要性: 第 42 回日本消化器免疫学会総会, 2005.8.4
 7. 玉置敬之、仲瀬裕志、西尾彰功、岡崎和一、千葉 勉: ヒト単球細胞における *Mycobacterium paratuberculosis* の感染性およびクローン病患者における抗 IS900 血清抗体価の検討: 第 42 回日本消化器免疫学会総会・シンポジウム, 2005.8.4
 8. H. Nakase, Y. Tabata, T. Chiba: The Novel Effect of oral drug delivery system targeting M cells and GALT on experimental intestinal inflammation : A New Therapeutic Strategy for Inflammatory Bowel Disease: Inflammatory Bowel Disease Research Drives Clinics (Germany), 2005.9.3
 9. H. Nakase, S. Inoue, H. Tamaki, M. Matsuura, A. Nishio, T. Chiba: Long-Term outcome of treatment with tacrolimus therapy in patients with inflammatory bowel disease: APDW 2005 Asian Pacific Digestive Week 2005, 2005.9.25
 10. 井上聡子、仲瀬裕志、千葉 勉: クローン病患者の骨量減少における脂溶性ビタミンの役割: 第 47 回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 2005.10.5
 11. 仲瀬裕志、千葉 勉: QOL の観点からみた難治性炎症性腸疾患治療における免疫抑制剤治療の意義: 第 47 回日本消化器病学会大会・パネルディスカッション, 2005.10.5
 12. 上野 哲、仲瀬裕志、宇座徳光、井上聡子、北村 浩、浅田全範、玉置敬之、松浦 稔、千葉 勉: 潰瘍性大腸炎に

- におけるPCR法を用いたCMV感染合併の診断の有用性: 第47回日本消化器病学会大会, 2005.10.5
13. H. Tamaki, H. Nakase, S. Ueno, N. Uza, H. Kitamura, S. Inoue, M. Asada, M. Matsuura, K. Okazaki, T. Chiba: The first demonstration of the infectivity and immunological response of mycobacterium paratuberculosis in human monocyte cell and novel specific antibodies against insertion element 900 in patients with crohn's disease: 13th United European Gastroenterology Week (Copenhagen, Denmark), 2005.10.15
14. H. Nakase, H. Tamaki, S. Inoue, M. Matsuura, A. Nishio, T. Chiba: Long-term outcome of treatment with tacrolimus therapy in japanese patients with inflammatory bowel disease: 13th United European Gastroenterology Week (Copenhagen, Denmark), 2005.10.15
15. Kiyoshi Takeda, The roles of STATs in inflammatory responses: Lessons from the knockout mouse. (symposium, invited), American Thoracic Society 2005, 2005.5-20-25, San Diego, USA
16. Kiyoshi Takeda, Makoto Matsumoto, Toll-like receptor-dependent innate immune responses in mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2005.7.28-30, Seattle, USA
17. Kiyoshi Takeda, Regulation of Toll-like receptor-mediated gene expression by nuclear IκB proteins. The 6th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, 2005.9.28-10.2, Heidelberg, Germany
18. 竹田潔, Toll-like receptors and pathogen recognition (Symposium, invited) 第78回日本細菌学会総会、2005.4.4-6、東京
19. 竹田潔, Toll-like receptorと結核感染 (シンポジウム) 第80回日本結核病学会、2005.5.12-13、埼玉
20. 竹田潔, 自然免疫シグナルの制御機構 (ワークショップ、招待講演) 第5回日本蛋白質科学会年会、2005.7.1、福岡

21. 竹田潔, Toll-like receptor を介した自然免疫系の制御 (特別講演) 第 45 回日本リンパ網内系学会総会、2005.7.14-15、福岡
22. 竹田潔, 自然免疫系と炎症性腸疾患 (シンポジウム、招待講演) 第 42 回日本消化器免疫学会総会、2005.8.4-5、東京
23. Kiyoshi Takeda: Regulation of innate immune responses against intracellular pathogen infection (Symposium) 第 35 回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
24. 桑田啓貴、竹田潔、Regulation of Toll-like receptor dependent gene induction by nuclear IκB protein IκBNS. 第 35 回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
25. 古賀律子、濱野真二郎、松本真琴、久枝一、審良静男、姫野國介、竹田潔、Involvement of Toll-like receptor-dependent activation of innate immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. 第 35 回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
26. 松本真琴、桑田啓貴、山本雅裕、審良静男、吉開泰信、竹田潔、The role of Toll-like receptor signaling in mycobacterial infection. 第 35 回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜

H. 知的所有権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録出願は現在のところおこなっていない。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

「腸粘膜 M 細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発」

分担研究報告書

M細胞の同定・単離法の確立に関する研究

分担研究者： 清野 宏 東京大学医科学研究所 教授

研究協力者： 寺原 和孝 東京大学医科学研究所 研究員

研究要旨：粘膜実効組織の上皮層に存在する抗原取り込み能を有するM細胞を標的とすることで、従来よりも効果的・効率的なドラッグデリバリーシステムが構築できると考えられる。本研究は、マウスのパイエル板に存在するM細胞に特異的なレクチン *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1)を用いることで、細胞レベルでの解析が可能なM細胞を単離する方法の確立を目指した。マウスのパイエル板上皮層から分散させた細胞群に対し、UEA-1、wheat germ agglutinin (WGA)および抗 CD45 抗体で標識して FACS 解析を行った結果、M細胞と推定される UEA-1⁺WGA⁻CD45⁻細胞は約 5%存在した。この UEA-1⁺WGA⁻CD45⁻細胞におけるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性と peptidoglycan recognition protein-S (PGRP-S)の発現遺伝子量について、上皮細胞画分 (UEA-1⁺CD45⁻)や白血球画分 (CD45⁺)と比較したところ、ALP 活性は上皮細胞画分より有意に低く、また、PGRP-S の mRNA 発現量は上皮細胞画分や白血球画分と比較して有意に高い値を示した。これらの結果から、UEA-1、WGA、抗 CD45 抗体を用いることでM細胞を FACS 上で同定・単離することが可能となった。

A. 研究目的

粘膜面における感染防御の一翼を担う分泌型 IgA の産生・誘導において、パイエル板を代表とする粘膜実効組織での抗原感作が重要であり、その上皮層には抗原取り込み能を有するM細胞が存在する。つまり、粘膜免疫系の誘導・成立における初発細胞としてM細胞が重要な役割を担っているといっても過言ではなく、M細胞を標的とすることで従来よりも効果的・効率的なドラッグデリバリーシステムが構築できると考えられる。しかしながら、M細胞の特異的膜表面分子や免疫生物学的特徴はいまだ不明な点が多く、その理由

としてはM細胞の単離法が確立されていないために、細胞レベルでの解析が現在もなお不可能であることに起因する。そこで本研究は、マウスのパイエル板M細胞に特異性を示すことが知られているレクチン *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1)を用いることによって、細胞レベルでの解析が可能なM細胞を単離する方法の確立を目指した。

B. 研究方法

BALB/c マウスの小腸からパイエル板を切り出し、EDTA による細胞分散法によってパイエル板上皮細胞群を分

散させた。分散させた細胞群に対して、UEA-1 の他、杯細胞に強い反応性を示すレクチン wheat germ agglutinin (WGA)および抗 CD45(白血球系細胞マーカー)抗体を用いて分散細胞群に含まれる各細胞集団を標識し、FACS解析を行った。FACS解析においてM細胞画分と推定された UEA-1⁺WGA⁻CD45⁻細胞画分ならびに、上皮細胞画分(UEA-1⁻CD45⁻)や白血球画分(CD45⁺)を自動セルソーターによって分離・精製し、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性と peptidoglycan recognition protein-S (PGRP-S)の発現遺伝子量を各細胞画分間で比較した。ALP 活性については p-nitrophenylphosphateを添加した際の OD405 の値で評価し、PGRP-S の発現遺伝子量(mRNA 量)については real-time PCR 法に従った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験については東京大学医科学研究所動物実験委員会が定める指針に従って行われた。

C. 研究結果

FACS解析の結果、分散上皮細胞群において UEA-1⁺WGA⁻CD45⁻細胞は約 5%存在することが示された。この UEA-1⁺WGA⁻CD45⁻細胞画分の生化学的特徴に関して、ALP 活性は上皮細胞画分より有意に低く、また、PGRP-S の mRNA 発現量は上皮細胞画分に対して約 10 倍、白血球画分に対して約 5 倍有意に高い値を示した。

D. 考察

マウスのパイエル板上皮層に占めるM細胞の割合は約 10%であることが知られている。FACS解析で示された、分散上皮細胞群に占める推定上のM細胞(UEA-1⁺WGA⁻CD45⁻細胞)の割合(約 5%)は、回収したパイエル板に付随する絨毛由来の上皮細胞の混在を考慮に入れると妥当な数値であると考えられる。M細胞の特徴として、上皮細胞と比較して ALP 活性が低いこと、また、PGRP-S がM細胞の特異的遺伝子マーカーであることが知られている。UEA-1⁺WGA⁻CD45⁻細胞はそれらM細胞の特徴を示したことからも、UEA-1⁺WGA⁻CD45⁻細胞はM細胞であると考えられ、今後は形態学的検証も進めていく。

細胞と比較して ALP 活性が低いこと、また、PGRP-S がM細胞の特異的遺伝子マーカーであることが知られている。UEA-1⁺WGA⁻CD45⁻細胞はそれらM細胞の特徴を示したことからも、UEA-1⁺WGA⁻CD45⁻細胞はM細胞であると考えられ、今後は形態学的検証も進めていく。

E. 結論

本研究は、UEA-1、WGA、抗 CD45 抗体による指標によって細胞レベルでの解析が可能なM細胞単離法を確立することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kweon MN, Yamamoto M, Rennert PD, Park EJ, Lee AY, Chang SY, Hiroi T, Nanno M. and Kiyono H. (2005). Prenatal blockage of lymphotixin beta receptor and TNF receptor p55 signaling cascade resulted in the acceleration of tissue genesis for isolated lymphoid follicles in the large intestine. *J.Immunol.* 174:4365-4372.
2. Kobayashi R, Kohda T, Kataoka K, Ihara H, Kozaki S, Pascual DW, Staats HF, Kiyono H, McGhee JR. and Fujihashi K. (2005). A novel neurotoxic vaccine prevents mucosal botulism. *J.Immunol.* 174:2190-2195.
3. 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. (2005). Colitis in mice lacking the common cytokine receptor gamma chain mediated by IL-6-producing CD4⁺ T cells. *Gastroenterology* 128: 922-934.
4. Nonaka S, Naito T, Chen H, Yamamoto M, Moro K, Kiyono H, Hamada H. and Ishikawa H. (2005). 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.
5. Ohmura M, Yamamoto M, Tomiyama-Miyaji C, Yuki Y, Takeda Y, and Kiyono H. (2005). 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.
 6. Ueta M, Hamuro J, Kiyono H. and Kinoshita S. (2005). Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induces inflammatory cytokines. *Biochem. Biophys.Re.Comm.* 331:285-294.
 7. Hino A, Fukuyama S, Kataoka K, Kweon MN, Fujihashi K. and Kiyono H. (2005). Nasal IL-12p70 DNA prevents and treats intestinal allergic diarrhea. *J.Immunol.* 174:7423-7432.
 8. Takagi H, Hiroi,T, Yang L, Tada Y, Yuki Y, Takamura K, Ishimitsu R, Kawauchi H, Kiyono H. and Takaiwa F. (2005). A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th-2 mediated IgE responses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 29:17525-17530.
 9. Kunisawa J, Fukuyama S. and Kiyono H. (2005). 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.
 10. Kunisawa J. and Kiyono H. (2005). A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation first lines of defense. *Cell Mol. Life Sci.* 62:1308-1321.
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

腸粘膜 M 細胞および腸粘膜免疫担当細胞の基礎的検討

分担研究者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所 教授

研究要旨：腸管粘膜免疫系の分子機構を明らかにするため、自然免疫系による腸管免疫系の制御機構を解析した。特に、自然免疫系の活性制御機構を解析するため、正常マウスと慢性大腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウスの大腸粘膜固有層マクロファージ間で遺伝子発現の差を DNA マイクロアレイで解析した。その結果、I κ B ファミリーに属する I κ BNS が正常大腸粘膜固有層マクロファージに特異的に発現していることを見出した。I κ BNS の生理機能を解析するためノックアウトマウスを作製したところ、I κ BNS ノックアウトマウス由来のマクロファージでは、TLR 刺激により誘導される遺伝子の中で、IL-6 などの NF- κ B 依存性に 3 時間以降に遅れて誘導されてくる遺伝子の発現が有意に上昇していた。また TLR 刺激による NF- κ B の活性が遷延化し、刺激後 3 時間でも NF- κ B の活性が残存していた。さらに、dextran sodium sulfate の経口投与による腸管炎症に対する感受性も極めて高くなっていた。以上の結果から、核に発現する I κ B 分子 I κ BNS が、NF- κ B の活性を抑制することにより自然免疫系の活性を制御し、個体レベルで腸管炎症抑制に関与していることが明らかになった。

A. 研究目的

自然免疫系が、Toll-like receptor (TLR) ファミリーメンバーにより、病原微生物の生体内侵入を感知し、自然免疫系の活性化のみならず抗原特異的な獲得免疫系の活性化をも誘導することが、明らかになってきた。しかし、TLR を介した自然免疫系の活性化は、その制御機構が破綻すると、慢性炎症性腸疾患などの慢性炎症を引き起こすことも明らかになっている。このように、腸粘膜において自然免疫系の重要性がクローズアップされている。通常、腸粘膜 M 細胞の直下で自然免疫系担当細胞が病原微生物をはじめとした外界異物の侵入を感知し免疫応答を繰り広げるものと考えられる。そこで腸粘膜における免疫応答機構を明らかにするため、自然免疫系の活性制御機構に標的を絞り、その分子機構を解析し、腸粘膜 M 細胞を介したドラッグデリバリーシステムの開発に資することを本

研究の目的とする。

B. 研究方法

自然免疫系の活性制御機構を解析するためのモデルとして、自然免疫系の活性制御機構の破綻により慢性大腸炎を発症する、自然免疫系特異的 Stat3 欠損マウス、IL-10 ノックアウトマウスを用いて解析を行った。

正常マウスの大腸の粘膜固有層には少数のマクロファージや樹状細胞が存在している。これらの細胞群の単離法を確立し、高純度のマクロファージや樹状細胞を培養できるようになった。正常マウスの大腸の粘膜固有層由来の細胞は、IL-12 などの炎症性サイトカインを産生しない。一方、慢性腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウスや Stat3 変異マウスの大腸の粘膜固有層では、たとえ慢性腸炎を発症する前の若いマウスでも、マクロファージや樹状細胞の数が極