

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 千葉 勉

平成 19(2007)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	----- 17
清野 宏	
2. ドラッグデリバリー・システムの開発のための 自然免疫機構の解析	----- 22
竹田 潔	
3. ドラッグ・デリバリー材料の改良と開発	----- 27
田畑泰彦	
4. 経口投与された抗原の抗原提示に関わる 樹状細胞の特性について	----- 31
若月芳雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 35

## 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であ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、ヒトへの投与試験を開始した。それを含めて今回以下の成果が得られた。(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、安定した大きさの PL-MS が得られる方法を開発し、直径が  $3.5\mu\text{m}$  の PL-MS が最も効率的に腸粘膜に吸収されることを確認した。これをもとに京都大学附属病院薬剤部でGMPに則してPL-MSを作製するシステムを構築した。(2)IL10発現プラスミドを結合させたカチオン化ゲラチンを開発し、動物実験によって炎症性腸疾患モデルに対してすぐれた抗炎症効果を確認した。(3)またステロイド包埋 PL-MS にプロバイオテイクスである bifidobacterium lognam の菌体成分を同時に包埋することによって、炎症性腸疾患動物モデルにおいてすぐれた抗炎症効果を確認した。(4)絨毛 M 細胞の染色において、パイエル板上と小腸粘膜上の M 細胞は性質が異なること、さらに特に小腸絨毛上 M 細胞の分布は腸管の部位によって異なることが明らかとなった。さらにパイエル板と小腸絨毛の M 細胞の遺伝子発現を比較することによって、PP 上の M 細胞に特異的に発現する遺伝子として PGRP-S, Sgna-1, annexin V を同定した。(5)現在までに十分なインフォームドコンセントを得た後、ヒトへのステロイド包埋 PL-MS 投与を 4 例の潰瘍性大腸炎患者に対しておこなった。その結果 4 週間投与にて炎症は全例で改善傾向を示し、CAI スコアは著明に改善した。また投与期間中、投与後も特に副作用は認めなかった。以上よりステロイド包埋 PL-MS は炎症性腸疾患および GVHD 患者に対する、より効果的で副作用の少ない治療薬となりうるものと考えられた。

### [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手術が普及し、その結果代表的な拒絶反応のひとつである Graft vs Host Disease (GVHD)が増加してきているが、その主要な臓器は腸管である。一方近年わが国では炎症性腸疾患が著増しつつある。これ

らの腸疾患の薬物治療の中心はステロイドをはじめとする免疫抑制薬であるが、これらは全身的に投与すると様々な重篤な副作用を生じることが知られている。したがって腸粘膜の炎症部に特異的に薬物を集積させるドラッグデリバリー・システム(DDS)の開発が必要である。

一方腸粘膜 M 細胞は細菌などの腸内抗原を消化することなく取り込み、腸粘膜リンパ装置の免疫担当細胞に送り込む細胞である。私たちは M 細胞が特定の大きさの粒子を取り込むことに注目し、PL-MS を用いた腸粘膜に対する DDS を考案した。そして消化管に投与した PL-MS が M 細胞に特異的に取り込まれた後、腸粘膜リンパ装置に特異的に分布すること、さらに PL-MS によって投与された薬剤が血中には流出しないことを示した。

以上より本研究では、免疫抑制剤などの薬物を PL-MS に包埋して、M 細胞を介して腸粘膜に特異的に投与し、その薬剤の効果を高めるとともに、全身の副作用を軽減する試みをおこなう。そして具体的な最終目標として、ヒトへの投与をおこなうことを目的とした。

## B. 研究方法

(1) PL-MS の材型の改良:PVA の重合度ならびに PLGA の溶解濃度を変化させることによって、PVA の重合度、さらには PL-MS サイズにおよぼす影響を検討する。さらに

様々な工夫をおこなうことによって安定した PL-MS が得られるよう工夫をおこなった。

その結果えられた様々なサイズの PL-MS にクマリン標識をおこなうマウスへ経口投与してその取り込み効率を検討した。さらにその際のクマリン標識 PL-MS の各臓器への分布を検討した。さらに取り込まれたクマリン標識 PL-MS の組織への停滞時間についても検討した(田畑)。

(2) 一方本 PL-MS を臨床応用するために、large scale で PL-MS を効率的、かつ画一的に安定して作成する方法を検討した(田畑)。

(3) ステロイド含有 PL-MS の効果をより高めるために、IL10 発現プラスミドを結合させたカチオン化ゲラチンを作製し、これを上記のステロイド包埋 PL-MS とともに DSS 腸炎、TNBS 腸炎マウスに投与させて、その抗炎症効果を検討した(千葉、若月)。

(4) ステロイド含有 PL-MS の効果をより高めるために、プロバイオティクス製剤である bifidobacterium lognam の菌体成分を同時に包埋して DSS 腸炎、TNBS 腸炎マウスに投与し、その抗炎症効果をステロイド単独の PL-MS と比較した(千葉、若月)。

- (5) 腸管の M 細胞の性状、分布、役割などを検討するために、M 細胞を特異的に染色する UEA-1 レクチンを用いて M 細胞を染色すると同時に上皮細胞を分離して FACS 解析をおこない、様々な検討をおこなった。その際コレラ毒素を経口投与することによって M 細胞の数を増加させても検討をおこなった。さらにパイエル板上の M 細胞と小腸絨毛上皮の M 細胞を別々に採取して、通常の上皮細胞との間で DNA アレイをおこない、それぞれの M 細胞に特異的な物質の同定を試みた(清野)。
- (6) 腸管特異的に発現している Toll-like receptor (TLR)の活性化制御機構を検討した(竹田)。
- (7) 潰瘍性大腸炎患者に対してデキサメサゾン含有 PL-MS 投与をおこない、その効果を検討した(千葉)。

### C. 研究結果

- (1) PL-MS の材型の改良:PVA の重合度ならびに PLGA の溶解濃度を変化させたところ、PVA の重合度が大きくなるとともに得られた PL-MS サイズが増加することが明らかとなった。さらに様々な工夫をおこなうことによって表面が平滑で安定した PL-MS が得られるように

なった。これを用いてクマリン標識 PL-MS をマウスへ経口投与してその取り込みを検討したところ、その直径が  $3.5 \mu\text{m}$  の場合もとても効率よく腸管粘膜に取り込まれることが明らかとなった。さらに粒子サイズが  $3-3.5 \mu\text{m}$  の微粒子のみが脾臓で確認された。さらに平均粒子径が  $5 \mu\text{m}$  以上になるとその腸管粘膜への取り込みは低下するが、逆に長く腸管粘膜にとどまることが確認された(田畑)。

- (2) 一方 large scale で PL-MS を作製した場合、微粒子作成過程で形成されるエマルジョンのサイズを小さくする必要がある。そこでそれぞれのエマルジョンを形成させる条件を変化させて得られた微粒子の粒子径を評価したところ、超音波照射時間 240 秒、ホモジナイザー処理時間 90 秒の場合、平均粒子径が  $5 \mu\text{m}$  程度の粒子を得ることができた。このようにして条件を検討した結果、平均  $3-5 \mu\text{m}$  の PL-MS を薬剤部において GMP にのっとり、large scale で作製をおこなうことが可能となった(田畑)。
- (3) IL10 発現プラスミドを結合させたカチオン化ゲラチンを作製した。これを上記のステロイド包埋 PL-MS とともに DSS 腸炎、TNBS 腸炎マウスに投与させることによって、

PL-MS 単独投与群に比較してよりすぐれた抗炎症作用を確認した(千葉、若月)。

- (4) ステロイド包埋 PL-MS に同時にプロバイオテイクス製剤である bifidobacterium lognam の菌体成分を同時に包埋して DSS 腸炎、TNBS 腸炎マウスに投与したところ、ステロイド単独に比較してより強い抗炎症効果が得られた。またその際 bifidobacterium lognam の投与量としては 500 万個・kg 体重ぐらいがもっとも効果的であった(千葉、若月)。
- (5) M 細胞を特異的に染色する UEA-1 レクチンを用いて M 細胞を染色すると同時に上皮細胞を分離して FACS 解析をおこなった。その結果十二指腸、空腸上皮においてパイエル板上の M 細胞は 7% の比率で存在した。一方絨毛上の M 細胞は回腸上皮には高頻度で存在したが、十二指腸、空腸には存在しなかった。興味深いことにコレラ毒素を経口投与すると十二指腸、空腸にも M 細胞が出現した(清野)。
- (6) マウスからパイエル板 M 細胞、およびマウスにコレラ毒素を投与して M 細胞数を増加させた後絨毛上皮の M 細胞を採取して RNA を採取し、DNA アレイをおこない、

パイエル板上の M 細胞に特異的に発現している遺伝子として PGRP-S, Sgna-1, annexin V を同定した。さらに遺伝子プロファイリングからパイエル板 M 細胞、絨毛上皮 M 細胞においてそれぞれ 17922, 14468 個の発現プローブが同定された(清野)。

- (7) 腸管特異的に発現している Toll-like receptor (TLR) の活性化制御機構を検討した。その結果上皮細胞の TLR を介した NFκB 依存性の遺伝子発現には早期誘導型遺伝子と後期誘導型遺伝子が存在し、特に後期誘導型遺伝子の発現が核に発現する IκB 分子 IκBNS が抑制することが見出された。これら後期誘導型遺伝子はアジュバントの作用を伝達する重要な役割をになっているが、今後こうした遺伝子に影響をおよぼすアジュバントを開発することによって、新しい薬剤を開発できる可能性が示された(竹田)。
- (8) 潰瘍性大腸炎患者 4 例に対してデキサメサゾン含有 PL-MS 投与をおこない、全例で優れた効果が確認された。すなわち 5ASA 製剤および経口ステロイド剤にて緩解が得られていない、中等症以上の患者(CAI スコア 4 点以上)を対象として、現行の薬剤は変更せずに、

デキサメサゾン含有 PL-MS (10  $\mu$ g/mg PL-MS/kg bw) 一日一回の注腸投与を 8 週間おこなった。そして PL-MS 投与前後において、炎症の変化を CAI スコアを用いて検討した。患者は 26 歳男性、42 歳男性、38 歳女性、48 歳女性で、CAI スコアはそれぞれ 8 から 3、10 から 6、15 から 10、9 から 4 へと改善し、したがって平均 10.5 から 5.8 と有意に低下した。

#### D. 考察

今回の研究ではまず従来のステロイド含有 PL-MS の効果をより高めることを目的として、IL10 プラスミドおよびプロバイオテイクス製剤の同時投与を動物実験によって試みた。その結果、ゲラチン結合 IL10 プラスミド同時投与、プロバイオテイクス製剤である *Bifidobacterium lognam* の菌体成分のステロイド PL-MS との同時投与は、DSS 腸炎モデル、TNBS 腸炎モデルの双方において、ステロイド PL-MS 単独投与よりもより強い抗炎症効果を発揮した。以上より今後ステロイド包埋 PL-MS とこれらの同時投与の可能性について追及する必要があると考えられた。

一方、今回ヒトへの投与を具体化するために、PL-MS 製剤の改良の試みをおこなうと同時に、病院の薬剤部

での large scale での安定した製剤供給の試みをおこなった。その結果 PVA の重合度ならびに PLGA の溶解濃度を変化させることによって、PVA の重合度が大きくなるにつれて得られた PL-MS サイズが増加することが明らかとなった。さらに様々な工夫をおこなうことによって表面が平滑で安定した PL-MS が得られるようになった。そしてこれを用いてクマリン標識 PL-MS をマウスへ経口投与してその取り込みを検討したところ、その直径が 3.5  $\mu$ m の場合もとても効率よく腸管粘膜に取り込まれること、さらに直径 3–3.5  $\mu$ m の微粒子は脾臓など全身のリンパ臓器に移送されるのに対して、5  $\mu$ m 以上になるとその腸管粘膜への取り込みは低下するが、逆に長く腸管粘膜にとどまることが確認された。以上より作製方法の工夫によってその粒子サイズを変化させることにより、今後より腸管への取り込み効率の高い、かつ腸管に長く停滞する PL-MS の開発が可能となるものと期待された。

一方 large scale で PL-MS を作製する場合、微粒子作成過程で形成されるエマルジョンのサイズを小さくする必要がある。そこでそれぞれのエマルジョンを形成させる条件を変化させて得られた微粒子の粒子径を評価したところ、超音波照射時間、ホモジナイザー処理時間を変化させることによってそ

の種々の粒子径の PL-MS を得ることができた。このようにして薬剤部において GMP にのっとり、large scale で PL-MS を安定して作製供給することが可能となった。

そこで本デキサメサゾン PL-MS を 4 例の潰瘍性大腸炎患者に投与したところ、4 例とも本剤投与によって著明な臨床症状の改善をみた。

今回の研究では上記のヒトへの投与と同時に、腸管 M 細胞の基礎的検討もおこなった。その結果、M 細胞はパイエル板のみならず、小腸上皮にも分布することが明らかとなった。しかし M 細胞は十二指腸、空腸には存在せず、回腸にのみ存在することが判明した。しかしながら興味深いことに、コレラ毒素を経口投与したところ空腸においても M 細胞の発現が見られるようになった。このように M 細胞の数が cyclic AMP 依存性に増加する可能性があることから、M 細胞を標的とした DDS を考える際、同時に M 細胞を増加させる工夫をおこなうことも今後の検討課題と考えられた。さらに今回小腸上皮 M 細胞とパイエル板上の M 細胞を分離して採取する試みをおこない、これらの M 細胞を用いてそれぞれに特異的に発現している遺伝子の解析をこころみた。今後これらの方法を発展させることによって、それぞれの M 細胞の特徴を明らかにできる可

能性があると同時に、薬剤のデリバリーのターゲットとしていずれの M 細胞がより対象となるのか、またそれぞれの M 細胞に別々にターゲットするためにはどのようにすればよいのか、などと言った点まで追求できるものと考えられた。

## E. 結論

- 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、安定した大きさの PL-MS が得られる方法を開発し、直径が  $3.5 \mu\text{m}$  の PL-MS が最も効率的に腸粘膜に吸収されることを確認した。これをもとに京都大学付属病院薬剤部で GMP に則して large scale で PL-MS を作製するシステムを構築した。
- 2) IL10 発現プラスミドを結合させたカチオン化ゲラチンを開発し、動物実験によって炎症性腸疾患モデルに対してすぐれた抗炎症効果を確認した。
- 3) ステロイド包埋 PL-MS に bifidobacterium lognam 菌体成分を同時に包埋することによって、炎症性腸疾患動物モデルにおいてすぐれた抗炎症効果を確認した。
- 4) 絨毛 M 細胞の染色において、パイエル板上と小腸粘膜上の M 細胞の性質が異なること、さらに特に小腸絨毛上 M 細胞は回腸にのみ存在することが明らかとなった。またパイエル板と



小腸絨毛の M 細胞の遺伝子発現を比較することによって、PP 上の M 細胞に特異的に発現する遺伝子として PGRP-S, Sgna-1, annexin V を同定した。

- 5) ステロイド包埋 PL-MS 投与を 4 例の潰瘍性大腸炎患者に対しておこなった。その結果 4 週間投与にて炎症は全例で改善傾向を示し、CAI スコアは著明に改善した。また投与期間中、投与後も特に副作用は認めなかった。
- 6) 以上よりステロイド包埋 PL-MS は炎症性腸疾患および GVHD 患者に対する効果的で副作用の少ない治療薬となりうるものと考えられた。

## 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. 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.
2. Kou T, Nakase H, Tamaki H, Kudo T, Nishio A, Chiba T: Cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis diagnosed by quantitative real-time PCR analysis. *Dig Dis Sci* 51:1052-1055:2006.
3. Tamaki H, Nakamura H, Nishio A, Nakase H, Ueno S, Uza N, Kido M, Inoue S, Mikami S, Asada M, Kiriya K, Kitamura H, Ohashi S, Fukui T, Kawasaki K, Matsuura M, Ishii Y, Okazaki K, Yodoi J, Chiba T: Human Thioredoxin-1 Ameliorates Experimental Murine Colitis in Association with Suppressed MIF Production. *Gastroenterology* 131:1110-1121:2006.
4. Uza N, Nakase H, Kuwabara H, Fujii S, Chiba T: Cecal cancer associated with long-standing Crohn's disease. *Lancet* 368(9549):1842:2006.
5. Nakase H, Yoshino T, Ueno S, Mikami S, Matsuura M, Chiba T: Importance of early detection of cytomegalovirus infection in refractory inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007(in press)
6. Inoue S, Nakase H, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Kitamura H, Mikami S, Tamaki H, Kasahara K, Chiba T: Open label trial of Clarithromycin therapy in Japanese

- patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 (in press)
7. Nakase H, Mikami S, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Inoue S, Kitamura H, Kasahara K, Yoshino T, Takeda Y, Chiba T: Rescue therapy with Tacrolimus for a patient with severe ulcerative colitis refractory to combination leukocytapheresis and high-dose of corticosteroid therapy. *Int Med* 2007 (in press).
  8. 藤井茂彦、武川賢一郎、吉武直人、千葉 勉、藤盛孝博:潰瘍性大腸炎に合併する大腸腫瘍。『新しい診断と治療のABC35/消化器 5 大腸腺腫・大腸癌』pp63-70, 2006.
  9. 井上聡子、仲瀬裕志、西尾彰功、千葉 勉: Crohn 病におけるクラリスロマイシン治療の有効性の検討。 *The Japanese Journal of Antibiotics* 59: Supl A69-71:2006.
  10. 仲瀬裕志、千葉 勉:潰瘍性大腸炎・クローン病の薬物療法(免疫抑制剤)。 *モダンフィジシャン* 26(9): 1471-1476:2006.
  11. 仲瀬裕志、千葉 勉:生体内分解吸収性マイクロスフェアの開発～難治性炎症性腸疾患治療に役立つDDS～。 *バイオテクノロジージャーナル(BIO)* 6(5):571-573:2006.
  12. 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.* 2007. (in press)
  13. Kunisawa J, Takahashi I, and Kiyono H. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol. Rev.* 2007. (in press)
  14. 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* 2007. (in press)
  15. Kim N, Knisawa J, Kweon MN, Eog Ji G, and Kiyono H. Oral feeding of *Bifidobacterium bifidum* (BGN4) prevents CD4<sup>+</sup> CD45RB (high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. *Clin.Immunol.* 2007. (in press)
  16. 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.
17. Nochi T, and Kiyono H. Innate immunity in the mucosal immune system. *Curr Pharm Des.* 12 : 4203-4213. 2006.
  18. 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.
  19. 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.
  20. Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Ebisuno Y, Tang BG, Seoh JY, Lipp M, Kiyono H, Miyasaka M. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* 176 : 803-810. 2006.
  21. 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)
  22. 吉田理人、五十嵐脩、寺原和孝、清野 宏. 絨毛 M 細胞の形態と機能. *臨床免疫.* 45:236-242. 2006.
  23. 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.
  24. Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., Yamamoto, M., Akira, S., Himeno, K., Matsumoto, M., and Takeda, K.: TLR-dependent induction of IFN- $\beta$  mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177, 7059-7066 (2006).
  25. Nemoto, Y., Kanai, T., Makita, S., Okamoto, R., Totsuka, T., Takeda, K., and Watanabe, M.: Bone marrow retaining colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* in press
  26. Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K. J.,

- Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., and Akira, S.: Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7, 962-970 (2006).
27. Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., and Akira, S.: Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 7, 868 - 874 (2006).
28. Yoshimatsu, T., Kawaguchi, D., Oishi, K., Takeda, K., Akira, S., Masuyama, N., and Gotoh, Y.: Non-cell-autonomous action of STAT3 in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex. *Development* 33, 2553-2563 (2006).
29. Miyatsuka, T., Kaneto, H., Shiraiwa, T., Matsuoka, T. A., Yamamoto, K., Kato, K., Nakamura, Y., Akira, S., Takeda, K., Kajimoto, Y., Yamasaki, Y., Sandgren, E. P., Kawaguchi, Y., Wright, C. V., and Fujitani, Y.: Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation. *Genes Dev.* 20, 1435-1440 (2006).
30. Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D. V., Suzuki, K., Ishii, M., Terai, K., Moriya, M., Nakatsuji, Y., Sakoda, S., Sato, S., Akira, S., Takeda, K., Inui, M., Takai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Kumanogoh, A., and Kikutani, H.: Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 8, 615-622 (2006).
31. Nakamura, K., Miyagi, K., Koguchi, Y., Kinjo, Y., Uezu, K., Kinjo, T., Akamine, M., Fujita, J., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Adachi, Y., Ohno, N., Takeda, K., Akira, S., Miyazato, A., Kaku, M. and Kawakami, K.: Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47, 148-154 (2006).
32. Yu, Q., Tang, C., Xun, S., Yajima, T., Takeda, K. and Yoshikai, Y.: MyD88-dependent signaling for IL-15 production is important for the development of CD8a and TCRgd intestinal intraepithelial T

- lymphocytes. *J. Immunol.* 176, 6180-6185 (2006).
33. Inoue, H., Ogawa, W., Asakawa, A., Okamoto Y., Nishizawa, A., Matsumoto, M., Teshigawara, K., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Notohara, K., Katayose, K., Okamura, H., Kahn, C. R., Noda, T., Takeda, K., Akira, S., Inui, A. and Kasuga, M.: Role of hepatic STAT3 in brain insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab.* 3, 267-75 (2006).
34. Kinoshita, D., Hirota, F., Kaisho, T., Kasai, M., Izumi, K., Bando, Y., Mouri, Y., Matsushima, A., Niki, S., Han, H., Oshikawa, K., Kuroda, N., Maegawa, M., Irahara, M., Takeda, K., Akira, S. and Matsumoto, M.: Essential role of I $\kappa$ B kinase a in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J. Immunol.* 176, 3995-4002 (2006).
35. Santos, L. L., Milenkovski, G. P., Hall, P. H., Leech, M., Sharma, L., Takeda, K., Akira, S., Kitching, A. R., and Morand, E. F.: IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. *Immunol. Cell Biol.* 84, 166-173 (2006).
36. Owaki, T., Asakawa, M., Kamiya, S., Takeda, K., Fukai, F., Mizuguchi, J. and Yoshimoto, T.: IL-27 suppresses CD28-mediated IL-2 production through Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J. Immunol.* 176, 2773-2780 (2006).
37. Yasukawa T, Ogura Y, Kimura H, Sakurai E, and Tabata Y: Drug delivery from ocular implants. *Expert Opinion Drug Delivery*, 3(2), 261-273 (2006).
2. 学会発表
1. 玉置敬之、仲瀬裕志、千葉 勉: Thioredoxin-1 の IBD への関与と Dextran sodium sulfate 腸炎抑制効果の検討: 第 92 回日本消化器病学会総会・シンポジウム, 2006.4.20.
2. 上野 哲、仲瀬裕志、千葉 勉: 免疫抑制剤治療によるクローン病患者の脂質摂取量及び栄養状態の改善: 第 92 回日本消化器病学会総会・シンポジウム, 2006.4.20.
3. 井上聡子、仲瀬裕志、千葉 勉: Bifidobacterium longum (BB-536) の潰瘍性大腸炎に対する治療効果と機序の解明: 第 92 回日本消化器病学会総会・シンポジウム, 2006.4.20.
4. 北村 浩、仲瀬裕志、千葉 勉: 慢性腸管炎症に伴う線維化における

- Hsp47 は治療標的分子になりうるか: 第 92 回日本消化器病学会総会・ワークショップ, 2006.4.20.
5. Minoru Matsuura, Hiroshi Nakase, Satohiro Masuda, Masanori Asada, Satoru Ueno, Hiroshi Kitamura, Satoko Inoue, Norimitsu Uza, Katsuhiko Kasahara, Yasuhiko Tabata, Ken-Ichi Inui, Tsutomu Chiba: Basic Fibroblast Growth Factor-Induced Multidrug Resistance 1 Expression Plays An Important Role in the Protective Effect On Intestinal Epithelial Injury: Digestive Disease Week and the 107th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute. oral sessions, 2006.5.20.
6. Sakae Mikami, Hiroshi Nakase, Takashi Nagasawa, Tsutomu Chiba: Critical Role of CXCL12-CXCR4 Interaction in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Digestive Disease Week and the 107th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute, 2006.5.20.
7. Hiroshi Nakase, Hiroyuki Tamaki, Minoru Matsuura, Satoko Inoue, Mitsunori Uza, Satoru Ueno, Hiroshi Kitamura, Katsuhiko Kasahara, Tsutomu Chiba: Maintenance Therapy with Tacrolimus in Patients with Crohn's Disease Refractory to Azathiopurine: 2 Years Trial: Digestive Disease Week and the 107th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute, 2006.5.20.
8. 三上 栄、仲瀬裕志、笠原勝宏、宇座徳光、上野 哲、井上聡子、北村 浩、松浦 稔、千葉 勉: 炎症性腸疾患の病態におけるCXCL12 /CXCR4系の役割: 第43回日本消化器免疫学会総会, 2006.8.3.
9. Mikami S, Nakase H, Nagasawa T, Chiba T: Critical Role of CXCL12-CXCR4 Interaction in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease (poster session):

- Japan-Korea IBD Symposium,  
2006.9.23.
10. 宇座徳光、仲瀬裕志、千葉 勉:  
SP-PSOX/CXCL16 制御による炎症性腸疾患に対する新規治療開発: 第 48 回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 2006.10.13.
  11. 井上聡子、仲瀬裕志、千葉 勉:  
Bifidobacterium longum (BB-536) の潰瘍性大腸炎に対する治療効果と腸管上皮バリア機能に対する影響: 第 48 回日本消化器病学会大会・パネルディスカッション, 2006.10.12.
  12. 仲瀬裕志、松浦 稔、千葉 勉:  
難治性クローン病に対する Tacrolimus を用いた緩解維持効果の検討: 第 48 回日本消化器病学会大会・ワークショップ, 2006.10.12.
  13. Kiyono H. 粘膜ワクチン開発へ向けて:新しい展開. The 79th Annual meeting of Japanese Society for Bacteriology. Kanazawa. Japan. March 2006.
  14. Kiyono H. 粘膜免疫を応用した感染症ワクチン開発戦略. The 80<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Association for Infectious Diseases. Tokyo. April 2006.
  15. Kurashima Y, Kunisawa J, Gohda M, Higuchi M, Shimizu M, and Kiyono H. . Different roles of sphingosine 1-phosphate in the regulation of mobility of mast cells and eosinophilis in peritoneal and intestinal compartments. Immunology 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 12<sup>th</sup>. 2006.
  16. Kiyono H. M cell targeted mucosal vaccine. Immunology 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 13<sup>th</sup>. 2006.
  17. Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda M, Shimizu M, and Kiyono H. Sphingosine-1-phosphate-mediated regulatory T cell trafficking in the large intestinal epithelium. Immunology 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 13<sup>th</sup>. 2006.
  18. Takayama N, Igarashi O, Kweon MN, and Kiyono H. Peyer's patch NKT and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell mediated mucosal regulatory network for the control of intestinal allergy. Immunology 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists.

- Massachusetts, USA. May 13<sup>th</sup>.  
2006.
19. Gohda M, Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Shimizu M, and Kiyono H. Regulation of peritoneal B cell mobility to intestine and subsequent production of the intestinal IgA by phingosine -1- phosphate  
Immunology 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14<sup>th</sup>. 2006.
  20. Terahara K, Igarashi O, Gotoh Y, Nochi T, Yuki Y, Hiroi T, Kiyono H. Induction of villous M-cells by intestinal environmental factors.  
Immunology 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14<sup>th</sup>. 2006.
  21. Yuki Y, Takagi H, Nochi T, Yang L, Hiroi T, Takaiwa F, and Kiyono H. Development of a rice-based oral vaccine. Immunology 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14<sup>th</sup>. 2006.
  22. Terahara K, Igarashi O, Yoshida Y, Nochi T, Goto G, Taguchi F, Beauchemin N, and Kiyono H. Novel CEACAM 1 splice variants expressed by murine small intestinal epithelium. The 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress. Kyoto, Japan. Jun 17<sup>th</sup>. 2006.
  23. Kiyono H. Mucosal decision for immunity, tolerance and infection. 2<sup>nd</sup> the Biomolecule Secretion Research Symposium. Seoul. Korea. October 2006.
  24. Kiyono H. 粘膜免疫:免疫とアレルギーの接点. The 43th Annual meeting of Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical immunology. Chiba. November 2006.
  25. Kiyono H. Mucosal antigen uptake network : A key for the development of mucosal vaccine. US-Japan Cooperative Medical science Program, 19<sup>th</sup> Joint Meeting of the AIDS Panels. Kagoshima. December 2006.
  26. 國澤純、倉島洋介、樋口森生、合田昌史、清野宏. Sphingosine 1-phosphate receptor differently regulates naïve and activated intraepithelial T lymphocytes. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.
  27. 高山尚子、五十嵐脩、権美那、清野宏. Role of NKT cells for the formation of a mucosal regulatory



- network in the control of intestinal allergy. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.
28. 樋口森生、國澤純、倉島洋介、合田昌史、清野宏. Cytokine regulation of epithelial cell-mediated innate and acquired phases of antigen presentation. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.
29. 野地智法、幸義和、依田昌樹、魚住明央、寺原和孝、金銅瑩、福山聡、五十嵐脩、清野宏. Immunological and biochemical characterization of M-cell by newly established monoclonal antibody. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.
30. 魚住明央、野地智法、依田昌樹、幸義和、五十嵐脩、柴田宏昭、清野宏. Identification and characterization of non-human primate M-cells. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.
31. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. Awaji Forum, 2006.9.3-6, Hyogo, Japan
32. Kiyoshi Takeda, Innate immune responses against mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program, 41<sup>st</sup> Tuberculosis and leprosy research conference, 2006.7.19-21, Kagoshima, Japan
33. Kiyoshi Takeda, Role of TLR in innate and acquired phase of IBD. 2006 SMI Annual Meeting, 2006.6.1, San Francisco, USA
34. Kiyoshi Takeda, Nuclear IκB protein-mediated regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa (symposium), 第36回日本免疫学会学術集会, 2006.12.11-13、大阪
35. 香山尚子、竹田潔, Epigenetic regulation of Toll-like receptor-dependent gene expression. 第36回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪
36. 財賀大行、竹田潔, Lipocalin 2 mediates anti-mycobacterial immune responses. 第36回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪
37. 古賀律子、竹田潔, IFN-beta-dependent innate immune response against *Trypanosoma cruzi*, 第36回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪
38. 竹田潔, 自然免疫系によるトリパノソーマ原虫の感染制御機構, 第

- 59 回日本寄生虫学会、2006. 10. 28、福岡
39. 竹田潔，自然免疫系の活性制御機構（シンポジウム），第 2 回食品免疫学会、2006. 10. 23、東京
40. 竹田潔，自然免疫系の活性制御機構（特別講演），第 43 回補体シンポジウム、2006. 8. 19、福岡
41. 竹田潔，粘膜免疫の今後の展望（イブニングセミナー），第 43 回日本消化器免疫学会総会、2006. 8. 3-4、青森
42. 竹田潔，自然免疫系による炎症制御，日本動脈硬化学会、2006. 7. 13-14、東京
43. 竹田潔，I 型 IFN による細胞内寄生性原虫の感染防御機構，第 71 回インターフェロンサイトカイン学会、2006. 7. 7-8、兵庫
44. 若月芳雄、勝倉浩昭、渡辺智裕、家森正志、森本正和、千葉 勉：肝臓の免疫調節性 CD4T の誘導における自然免疫のはたす役割．第 43 回日本消化器免疫学会、シンポジウム 2007.8. 3 弘前

#### 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。M細胞はパイエル板などの誘導組織の上皮層に存在するタイプ(パイエル板M細胞)と実効組織である絨毛上皮層に散在するタイプ(絨毛 M 細胞)に分類されるものの、両者 M 細胞の免疫生物学的異同は不明であり、両者を区別して単離する方法も確立されていない。パイエル板 M 細胞は十二指腸から回腸に至る全てのパイエル板上皮層に存在する一方で、絨毛 M 細胞は十二指腸・空腸絨毛上皮層にはほとんど存在しないことが明らかとなり、十二指腸・空腸由来のパイエル板を用いることで純度の高いパイエル板 M 細胞の精製が可能となった。また、腸内環境を変化させることで十二指腸・空腸絨毛上皮層においても絨毛 M 細胞が誘導されることが明らかとなった。発現遺伝子の観点から、単離された細胞画分の検証を DNA マイクロアレイ法により行い、パイエル板 M 細胞特異的遺伝子として既知の PGRP-S、Sgnc-1、annexin V の発現はパイエル板 M 細胞画分においてのみ認められ、絨毛 M 細胞画分、上皮細胞画分では認められなかった。

### 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誘導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。さらに当研究グループでは粘膜実効組織である小腸絨毛上皮層においてもM細胞(絨毛M細胞)が存在し、それを介した抗原取り込みがIgGを主体とする全身免疫系の惹起に関与することを示してきた。つまり、粘膜・全身免疫系の誘導・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、パイエル板ならびに絨毛に存在する両者M細胞の免疫生物学的異同はいまだ不明な点が多く、また、両者を区別して単離する方法も確立されていない。

当研究グループでは、マウス小腸M細胞に反応性を示すことが知られているレクチン *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1)を用いて標識したパイエル板M細胞をFACSソーターによって単離

する方法を確立した。UEA-1 は杯細胞にも反応性を示すことから、M 細胞に対する特異的マーカーとしては不十分であるものの、Wheat germ agglutinin (WGA) と併用することにより MS 細胞を上皮細胞・胚細胞から識別し単離できる。

## B. 研究方法

(マウス)

6-8 週齢の BALB/c マウスを用いた。

(コレラトキシン投与)

PBS に懸濁させたコレラトキシン (20 $\mu$ g) を、絶食・胃酸中和させたマウスに経口投与した。

(組織学的解析)

4%パラホルムアルデヒド-PBS にて固定した小腸に対して、蛍光標識した UEA-1 のほか、上皮細胞と杯細胞に反応性を示すレクチン wheat germ agglutinin (WGA) を反応させ、ホールマウントによる共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。

(FACS による細胞単離)

パイエル板ならびに小腸絨毛上皮層から 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 UEA-1、WGA、CD45 (白血球系細胞マーカー) 抗体を用いて標識した。FACS 解析において M 細胞画分 (UEA-1<sup>+</sup>, WGA<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>)、上皮細胞画分 (UEA-1<sup>-</sup>, WGA<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>) を FACS ソーターによって分離・精製した。

(包括的発現遺伝子解析)

単離された細胞画分について、45101 個のプローブセットを含む DNA マイクロアレイ (GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array, Affymetrix) を用いて包括的発現遺伝子のプロファイリングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験については国立大学法人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

### C-1. 小腸におけるパイエル板 M 細胞、絨毛 M 細胞の頻度

組織学的観察ならびに FACS 解析の結果、正常 BALB/c マウスの十二指腸・空腸上皮層において、パイエル板 M 細胞は約 7% の比率で認められた。絨毛 M 細胞は回腸上皮層に高頻度に存在するものの (約 60%)、十二指腸・空腸上皮層においてはほとんど認められなかった (約 1%)。興味深いことに、コレラトキシンを経口投与した場合、少なくとも 2 日後で、十二指腸・空腸上皮層における絨毛 M 細胞の有意な頻度を認めた (約 50%)。

### C-2. パイエル板 M 細胞、絨毛 M 細胞、上皮細胞における発現遺伝子プロファイリング

パイエル板 M 細胞細胞、上皮細胞については正常マウスの十二指腸・空腸から、絨毛 M 細胞についてはコレラトキシン投与 2 日後のマウスの十二指腸・空腸から調製した。それら各細胞画分の包括的発現遺伝子プロファイリングを行った結果、パイエル板 M 細胞細胞、絨毛 M 細胞、上皮細胞において、それぞれ 17922、14468、15636 個の発現プローブが同定された。パイエル板 M 細胞特異的遺伝子として既に報告されている PGRP-S、Sgne-1、annexin V の発現を調べた結果、これら全ての遺伝子の発現が認められたのはパイエル板 M 細胞画分のみであった。

## D. 考察

十二指腸・空腸上皮層には絨毛 M 細胞がほとんど存在しないことが示唆された。すなわち、回収するパイエル板に付随する絨毛の混在を考慮した場合、十二指腸・空腸由来のパイエル